

Aus dem Institut für Molekulare Immunologie, Helmholtz Zentrum München

Kommissarische Leitung: Prof. Dr. med. Ralph Mocikat

Verteilung und zytotoxische Qualität von T-Zellen und natürlichen Killerzellen im klarzelligen Nierenzellkarzinom

Gefäßsystem-bezogene Lokalisation und Ausstattung mit Perforin
beeinflussen Metastasierung und Tumor-spezifisches Überleben

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Ilias Masouris

aus Athen

im Jahr 2016

**Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Elfriede Nößner

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Med. David Horst

Prof. Dr. Med. Michael Fischerder

Prof. Dr. Med. Stefan Endres

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 28.01.2016

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Immunsystem	1
1.1.1 T-Zellen	2
1.1.2 NK-Zellen	4
1.1.3 Zytotoxische Funktion von ZTL und NK-Zellen	7
1.2 Zytokine und Chemokine.....	8
1.2.1 Zytokine	8
1.2.1.1 Interferone	9
1.2.1.2 Interleukine	9
1.2.2 Chemokine.....	10
1.3 Das Nierenzellkarzinom.....	11
1.4 Immuninfiltrat im Tumor.....	14
1.4.1. Rolle des Immunzellinfiltrats als prognostischer Marker in der Onkologie	17
1.5. Immunzellinfiltrat im Nierenzellkarzinom.....	20
2. Zielsetzung der Arbeit	21
3. Material	23
3.1 Geräte und Verbrauchsmaterial.....	23
3.2 Chemikalien und fertige Lösungen	24
3.3 Lösungen und Puffer	26
3.4 Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbungen	27
3.4.1 Primäre Antikörper.....	27
3.4.2 Sekundäre Antikörper für die Immunfluoreszenzhistologie	27
3.5 Antikörper für die Immunhistochemie.....	28
3.5.1 Primäre Antikörper.....	28
3.5.2 Sekundäre Antikörper für die Immunhistochemie.....	28
3.6 Zelllinien	28
3.7 Medien	29
3.8 Software	30
3.9 Kits	30
3.10 Patientenmaterial.....	30
4. Methoden.....	32
4.1 Arbeiten mit Gewebe	32
4.1.1 Immunhistochemie.....	32

4.1.1.1 Prinzip	32
4.1.1.2 Gewebefärbung mit der APAAP-Methode	32
4.1.1.3 Gewebefärbung mit der ImmPRESS-(Peroxidase-Anti-Peroxidase)-Methode.....	33
4.1.1.4 Mikroskopische Analyse	34
4.1.2 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	34
4.1.2.1 Prinzip	34
4.1.2.2 Gewebefärbung.....	35
4.1.2.3 Mikroskopische Analyse	36
4.2 Zellkultur.....	37
4.2.1 Allgemein.....	37
4.2.2 Bestimmung der Zellzahl	37
4.2.3 Kultivierung von adhärenenten Zellen	37
4.2.4 Kultivierung des T-Zell-Klons JB4	38
4.2.5 Herstellung des zellfreien Tumormilieus (zTM)	39
4.3. In vitro Live Cell Imaging zur Bestimmung der T-Zellmobilität	39
4.4 Statistische Analysen	40
5. Ergebnisse.....	45
5.1 Histologischer Nachweis von T- und NK-Zellen im Nierenzell-karzinom	46
5.2. Lokoregionäre Verteilung der T- und NK-Lymphozyten in Bezug auf das Gefäßsystem.....	48
5.3 Zytotoxische Qualität der CD8+ T- und NK-Lymphozyten im Nierenzellkarzinom	55
5.3.1 Extravasationsmuster und Perforingehalt der Lymphozyten im reaktiven NKC-Gewebe ...	61
5.4 Zusammenhang zwischen dem Extravasationsmuster der Lymphozyten im RCC und Faktoren des Tumormilieus	64
5.4.1. Lösliche Faktoren des Tumormilieus	64
5.4.2. Zelluläre Komponenten des Tumormilieus	66
5.5 Eigenschaften des Lymphozyteninfiltrats und histopathologi-sche Charakteristika des Nierenzellkarzinoms	69
5.5.1 Gefäßmorphologie und Lymphozyteninfiltrat.....	69
5.5.2 Tumorstadium und Lymphozyteninfiltrat	72
5.5.3 TNM-Klassifikation und Lymphozyteninfiltrat.....	74
5.6 Intravaskuläre NK-Zellen als Indikatoren für Metastasierung.....	77
5.7 Eigenschaften des Lymphozyteninfiltrats und klinische Relevanz beim Nierenzellkarzinom	79
5.7.1 Eigenschaften des Lymphozyteninfiltrats und Patientenüberleben	79
5.7.2 Intravaskuläre NK-Zellen als unabhängiger prognostischer Faktor	83
5.7.3 Eigenschaften des Immunzellinfiltrats in Tumoren der späten Stadien	85

5.8 Mobilität der CD8+ T-Zellen im Tumormilieu in vitro	86
6. Diskussion.....	91
6.1 Nachweismethode für NK-Zellen im Gewebe	92
6.2 Lokoregionäre Verteilung der Lymphozyten im klarzelligen RCC und Nichttumor-Nierengewebe	94
6.3 CD8+ T-Zellen und ihre zytotoxische Qualität.....	98
6.4 Das intravaskuläre Kompartiment und seine Bedeutung für die Tumormetastasierung und das Überleben beim Nierenzellkarzinom	100
6.5 In späten Tumorstadien gewinnen Extravasierte Perforin+ CD8+ T Zellen an Bedeutung	102
6.6 Zusammenfassung und Ausblick: Bedeutung der Lymphozyten-infiltrationseigenschaften für die Immuntherapie des RCC.....	103
7. Zusammenfassung.....	106
8. Anhang.....	108
8.1 Histomorphologische Charakterisierung der Tumorgewebe der einzelnen Patienten.....	108
8.2 Anzahl der T- und NK-Zellen und Berechnung des NK-Zell-Anteils an Lymphozyten ermittelt aus der CD3ε/CD3ζ Doppelmarker-Fluoreszenzfärbung	113
8.3 Morphometrie verschiedener Immunzelltypen im RCC mittels Einzelmarker-Immunhistochemie	114
8.4 Parameter des lymphozytären Infiltrates im RCC, ermittelt aus Fluoreszenzmehrfachfärbungen	115
8.5 Parameter des lymphozytären Infiltrates im NKC und rNKC-2890 ermittelt aus Fluoreszenzmehrfachfärbungen	118
9. Literaturverzeichnis.....	119
10. Abkürzungen.....	125
11. Veröffentlichungen.....	127
12. Danksagung	128

1. Einleitung

1.1 Immunsystem

Das Immunsystem mit seiner Fähigkeit, eigen von fremd (Medzhitov und Janeway 2002) bzw. gefährlich von ungefährlich (Matzinger 2002) zu unterscheiden, ist der wichtige Abwehrmechanismus beim Kontakt mit potentiell pathologischen Mikroben. Es besteht aus einer Vielfalt von zellulären und molekularen Komponenten, die in einem sehr komplexen Zusammenspiel unterschiedlichste gesundheitliche Bedrohungen abwehren können. Grundsätzlich unterscheidet man das angeborene vom adaptiven Immunsystem.

Neben physikalischen Barrieren, wie die epitheliale Hautbarriere, spezielle pH-Verhältnisse in den verschiedenen Körperpforten sowie sezernierte Flüssigkeiten mit antimikrobiellen Molekülen (z. B. Lysozym), stellt das angeborene Immunsystem die erste Abwehrlinie dar. Zu den Zellen des angeborenen Immunsystems gehören die Makrophagen, die Granulozyten (neutrophile, basophile und eosinophile), die dendritischen Zellen (DZ) und die natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen). Diese Zellen haben die Fähigkeit, Pathogene ohne vorangehende Aktivierung zu erkennen, besitzen jedoch keine ausgeprägte Spezifität gegenüber Mikroorganismen und haben keine Gedächtnisfunktion. Pathogene werden im Wesentlichen durch Phagozytose und Ausschüttung von zellschädlichen Substanzen eliminiert.

Die B- und T-Zellen gehören zum adaptiven Immunsystem. Die zwei Zellarten entstehen im Knochenmark, reifen aber in unterschiedlichen Organen, die T-Zellen im Thymus und die B- und T-Zellen im Knochenmark und in den sekundären lymphatischen Organen. Jeder Lymphozyt besitzt einen individuellen Antigenrezeptor, der eine sehr hohe Spezifität aufweist. Die hohe Vielfalt der unterschiedlichen Rezeptoren entsteht durch Rekombination rezeptorkodierender Gensegmente während der Zellreifung. Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem benötigen die Lymphozyten eine antigenabhängige Aktivierung, damit sie sich zu Effektorzellen entwickeln können. Zudem besitzen sie die Fähigkeit der Gedächtnisbildung, so dass sie bei folgenden Kontakten mit dem gleichen Antigen schneller aktiviert werden

können. Das angeborene und adaptive Immunsystem haben viele Schnittstellen und deren Zusammenarbeit ist die Voraussetzung für eine effektive Abwehr (Borghans 1999).

1.1.1 T-Zellen

Die T-Zellen entstehen im Knochenmark aus Vorläuferzellen und wandern dann in den Thymus für die weitere Reifung. Dort werden diejenigen T-Zellen, die Strukturen des eigenen Körpers erkennen oder keine Antigene erkennen, eliminiert. Die übrigen naiven (nicht aktivierten) T-Zellen gelangen dann ins periphere Blut und die sekundäre lymphatische Organe. Dort kommen sie mit Antigenen durch antigenpräsentierende Zellen in Kontakt, werden aktiviert und differenzieren sich. Die reifen T-Zellen gehen dann wieder in den Kreislauf über, um zu ihrem Zielort der Infektion zu gelangen.

T-Zellen besitzen einen T-Zell-Rezeptor (TZR) zur Antigenerkennung. Das Antigen wird als Fragment (Peptid) erkannt, wenn es in einem MHC-Molekül gebunden auf der Zelloberfläche einer antigen-infizierten Zelle präsentiert wird. Der TZR ist ein $\alpha\beta$ -Heterodimer, das mit dem CD3-Komplex koexprimiert wird (Abb. 1.1).

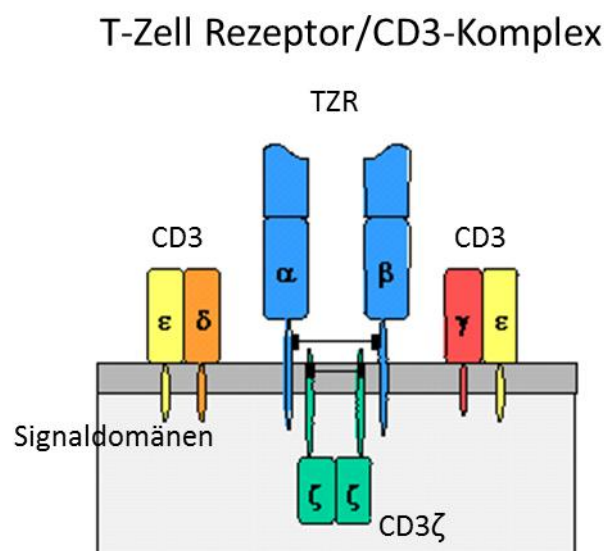


Abbildung 1.1. Struktur des T-Zell-Rezeptors/CD3-Komplexes.

Der TZR ist ein Heterodimer aus je einer hochvariablen α - und β - Kette, die mit den CD3-Heterodimeren ϵ/δ und γ/ϵ und dem CD3 ζ -Molekül in Verbindung stehen. Der TZR erkennt das Antigen und die CD3-Moleküle leiten das Aktivierungssignal ins Innere der Zelle weiter. (nach Charles A. Janeway und Paul Travers, Immunologie, 2. Aufl., S.161, Spektrumverlag 1997).

Die CD3-Moleküle besitzen intrazelluläre Signaldomänen, die eine T-Zelle befähigen, nach Antigenerkennung über dem TZR ein Aktivierungssignal ins Innere der Zelle weiterzuleiten. Der CD3-Komplex, insbesondere das CD3 ϵ -Protein, ist der Marker, der T-Zellen definiert und die Unterscheidung von den anderen Zellen des Immunsystems erlaubt. Die T-Zellen werden in verschiedene Subgruppen unterteilt, die spezifische Funktionen haben. Die drei Hauptuntergruppen der T-Lymphozyten sind die T-Helfer-Zellen (Th-Zellen), die zytotoxischen T Lymphozyten (ZTL) und die T-regulatorischen Zellen (Tregs).

Die Th-Zellen zeichnen sich durch die Expression des CD4-Moleküls auf ihrer Oberfläche aus. Mithilfe ihres TZRs erkennen sie Moleküle, die auf MHC-II-Molekülen auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen (APZ; Monozyten und Makrophagen, DZ, B-Lymphozyten) präsentiert werden und werden im Zuge dieser Erkennung aktiviert. Ihre Hauptfunktion ist die Unterstützung der Aktivierung anderer Immunzellpopulationen durch Sekretion von verschiedenen regulierenden Zytokinen. Je nach Art der unterstützenden Funktion werden die Th-Zellen in verschiedene Untergruppen eingeteilt: Die Th1-Zellen sind an der Aktivierung von Makrophagen und ZTL beteiligt, während die Th2-Zellen bei der Reifung von naiven B-Lymphozyten zu Plasmazellen helfen. Die Th1-Zellen üben ihre Funktion über die Produktion von Interleukin-2 (IL-2), Interferon- γ (IFN γ) und Tumornekrose-Faktor- α (TNF- α) aus, während die Th2-Zellen die Interleukine IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 produzieren. Weitere Th-Zelluntergruppen sind die Th3-Zellen, die eine immunregulatorische Funktion ausüben und TGF- β sezernieren, und die Th17-Zellen, welche immunfördernd bei bakteriellen und mykotischen Infektionen wirken und hauptsächlich IL-17, TNF- α , GM-CSF und IL-6 sezernieren.

Die ZTL sind durch die Oberflächenexpression des CD8-Moleküls gekennzeichnet. Sie erkennen Antigene, die auf MHC-I-Molekülen präsentiert werden. MHC-I, im Gegensatz zu MHC-II, wird von allen Zellen des menschlichen Körpers produziert. Somit sind die ZTL am besten geeignet, virusinfizierte Körperzellen und Tumorzellen anzugreifen. Dies gelingt mithilfe eines breiten Arsenal an zytotoxischen Molekülen, wie Perforin und Granzymen (s. Kapitel 1.1.3).

Die Tregs dienen der Kontrolle der Immunabwehr. Es ist ihre Aufgabe, Immunantworten gegen pathogene Antigene zu limitieren und zu beenden. Weiterhin können sie fehlgeleitete Immunreaktionen gegen eigene Moleküle (Autoimmunität) oder fremde ungefährliche Antigene (Allergien) aufhalten. Sie exprimieren auf ihrer Oberfläche, wie die Th-Zellen, das CD4-Molekül, weisen jedoch zusätzlich das Oberflächenmolekül CD25 und den Transkriptionsfaktor FOXP3 auf. Sie sezernieren immuninhibierende Zytokine wie IL-10 und TGF- β .

1.1.2 NK-Zellen

NK-Zellen bedürfen im Gegensatz zu den T- und B-Lymphozyten keiner spezifischen Aktivierung, bevor sie zur Abtötung der Zielzellen fähig sind, so dass sie eine schnelle Antwort auf eine Gefahr gewährleisten. Sie besitzen keine spezifischen Rezeptoren wie die T- und B-Lymphozyten und haben somit ein breiteres Erkennungspotenzial gegenüber Antigenen. Sie tragen auf ihrer Oberfläche verschiedene aktivierende und inhibierende Rezeptoren, die sich in einem dynamischen Gleichgewicht befinden. Der Funktionszustand der NK-Zellen hängt maßgeblich von diesem Gleichgewicht ab. NK-Zellen sind im Besonderen darauf spezialisiert, Zellen zu erkennen, die keine MHC-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren, genauer gesagt ist MHC-I ein Molekül, das die Funktion von NK-Zellen inhibiert. So sind normale Körperzellen vor dem Angriff durch NK-Zellen geschützt. Virus-infizierte bzw. Tumorzellen, die oftmals wenig oder kein MHC-I exprimieren, sind dagegen bevorzugtes Ziel für die NK-Zellen.

NK-Zellen lassen sich durch die Abwesenheit von CD3 ϵ , welches ein T-Zell-spezifischer Marker ist, und durch die Expression von CD56 von den T-Lymphozyten und den anderen Immunzellen (Monozyten, B-Zellen) abgrenzen. Über die Expressionsstärke von CD56 sowie CD16 (Fc γ -Rezeptor III) werden die NK-Zellen in zwei Gruppen unterteilt. Die NK-Zellen mit niedriger Expression von CD56 und hoher Expression von CD16 sind mit ca. 90% die Hauptgruppe der NK-Zellen im Blut und gelten als die eigentlichen zytotoxischen NK-Zellen.

Die restlichen 10% der Blut-NK-Zellen exprimieren viel CD56 und wenig oder gar kein CD16. Sie produzieren bevorzugt Zytokine (z. B. IFN γ und TNF- α) und sind wenig zytotoxisch.

Um gesunde von kranken Körperzellen zu unterscheiden, benutzen NK-Zellen ihre inhibitorischen Rezeptoren, wie z. B. KIR. Diese erkennen MHC-I Moleküle auf der Oberfläche von gesunden Zellen und vermitteln ein negatives Signal, welches die NK-Zellfunktion hemmt. Infizierte oder entartete Tumorzellen, die wenig MHC-I Moleküle exprimieren, vermitteln dieses inhibitorische Signal nicht und können somit erkannt und eliminiert werden. Unter bestimmten Umständen können Zellen auch dann erkannt werden, wenn sie inhibitorische MHC-I Moleküle exprimieren. Dies ist möglich, wenn die Zelle auf ihrer Oberfläche Liganden für aktivierende Rezeptoren trägt. Durch einen Überschuss an positiven Signalen können die über MHC-I-Moleküle ausgelösten inhibitorischen Signale überwunden werden und die NK-Zelle kann ihre Funktion ausüben. Wichtige aktivierende Rezeptoren sind die natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren (NZR) CD337/NKp30, CD334/NKp44 und CD335/NKp46. Die NZR sind insgesamt die einzigen Marker, die nur von NK-Zellen exprimiert werden, und werden häufig zum Nachweis der NK-Zellen benutzt. Die NZR bilden Heterodimere mit verschiedenen Signaladaptormolekülen, z. B. CD3 ζ , welches für NKp30 und NKp46 ein wichtiger Mediator zwischen Antigenerkennung und Aktivierung von Signalkaskaden ist (Abb. 1.2).

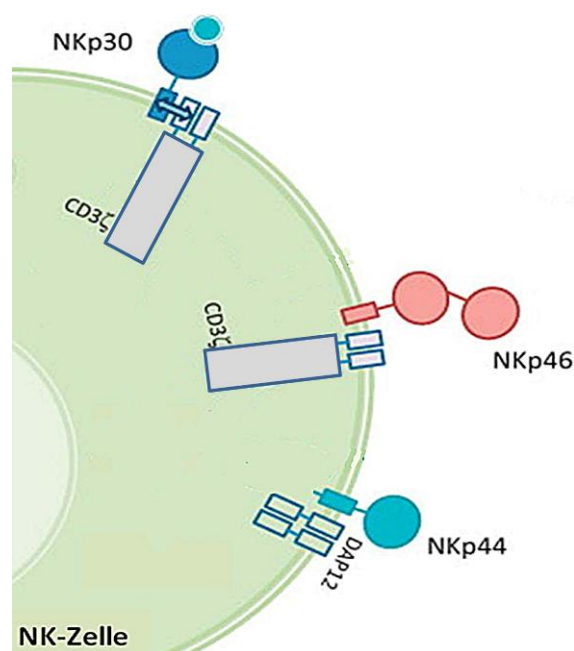


Abb. 1.2. Schematische Darstellung einer NK-Zelle mit ihren natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren NKp30, NKp44 und NKp46.

CD3ζ ist ein Adaptermolekül für NKp30 und NKp46 und ist ein wichtiger Mediator zwischen Antigenerkennung und Aktivierung der Signalkaskaden bei diesen zwei Rezeptoren. NKp44 ist entsprechend mit seinem Signaltransduktionsadapter DAP12 dargestellt. (Modifiziert nach Koch et al. 2013).

Trotz der Vielfalt an NK-Zell-assoziierten Molekülen gestaltet sich ihr Nachweis in einem Gewebe oft schwierig. Die häufigste Nachweismethode beruht auf einer Zweimarkerkombination von CD3ε mit CD56, wobei die NK-Zellen als CD3ε negativ und CD56 positiv erkannt werden. Mit dieser Kombination wird in der Regel die Gesamtheit der verschiedenen NK-Zelltypen erfasst. Dieser Nachweis wird v. a. bei Gewebesuspensionen in Zusammenhang mit der Durchflusszytometrie verwendet. CD56 allein ist nicht ideal für den NK-Zellnachweis, da es auch auf T-Zellen und neuronalen Strukturen (Michel 2007) zu finden ist. Auch CD16, das zusammen mit CD56 für die weit verbreitete Klassifizierung der NK-Zellen in funktionellen Subgruppen benutzt wird, wird auf Neutrophilen und Makrophagen exprimiert. Auf der anderen Seite sind die oben genannten Aktivierungs- und Inhibitionsrezeptoren zwar NK-zellspezifisch, unterliegen jedoch einer gewebe- und situationsabhängigen Regulation. So wird z. B. NKp44 erst nach Aktivierung mit IL-2 und IL-15 induziert und durch IL-21 herunterreguliert (de Rham 2007), NKp46 kann durch TGF-β herunterreguliert werden. Demzufolge sind diese Rezeptoren in Situationen, wo sie herunterreguliert werden, wie

NKp30 bei Hepatitis-C-Virusinfektion (Holder 2013) oder NKp46 beim Nierenzellkarzinom (Prinz 2012) und Influenzavirus-infektion (Jost 2011) nicht für den NK-Zellnachweis geeignet.

1.1.3 Zytotoxische Funktion von ZTL und NK-Zellen

NK-Zellen und CD8+ T-Zellen (ZTL) bilden die Gruppe der zytotoxischen Lymphozyten, deren wichtigste Funktion die Zerstörung ihrer Zielzellen ist. Zur Zellzerstörung können verschiedene Mechanismen angewandt werden. Einer ist die Zytotoxizität über Exozytose lytischer Granula (Degranulation; Abb. 1.3) und die dabei stattfindende Übertragung von Granzymen in die Zielzellen. Zytotoxinhaltige Granula sind ein definierendes Element einer zytotoxischen Effektorzelle. Ein charakteristisches Protein der zytotoxischen Granula ist das Membranprotein GMP-17/TIA (Medley 1996). In den zytotoxischen Granula eingeschlossen sind zytotoxische Moleküle, hauptsächlich Perforin und verschiedene Granzyme, die beim Prozess der Degranulation in den intersynaptischen Spalt ausgeschüttet und in die Zielzelle aufgenommen werden. Dort wird dann die Apoptose ausgelöst. Zum lytischen Prozess wird zunächst Perforin benötigt, welches unter dem Einfluss von Kalzium in der Membran der Zielzelle einen Porenkomplex ausbildet, der das Eindringen anderer Moleküle (vor allem Granzyme) in die Zelle ermöglicht (Abb. 1.3.). Nach aktueller Datenlage entsteht diese Pore nicht nur in der Zellmembran (Abb. 1.3, 3), sondern die Perforinmonomere werden zusammen mit Granzymen und Granulysin durch spezielle Rezeptoren (z. B. Mannose-6-Phosphat-Rezeptor) von den Zielzellen phagozytiert und in Endosomen aufgenommen, wo dann die Pore gebildet wird (Abb. 1.3, 4a+b; Veugelers 2006). Granzyme sind Serinproteasen, die in der Zielzelle eine Signalkaskade auslösen, die in der Apoptose der Zielzellen endet, indem sie Caspasen (besonders Caspase-3) und das Protein Bid aktivieren.

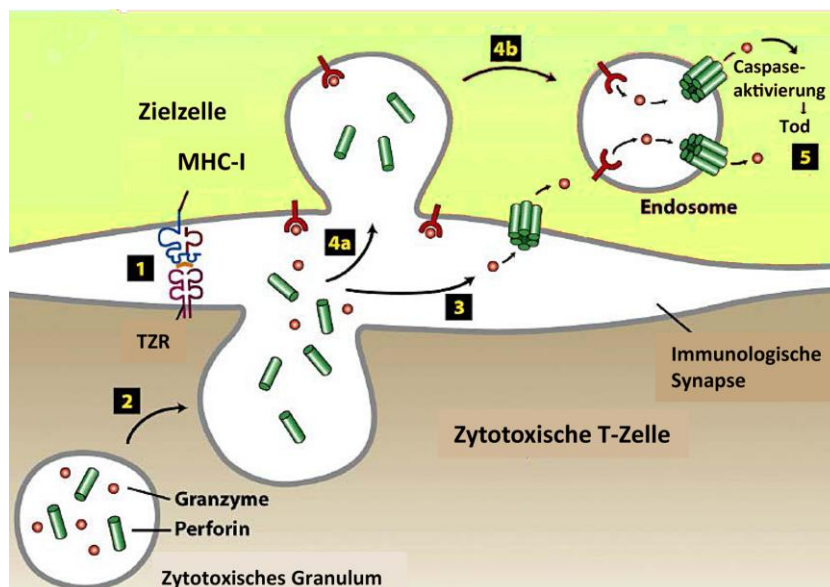


Abbildung 1.3. Degranulation als ein Mechanismus der zytotoxischen Funktion einer CD8+ T-Zelle.

In den zytotoxischen Granula eingeschlossen sind zytotoxische Moleküle, hauptsächlich Perforin und Granzyme. Nach Bindung des T-Zell-Rezeptors an ein MHC-I-Molekül und nachfolgender T-Zellaktivierung (1) werden die zytotoxischen Moleküle beim Prozess der Degranulation in den intersynaptischen Spalt ausgeschüttet (2). Danach bildet entweder Perforin in der Membran der Zielzelle einen Porenkomplex (3), der das Eindringen anderer Moleküle (vor allem Granzyme) in die Zelle ermöglicht, oder die Perforinmonomere werden zusammen mit Granzymen durch speziellen Rezeptoren (z. B. Mannose-6-Phosphat-Rezeptor) von den Zielzellen phagozytiert (4a) und in Endosomen aufgenommen (4b), wo dann die Pore gebildet wird. Granzyme lösen dann im Zytosol eine Signalkaskade mit Caspasenaktivierung aus, die in der Apoptose der Zielzellen endet (5).

Ein weiterer Weg zur Abtötung einer Zelle ist der Fas-Fas-Ligand-Signalweg. Fas (CD95) ist ein Oberflächenrezeptor der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie, der von Zielzellen exprimiert wird. Er erkennt und bindet an den Fas-Ligand auf den ZTL und den NK Zellen. Der Fas-Signalweg spielt zudem eine wichtige Rolle bei der Elimination von autoreaktiven Lymphozyten, welche den Fas-Rezeptor exprimieren.

1.2 Zytokine und Chemokine

1.2.1 Zytokine

Zytokine sind eine Gruppe von Proteinen, die eine Rolle bei der Regulation von Wachstum, Differenzierung und Aktivität von verschiedenen Zellen sowie deren Interaktionen spielen. Es gibt 4 Hauptgruppen von Zytokinen, unter anderem Interferone und Interleukine.

1.2.1.1 Interferone

Interferone sind Proteine mit immunstimulierender, antiviraler und antitumoraler Funktion. Die drei Hauptvertreter dieser Gruppe sind Interferon- α , - β und - γ . Die beiden ersten werden als TypI Interferone bezeichnet und von virusinfizierten Zellen produziert und sezerniert. Sie binden an ihren spezifischen Rezeptoren auf diesen Zellen selbst oder auf umliegenden infizierten und nichtinfizierten Zellen. Die darauffolgende Signalkaskade führt zur Produktion von Proteinen, die die virale Translation hemmen und den viralen DNA/RNA-Abbau fördern. Gleichzeitig werden ZTL und NK-Zellen zur Eliminierung der infizierten Zellen stimuliert. TypII-Interferone (Interferon- γ /IFN γ) werden von einer Vielzahl von Immunzellen gebildet, darunter den NK-Zellen und den ZTL. Zu ihren Funktionen gehören die Unterstützung der Th1-Zelldifferenzierung, die Aktivierung von Makrophagen, NK-Zellen und ZTL sowie die Hochregulierung der Expression von MHC-I- und -II-Molekülen. Somit ist IFN γ eines der wichtigsten Faktoren für eine erfolgreiche zelluläre Immunantwort.

1.2.1.2 Interleukine

Interleukine sind Peptidhormone, die von Leukozyten produziert werden, vor allem Makrophagen und T-Zellen. Sie vermitteln die Kommunikation zwischen den Leukozyten und regulieren die Immunabwehr. Sie können proliferierende, differenzierende, aktivierende oder supprimierende Wirkungen haben. Bislang sind 36 unterschiedliche Interleukine identifiziert. Tabelle. 1.1 zeigt die wichtigsten Interleukine und ihre Funktion.

Interleukin	Produzenten	Hauptfunktion
IL-1	Makrophagen Monocyten Endothelzellen	B-, T-, NK-Zellaktivierung, Induktion von Fieber über Hypothalamus
IL-2	T-Zellen	T-Zell-Proliferation/ Aktivierung
IL-4	T _H 2-Zellen Mastzellen	B-Zellaktivierung Wechsel zu IgE-Synthese, antiinflammatorisch
IL-5	T _H 2-Zellen Mastzellen	Wachstum und Differenzierung von eosinophilen Granulocyten, chemotaktisch für eosinophile Granulocyten
IL-6	Makrophagen T-Zellen	Induktion der Synthese und Freisetzung von Akutphaseproteinen in Hepatocyten, proinflammatorisch
IL-7	Stromazellen des Knochenmarks	Proliferation von Prä-B-Zellen, Prä-T-Zellen, proinflammatorisch
IL-9	T-Helferzellen	Proliferation von Mastzellen
IL-10	T _H 2-Zellen CD8 ⁺ -T-Zellen Makrophagen Monocyten	inhibiert Makrophagen, inhibiert T _H 1-Zellen, antiinflammatorisch
IL-12	B-, T-Zellen Dendriten Makrophagen	Induktion der Differenzierung von CD4 ⁺ -T-Zellen, Aktivierung von NK-Zellen fördert Produktion von IFN-γ
IL-13	T _H 2-Zellen Mastzellen NK-Zellen	Proliferation und Differenzierung von B-Zellen, inhibiert Synthese proinflammatorischer ILs von Makrophagen
IL-15	mononucleäre Phagocyten Makrophagen	Proliferation von Mastzellen, NK-Zellen

Tabelle 1.1. Wichtige Interleukine, der produzierende Zelltyp und ihre Funktion (nach Molekulare Virologie Modrow, Heidelberg, Spektrum, Akad. Verl., 2010). ILs = Interleukine

1.2.2 Chemokine

Chemokine sind eine Familie von ca. 50 Proteinen, die eine wichtige Rolle bei der Migration von Immunzellen spielen. Bei der sogenannten Chemotaxis bewegen sich die Immunzellen in Richtung zunehmender oder abnehmender Chemokinkonzentration. So wird die Wanderung vom Blut ins Gewebe und innerhalb des Gewebes gesteuert. Zudem spielen einige Vertreter dieser Gruppe eine Rolle bei der Aktivierung von Immunzellen und bei der Angiogenese. Die Chemokine werden von Immun- und Gewebszellen produziert. Sie werden

in 4 Klassen eingeteilt, abhängig von einer konservierten Präsenz von Cysteinmolekülen am N-Terminus der Aminosäurenkette (Zlotnik und Yoshie 2000). So besitzen die XC-Chemokine nur ein Cystein, während bei den CC-Chemokinen 2 Cysteine hintereinander vorkommen. Die CXC-Chemokine haben eine beliebige Aminosäure zwischen den Cysteinen und die CX₃C-Chemokine 3 Aminosäuren. Tabelle 1.2 gibt einen Überblick über die wichtigsten Chemokine.

Chemokin-Familie	Vertreter	Chemokin-rezeptor	Chemokinrezeptor-expression
CC 	CCL3, CCL5, CCL7, CCL14, CCL15, CCL16, CCL23 CCL2, CCL7, CCL12, CCL13 CCL3, CCL4, CCL5 CCL20 CCL19, CCL21	CCR1 CCR2 CCR5 CCR6 CCR7	immature DZ, Monozyten, NK-Zellen immature DZ, Monozyten, Basophile immature DZ, Monozyten, T-Zellen, NK-Zellen immature DZ, B-Zellen immature und mature DZ, T-Zellen
CXC 	CXCL1, CXCL6, CXCL8 CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8	CXCR1 CXCR2	immature DZ immature DZ, neutrophile Granulozyten
CX ₃ C 	CX ₃ CL1	CX ₃ CR1	Monozyten, T-Zellen, NK-Zellen
XC 	XCL1	XCR1	NK-Zellen

Tabelle 1.2. Chemokine mit ihren Rezeptoren und ihren Zielzellen (nach Lettenmeyer 2011). Die schematischen Strukturformeln der Chemokinfamilien sind nach Kohidai und Csaba 1998.

1.3 Das Nierenzellkarzinom

Das Nierenzellkarzinom (renal cell carcinoma, RCC; auch bekannt als Hypernephrom) ist ein bösartiger Tumor der Niere. Mit einem Anteil von 3% aller bösartigen Tumoren des Menschen ist es ein relativ seltener Tumor, jedoch ist er für 3,6% der krebisbedingten Todesfälle bei Männern sowie 2,4% der Todesfälle bei Frauen verantwortlich. Die Inzidenz beträgt etwa 9/100.000 Einwohner pro Jahr in Deutschland. Männer erkranken ca. 2-mal häufiger als Frauen. Der Erkrankungsgipfel liegt im 7. Lebensjahrzehnt.

Die WHO unterscheidet 10 Untergruppen nach zytologischen und molekularen Eigenschaften. Davon ist das klarzellige Nierenzellkarzinom (clear cell, ccRCC) mit ca. 75% das häufigste, gefolgt vom papillären (10%) und chromophoben (5%) Nierenzellkarzinom.

Als wichtige Risikofaktoren sind Zigarettenrauchen (Hunt 2005), Übergewicht (von Dijk 2004), arterieller Hypertonus (McLaughlin 1995), chronische Niereninsuffizienz (Nouh 2010), langjährige Therapie mit nicht-steroidalen Antiphlogistika (Cho 2011), Exposition zu Trichlorethen (Kelsh 2010) sowie Cadmium- und Bleibelastung (Boffetta 2011) zu erwähnen.

95% aller Nierenzellkarzinome treten sporadisch auf, beim Rest besteht eine familiäre Prädisposition. Mittlerweile sind mehrere Mutationen identifiziert, die mit einem erhöhten Nierenzellkrebsrisiko assoziiert sind, so ist z. B. beim von-Hippel-Lindau (VHL)-Syndrom das VHL-Tumorsuppressorgen auf Chromosom 3 inaktiviert.

Klinisch bleibt das Nierenzellkarzinom in Frühstadien meistens asymptomatisch. Die klassische Trias aus schmerzloser Hämaturie, Flankenschmerzen und palpablem abdominalem Tumor ist heutzutage eine Seltenheit und ist Zeichen eines fortgeschrittenen Erkrankungsstadiums. Aufgrund des bildtechnischen Fortschritts der letzten Jahre wird der Nierentumor oft bei einer aus anderen Gründen veranlassten computertomographischen oder sonographischen Untersuchung zufällig entdeckt und ist damit der Hauptgrund eines sogenannten „stage-shifts“ in Richtung früherer Stadien mit kleinen Tumoren, die auch besser behandelbar sind. Die lymphogene Metastasierung erfolgt in paraaortale und parakavale Lymphknoten. Die häufigere hämatogene Metastasierung manifestiert sich hauptsächlich in Lunge, Skelett, Leber, und Nebennieren. Relativ häufig ist auch ein Durchbruchswachstum in die Vena cava inferior.

Die Tumorklassifikation und die Stadieneinteilung nach den Richtlinien der Union Internationale Contre Le Cancer (UICC) sind in Tabelle 1.3 ersichtlich.

Tabelle 1.3. TNMG Klassifikation und Stadieneinteilung nach UICC beim Nierenzellkarzinom (Yoon und Herts 2003, Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge: Urogenitale Tumoren, Tumorzentrum München 4. Auflage 2008)

T: Primärtumor			
pTx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden		
pT0	Kein Nachweis eines Primärtumors		
pT1	Primärtumor mit einem maximalen Durchmesser von 7 cm, auf die Niere begrenzt		
pT1a	Primärtumor mit einem maximalen Durchmesser von 4 cm, auf die Niere begrenzt		
pT1b	Primärtumor größer als 4 cm, aber maximal 7 cm im größten Durchmesser, auf die Niere begrenzt		
pT2	Primärtumor mit einem Durchmesser von mehr als 7 cm, auf die Niere begrenzt		
pT3	Tumor dehnt sich in große Venen aus oder invadiert die ipsilaterale Nebenniere oder perirenales Gewebe, durchbricht aber nicht die Gerota'sche Faszie		
pT3a	Tumor invadiert die ipsilaterale Nebenniere oder perirenales Gewebe, durchbricht aber nicht die Gerota'sche Faszie		
pT3b	Tumor dehnt sich makroskopisch in die Nierenvene oder die Vena cava aus, jedoch nur infradiaphragmatisch		
pT3c	Tumor dehnt sich makroskopisch bis supradiaphragmatisch in die Vena cava aus		
pT4	Tumor durchbricht die Gerota'sche Faszie		
N: Regionale Lymphknoten (hilär, abdominal paraaortal und paracaval)			
Nx	Regionale Lymphknoten können nicht beurteilt werden		
N0	Kein Hinweis auf regionale Lymphknotenmetastasen		
N1	Singuläre regionale Lymphknotenmetastasen		
N2	Mehr als eine regionale Lymphknotenmetastase		
M: Fernmetastasen			
Mx	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden		
M0	Kein Hinweis auf Fernmetastasen		
M1	Nachweis von Fernmetastasen		
Stadiengruppierung			
Stadium I	pT1	N0	M0
Stadium II	pT2	N0	M0
Stadium III	pT3	N0	M0
	pT1-3	N1	M0
Stadium IV	pT4	N0/1	M0
	Jedes pT	N2	M0
	Jedes pT	Jedes N	M1
Histologisches Grading			
G1	gut differenziert		
G2	mäßig differenziert		
G3/G4	schlecht differenziert/undifferenziert		

Nach aktueller Studienlage ist die operative Entfernung des Nierenzellkarzinoms die einzige kurative Behandlung. Radiotherapie und/oder Chemotherapie haben sich wegen der hohen Resistenz des Nierentumors als unwirksam erwiesen. Während früher die totale Nephrektomie der betroffenen Niere Therapie der ersten Wahl war, haben neue Studien

gezeigt, dass die organerhaltende Tumorresektion gleichwertig bezüglich des gesamten und progressionsfreien Überlebens ist. Aktuell wird in frühen Stadien mit lokal begrenzten Tumoren die organerhaltende Tumorresektion durchgeführt, während bei lokal fortgeschrittenen Stadien die totale Tumornephrektomie immer noch als Therapie überwiegt. Sind lymphatische und/oder Organmetastasen nachgewiesen wird die operative Entfernung mit einer zusätzlichen medikamentösen Therapie kombiniert. Als wichtigste medikamentöse First-Line-Therapie gelten antiangiogenetische Medikamente, unter anderem die Multi-Tyrosinkinase-Inhibitoren Sunitinib (Sutent[®]), Sorafenib (Nexavar[®]) und Pazopanib (Votrient[®]) (Escudier und Kataja 2010). Weitere therapeutische Möglichkeiten sind Interferon- α plus Bevacizumab (Avastin[®], Anti-VEGF-Antikörper) sowie Temsirolimus (Torisel[®], mTOR-Kinase-Inhibitor). Als fakultative zusätzliche Option oder bei Versagen der First-Line-Therapien steht die hochdosierte Interleukin-2-Therapie zur Verfügung, die allerdings mit vielen therapielimitierenden Nebenwirkungen einhergeht, jedoch bei einigen Patienten einen langfristigen Überlebensvorteil erzielt. Während in den USA diese Therapie weiter verbreitet ist, bleibt man in Deutschland damit eher zurückhaltend. Die Prognose des metastasierten Nierenzellkarzinoms hat sich durch die Einführung der medikamentösen Therapie signifikant verbessert, dennoch sind komplette Remissionen selten, unter anderem wegen der häufigen Entwicklung von Medikamentenresistenz. So besteht weiterhin dringender Bedarf für neue Therapieformen und -kombinationen.

Die Prognose hängt maßgeblich von Tumorgröße und -ausdehnung ab. Für die frühen Stadien (UICC I + II) beträgt die 5-Jahresüberlebensrate 70-95%, für Stadium UICC III 35-60% und für Stadium IV 15-20%. Insgesamt beträgt die 5-Jahresüberlebensrate unabhängig von der Stadieneinteilung 70%.

1.4 Immuninfiltrat im Tumor

Tumorzellen entstehen aus gesunden Körperzellen, in dem sie Eigenschaften erlangen oder verlieren, die es ihnen erlauben, der normalen Zellregulation zu entkommen. Obwohl diese entarteten Zellen immer noch große Ähnlichkeit mit ihren gesunden verwandten Zellen

aufweisen, haben sie gewisse strukturelle Veränderungen erworben, die sie von normalen Gewebszellen unterscheiden. Sie sind somit potenziell vom Immunsystem erkennbar. In der Tat ist die Präsenz von Immunzellen im Tumorgewebe schon seit 1863 bekannt, als Rudolf Virchow Leukozyteninfiltrate im Tumor nachwies. 1909 wurde die Hypothese der Tumorbekämpfung durch den eigenen Körper von Paul Ehrlich postuliert (Garcia-Sanchez 2010), die dann von Burnet und Thomas 1957 im Begriff der „Immunosurveillance“ (Immunüberwachung) formuliert wurde. Die Immunosurveillance-Theorie besagt, dass Lymphozyten, und besonders die T-Zellen, entartete Zellen erkennen und eliminieren, so dass Tumoren relativ selten entstehen, obwohl zellverändernde Mutationen häufig sind (Burnet 1957). Unterstützung fand die Hypothese mit der Identifizierung von Tumorantigenen und von Lymphozyten, die spezifische Tumorantigene erkennen können. Spontanremissionen von Tumoren, sowie Korrelationen von Immundefiziten mit Tumorentstehung (de Miranda 2011) und von Tumorremission mit tumor-gerichteten Immunantworten (Dudley, 2002) sind weitere Indizien für eine Rolle des Immunsystems bei der Tumorkontrolle.

Trotz der nachgewiesenen intratumoralen Präsenz von Lymphozyten und ihrer potenziellen Fähigkeit zur gerichteten Tumorelimination, kann das Immunsystem in den meisten Fällen das Tumorwachstum nicht beherrschen. Als Erklärung für die zur Tumorkontrolle ungenügende Funktion des Immunsystems wurde 2002 von Dunn et al. der Begriff „Immunoediting“ eingeführt (Dunn 2002). Hierbei wird das komplexe Zusammenspiel zwischen Immun- und Tumorzellen in drei Phasen eingeteilt: In der frühen Eliminationsphase erkennen die Immunzellen die Tumorzellen und eliminieren sie. Dieser Vorgang setzt die Tumorzellen unter Selektionsdruck und führt dazu, dass Tumorzellen Ausweichmechanismen gegen das Immunsystem entwickeln. Es stellt sich daraufhin die Gleichgewichtsphase ein. Letztendlich aber entgehen die immer weiter selektierten Tumorzellen der Immunüberwachung. So tritt die Tumorescape-Phase ein, in welcher das Immunsystem die Kontrolle über das Tumorwachstum verliert. Die Escape-Mechanismen der Tumorzellen sind vielfältig (Poggi 2006).

Ein wichtiger Escape-Mechanismus ist der Verlust der Expression von MHC-I Molekülen, der Antigenprozessierungsmaschinerie und der Antigene selbst, die einzeln oder in Kombination auftreten können. Alle führen dazu, dass die betreffenden Zellen keine Zielstrukturen für die Erkennung durch T-Zellen mehr aufweisen. Ein weiterer Mechanismus ist die funktionelle Inaktivierung der zytotoxischen T-Zellen durch eine kontinuierliche Aktivierung in Orten chronischer Entzündung, wie beim Tumor (Haymaker 2012). Eine Form dieser Inaktivierung ist die sogenannte Erschöpfung. Sie führt zu einer reduzierten Zytokinproduktion und zytotoxischer Dysfunktion. Diese Effekte werden über den B7-H1/PD-1-Signalweg vermittelt, der vor allem Signale unterbindet, die vom TZR über den PI3K/Akt-Weg weitergeleitet werden. B7-H1 wird auf den Tumorzellen exprimiert, während PD-1 auf den T-Zellen zu finden ist. PD-1 ist auch als der Marker für Erschöpfung anerkannt, wobei mittlerweile belegt worden ist, dass es auch auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird und somit eher allgemein als Marker einer stattgefundenen Aktivierung gesehen wird (Crespo 2013). Andere Arten der funktionellen Inaktivierung sind die Anergie und die Seneszenz (Crespo 2013).

Unter den zellulären Komponenten des Tumormilieus spielen die Tregs eine wichtige Rolle bei der Immunsuppression (Pernot 2014). Tregs werden entweder durch bestimmte Zytokine wie CCL17, 22 und 28 bevorzugt in den Tumor rekrutiert oder entstehen durch Konversion aus konventionellen CD4⁺ T-Zellen mithilfe von Zytokinen wie TGF- β oder von VEGF, die u.a. von immaturen DZ produziert werden (Ghiringhelli 2005). Tregs wirken der antitumoralen Immunantwort entgegen, indem sie inhibitorische Zytokine wie IL-10 und TGF- β sowie inhibitorische Metabolite wie Adenosin sezernieren.

Auch das Gefäßsystem im Tumor reguliert die Immunantwort im Tumor, v. a. indem es das Ausmaß der Erreichbarkeit der Tumorzellen durch die zytotoxischen Lymphozyten kontrolliert (Mauge 2014). Durch den stetig zunehmenden Bedarf der Tumorzellen an Nährstoffen und Sauerstoff werden neue Gefäße gebildet. Diese sind im Vergleich zu den normalen Gefäßen arm an Adhäsionsmolekülen (ICAM, VCAM, E-selectin), so dass die Immunzellen schlechter adhären und wenig ins Tumorparenchym infiltrieren. Weiterhin exprimieren Endothelzellen immunsuppressive Moleküle wie B7-H3 oder PD-L1, oder

sezernieren Zytokine wie IL-10, die die Immunantwort drosseln. Auch der selektive Einfluss immuninhibitorischer Zellpopulationen wie Tregs wird durch das Tumorendothel reguliert.

1.4.1. Rolle des Immunzellinfiltrats als prognostischer Marker in der Onkologie

In einem Tumor findet man in der Regel alle Immunzelltypen, unter anderem Makrophagen, DZ, NK-Zellen, T-Zellen und B-Zellen. Jedoch können sich die Zusammensetzung und die Verteilung des Immunzellinfiltrats im Gewebe von Tumortyp zu Tumortyp und zwischen primärem Tumor und Metastasen unterscheiden.

Für die klinische Prognose von Tumoren und der Individualisierung multimodaler Therapien spielen die histopathologischen Parameter (TNM-Klassifikation) die wichtigste Rolle (Ficarra 2009, Moch 2007). In den letzten Jahren hat jedoch die Tumorimmunologie an prognostische Bedeutung gewonnen (Shankaran 2001, Dunn 2004, Schreiber 2011). Vor allem die Untersuchungen am humanen kolorektalen Karzinom zeigen, dass das Immunzellinfiltrat, insbesondere die T-Zellen, die klinischen Charakteristika der Tumoren und das Überleben der Patienten beeinflusst (Galon 2006, Mlecnik 2011).

Die erste einschlägige Beobachtung wurde beim kolorektalen Karzinom gemacht. Hier zeigte sich deutlich, dass das Ausmaß der Infiltration mit CD3+ T-Zellen in Relation zur klassischen histopathologischen Stadieneinteilung ein besserer Prädiktor für das Überleben war als die UICC-Einteilung, da es innerhalb der Stadien die Patienten präziser in solche mit kurzem und solche mit langem Überleben unterteilen konnte, wobei kurzes Überleben mit der Abwesenheit von T-Zellen im Infiltrat einherging (Abb. 1.4.).

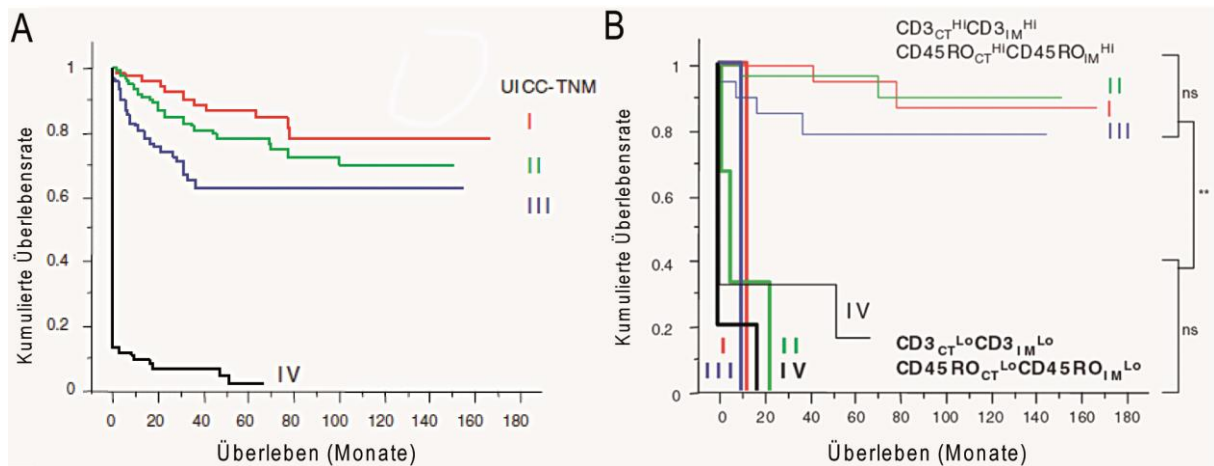


Abbildung 1.4. Die Dichte der CD3+ T-Zellen kann präziser das Überleben von Patienten mit kolorektalem Karzinom vorhersagen als die UICC-Stadieneinteilung.

Kaplan-Meier Überlebenskurven stellen die kumulierte Überlebensrate von Patienten mit kolorektalem Karzinom nach UICC Stadien (A) sowie nach UICC-Stadien und der Dichte an CD3+ und CD45RO+ Zellen im Tumor (>Median = hi, dünne Linien; <Median = lo, dicke Linien; B). CT: center of tumor; Tumorzentrum, IM: invasive margin; Tumorperipherie. **P < 0,0001, ns = nicht signifikant (nach Galon 2006).

Mittlerweile belegen viele Studien an verschiedenen Tumortypen, dass Komponenten des Immunsystems im Tumorgewebe mit der klinischen Prognose korrelieren. In Abbildung 1.5 sind die Ergebnisse von 124 publizierten Artikeln zur Rolle verschiedener T-Zellsubpopulationen für das Überleben zusammengefasst (Fridman 2012). Bei allen untersuchten Tumoren mit Ausnahme des RCC haben die CD8+ T-Zellen den größten positiven prognostischen Effekt. Eine starke lymphozytäre Infiltration korreliert dabei mit einem besseren Überleben. Im Gegensatz dazu haben die immunsuppressiven Tregs oftmals einen negativen Einfluss auf das Patientenüberleben. Es sind aber auch positive Korrelationen oder keine Korrelationen beschrieben.

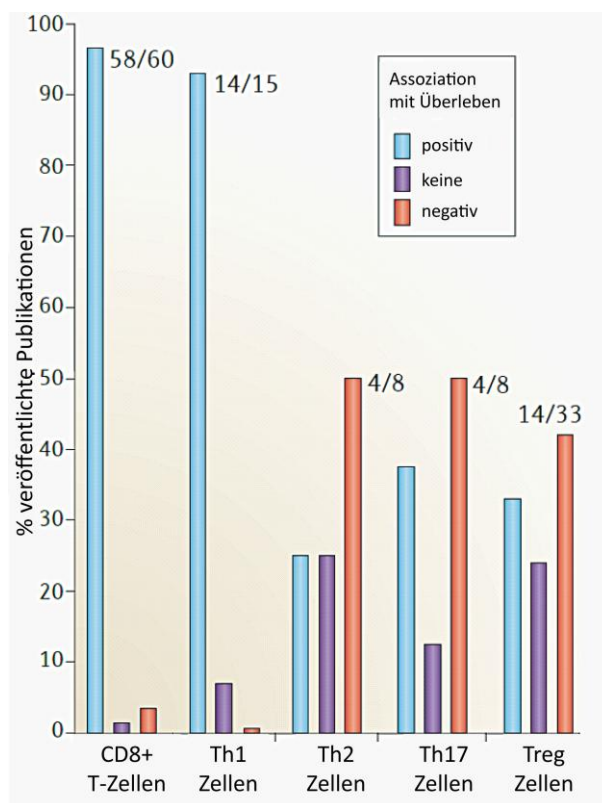


Abbildung 1.5. Zusammenfassung von 124 Artikeln zum Effekt von verschiedenen T-Zellsubpopulationen auf das Patientenüberleben (nach Fridman 2012).

Dargestellt ist die Bedeutung verschiedenen T-Zelltypen bezüglich der Krebsprognose in insgesamt 20 verschiedenen Tumortypen. Es wurden die zytotoxischen T Zellen (CD8+CD45RO+), die T-Helfer-Zellen (Th1, Th2 und Th17) und die T-regulatorischen Zellen (Treg) berücksichtigt. Hellblau bedeutet einen positiven Effekt der jeweiligen Zellpopulation aufs Überleben, rot einen negativen und lila keine Korrelation.

Auch die NK-Zellen wurden auf eine mögliche prognostische Rolle untersucht, zeigten aber unterschiedliche Ergebnisse, je nachdem welcher Marker für ihre Identifikation verwendet wurde. So korrelierten NK-Zellen, die über CD57 identifiziert wurden, positiv mit dem Überleben, z. B. beim kolorektalen Karzinom (Coca 1997), beim Bronchialkarzinom (Villegas 2002) und beim hepatozellulären Karzinom (Zhu 2009), während NK-Zellen, die über NKp46 nachgewiesen wurden, keine Korrelation mit dem Überleben zeigten (untersucht beim Bronchialkarzinom; Platonova 2011). Dies zeigt eine Problematik bei der Analyse des Immunzelinfiltrats auf, nämlich die Verwendung bestimmter Marker für die Identifizierung. Diese können durch das Gewebemilieu verändert sein und daher zu unterschiedlichen Aussagen führen (s. auch Kapitel 1.1.2 und Zielsetzung).

1.5. Immunzellinfiltrat im Nierenzellkarzinom

Beim RCC wurde dem Immunzellinfiltrat schon seit Jahrzehnten klinisches Interesse gewidmet. Denn das RCC gilt als immunogen, weil Spontanremissionen und Ansprechen auf systemische Immunmodulation (IL-2, IFN- γ) schon lange erkannt waren (Autorino 2010, Janiszewska 2013). Allerdings zeigte sich interessanterweise im Gegensatz zu anderen Tumortypen keine Korrelation zwischen der Infiltration von zytotoxischen T-Zellen und dem Überleben (Nakano 2001, Remark 2012). Dagegen zeigte sich eine positive Korrelation zwischen NK Zellen und Überleben in verschiedenen Analysen, wobei NK-Zellen entweder über CD57 (Donskov 2006) oder über die Kombination CD3-CD56+ (Eckl 2012) quantifiziert wurden.

Mit der Beobachtung, dass beim RCC keine positive Korrelation von CD8+ T-Zellen mit dem Überleben besteht, setzt sich das RCC von den übrigen untersuchten Tumortypen ab, insbesondere weil das RCC ein reichliches Immunzellinfiltrat hat, welches unter anderem T-Zellen, NK-Zellen, Makrophagen und DZ beinhaltet. Für die T-Zellen ist weiterhin bekannt, dass zumindest einige davon tumorspezifische Antigene erkennen und Tumorzellen eliminieren können, wenn sie aus dem Tumor isoliert und in vitro kultiviert werden (Jantzer und Schendel 1998; Leisegang 2010). Jedoch ist das Immunzellinfiltrat im Tumor nicht in der Lage, das RCC erfolgreich zu bekämpfen. Eine Erklärung ist, dass die tumor-infiltrierenden Lymphozyten funktionelle Defizite in Zytotoxizität und Zytokinproduktion haben. Dies wurde u.a. von Prinz et al gezeigt (Prinz 2012 und 2014). Diese Defizite können jedoch ex vivo korrigiert werden (z. B. nach Kultivierung mit IL-2). Das impliziert eine lokale funktionelle Behinderung durch das Tumormilieu (Prinz 2012).

Auch die NK-Zellen sind in ihrer Funktion behindert, teilweise durch die gleichen Mechanismen wie die zytotoxischen T-Zellen (Prinz 2014). Jedoch gibt es Hinweise, dass sie eine besondere Bedeutung bei der Kontrolle des RCC haben können (Schleypen 2006, Eckl 2012, Remark 2012).

2. Zielsetzung der Arbeit

Das Nierenzellkarzinom ist reich mit Immunzellen infiltriert, unter anderem mit zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen. Eine Rolle von den CD8⁺ T-Zellen bei der Tumorabwehr ist mittlerweile für verschiedene Tumoren gezeigt (s. Abs. 1.4). Für die NK-Zellen gilt das Gleiche bei den hämatologischen Tumoren, jedoch ist ihre Rolle bei soliden Tumoren umstritten, v. a. bedingt durch die Schwierigkeit, NK-Zellen in soliden Tumoren eindeutig nachzuweisen. Interessanterweise scheinen die CD8⁺ T-Zellen beim RCC keine Korrelation mit dem Überleben zu haben, während die NK-Zellen mit einer guten Prognose assoziiert werden.

Um die Rolle der NK- und T-Zellen im RCC-Gewebe besser zu verstehen, sollten diese im Tumorgewebe, also dort wo sie ihre antitumorale Funktion ausüben sollen, detaillierter untersucht werden. Dazu musste zunächst für die NK-Zellen eine histologische Nachweismethode etabliert werden. Weil Einzelmarker, wie CD56 und CD57, keine exakte Unterscheidung von anderen Immunzellen zulassen und andere Marker, wie NKp44 oder NKp46, durch Gewebemilieufaktoren in ihrer Expression beeinflusst werden (siehe Kapitel 1.1.2), wurde eine Zwei-Marker-Kombination als Fluoreszenzfärbung am Gewebeschnitt in Betracht gezogen. Für die Etablierung und Validierung der Methode standen RCC-Gewebe zur Verfügung, für welche das NK-Zellinfiltrat in parallel gewonnenen Zellsuspensionen per Durchflusszytometrie nach der klassischen Doppelfärbung CD3εCD56 bereits quantifiziert worden war.

Die neu etablierte Methode sollte dann weiterführend verwendet werden, um die regionale Verteilung der NK- und T-Zellen zusammen mit qualitativen Markern gleichzeitig in einem Gewebeschnitt darzustellen. Ziel war es, die scheinbar größere prognostische Bedeutung der NK-Zellen gegenüber den CD8⁺ T-Zellen besser zu verstehen. Insbesondere wurden zwei Hypothesen näher untersucht, eine beziehend auf die zytotoxische Qualität der T und NK-Zellen, die andere hinsichtlich der Erreichbarkeit der Tumorzellen durch die beiden Zellpopulationen. Bezüglich der zytotoxischen Qualität gibt es Hinweise, dass viele CD8⁺ T-Zellen im RCC kein Perforin haben, während NK-Zellen, hauptsächlich aus RCC mit

günstiger Prognose, einen besseren Funktionsstatus haben (Prinz 2012, 2014). Hinsichtlich der Erreichbarkeit ist bekannt, dass das Tumorendothel durch Verlust von Adhäsionsmolekülen die Extravasation von T-Zellen behindert (Griffioen 1996, Buckanovich 2008). Für die NK-Zellen ist diesbezüglich nichts bekannt. Um die Hypothesen zu untersuchen, wurden die lokoregionäre Verteilung und der Perforingehalt der Lymphozytensubpopulationen im RCC in Relation zu den Gefäßen bestimmt. Die gewonnenen Daten wurden mit löslichen (Chemokine, Zytokine) und zellulären Tumormilieufaktoren verglichen. Die neu erarbeiteten Daten wurden zudem mit bekannten klinisch-pathologischen und Follow-up-Daten korreliert, um eine Assoziation mit der Tumorentwicklung und der klinischen Prognose aufzudecken.

3. Material

3.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Name	Hersteller
6µ-Kapillarplatte	Ibidi, München
Aquatex Eindeckmittel	VWR International, Darmstadt
Axio Vert.A1-Mikroskop	Zeiss, Oberkochen
Bestrahlungsanlage HWM-D-200, (Strahlungsquelle: 137 Cäsium)	GammaCell 40, Ottawa, Kanada
Brutschrank (Zellkultur)	Heraeus Instruments, Hanau
Deckgläschen	IDL, Nidderau
Einmalpipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml und 25 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Eppendorfcentrifuge (Galaxy) Ministar	Eppendorf, Hamburg
Glas-Becherglas	Duran, Mainz
Heizblock BT 130-2	HLC Biotech, Bovenden
Immu-Mount	Thermo Scientific, MA, USA
Kryostat	Leica Jung CM 3000
Laserscanning System TCS SP2	Leica Microsystems, Heidelberg
Laserscanning System TCS SP5	Leica Microsystems, Heidelberg
Lichtmikroskop (Leica DMLS)	Leica Microsystems, Heidelberg
Magnetrührer IKA Color	Hytrel
Mehrloch-Platten (24-Loch)	Becton Dickinson (BD), Heidelberg/Nunc, Wiesbaden /TPP, Trasadingen, Schweiz
Messbecher (100 ml, 800 ml)	Duran, Mainz
Milli-Q®-Reinwasserherstellungssystem	Millipore, Schwalbach
Nagellack	Rival de Loup, Berlin
Neubauer-Zählkammer	GLW, Würzburg
Pasteurpipetten	Peske OHG, München
Pipetten 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg

Polypropylen Röhrchen (5 ml mit Deckel)	Becton Dickinson, Heidelberg
Pipettenspitzen	Eppendorf/Gilson
Reagenzröhrchen (15 ml und 50 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Reaktionsgefäße (0,5 µl; 1,5 µl; 2 µl)	Eppendorf, Hamburg
Schüttler	Heidolph, Schwabach
Sterilbank, Laminar Flow	BDK, Sonnenbrühl-Genkingen
Sterilfilter 0,22µm	Millipore, Schwalbach
Sudefrost® Plus Objektträger	Menzel, Braunschweig
Zellkulturflaschen (25/75/175 cm ²)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Vectashield	Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching
Waage PC440	Mettler, Gießen
Wasserbad	Köttermann Labortechnik, Uetze

3.2 Chemikalien und fertige Lösungen

Name	Hersteller
2 N Salzsäure	Merck, Darmstadt
3-Amino-9-Ethyl-Cabazol (AEC)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Aceton	Merck, Darmstadt
Aqua ad injectabilia, Braun	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Aquatex	Merck, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Destilliertes Wasser	Millipore, Schwalbach
Dimethylformamid (DMF)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Fixogum	Science Services, München

Fötale Kälberserum (FCS)	Invitrogen, Karlsruhe
H ₂ O ₂	Merck, Darmstadt
Hämalaun	Merck, Darmstadt
HEPES	Invitrogen, Karlsruhe
Humanserum (verschiedener gesunder Spender)	IMI, Helmholtz Zentrum München
Immersionsöl Type F 1,512	Leica Microsystems, Wetzlar
Immunomount	GeneTex, CA USA
Bovines Kollagen I 3mg/ml	Nutacon, Leimuiden
L-Glutamin 200 mM	Invitrogen, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
Naphthol AS-BI-Phosphat	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Natriumacetat (3H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Natriumbicarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid, 0,1 M	Merck, Darmstadt
Natriumnitrit	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat 100 mM	Invitrogen, Karlsruhe
Neufuchsin	Merck, Darmstadt
Normales 2,5% Pferdeserum	Vector Laboratories, CA, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin 100 x	Invitrogen, Karlsruhe
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Invitrogen, Karlsruhe
Rekombinantes humanes IL-2 (Proleukin)	Cancernova GmbH, Reute
RPMI 1640 ohne L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Tetramisohydrochlorid	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Trishydroxy(methyl-)aminomethan 0,1 M	Merck, Darmstadt
Trypanblau ICN	Biomedicals GmbH
Trypsin-EDTA (10x)	Invitrogen, Karlsruhe

3.3 Lösungen und Puffer

Name	Zusammensetzung
Paraformaldehydlösung	2% (w/v) PFA (in PBS)
Antikörperversdünnungslösung	12,5% Humanserum (in PBS)
BSA-Blockierungslösung	2% Bovines Serumalbumin (gelöst in PBS)
DAPI-Stocklösung	5 mg DAPI/ml in Aqua ad injectabilia
DAPI-Gebrauchslösung	150 µg/ml DAPI (3 µl Stocklösung) 2x SSC-Puffer (10 ml) zu Aqua ad injectabilia (90 ml)
20x SSC-Puffer	0,3 M Natriumcitrat 2x H ₂ O (8,82 g) 3 M Natriumchlorid (17,83 g) zu Aqua ad injectabilia (100 ml) → pH-Wert 7,0 (mit 1 N Salzsäure)
AP-Puffer für APAAP-Färbung	12,1 g Trishydroxy(methyl-)aminomethan 5,84 g Natriumchlorid Zu 1 l Aqua ad injectabilia
Entwicklungspuffer für APAAP-Färbung	1,21 g Trishydroxy(methyl-)aminomethan 5,85 g Natriumchlorid Zu 1 l Aqua ad injectabilia
Neufuchsin-Lösung für APAAP-Färbung	5 g Neufuchsin Zu 100 ml 1M HCl
APAAP-Entwicklungslösung	A) 20 mg Tetramisolhydrochlorid 12,5 ml AP-Puffer 35 ml Entwicklungspuffer B) 20 mg Natriumnitrit 250 µl Aqua ad injectabilia 100 µl Neufuchsin-Lösung C) 25 mg Naphthol AS-BI-Phosphat 300 µl DMF In der Reihenfolge zusammen pipettieren
Peroxidaseblockierungslösung	1 ml Methanol 1 ml 30% H ₂ O ₂ 8 ml PBS
Acetat-Puffer für Peroxidase-Färbung	10,75 g Natriumacetat (3H ₂ O) zu 1,21 ml Essigsäure
Peroxidase-Substratlösung	A) 16 mg AEC

	4 ml DMF B) 46 ml Acetat-Puffer 60 µl H ₂ O ₂ Dann zusammen pipettieren
--	--

3.4 Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbungen

3.4.1 Primäre Antikörper

Antigen	Spezies/Isotyp	Klon	Hersteller	Verdünnung
CD3ε	Maus IgG2a	OKT3	Biolegend	1:500
CD3ζ	Maus IgG1	8D3	BD Biosciences	1:500
CD31 (PECAM-1)	Maus IgG1	JC/70A	Dako	1:300
CD31 (PECAM-1)	Kaninchen monoklonal	EPR3094	Epitomics	1:200
CD8	Kaninchen polyklonal	SP16	Thermo Scientific	1:70
Perforin	Maus IgG2b	δG9	BD Biosciences	1:100

3.4.2 Sekundäre Antikörper für die Immunfluoreszenzhistologie

Antigen	Spezies/Isotyp	Kreuzreaktion	Fluoreszenz	Hersteller	Verdünnung
Maus IgG1	Ziege	Maus IgM/IgA, gepooltes Humanserum	AlexaFluor A488	Invitrogen	1:500
Maus IgG1	Ziege	Maus IgM/IgA, gepooltes Humanserum	AlexaFluor A647	Invitrogen	1:500
Maus IgG2a	Ziege	Maus IgM/IgA, gepooltes Humanserum	AlexaFluor A568	Invitrogen	1:500
Maus IgG2b	Ziege	Maus IgM/IgA, gepooltes Humanserum	AlexaFluor A488	Invitrogen	1:500
Kaninchen polyklonal	Ziege	Rind IgG, Ziege IgG, Maus IgG, Ratte IgG and humanes IgG	AlexaFluor A647	Invitrogen	1:100
Kaninchen polyklonal	Esel	Maus	Rhodamine-Red-X	Invitrogen	1:300

3.5 Antikörper für die Immunhistochemie

3.5.1 Primäre Antikörper

Antigen	Spezies/Isotyp	Klon	Hersteller	Verdünnung
CD14	Maus IgG1	RMO52	Immunotech	1:100
CD209	Maus IgG2b	DCN46	BD Biosciencies	1:100
CD3	Maus IgG1	UCHT-1	Sigma Aldrich	1:500
CD8	Maus IgG2a	UCHT-4	Sigma	1:50
FOXP3	Maus IgG1	259D	Biolegend	1:50
PD-1	Maus IgG1	MIH4	BD Biosciencies	1:50
Perforin	Maus IgG2b	δG9	BD Biosciencies	1:100
TIA/GMP17	Maus IgG1	2G9A10F5	Beckmann Coulter	1:1000

3.5.2 Sekundäre Antikörper für die Immunhistochemie

Antigen	Spezies/Isotyp	Hersteller	Verdünnung
Maus (Brücke)	Kaninchen, polyklonal	Dako	1:20
Kaninchen (APAAP)	Maus	Dako	1:40

3.6 Zelllinien

Zellen	Charakteristika	Medium	Herkunft
KT-195	humane Nierenzellkarzinomzelllinie, HLA-A2-negativ	RCC-Medium	DKFZ, Heidelberg
ZTL Klon JB4	humane klonale ZTL-Linie, allo-HLA-A2-reaktiv	T-Zell-Medium	IMI, Helmholtz Zentrum München
RCC-26	humane Nierenzellkarzinomzelllinie, HLA-A2-positiv	RCC-Medium	IMI, Helmholtz Zentrum München

PBMZ (periphere Blut mononukleäre Zellen)	isoliert aus Vollblutproben		Gesunde Spender
B-LCL-LAZ388	Epstein-Barr-Virus transformierte lymphoblastoide Zelllinie	LCL-Medium	Mackenson, A.

3.7 Medien

Name	Zusammensetzung
RPMI-Basis-Medium	RPMI 1640 (GibcoBRL) 2 mM L-Glutamin 1 mM Natriumpyruvat 1 mM nicht essentielle Aminosäuren
RCC-Medium	RPMI-Basis-Medium 12% Fötales Kälberserum
T-Zell-Medium	RPMI-Basis-Medium 7,5% Fötales Kälberserum 7,5% Humanserum
Glukosefreies Medium	RPMI-Basis-Medium ohne Glukose 7,5% Fötales Kälberserum (dialysiert) 7,5% Humanserum
T-Zell-Medium mit 2-Desoxyglukose	RPMI-Basis-Medium ohne Glukose 7,5% Fötales Kälberserum 7,5% Humanserum 2-Desoxyglukose (20 g/l)
RCC-Medium mit essentiellen Aminosäuren	RPMI-Basis-Medium 12% Fötales Kälberserum Essentielle Aminosäuren (1:100)

RCC-Medium mit Glukose	RPMI-Basis-Medium 12% Fötale Kälberserum Glukose (2 g/l)
-------------------------------	--

3.8 Software

Name	Zusammensetzung
Carmaweb	Bioinformatics Graz, Österreich
Graphpad Prism	GraphPad Software, Inc., CA USA
ImageJ	National Institutes of Health, MA USA
LAS AF Lite	Leica Microsystems, Heidelberg

3.9 Kits

Name	Zusammensetzung
Impress Reagent Kit	Vector Laboratories, CA, USA

3.10 Patientenmaterial

Durch Kooperation mit der Urologischen Klinik und Poliklinik im Klinikum Großhadern sowie der Urologischen Klinik Dr. Castringius in München Planegg wurden Nierenzellkarzinomgewebe von frisch operierten Patienten erhalten, die keine onkologische Systemtherapie bekommen haben. Histopathologisch waren alle Nierenkarzinomgewebe vom klarzelligen Typ. Nicht-tumor befallenes Nierengewebe (NKC) wurde von makroskopisch beurteilten tumorfreien Arealen aus dem Nierenresektat der gleichen Patienten gewonnen. Dieses wurde später histologisch geprüft und als tumorfrei befundet. Die Gewebe wurden binnen 30 Minuten nach Entnahme schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Die Gewebeentnahme und -nutzung wurde nach Aufklärung und Einwilligung der Patienten mit Genehmigung der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der LMU

durchgeführt. Die Patientencharakteristika sind in Tabelle 3.1 aufgeführt. Von dem Tumor der Patienten 3093 und 2869 wurden jeweils zwei makroskopisch voneinander getrennt liegende Gewebestücke aus dem RCC entnommen (I + II) und vergleichend analysiert.

Tabelle 3.1. Patientendaten

Patient-ID ¹	Geschlecht ²	Alter	OP-Datum	TNMG-Klassifikation ³	UICC Stadium ³	Überleben ⁴
3109	m	67	11.08.2004	pT1b pN0M0 G2	I	TaU (85)
3073*	w	61	19.02.2004	pT1a pN0M0 G2	I	L (103)
3074*	w	66	25.02.2004	pT1b pN0M0 G2	I	L (104)
2864*	m	68	12.11.2001	pT3b pN0M0 G2	III	L (132)
3093	m	68	01.06.2004	pT3b pN0M0 G2	III	T (34)
3108	m	59	02.08.2004	pT3b pNxM0 G2	III	L (97)
3242*	m	49	07.05.2007	pT2 pN0M0 G2	II	k. D.
2863	m	47	08.11.2001	pT1b pN0M0 G2	I	T (35)
T16*	w	69	18.03.2002	pT1 pNxM0 G2	I	L (126)
2901	m	83	16.01.2002	pT2 pN0M0 G2	II	L (103)
2869*	w	80	13.11.2001	pT3b pN2M0 G2	IV	T (76)
2988	m	61	04.07.2003	pT3b pN2M1 G3	IV	T (12)
2916	m	73	15.03.2002	pT3c pN0M1 G2	IV	T (27)
2890*	m	68	09.01.2002	pT3b pN0M1 G2	IV	T (48)
2885*	w	80	17.12.2001	pT1 pN0M1 G3	IV	T (83)
3272	w	57	07.04.2008	pT2 pNxM1 G3	IV	T (3)
3279	w	72	02.07.2008	pT3b pN0M0 G3	III	T (12)
T50*	w	64	19.05.2009	pT3b pN1M1 G2	IV	k.D.
T66	m	61	28.07.2010	pT3a pN0M1 G3	IV	k.D.

¹Patienten-Identifikationsnummer vom Tumorregister München. Es wurden nur klarzellige RCC untersucht. Für die Tumoren T16, T50 und T66 ist die Patientenidentifikationsnummer unbekannt; sie sind mit der Arbeitsgruppen-internen Kodierung gekennzeichnet. * = Tumor, dessen korrespondierende Nichttumorniere mituntersucht wurde

² Geschlecht: m = männlich, w = weiblich

³ TNMG-Klassifikation: T = Tumorausbreitung, N = Lymphknotenbefall, M = Fernmetastasen, G = Grad der histologischen Differenzierung. Klassifikation und Stadiengruppierung der Tumoren nach den Richtlinien der Union Internationale Contre le Cancer (UICC). S. auch Tabelle 1.3

⁴ Überleben: L = lebend, T = Tod durch Nierenkrebs, TaU: Tod aus anderer Ursache, k.D. = keine Überlebensdaten vorhanden, in Klammern: Anzahl der überlebten Monate vom Tag der Operation bis zum letzten Follow-up Juni 2013

4. Methoden

4.1 Arbeiten mit Gewebe

4.1.1 Immunhistochemie

4.1.1.1 Prinzip

Als Immunhistochemie bezeichnet man die Untersuchung von Geweben mit immunchemischen Methoden. Der Nachweis beruht auf der Affinität eines Antikörpers zu einer bestimmten Gewebeeigenschaft (Epitop) als Antigen-Antikörper-Reaktion. Im Idealfall kommt es zu einer spezifischen und starken Bindung zwischen Antikörper und Epitop. Der Antikörper wird von einem sekundär-Antikörper erkannt, an welchem ein Enzym gekoppelt ist, welches ein Substrat in eine farbige Substanz umsetzt und somit das Vorhandensein des Antikörpers im Präparat sichtbar macht.

4.1.1.2 Gewebefärbung mit der APAAP-Methode

Unter der APAAP-Methode versteht man die Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Methode. Das Besondere dieser Methode ist die Verwendung eines Brückenantikörpers zwischen primären und sekundären Antikörper. So können mehrere Moleküle des sekundären Antikörpers vom Brückenantikörper gebunden werden, so dass das Farbsignal verstärkt wird.

Kryokonservierte Gewebe wurden zu 5 µm dicken Schnitten mit einem Kryostat geschnitten, auf Superfrost® Plus Objektträger aufgetragen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Die Schnitte wurden in eisgekühlter 100% Azetonlösung 10 Minuten lang fixiert und anschließend mit Fixogum (Fettstift) umrandet, um die lokal begrenzte Applikation von flüssigen Lösungen auf dem Präparat zu ermöglichen. Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wurden die Gewebeschnitte mit 2% BSA in PBS für 20 Minuten blockiert. Dann wurden die Schnitte mit den primären Maus-anti-human Antikörpern, z. B. gegen CD3ε, CD8, Perforin, FOXP3, PD-1, CD14 oder TIA/GMP-17 (Konzentrationen s. Material) jeweils auf separaten Schnitten für eine Stunde inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde der Brücken-

Antikörper anti-Maus für 30 Minuten aufgetragen. Im Anschluss wurden die Schnitte mit dem APAAP-AK (Alkalische Phosphatase anti-Alkalische Phosphatase) für 30 Minuten inkubiert. Die Inkubationen mit dem Brücken- und dem APAAP-Antikörper wurden noch einmal wiederholt, diesmal jeweils für 15 Minuten. Alle Antikörper waren in 12,5% Humanserum in PBS verdünnt. Vor der Fortsetzung der Färbung wurde die APAAP-Entwicklungslösung angesetzt (Zusammensetzung s. Material). Anschließend wurden die Objektträger in eine mit der APAAP-Entwicklungslösung gefüllten Glasküvette getaucht und für 20 Minuten auf einem Schüttler inkubiert. Nach einem Waschschrift mit destilliertem Wasser in der Küvette wurden die Schnitte mit Hämalaun gegengefärbt und kurz in destilliertem Wasser geschwenkt. Zum Schluss wurden die Präparate für 10-15 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut und mit dem Eindeckmedium Immunomount® mit einem Deckglas eingedeckt und die Ränder mit Nagellack verklebt. Die Objektträger wurden bei Raumtemperatur dunkel bis zu ihrer Bewertung aufbewahrt.

4.1.1.3 Gewebefärbung mit der ImmPRESS-(Peroxidase-Anti-Peroxidase)-Methode

Kryokonservierte Gewebe wurden zu 5 µm dicken Schnitten mit einem Kryostat geschnitten und auf Superfrost® Plus Objektträger aufgetragen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Die Schnitte wurden in eisgekühlter 100% Azetonlösung 10 Minuten lang fixiert und anschließend mit Fixogum (Fettstift) umrandet. Anschließend wurden die Gewebeschnitte mit Peroxidaseblockierungslösung für 5 Minuten und mit 2,5% Pferdeserum für 20 min geblockt. Nach einem Waschschrift erfolgte die Inkubation mit dem primären Maus-anti-human-Antikörper gegen CD209 für zwei Stunden. Nach erneutem Waschen wurde das Immpress™ Agent aufgetragen. Vor der Fortsetzung der Färbung wurde die Peroxidase-Substratlösung angesetzt und die Objektträger für 15 Minuten in eine mit der Lösung gefüllten Küvette getaucht. Nach einem Waschschrift mit PBS in der Küvette wurden die Schnitte mit Hämalaun für 30 Sekunden gegengefärbt und kurz in destilliertem Wasser geschwenkt. Zum Schluss wurden die Präparate für 10-15 Minuten unter fließendem

Leitungswasser gebläut und mit dem Eindeckmedium Aquatex® und einem Deckglas eingedeckt. Die Objektträger wurden bei Raumtemperatur bis zu ihrer Auswertung aufbewahrt.

4.1.1.4 Mikroskopische Analyse

Die Gewebeschnitte wurden mit einem Leica DMLS Lichtmikroskop analysiert. Für jeden Marker wurden die positiv gefärbten Zellen pro Gesichtsfeld bei insgesamt 400facher Vergrößerung (40x Objektiv x 10x Okular) ausgezählt (= HPF/high power field). Aus der Anzahl positiver Zellen in zehn nicht-überlappenden ausgezählten HPF wurde dann der Median aller HPF gebildet. Zur Quantifizierung der Lymphozytenverteilung wurden im RCC Bilder mit großen Lymphozytenansammlungen (Lymphozytenclustern), nekrotische sowie beschädigte Areale nicht berücksichtigt. Beim NKC wurden nur die tubulo-interstitiellen Bereiche des Nierengewebes ausgewertet, weil diese das Ausgangsgewebe des Nierenzellkarzinoms sind. Glomeruli wurden demzufolge von der Auswertung ausgeschlossen.

4.1.2 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

4.1.2.1 Prinzip

Mit der Immunfluoreszenztechnik werden im Präparat gebundene AK mithilfe von Fluoreszenzemission mikroskopisch sichtbar gemacht. Die Bildaufnahme erfolgte mit einem konfokalen Laser-scanning Mikroskop (TCS-SP5 von Leica). Das Mikroskop war mit zwei Helium-Neonlasern (633 nm bzw. 561 nm), einem Diodenlaser (405 nm) und einem Argonkryptonlaser (488 nm) ausgestattet. Anhand dieser Ausstattung ist es möglich bis zu vier Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig zu analysieren. So kann beispielsweise bestimmt werden, in welchem Gewebe verschiedene Proteine vorhanden sind und sogar in welchem Kompartiment der Zelle sie lokalisiert sind. Ein wesentlicher Vorteil gegenüber der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie besteht darin, dass das Fluoreszenzsignal nur aus

einer optischen Ebene gemessen wird und Signale aus anderen optischen Ebenen ausgeblendet werden. Es können mehrere optische Ebenen hintereinander aufgenommen und nachher zusammengesetzt werden. Damit kann man ein räumliches Bild erzeugen, um die räumliche Verteilung und die Kolo-kalisation von Markern zu bestimmen. Die Immunmarkierung kann entweder direkt oder indirekt erfolgen. Bei der direkten Methode besitzt der gegen den zu untersuchenden Marker gerichtete Antikörper (primärer Antikörper) ein Fluorochrom, während bei der indirekten Methode das Fluorochrom durch einen zweiten Antikörper (sekundären Antikörper), der gegen den primären Antikörper gerichtet ist, eingebracht wird.

4.1.2.2 Gewebefärbung

Kryokonservierte Gewebe wurden zu 5 µm dicken Schnitten mit einem Kryostat geschnitten und auf Superfrost® Plus Objektträger aufgetragen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Die Schnitte wurden in eisgekühlter 100% Azetonlösung 10 Minuten lang fixiert und anschließend mit Fixogum (Fettstift) umrandet, bevor sie mit 2% BSA in PBS für 20 Minuten blockiert wurden. Dann wurden die Schnitte mit primären Antikörpern in 2 Kombinationen für eine Stunde inkubiert: 1) Maus-anti-human CD3 ϵ (IgG2a), Maus-anti-human CD3 ζ (IgG1) und Kaninchen-anti-human CD31/PECAM-1 (polyklonal); 2) Maus-anti-human CD31 (IgG1), Maus-anti-human Perforin (IgG2b) und Kaninchen-anti-human CD8 (polyklonal) (s. Kapitel 3.5 und Tabelle 4.1). Nach dreimaligem Waschen in PBS erfolgte die Inkubation für 45 Minuten mit den sekundären Antikörpern entsprechend den primären Kombinationen: 1) anti-Kaninchen-AlexaFluorA647, anti-Maus-IgG1-AlexaFluorA488, anti-Maus-IgG2a-AlexaFluorA568; 2) anti-Maus-IgG2b-AlexaFluorA488, anti-Kaninchen-Rhodamine-RedX und anti-Maus-IgG1-Alexa FluorA647 (s. Kapitel. 3.5 und Tabelle 4.1). Die sekundären Antikörper waren so gewählt, dass sie keine Kreuzreaktivität untereinander und mit den primären Antikörpern zeigten. Alle Antikörper waren in 12,5% Humanserum in PBS verdünnt. Nach erneuter kurzer Fixation mit 4% PFA für 10 Minuten und nukleärer Anfärbung durch Eintauchen in einer Küvette mit DAPI-Lösung für eine Minute wurden die Präparate mit

dem Eindeckmedium Vectashield® eingedeckt und die Ränder mit Nagellack verklebt. Die Objektträger wurden dann bis zur mikroskopischen Auswertung bei -20°C aufbewahrt.

Tabelle 4.1. Färbekombinationen für die konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Primäre Antikörper Kombination	Sekundäre Antikörper	Analyse
CD3ζ Maus anti-human IgG1	anti-Maus-IgG1-A488	Verteilung der T- und NK-Zellen im RCC und NKC
CD3ε Maus anti-human IgG2a	anti-Maus-IgG2a-A568	
CD31 Kaninchen anti-human	anti-Kaninchen-A647	
CD8 Kaninchen anti-human	anti-Kaninchen-RRX	Perforingehalt der zytotoxischen T-Zellen im RCC und NKC
Perforin Maus anti-human IgG2b	anti-Maus-IgG2b-A488	
CD31 Maus anti-human IgG1	anti-Maus-IgG1-A647	

4.1.2.3 Mikroskopische Analyse

Die Bilder wurden mit dem konfokalen Laserscanning Fluoreszenzmikroskop TCS SP5 mit dem Objektiv HCX PL APO CS 40x1.30 Ölimmersion (400fache Vergrößerung) aufgenommen. Die Detektion der Emissionen der kombinierten Fluorochrome erfolgte über getrennte PMT-Einheiten oder HyD-Einheiten. Durch die Regelung des Wellenlängenbereiches der Aufnahme Fenster entsprechend den Absorptions- und Emissionskurven der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe wurde das Überstrahlen einer Fluoreszenz in jeweils andere Fluoreszenzkanäle ausgeblendet. Zusätzlich wurden die vier verwendeten Fluoreszenzmoleküle in zwei Paaren nicht überstrahlender Fluoreszenzen im sequentiellen Modus aufgenommen. Um die räumliche Ausdehnung zu erfassen, wurden jeweils mehrere optische Schnittebenen in der z-Dimension (z-Stacks; Abstand 0,6 µm) aufgenommen. Die Intensitäten einzelner Fluoreszenzfarbstoffe wurden in der Bildbearbeitung durch ausgewählte Farben dargestellt. Liegen zwei Oberflächenproteine, die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert wurden, räumlich eng nebeneinander (Kokalisation), kommt es zur Überlagerung der für die Darstellung verwendeten Farbsignale. Die Überlagerung wird durch die Mischfarbe der entsprechenden Farben optisch sichtbar. Die Bearbeitung der in dieser Arbeit verwendeten Bilder erfolgte nur durch

Veränderungen des Kontrasts und/oder der Helligkeit des gesamten Bildes mittels der Leica LAS AF Software.

4.2 Zellkultur

4.2.1 Allgemein

Alle Arbeitsschritte wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C und 6,5% CO₂ kultiviert.

4.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Dazu wurde zunächst ein bestimmtes Volumen der Zellsuspension mit Trypanblau verdünnt. Trypanblau kann nur die Plasmamembran toter Zellen überwinden, wodurch die toten Zellen bläulich schimmern und von den lebenden unterschieden werden können. Die Zellen der vier Großquadrate wurden jeweils ausgezählt und der Mittelwert bestimmt. Das Volumen zwischen Deckglas und Neubauer Zählkammer beträgt 0,1 µl. Multipliziert man die ermittelte Zellzahl pro Großquadrat mit 10⁴ und dem Verdünnungsfaktor 10, erhält man die Zellzahl pro ml.

4.2.3 Kultivierung von adhärenenten Zellen

Adhärenent wachsende Zellen (wie die Tumorzelllinie KT-195) wurden in Zellkulturflaschen mit Filterdeckel (T175 mit 175 cm² Adhärenzfläche) in 25 ml des für die Zellen jeweils optimalen Kulturmediums kultiviert. Das Medium wurde alle drei bis vier Tage ausgewechselt. Dazu wurde das alte Medium mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgesaugt und 25 ml frisches Medium zu den Zellen gegeben. Wurde mikroskopisch ein konfluenten Zellrasen ermittelt (80 % bis 100 % Zellkonfluenz), so war es nötig die Zellen zu splitten, um ein Überwachsen zu verhindern. Dabei wurde zunächst das Medium vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit 10 ml PBS gespült, um noch verbleibende Medienreste sowie tote Zellen, die nicht mehr am Zellkulturboden angeheftet waren, zu entfernen. Anschließend wurden 2 ml Trypsin-EDTA-

Lösung zu den Zellen gegeben und für ca. 2 bis 5 min inkubiert. Dabei wurde die Zellkulturflasche immer wieder leicht geschwenkt, um die Trypsin-EDTA-Lösung gleichmäßig zu verteilen. EDTA komplexiert zweiwertige Kationen, v.a. Kalzium, welches für die Salzbrücken der Zellen mit der Anheftefläche nötig ist. Trypsin spaltet die Bindeproteine zwischen Zelle und Substrat. Konnte mikroskopisch ein Lösen der Zellen von der Zellkulturflasche festgestellt werden, so wurden 10 ml Zellkulturmedium zu den Zellen gegeben. Das im Medium enthaltene FKS inaktiviert das Trypsin und stoppt somit die Ablösereaktion. Anschließend wurde ein Teil der Zellsuspension entfernt und je nach Bedarf auf mehrere Flaschen aufgeteilt oder verworfen bzw. eingefroren. Die zur weiteren Kultur in der Kulturflasche verbliebene Zellsuspension wurde mit entsprechendem Medium auf 25 ml aufgefüllt.

4.2.4 Kultivierung des T-Zell-Klons JB4

ZTL-Klone müssen regelmäßig stimuliert werden, um eine kontinuierliche Funktion und Proliferation zu erzielen. Diese Stimulation erfolgt durch die Kultivierung der Zellen mit anderen Zellen, welche einerseits ein für die T-Zellen nötiges Zytokinmilieu schaffen und andererseits das für den TZR geeignete MHC-Epitop besitzen. Bevor diese Zellen zu den ZTL-Klonen gegeben wurden, wurden sie in einer Bestrahlungsanlage mit dem Cäsium-Isotop ^{137}Cs (β - und γ -Strahler) bestrahlt, um ihre Proliferation zu verhindern. Hier wurde der ZTL-Klon JB4 verwendet (Milani 2005), die „Feederzellen“ RCC-26, welche das MHC-Epitop besitzen sowie die B-LCL-LAZ388 Zelllinie und ein Gemisch aus PMBZ verschiedener Spender als MHC-negative Feederzellen. Die RCC-26 wurden davor mit 100 Gy, die PBMC-Mischung mit 150 Gy und die B-LCL mit 50 Gy bestrahlt. Die Zellen wurden in einer Mischung aus $0,6 \times 10^6$ Zellen des ZTL-Klons, $1-1,4 \times 10^6$ des PBMC-Gemisches, 1×10^5 der B-LCL und 6×10^4 der RCC-26 in einer 24-Loch-Platte in 1,5 ml T-Zell-Medium mit 50 U/ml IL-2 pro Loch kultiviert. Am Tag 4 wurde mikroskopisch die Zelldichte der ZTL beurteilt und gegebenenfalls die Zellen 1:1 gesplittet, indem die Zellsuspension eines Lochs durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gut resuspendiert wurde und anschließend die Hälfte

des Volumens (750 µl) in eine leere Vertiefung überführt wurde. Anschließend wurden 750 µl frisches T-Zell-Medium mit 100 U/ml IL-2 zu den Zellen gegeben, um eine Endkonzentration von 50 U/ml zu erzielen. Diese Restimulation erfolgte alle 10 bis 14 Tage. Die ZTL wurden zwischen Tag 8 und Tag 12 nach Restimulation für Versuche verwendet. Jeweils am Tag vor einem Experiment wurde den Zellen frisches Medium mit frischem IL-2 gegeben, um die gleiche Ausgangssituation für alle Versuche zu gewährleisten. Dazu wurde vorsichtig, ohne die ZTL am Boden der Kulturvertiefung mitzunehmen, die Hälfte des Mediums aus der Vertiefung abgenommen und verworfen. Anschließend wurde mit 750 µl frischem T-Zell-Medium mit 100 U/ml IL-2 aufgefüllt. Dabei stellte sich eine Endkonzentration von 50 U/ml IL-2 ein.

4.2.5 Herstellung des zellfreien Tumormilieus (zTM)

Für die Generierung des zTM, d.h. lösliche Faktoren, die während der Kultur von Tumorzellen entstehen, wurden KT-195 Tumorzellen in einer Dichte von 1×10^6 (zTM1), 2×10^6 (zTM2), 5×10^6 (zTM5) oder 10×10^6 (zTM10) pro 5 ml T-Zell-Medium in Polystyrol-Röhrchen für 40 h kultiviert. Anschließend wurde die Zellsuspension für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Um zu gewährleisten, dass sich keine Zellen im Überstand befanden, wurde dieser über einen 0,22 µm Filter filtriert. Der Überstand wurde entweder direkt für einen Versuch eingesetzt oder bis zur Nutzung bei -20°C eingefroren.

4.3. In vitro Live Cell Imaging zur Bestimmung der T-Zellmobilität

Für die Generierung der 3D-Kollagenmatrix wurden zunächst die T-Zellen des Klons JB4 geerntet und in dem jeweilig zu untersuchendem Medium in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml eingesetzt. Es wurden folgende Medien verwendet: T-Zell-Medium als Kontrollmedium, zTM1 bis zTM10, T-Zell-Medium mit 2-DG (20 mg/ml), glukosefreies T-Zell-Medium mit dialysiertem FKS und zTM5 mit Glukose und/oder essentiellen Aminosäuren. Zu den Zellen wurden HEPES, H₂O und NaHCO₃ hinzugefügt. NaHCO₃ ist sehr wichtig, da das

Kollagen nur im Basischen polymerisiert. Zum Schluss wurde die Kollagenlösung zugegeben (Mengen s. Tabelle 4.2). Letztendlich waren die Zellmedien im Gemisch 1:2 verdünnt, so dass folgende Konzentrationen des zTM entstanden, denen die T-Zellen während des Versuchs ausgesetzt waren: 0,5 Millionen Zellen pro ml ($\frac{1}{2}$ zTM1), 1 Million Zellen pro ml ($\frac{1}{2}$ zTM2), 2,5 Millionen Zellen pro ml ($\frac{1}{2}$ zTM5) und 5 Millionen Zellen pro ml ($\frac{1}{2}$ zTM10). Nach kurzem Auf- und Abpipettieren wurde das Gemisch schnell in einer Kapillare einer 6 μ -Kapillarplatte eingefüllt und eine Stunde zur Verfestigung im Brutschrank bei 37°C gelassen. Danach wurden die Zellen in einem Zeiss-Axio Vert.A1-Mikroskop im Phasenkontrastmodus für 4 Stunden aufgenommen. Zur Auswertung wurden zu den Zeitpunkten 1, 50, 100, 150 und 200 Minuten die mobilen und die immobilen Zellen mithilfe der ImageJ-Software gezählt und der Mobilitätsindex (Anzahl mobile Zellen/Anzahl immobile Zellen) berechnet. Die für die entsprechenden Milieus an einem bestimmten Zeitpunkt ermittelten Werte wurden jeweils zum parallel untersuchten Kontrollmedium (T-Zell-Medium) in Relation gesetzt (x-facher Unterschied zur Kontrolle). Davon wurde dann der Mittelwert von verschiedenen Experimenten gebildet und graphisch dargestellt.

Tabelle 4.2. Mischung für die Kollagenmatrix

Komponent	Menge
NaHCO ₃ 7,5%	10 μ l
HEPES	14 μ l
Dest. Wasser	6 μ l
Zellen in Medium (10 ⁶ /ml)	120 μ l
Kollagen I (3 mg/ml)	150 μ l
Summe	300 μ l

4.4 Statistische Analysen

Alle statistischen Analysen wurden mit der Graphpad Prism Software (Version Windows 5.01, Firma GraphPad Software, San Diego Kalifornien USA) durchgeführt. Bei sämtlichen

Verfahren wurde das Signifikanzniveau $\alpha < 0,05$ gewählt. Die Erstellung der Heatmaps erfolgte mit der online-Freeware Carmaweb 1.5 der medizinischen Universität Innsbruck.

Mann-Whitney-U-Test

Der Mann-Whitney-U Test ist ein nicht-parametrisches Testverfahren, welches für die statistische Untersuchung von geringen Probenanzahlen und nicht normalverteilten Daten geeignet ist. Der Mann-Whitney-U Test untersucht zwei Gruppen bei einer zweiseitigen Fragestellung, ob sich die Alternativhypothese signifikant von der Nullhypothese unterscheidet, also ob der Mittelwert einer Gruppe A signifikant unterschiedlich ist von dem Mittelwert einer Gruppe B.

Kruskal-Wallis-Test

Der Kruskal-Wallis-Test (nach William Kruskal und Wilson Allen Wallis; auch H-Test) ist ein nicht-parametrischer statistischer Test, mit dem im Rahmen einer Varianzanalyse verglichen wird, ob sich verschiedene unabhängige nicht gepaarte Stichproben (Gruppen oder Messreihen) hinsichtlich einer ordinalskalierten Variable in ihrem Erwartungswert (Mittelwert) unterscheiden. Er ähnelt dem Mann-Whitney-U-Test und basiert wie dieser auf Rangplatzsummen, mit dem Unterschied, dass er für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen angewendet werden kann.

Friedman-Test

Der Friedman-Test ist ein nicht-parametrischer statistischer Test, der drei oder mehr gepaarte Stichproben auf Gleichheit des Lageparameters untersucht. Er setzt voraus, dass die Werte innerhalb der gepaarten Stichproben unabhängig voneinander sind. Die Analyse beruht auf einer Sortierung der Werte in jedem gepaarten Satz von Daten vom kleinsten zum größten Wert, wobei jeder Wertesatz separat sortiert wird. Anschließend werden die Ränge in jeder Stichprobe addiert. Der p-Wert ist dabei umso geringer, je größer die Unterschiede zwischen den Rangsummen der einzelnen Stichproben sind.

Spearman Korrelation

Der Zusammenhang zwischen zwei Variablen wird mit einem sogenannten Korrelationskoeffizienten bestimmt. Hier wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman für nicht-parametrische Testverfahren verwendet. Im Gegensatz zum Pearson Korrelationskoeffizient für parametrische Daten muss die Beziehung zwischen den Variablen nicht linear sein, wodurch die Analyse robust gegenüber Ausreißern ist. Für jede Korrelation ergibt sich ein Korrelationskoeffizient r , der positiv ist, wenn es sich um eine direkte Korrelation handelt, und negativ ist, wenn die Korrelation invers ist. Zu diesem Korrelationskoeffizient r gehört ein p-Wert, der die Signifikanz der Korrelation angibt.

Kontingenztafel, Odds Ratio und Fisher's exact-Test

Eine Kontingenztafel ist eine Tabelle, die 2 oder mehrere Merkmale beinhaltet mit dem Ziel, das gemeinsame Auftreten dieser Merkmale (Kontingenz) zu untersuchen. Das bedeutet, dass sie die multivariate abhängige Häufigkeitsverteilung der Merkmale darstellt. Die einfachste Form der Kontingenztafel ist die zweidimensionale Vierfeldertafel, wo die zwei abgebildeten Merkmale jeweils zwei Ausprägungen haben. Sie wird besonders in der Medizin zur Beurteilung der Signifikanz von Screening-Tests auf bestimmte Krankheiten verwendet. Mit der Vierfeldertafel können die Sensitivität (Anteil der korrekt als positiv klassifizierten Objekte an der Gesamtheit der tatsächlich positiven Objekte) und die Spezifität (Anteil der korrekt als negativ klassifizierten Objekte an der Gesamtheit der in Wirklichkeit negativen Objekte) berechnet werden. Aus diesen beiden Zahlen zusammen mit der Prävalenz der abhängigen Variable in der allgemeinen Bevölkerung können der positive prädiktive Wert (Anteil der korrekt als positiv erkannten Ergebnisse an der Gesamtheit der als positiv erkannten Ergebnisse) und negative prädiktive Wert (Anteil der korrekt als negativ erkannten Ergebnisse an der Gesamtheit der als negativ erkannten Ergebnisse) berechnet werden, die letztendlich die Stärke der Vorhersagbarkeit des Tests darstellen.

Die Odds Ratio stellt die Chance dar, dass eine Eigenschaft bei einer Gruppe mit einem bestimmten Merkmal im Vergleich zu einer anderen Gruppe ohne dieses Merkmal auftritt.

Sie wird häufig in der Medizin benutzt, um die Chance des Auftretens einer Erkrankung bei Gruppen mit vorliegenden Risikofaktoren zu berechnen.

Der Fisher's exact Test (von Ronald Aylmer Fisher entwickelt, auch exakter Chi-Quadrat-Test genannt) bestimmt die Signifikanz auf Unabhängigkeit der Merkmalsausprägungen in einer Kontingenztafel. Er ist besonders für kleine Fallzahlen sinnvoll, da er im Gegensatz zum Standard-Chi-Quadrat-Test einen zuverlässigen exakten Signifikanzwert liefert.

Heatmap

Eine Heatmap ist ein Diagramm zur Visualisierung von Daten, deren abhängige Werte einer zweidimensionalen Definitionsmenge als Farben repräsentiert werden. Sie dient dazu, in einer großen Datenmenge intuitiv und schnell besonders markante Werte zu erfassen. Sie wird in der Molekularbiologie typischerweise zur Erfassung des Expressionslevels von verschiedenen Genen und zum Vergleich von zwei oder mehreren Stichproben auf ihr Genexpressionsmuster verwendet. Es gibt verschiedene Farbkombinationen, die zur Visualisierung herangezogen werden können, sowohl schwarz-weiß mit Graustufen als auch Farben aus dem sichtbaren Lichtspektrum. Hier wurde die Kombination rot = hoher Wert, schwarz = mittlerer Wert und blau = niedriger Wert verwendet. Die verschiedenen untersuchten Parameter wurden jeweils mit Werten 0-1 verschlüsselt, so dass 0 den Tumor mit dem niedrigsten und 1 den Tumor mit dem höchsten Wert für den einzelnen Parameter darstellt, die restlichen Werte wurden entsprechend ihrer Größe zu den beiden Endwerten mit Werten zwischen 0 und 1 repräsentiert. Somit entsteht keine Farbdiskrepanz auf der Heatmap durch unterschiedlich hohe Werte zwischen den Parametern.

Kaplan-Meier-Überlebenskurve

Eine Überlebenskurve ist die grafische Darstellung der Sterberate (Mortalität) einer Population über die Zeit. Der Kaplan-Meier-Schätzer dient zum Schätzen der Wahrscheinlichkeit, dass bei einem Versuchsobjekt ein bestimmtes Ereignis (z. B. Tod) innerhalb eines Zeitintervalls (nicht) eintritt. Es handelt sich um eine nicht-parametrische

Schätzung der Überlebensfunktion im Rahmen der Ereigniszeitanalyse. Die zu Grunde liegenden Daten können rechts-zensiert sein, d. h. dass bei einzelnen Stichproben das Ereignis bis zum Ende des Experiments nicht auftritt oder sie werden nicht bis zum Ende des vorgegebenen Beobachtungsintervalls verfolgt.

Um 2 oder mehr Kurven miteinander auf signifikante Unterschiede zu untersuchen, wurde der nicht-parametrische Log-rank-Test (auch Mantel Cox nach Nathan Mantel und David Cox benannt) verwendet. Er ist besonders für Gruppen mit rechts-zensierten Daten geeignet. Er vergleicht die Hazardfunktionen $h(t)$ (definiert als Rate, mit der ein Ereignis zu einem Zeitpunkt T eintritt unter der Voraussetzung, dass es bis zum Zeitpunkt t noch nicht eingetreten ist) der einzelnen Gruppen zu jeder beobachteten Zeiteinheit, in dem er die beobachteten und zu erwartenden Ereignisse der Gruppen zu jedem Zeitpunkt kalkuliert und schließlich alle Zeitpunkte zusammen addiert.

Cox-Regressionsmodell

Das Cox-Modell, auch proportionales Hazard Modell genannt, ist die am meisten verbreitete Regressionsmethode zur Analyse von Überlebensdaten (Ziegler, Thieme Verlag). Es wird benutzt, wenn gleichzeitig der Effekt mehrerer Einflussgrößen auf eine Zielvariable untersucht werden soll, um den unabhängigen Einfluss jeder dieser Größen zu bestimmen. Bei der Zielvariablen handelt es sich um Überlebenszeiten. Meistens wird dieses Modell in klinischen Therapiestudien angewandt, um die Relevanz bzw. das Ausmaß des Therapieeffekts hinsichtlich des Überlebens unter gleichzeitiger Berücksichtigung weiterer relevanter Einflussfaktoren zu bestimmen. Im Cox-Modell wird für eine Person, die die zu untersuchende Einflussgröße aufweist, der Hazard (das Risiko) ermittelt, einen bestimmten Endpunkt (z. B. Tod) zu erreichen. Zur Berechnung wird angenommen, dass die Effekte verschiedener Variablen auf das Überleben über die Zeit konstant sind. Das heißt, dass diese Effekte auf einer bestimmten Skala additiv sind.

5. Ergebnisse

Die Präsenz eines reichlichen Immunzellinfiltrats im Nierenzellkarzinom reicht nicht aus, um Tumorabstoßung zu bewirken. Besonders die zytotoxischen Lymphozyten, die CD8+ T- und die NK-Zellen, als Träger der antitumoralen Immunantwort, können ihre Funktion im Tumor nicht korrekt ausüben (s. Kapitel 1.4). Jedoch gibt es Hinweise, dass das Vorhandensein eines Infiltrats, insbesondere die Anzahl der CD8+ T-Lymphozyten, bei vielen Tumorentitäten prognostischen Wert hat (Fridman 2012). Das RCC ist in diesem Zusammenhang interessant, weil anders als bei den meisten soliden Tumoren die Anzahl der CD8+ T-Zellen keine, dafür aber die NK-Zellen eine positive prognostische Relevanz zu haben scheinen (Remark 2012, Eckl 2012). Um einen Einblick zu bekommen, was den Unterschied zwischen den beiden Zellpopulationen bewirken könnte, wurden beide Zellpopulationen im Tumorgewebe, also dort wo sie ihre Funktion ausüben sollen, gemeinsam analysiert. Es wurden im Speziellen zwei Aspekte genauer betrachtet: 1) Die lokoregionäre Verteilung mit der Fragestellung, ob eventuell das Endothel eine Barriere für die CD8+ T-Zellen darstellt, so dass sie keinen direkten Kontakt mit den Tumorzellen aufnehmen können, um diese zu zerstören. 2) Die zytotoxische Qualität mit der Fragestellung, ob eine Funktionsschwäche bei den CD8+ T-Zellen, aber nicht den NK-Zellen, vorliegt, so dass die CD8+ T-Zellen trotz Anwesenheit im Tumor für die Tumorkontrolle unbrauchbar sind. Um diese Fragestellungen zu bearbeiten, wurden Nierenresektate von 19 an klarzelligem Nierenzellkarzinom erkrankten Patienten untersucht. Um tumorbedingte Unterschiede zu detektieren, wurden neben dem Nierenzellkarzinom auch tumorfreie Nierengewebe aus dem Op-Resektat der gleichen Patienten (vorher von Pathologen als tumorfreies Gewebe identifiziert) analysiert. In einem ersten Schritt musste eine histologische Methode etabliert werden, um NK- und T-Zellen zuverlässig im Gewebeschnitt darzustellen.

5.1 Histologischer Nachweis von T- und NK-Zellen im Nierenzellkarzinom

NK-Zellen exprimieren mit Ausnahme des NKp46 keine singulären Marker, die die gesamte NK-Zellpopulation erfasst und diese eindeutig von den anderen Immunzellen unterscheidet (siehe Kapitel 1.1.2). NKp46 erwies sich für die Darstellung der NK-Zellen im RCC nicht geeignet, da wir bei der durchflusszytometrischen Analyse der tumor-infiltrierenden NK-Zellpopulation (NK-TIL) festgestellt hatten, dass dieser Marker im RCC auf den NK-Zellen herabreguliert ist (Prinz 2014). In der Durchflusszytometrie werden die NK-Zellen klassischerweise über die Kombination CD3 ϵ mit CD56 erfasst, wobei die NK-Zellen CD3 ϵ -CD56 $^{+}$ sind. So wurde auch für die histologische Darstellung der NK-Zellen eine Zweimarkerkombination in Betracht gezogen. Jedoch konnte der anti-CD56 Antikörper im Kryogewebe nicht etabliert werden, weil mit dem Antikörper gegen CD56 keine brauchbare Färbung gelang. Deshalb wurde CD3 ϵ mit CD3 ζ gefärbt, weil CD3 ζ auf allen NK-Zellen als Adaptermolekül zu NKp30 und NKp46 exprimiert wird (s. Kapitel 1.1.2). Beim Nierenzellkarzinom wurde beschrieben (Dissertation Anz 2007 und Rosmanit 2007), dass das CD3 ζ -Molekül nicht herunterreguliert ist. CD3 ζ markiert sowohl T-Zellen als auch NK-Zellen, so dass eine Kombination mit dem T-Zellspezifischen Antikörper gegen CD3 ϵ nötig war, um NK- und T-Zellen zu unterscheiden. Diese Doppelfärbung konnte gut etabliert werden (Abb. 5.1, A). Die NK-Zellen stellten sich als CD3 ϵ -CD3 ζ $^{+}$ einfach-positive Zellen dar (grün dargestellt, Pfeile). Die T-Zellen waren CD3 ϵ $^{+}$ und auch positiv für CD3 ζ (CD3 ϵ +CD3 ζ $^{+}$, rot+grün).

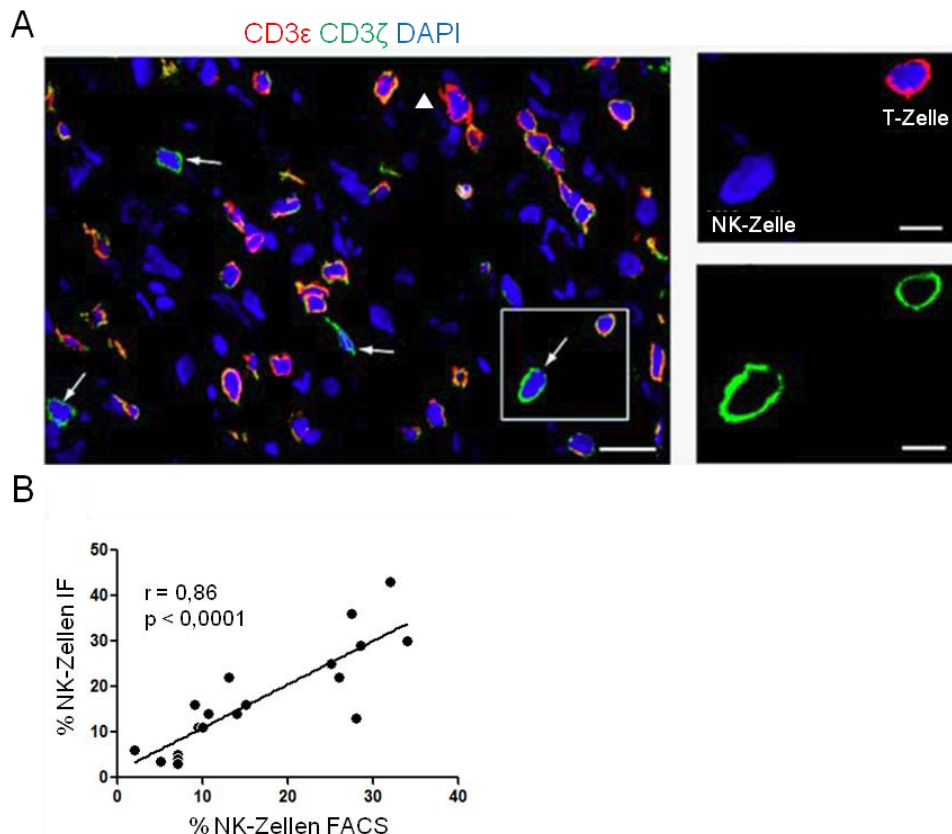


Abbildung 5.1. Immunfluoreszenzfärbung von RCC-Gewebeschnitten mit Antikörpern gegen CD3ε und CD3ζ.

A. Konfokales Bild einer histologischen Doppelfärbung mit CD3ε (rot), CD3ζ (grün) und Kernen (DAPI, blau). Zur Darstellung wurden 7 optische z-Ebenen (Abstand zwischen den Ebenen 0,6 µm) überlagert. T-Zellen sind als CD3ε+CD3ζ+ Zellen (rot+grün) zu sehen, NK-Zellen sind CD3ε- und CD3ζ+ (grün, Pfeile). Die Bilder rechts sind die Vergrößerung des im weißen Rechteck markierten Bereichs. Im oberen Bild sind nur die Fluoreszenzkanäle für CD3ε und DAPI gezeigt, der Kanal für CD3ζ ist ausgeblendet), im unteren Bild ist nur der Fluoreszenzkanal für CD3ζ gezeigt und zeigt alle T-Zellen. Die NK-Zelle (linke Zelle) ist im oberen Bild als rote Zelle zu sehen und gleichzeitig im unteren Bild als grüne Zelle sichtbar. Balken = 30 µm links; 10 µm rechts. **B.** Spearman Korrelation zwischen dem Anteil der NK-Zellen an den Lymphozyten, berechnet aus den histologischen Immunfluoreszenzfärbungen (% NK-Zellen IF) und den FACS-Färbungen der Gewebesuspension des gleichen Tumors (% NK-Zellen FACS, FACS-Daten aus Prinz 2014 entnommen).

Um zu bestimmen, ob mit dieser Methode die Gesamtpopulation der NK-Zellen im Gewebe angefärbt wurde, wurden 19 RCC-Gewebe, für welche bereits die NK-Zellpopulation durchflusszytometrisch als CD3ε-CD56+ Population quantifiziert worden war (Eckl 2012, Prinz 2014), mit Antikörpern gegen CD3ε und CD3ζ gefärbt und mittels konfokaler Mikroskopie aufgenommen. Die Anzahl der T- und NK-Zellen wurden in mindestens 10 Gesichtsfeldern (40x) ausgezählt.

Die Anzahl der T- und NK-Zellen in jedem untersuchten Nierenzellkarzinomgewebe sowie der prozentuale Anteil der NK-Zellen an den Lymphozyten ist im Anhang zu finden (Tabelle

8.1). Die Auszählung der gefärbten Präparate ergab, dass die T-Zellen mit einer medianen Anzahl von 37,5 Zellen/HPF (HPF = High Power Field, Gesichtsfeld bei 400x Vergrößerung) und einer Streubreite von 12,5 bis 86 weit häufiger sind als die NK-Zellen/HPF (Median 6,5; Streubreite 2-19). Der errechnete prozentuale NK-Anteil an den Lymphozyten (T- plus NK-Zellen) lag zwischen 2,8 und 43,3% (Median 14%). Bei der Gegenüberstellung des errechneten prozentualen NK-Anteils in den einzelnen Tumoren ermittelt mittels Immunfluoreszenzhistologie (IF CD3ε/CD3ζ) und FACS-Analyse in Gewebesuspension (CD3/CD56) zeigte sich eine hochsignifikante Korrelation ($r = 0,86$, $p < 0,0001$) (Abb. 5.1, B). Somit konnte die Immunfluoreszenzmehrfachkombination aus CD3ε und CD3ζ die NK-Zellen im RCC histologisch verlässlich darstellen. Dies wurde in der Arbeit Prinz et al. (2014) publiziert.

Nachdem eine histologische Methode etabliert war, welche die NK-Zellen im Gewebe gut darstellte, und darüber hinaus parallel die T-Zellen markierte, wurden die beiden Eingangs gestellten Fragen nach der lokoregionären Verteilung und der zytotoxischen Qualität bearbeitet.

5.2. Lokoregionäre Verteilung der T- und NK-Lymphozyten in Bezug auf das Gefäßsystem

In verschiedenen Mausmodellen (Salnikova 2013) und humanen Tumoren (Griffioen 1996, Buckanovich 2008) ist beschrieben, dass das Tumorendothel durch den Verlust z.B. von Adhäsionsmolekülen die Extravasation von T-Zellen nicht unterstützt. Es könnte somit sein, dass die CD8⁺ T-Zellen im RCC nicht extravasieren und somit keinen Kontakt zu Tumorzellen aufnehmen können. Sie wären also für eine direkte Zerstörung der Tumorzellen unbrauchbar. Entsprechende Daten zu NK-Zellen liegen bisher nicht vor. Um der Hypothese einer endothelialen Barriere nachzugehen, wurde eine histologische Färbung des Endothels zusammen mit der Darstellung von T-Zellen und NK-Zellen durchgeführt. Zur parallelen Darstellung beider Lymphozytenpopulationen wurde die im Abschnitt 5.1 etablierte

Färbekombination aus CD3 ϵ und CD3 ζ verwendet und um die zusätzliche Färbung des Gefäßsystems mittels CD31 erweitert. CD31, auch PECAM-1 genannt, ist ein integrales Membranglykoprotein, welches auf der luminalen Seite der vaskulären Endothelzellen exprimiert wird. Vergleichend zu den Tumorgeweben wurden einige korrespondierende Nichttumornierengewebe (engl.: non-tumor kidney cortex, NKC) ebenfalls gefärbt und ausgewertet, um zu sehen, ob es sich um ein tumor-spezifisches Infiltrationsmuster handelt. Eine exemplarische Färbung ist in Abb. 5.2. zu sehen. Das Gefäßsystem ist in rot dargestellt, die T-Zellen als CD3 ϵ +CD3 ζ + Zellen in blau/türkis (beispielsweise Zelle 2, dicker Pfeil), die NK-Zellen sind die CD3 ϵ -CD3 ζ + Zellen (grün dargestellt, dünner Pfeil).

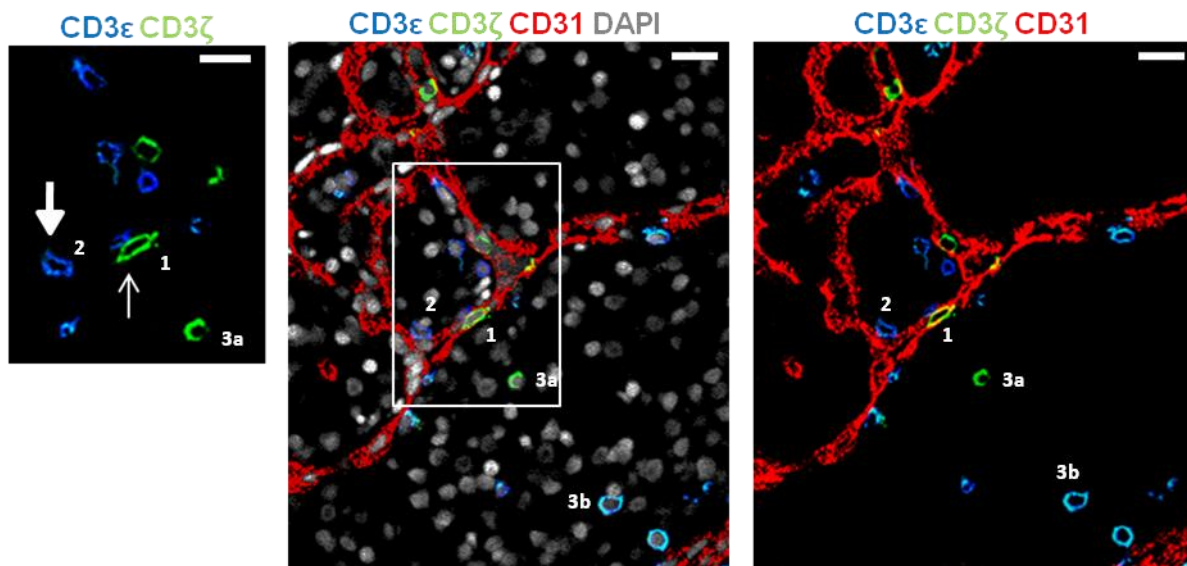


Abbildung 5.2. Immunfluoreszenzfärbung von T- und NK-Zellen sowie des Gefäßsystems im Nierenzellkarzinom

Antikörperkombination von CD3 ϵ (blau), CD3 ζ (grün), CD31 (rot) und DAPI (grau). Das Bild stammt vom Tumor 2863 ist eine Überlagerung aus 6 konfokalen z-Ebenen (Abstand zwischen den Ebenen 0,6 μ m). Im rechten Bild ist der Fluoreszenzkanal für DAPI ausgeblendet. Exemplarisch sind einige Zellen entsprechend ihrer Lokalisation zu den Gefäßen nummeriert: intravaskulär (1), perivaskulär (2) und parenchymatös (3a, NK-Zellen; 3b, T-Zelle). Das weiße Rechteck gibt den Bereich an, welcher im linken Bild vergrößert dargestellt ist. Dabei sind T-Zellen in blau/türkis (CD3 ϵ +CD3 ζ +, dicker Pfeil) und NK-Zellen in grün (CD3 ϵ -CD3 ζ +, dünner Pfeil) zu sehen. Balken = 20 μ m

Zur Quantifizierung der Lymphozytenverteilung in Relation zum Gefäßsystem wurden Bilder mit großen Lymphozytenansammlungen (Lymphozytenclustern), nekrotische sowie beschädigte Areale nicht berücksichtigt. Beim NKC wurden nur die tubulo-interstitiellen Bereiche des Nierengewebes ausgewertet, weil diese das Ausgangsgewebe des

Nierenzellkarzinoms sind. Glomeruli wurden demzufolge von der Auswertung ausgeschlossen (sie haben eine andere Infiltratzusammensetzung als das Tubulointerstitium mit hauptsächlich nur NK-Zellen und kaum T-Zellen). Die Lymphozyten wurden in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation zu den Gefäßen (CD31, in rot dargestellt) in drei Kategorien eingeteilt: intravaskulär (1), perivaskulär (2) und parenchymatös (3). Intravaskulär waren solche Lymphozyten, die sich innerhalb des Gefäßlumens befanden (als Beispiel ist in Abb. 5.2. eine NK-Zelle mit 1 markiert). Perivaskulär waren Lymphozyten, die außerhalb des Gefäßes aber tumoral dem Gefäß anliegend lokalisiert waren (T-Zelle mit 2 markiert). In die Kategorie „parenchymatös“ kamen Lymphozyten, welche entfernt vom Gefäß im Tumorparenchym lagen (als Beispiel eine NK-Zelle, 3a, und eine T-Zelle, 3b).

Die Zellverteilung wurde quantitativ ausgewertet. Pro Gewebeschnitt wurden mindestens 10 HPF aufgenommen, um eine Mindestgesamtzahl von 50 Zellen für T- bzw. NK-Zellen zu erreichen. Zunächst wurde pro HPF die Anzahl an T- bzw. NK-Zellen bestimmt und anschließend die Anzahl der T- und NK-Zellen in jedem Kompartiment (intravaskulär, perivaskulär, parenchymatös) gezählt. Daraus wurde der prozentuelle Anteil an T- bzw. NK-Zellen in jedem Kompartiment für jedes HPF berechnet. Aus den jeweiligen Werten (Prozente oder absolute Zahlen) pro HPF wurde dann der Median für jeden Gewebeschnitt gebildet und graphisch dargestellt (Abb. 5.3). Zur Beschreibungen des T-Zellinfiltrats wurden zwei Färbekombinationen durchgeführt, zum einen die Kombination CD3 ϵ und CD3 ζ mit CD31, mit welcher alle T-Zellsubtypen (CD8⁺ T Zellen, CD4⁺ T-Zellen und Tregs) als CD3 ϵ ⁺ erfasst werden; zum anderen die Kombination CD8 und Perforin mit CD31, welcher die Subgruppe der CD8⁺ T-Zellen, die eigentlichen zytotoxischen T-Zellen, die in dieser Arbeit im Vordergrund standen, erkennt. Die CD8⁺ T-Zellen zeigten ein vergleichbares Muster wie die übergeordnete Gruppe der CD3⁺ T-Zellen, weswegen die CD8⁺ T-Zellen im Folgenden detailliert beschrieben werden.

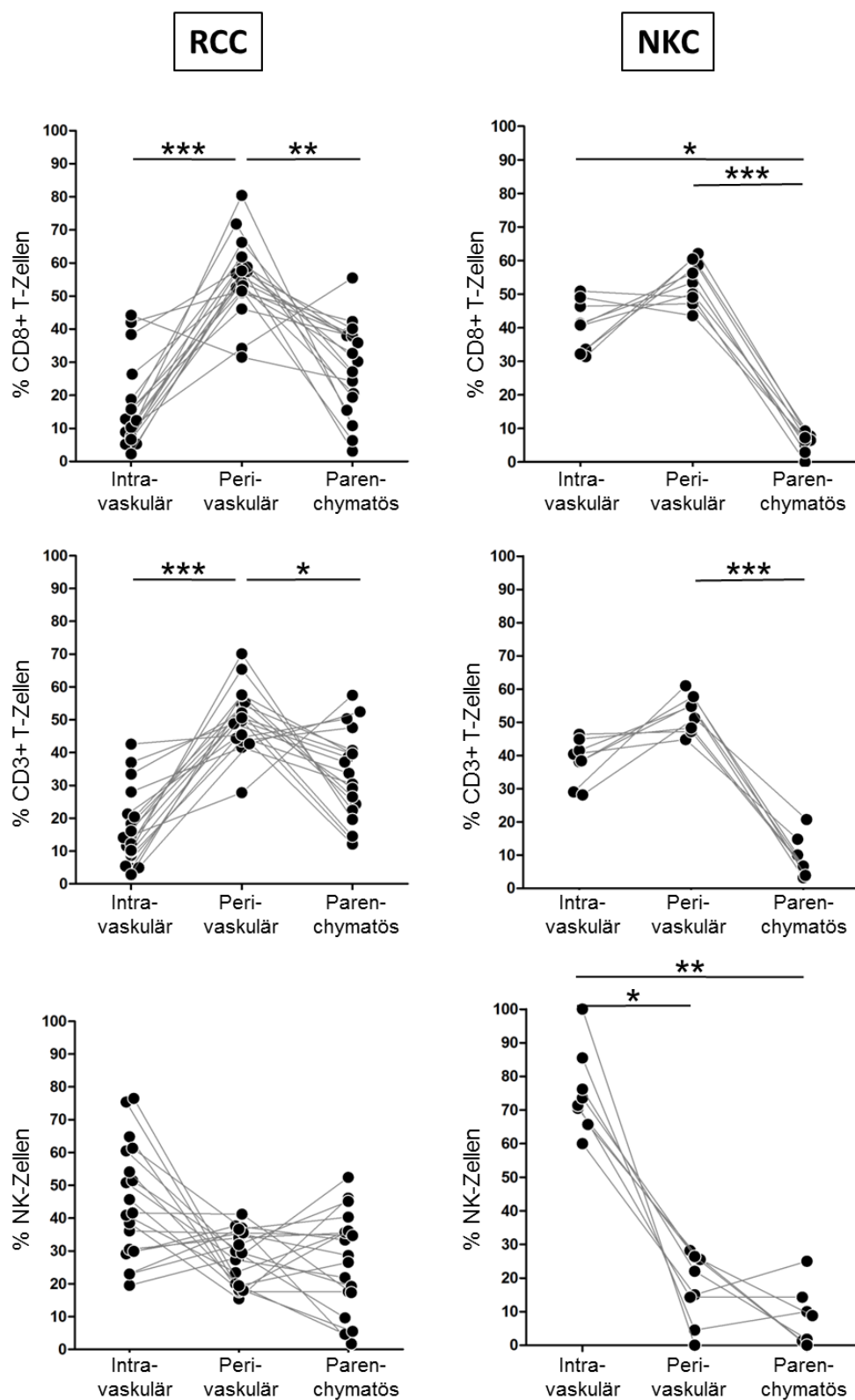


Abbildung 5.3. Extravasationsmuster der T- und NK-Zellen im Nierenzellkarzinom und der Nichttumorneiere.

Ermittelt wurde die Anzahl der CD8+ T-Zellen, CD3+ T-Zellen und NK-Zellen pro HPF und den Kompartimenten intravaskulär, perivaskulär und parenchymatös zugeteilt. Anschließend wurde der Prozentsatz der Zellen im jeweiligen Kompartiment zur Gesamtzahl pro HPF berechnet und aus allen ausgewerteten Gesichtsfeldern der Median für jeden Tumor gebildet und auf der y-Achse dargestellt. Eine Gruppe von 3 Symbolen, die durch eine Linie verbunden sind, gehört zum selben Gewebeschnitt. Jede Symbolgruppe ist ein anderer Patient. Die statistische Analyse wurde mithilfe des Friedman-Tests durchgeführt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Bei den 19 analysierten RCC-Tumoren befanden sich die CD8+ T-Zellen (wie auch die CD3+ T-Zellen) hauptsächlich extravaskulär mit nur einem Median von 12,4% an intravaskulären CD8 T Zellen (Streubreite 2,3% - 44,2%) (Abb. 5.3). Die Mehrzahl der extravasierten CD8+ T-Zellen lag perivaskulär (Median 56,8%; Streubreite 31,5% - 80,4%) und 30,2% (Median) waren ins Tumorparenchym eingedrungen (Streubreite 3,1% - 55,5%). Bei den Gesamt(CD3+)-T-Zellen war der parenchymatöse Anteil mit 33,7% etwas höher als bei den CD8+ T-Zellen. In den NKC-Geweben waren vergleichsmäßig mehr CD8+ T Zellen innerhalb der Gefäße (Median 40,8%; Streubreite 31,4% - 50,9%), 53,5% (Spannweite 43,6% - 62,1%) lagen an den Gefäßen und nur 6,5% (Streubreite 0% - 9,3%) waren im Parenchym. Die Extravasation und tiefe Infiltration der CD8+ und CD3+ T Zellen ist demnach im Tumorgewebe stärker ausgeprägt als in der NKC.

Die NK-Zellen zeigten eine andere Verteilung als die T-Zellen. Im RCC waren fast die Hälfte der NK-Zellen in den Gefäßen (Median 41,6%; Streubreite 19,5% - 76,5%), die extravasierten NK-Zellen verteilten sich gleichmäßig zwischen dem perivaskulären (Median 29,4%; Streubreite 15,4% - 41,2%) und dem parenchymatösen Kompartiment (Median 28,6%; Streubreite 1,7% - 52,4%). Somit extravasierten die NK-Zellen schlechter ins Tumorparenchym als die T-Zellen. Allerdings blieben im Vergleich zu den T-Zellen weniger NK-Zellen nahe am Gefäß. Im NKC-Gewebe war die Anzahl der NK-Zellen allgemein sehr gering, mit im Median nur 1 Zelle/HPF (Streubreite 1-2), im RCC lag der Median bei 6,5 (Streubreite 2-19). Die meisten der NK-Zellen im NKC lagen im Gefäß (Median 72,5%; Streubreite 60% – 100%), 18,5% blieben perivaskulär (Streubreite 0% - 28,2%) und 5,3% infiltrierten das Nierenparenchym (Streubreite 0% - 25%).

In Abb. 5.4 ist der Vergleich der Extravasation und des parenchymatösen Anteils zwischen RCC und NKC noch einmal verdeutlicht. Es ist zu sehen, dass im Tumor der Prozentsatz an extravasierten CD8+ bzw. CD3+ T-Zellen sowie NK-Zellen signifikant höher ist als im NKC, d.h. Lymphozyten, unabhängig vom Subtyp, extravasierten im Tumorgewebe effizienter als im Nichttumor-nierengewebe (Abbildung 5.4, A). Vergleicht man die Lymphozytentypen untereinander so ist weiterhin zu sehen, dass die CD8+ bzw. CD3+ T-Zellen eine signifikant

höhere Extravasationseffizienz zeigten als die NK-Zellen, sowohl im RCC (blaue Linie) als auch besonders im NKC (grüne Linie), d.h. NK-Zellen extravasierten generell weniger als T-Zellen. Vergleicht man den parenchymatösen Anteil der Lymphozyten, war auch hier ein signifikant erhöhter Prozentsatz im RCC im Vergleich zum NKC bei allen 3 Subgruppen zu sehen, jedoch bestand kein signifikanter Unterschied zwischen T- und NK-Zellen (Abb. 5.4, B).

Bezugnehmend auf die eingangs formulierte Hypothese einer endothelialen Barriere, welche die Infiltrationseffizienz zytotoxischer Lymphozyten ins Tumorparenchym bestimmt, zeigten die gefundenen Beobachtungen ein unerwartetes Ergebnis. Während die T-Zellen, welche für das RCC prognostisch nicht aussagekräftig sind, in der Mehrzahl in Tumorparenchym lagen, waren die NK-Zellen durch das Endothel von den Tumorzellen getrennt.

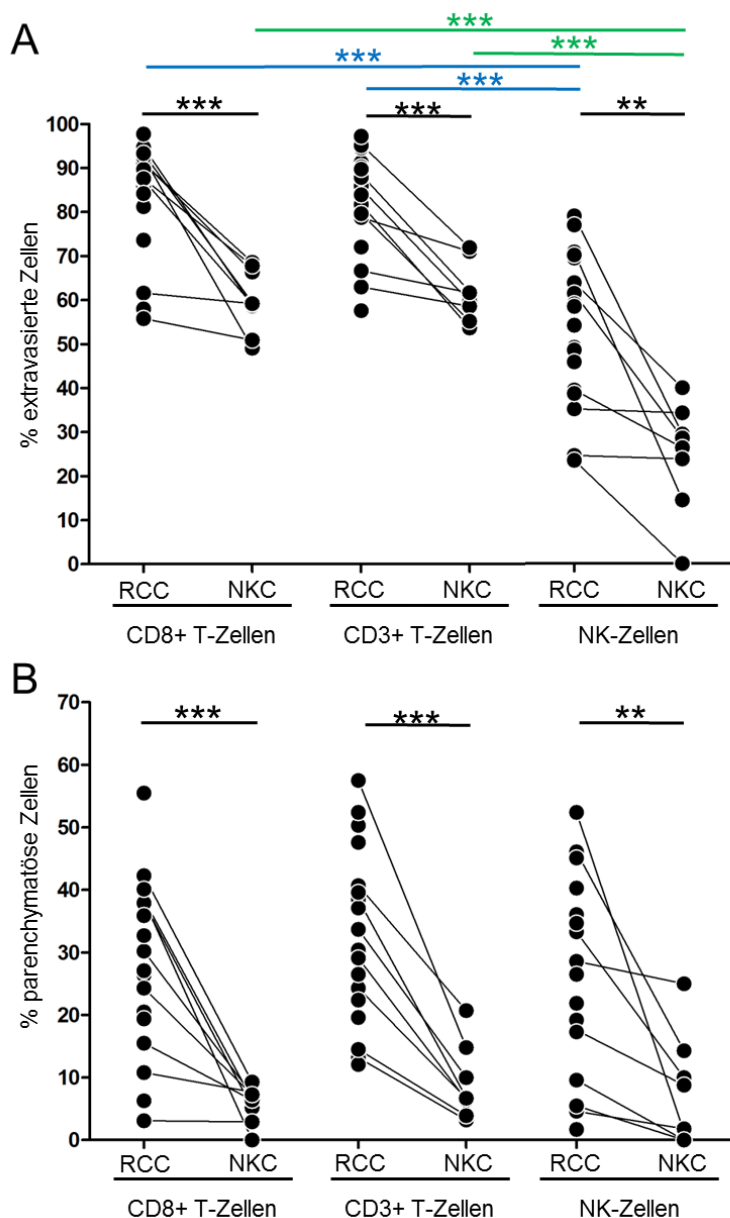


Abbildung 5.4. Vergleich zwischen RCC und NKC bezüglich der Extravasation und der tiefen Infiltration der Lymphozyten.

A, B. Die Kategorien „perivaskulär“ und „parenchymatös“ aus Abb. 5.3 wurden zusammengefasst und als extravasiierte Zellen bezeichnet (A). Linien verbinden die Werte von RCC und NKC desselben Patienten. Die statistische Analyse wurde mithilfe des Friedman-Tests durchgeführt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; in schwarz: die Signifikanz des Vergleichs zwischen RCC und NKC für die einzelnen Lymphozytentypen; in blau: der Vergleich der Lymphozytentypen im RCC; in grün: Vergleich der Lymphozytentypen im NKC.

Weil Tumoren heterogen sein können, wurde das lokoregionäre Extravasationsmuster bei zwei Tumoren, 3093 (rot) und 2869 (blau) in zwei mikroskopisch voneinander entfernten Gewebearealen bestimmt und miteinander verglichen. Wie in Abbildung 5.5 dargestellt, war in beiden Fällen die Verteilung der CD3+ T-Zellen und NK-Zellen vergleichbar, so dass beim

RCC möglicherweise die Färbung eines entnommenen Gewebeareals als repräsentativ für das ganze Gewebe angenommen werden kann.

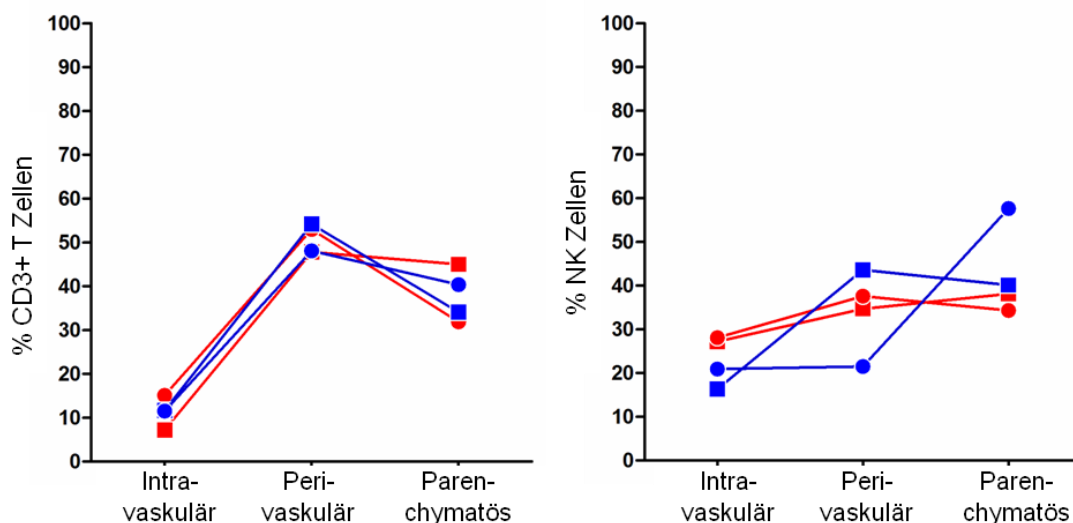


Abbildung 5.5. Das Infiltrationsmuster der T- und NK-Zellen in verschiedenen Gewebestücken desselben Tumors.

Von den beiden Tumoren 3093 (rot) und 2869 (blau) wurden jeweils zwei Gewebestücke aus makroskopisch entfernt liegenden Arealen (Kreis- bzw. Rechtecksymbol) desselben Tumorsektats gefärbt. Die Färbekombination und das Auswertungsverfahren sind in Kapitel 5.2.1 bzw. Abb. 5.2 beschrieben. Die Zellen wurden in die gleichen Kategorien geteilt wie in Abb. 5.3.

5.3 Zytotoxische Qualität der CD8+ T- und NK-Lymphozyten im Nierenzellkarzinom

Es gibt Hinweise, dass die T-Zellen im Tumor durch Mangel an Perforin und Degranulationsfähigkeit beeinträchtigt und dadurch für die antitumorale Aktivität unzureichend sind (Prinz 2012, Mortarini 2003). Weiterhin konnte von der eigenen Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass NK-Zellen weniger vom Tumormilieu beeinträchtigt zu sein scheinen, insbesondere wenn sie sich in einem Tumor mit einem hohen NK-Anteil und guter Prognose befinden (Eckl 2012, Prinz 2014).

Um die zytotoxische Qualität der CD8+ T- und der NK-Zellen zu evaluieren, wurde das zytotoxische Protein Perforin angefärbt. Perforin wird für die zytotoxische Funktion der CD8+ T-Zellen und NK-Zellen benötigt. Eine Defizienz dieses Moleküls könnte eine Erklärung sein, warum CD8+ T-Zellen trotz Anwesenheit im Tumor für die Tumorkontrolle wertlos sind. Mit

einer Antikörperkombination aus CD8, Perforin und CD31 wurde der Perforinstatus der intravaskulären vergleichend zu den extravasierten CD8+ T-Zellen bestimmt.

In Abb. 5.6. ist eine exemplarische Bildaufnahme gezeigt: Perforin (in türkis dargestellt) zeigt eine typische granuläre Struktur im Zytoplasma der CD8+ T-Zelle. CD8 (dunkelblau dargestellt) ist eine Oberflächenfärbung. Das Gefäßsystem ist in rot dargestellt. Die CD8+ T Zellen wurden auf die drei Kategorien intravaskulär (1), perivaskulär (2) und parenchymatös (3) verteilt. Die Zellen (2 und 3, mit dünnem Pfeil markiert) sind CD8+ T-Zellen (blau) ohne Perforin (keine türkisen Granula). Sie befinden sich außerhalb des Gefäßlumens, speziell perivaskulär (T-Zelle 2) bzw. parenchymatös (T-Zelle 3). Die mit Pfeilspitze markierte CD8+ T-Zelle ist Perforin-positiv (türkise Granula) und befindet sich im Gefäßlumen (1a).

NK-Zellen sind CD8-negativ. Daher sind sie in dieser Färbekombination nur dann erkenntlich, wenn sie Perforin positiv sind. Perforin-negative NK-Zellen sind mit dieser Antikörperkombination nicht sichtbar. Daher kann für die NK-Zellen zwar die absolute Anzahl an Perforin-positiven NK-Zellen, aber nicht ein Prozentanteil an Perforin-positiven NK-Zellen ermittelt werden. Eine Perforin-positive NK-Zelle ist in Abb. 5.6. (rechts) mit dickem Pfeil markiert. Sie befindet sich im Gefäßlumen (1b).

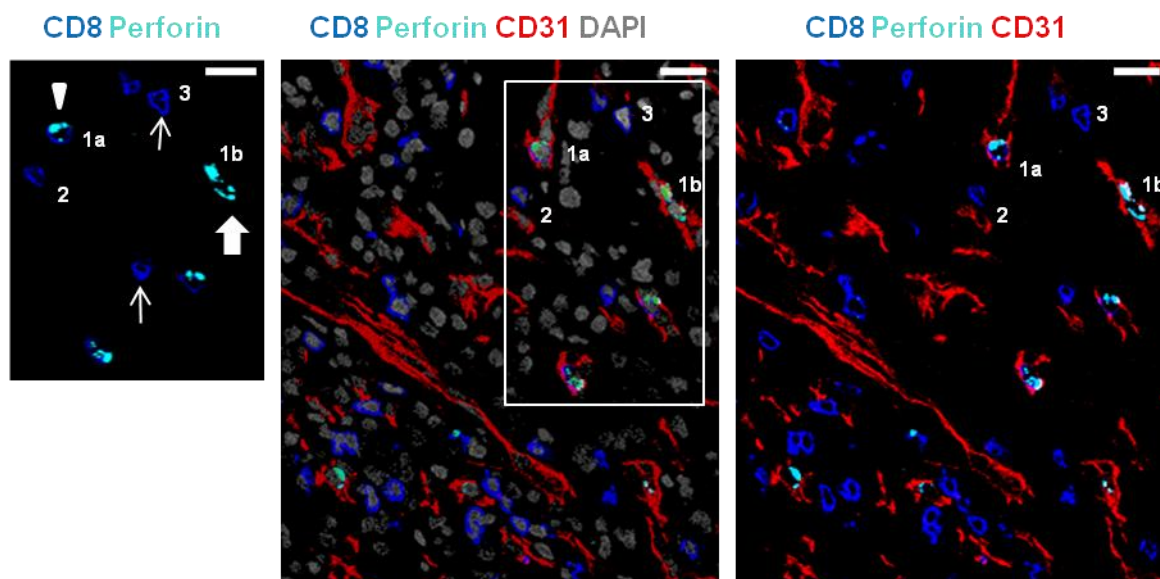


Abbildung 5.6. Immunfluoreszenzfärbung von CD8+ T Zellen und Perforin im Nierenzellkarzinom

Konfokale Bildaufnahme der Antikörperkombination CD8 (blau), Perforin (türkis), CD31 (rot) und DAPI (grau). Das Bild stammt vom Tumor T16 und ist aus 7 z-Ebenen (Abstand zwischen den Ebenen 0,6 μm) zusammengefügt. Die Zellen wurden hinsichtlich ihrer Lokalisation zu den Gefäßen (CD31) auf drei Gruppen verteilt, intravaskulär (1), perivaskulär (2) und parenchymatös (3). Das weiße Rechteck markiert den Bildausschnitt, der im linken Bild ohne die Fluoreszenzkanäle von DAPI und CD31 dargestellt ist. Dabei werden Perforin+ CD8+ T Zellen (blau mit türkisen Granula, Pfeilspitze), Perforin-CD8+ T Zellen (blau ohne türkise Granula, dünner Pfeil) und Perforin+ NK Zellen (ohne blaue Oberflächenfärbung aber mit türkisen Granula, dicker Pfeil) sichtbar. Perforin- NK-Zellen sind mit dieser Färbekombination nicht sichtbar. Balken = 20 μm

Bei der Quantifizierung wurden Bilder mit großen Lymphozytenansammlungen (Lymphozytencluster), sowie nekrotischen und beschädigten Areale nicht berücksichtigt. Bei den NKC-Geweben wurden die Glomeruli von der Auswertung ausgeschlossen, da das Nierenzellkarzinom aus dem Tubulusepithel entsteht. Von jedem Gewebe wurden mindestens 10 HPF (Gesichtsfeld bei 400x Vergrößerung) aufgenommen, um eine Mindestgesamtzahl von 50 Zellen für jede Zellpopulation zu erreichen. Pro Gesichtsfeld wurde die Gesamtzahl an CD8+ T-Zellen bestimmt sowie die Anzahl in jedem Kompartiment. Die CD8+ T-Zellen wurden weiterhin in Perforin-positive und Perforin-negative Zellen unterteilt. Aus den Werten wurde für jedes Kompartiment der prozentuelle Anteil der Perforin+ Zellen innerhalb der CD8+ T-Zellen berechnet. Mit den jeweiligen Werten (Prozente oder absolute Zahlen) pro HPF wurde dann der Median aller HPF für den gesamten Gewebeschnitt gebildet (Tabelle 8.4 im Anhang).

Abbildung 5.7.1 A zeigt den Prozentsatz an Perforin-positiven CD8+ T-Zellen in den verschiedenen Kompartimenten in RCC- bzw. NKC-Gewebe verschiedener Patienten.

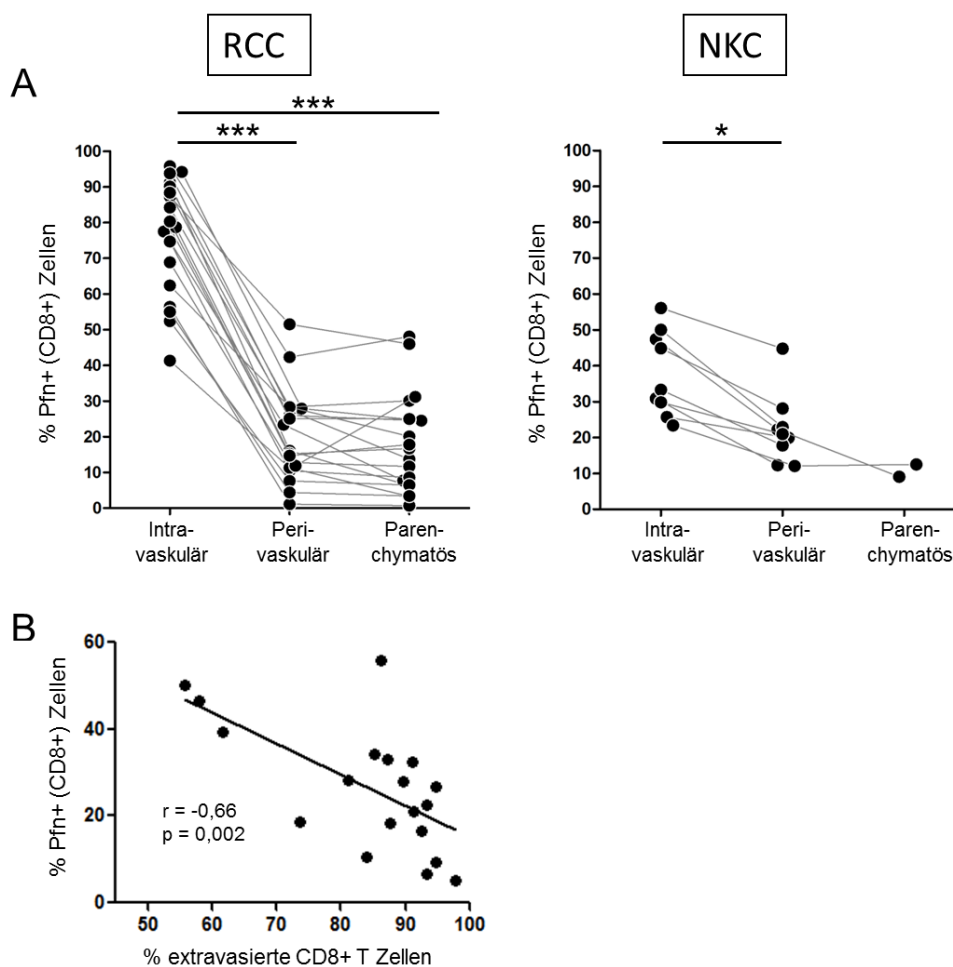


Abbildung 5.7.1 Prozentuale Anteile der Perforin+ CD8+ T-Zellen im RCC in den verschiedenen Kompartimenten.

A. Prozentualer Anteil an Perforin+ (Pfn+) Zellen innerhalb der CD8+ T-Zellen im intravaskulären, perivaskulären und parenchymatösen Kompartiment. Der Prozentsatz der Perforin+ (Pfn+) CD8+ T-Zellen innerhalb jedes Kompartiments pro HPF wurde berechnet und aus allen HPF der Median gebildet und auf der y-Achse dargestellt. Eine Gruppe von 3 Symbolen, die durch eine Linie verbunden sind, gehört zum selben Gewebeschnitt. Jede Symbolgruppe ist ein anderer Patient. Die statistische Analyse wurde mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests durchgeführt. *** $p < 0,001$. **B.** Spearman Korrelation zwischen dem prozentuellen Anteil extravasierter CD8+ Zellen und dem Prozentsatz Pfn+ CD8+ T-Zellen im gesamten Tumor (ohne Unterteilung in Kompartimente).

Im RCC waren die intravaskulären CD8+ T-Zellen größtenteils Perforin-positiv (Median 78,6%, Streubreite 41,3% - 95,8%). Unter den extravasierten CD8+ T-Zellen war der Prozentsatz an Perforin+ CD8+ T-Zellen signifikant niedriger (Median 16,1%, Streubreite 1,1% - 51,5%), wobei sich interessanterweise kein Unterschied zwischen perivaskulärer Lokalisation und tiefer Penetration (parenchymatös) (Median 16,7% Streubreite 0,7% - 48,1%)

zeigte. Zwischen den untersuchten Patienten gab es eine große Variation bezüglich des Prozentanteils der Perforin+ CD8+ T-Zellen im intravaskulären Kompartiment mit einer Streubreite von 96% Perforin-positiven CD8+ T-Zellen bis zu nur 40% Perforin-positiven. Trotz dieser Variation war bei allen Patienten unabhängig vom intravaskulären Prozentsatz an Perforin-positiven CD8+ T-Zellen eine vergleichbare Reduktion zwischen den intravaskulären und den extravasierten Zellen zu sehen. Die Reduktion jeweils betrug ca. 50%.

In der Normalniere war der Prozentsatz an Perforin-positiven intravaskulären CD8+ T-Zellen geringer als im RCC (Median 33,3%, Streubreite 23,4% - 56,1%). Bei den perivaskulären zeigte sich auch hier eine leicht signifikante Reduktion (Median 21%, Streubreite 12,1% - 44,8%), aber mit durchschnittlich um 12% deutlich geringer als beim RCC (durchschnittlich um ca. 62%). Der Prozentsatz der parenchymatösen CD8+ T-Zellen zeigte eine weitere, jedoch nicht signifikante Reduktion (Median 10,8%, Streubreite 9,1% – 12,5%). Anmerkung: Bei den meisten Normalnierengeweben waren nur sehr wenige CD8+ T-Zellen tief ins Gewebe eingedrungen (parenchymatös, <10 CD8+ T-Zellen in allen HPF). Bei diesen NKC wurde die Kategorie „parenchymatös“ nicht bewertet.

Abb. 5.7.1 B zeigt eine Spearman-Korrelation zwischen dem Prozentsatz an allen Pfn+CD8+ T-Zellen (ohne Berücksichtigung ihrer Lokalisation) und dem Prozentsatz der extravasierten CD8+ T-Zellen (unabhängig von ihrem Perforingehalt). Es ist zu sehen, dass eine negative Korrelation vorliegt, d.h. in einem RCC-Gewebe mit hoher Extravasation der CD8+ T-Zellen war der Anteil an Perforin-positiven CD8+ T-Zellen niedrig.

Wie bereits oben erwähnt konnten mit der CD8/Perforin Antikörperkombination nur solche NK-Zellen detektiert werden, welche Perforin+ waren. Um auch Perforin-negative NK-Zellen darstellen zu können, hätten die NK-Zellen über die vorher beschriebene Doppelfärbung, CD3 ϵ plus CD3 ζ , detektiert werden müssen. Zusammen mit Perforin und CD31 sowie Darstellung der Zellkerne mit DAPI wäre somit eine Fünffachkombination nötig gewesen, die technisch nicht durchgeführt werden konnte. Mithilfe der CD8/Perforin-Kombination wurde daher nur die absolute Anzahl an Perforin+ NK-Zellen (CD8-Pfn+) pro HPF ermittelt und der

Anzahl aller NK-Zellen (unabhängig von Perforin; entnommen aus der CD3 ϵ CD3 ζ -Kombination) gegenüber gestellt (Abb. 5.7.2). Es zeigte sich, dass die Anzahl an NK-Zellen mit der Anzahl an Perforin+ NK-Zellen positiv korrelierte, d.h. je mehr NK-Zellen in einem Tumor vorhanden waren, desto mehr Perforin+ NK-Zellen waren in diesem Tumor (Abb. 5.7.2, A). Das Gleiche galt nicht für die CD8+ T-Zellen: Hier zeigte sich keine Korrelation zwischen der Anzahl der CD8+ T-Zellen und der Anzahl an Perforin+ CD8+ T-Zellen (Abb. 5.7.2, B). In der Nichttumorniere war die Korrelation zwischen Gesamtanzahl und Perforin+ Anzahl für beide Zelltypen signifikant positiv (Abb. 5.7.2, C, D). Offensichtlich besteht für die beiden zytotoxischen Lymphozytenpopulationen im RCC-Gewebe ein unterschiedlicher Zusammenhang zwischen Zellquantität und Qualität: Ein hohes CD8+ T-Zellinfiltrat bedeutet somit im RCC nicht gleichzeitig auch eine hohe zytotoxische Qualität. Anders verhält es sich bei den NK-Zellen: Hier geht die zytotoxische Qualität mit der Zellanzahl einher.

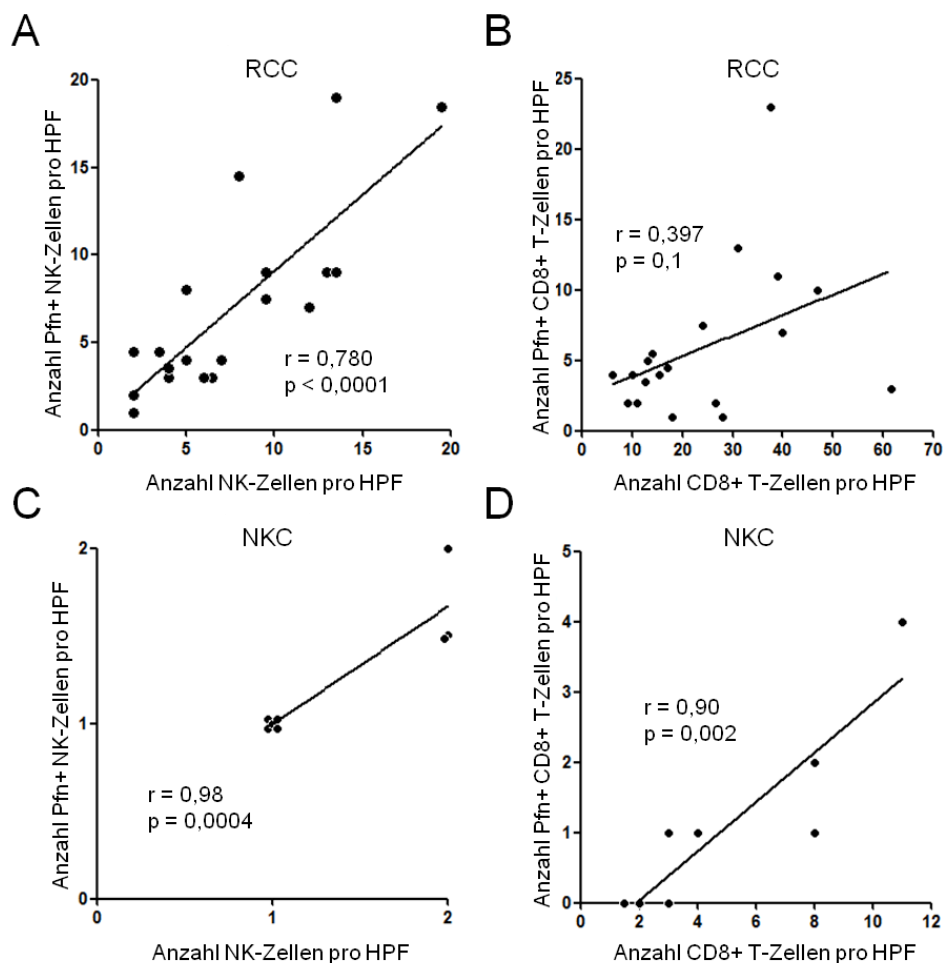


Abbildung 5.7.2 Korrelation zwischen der Gesamtzahl der NK- bzw. CD8+ T-Zellen und der Anzahl der jeweiligen Perforin+ Zellen im RCC und NKC.

Korrelation nach Spearman zwischen der Anzahl der NK-Zellen und der Anzahl der Perforin+ NK-Zellen A+C) sowie Anzahl der CD8+ T-Zellen und der Anzahl der Perforin+ CD8+ T-Zellen (B+D), jeweils pro HPF im RCC (A+B) und NKC (C+D).

5.3.1 Extravasationsmuster und Perforingehalt der Lymphozyten im reaktiven NKC-Gewebe

In manchen Normalnierengewebe, z.B. NKC-2890, wurden Regionen mit sehr dichtem Lymphozyteninfiltrat gefunden. In diesen Bereichen wurden auch Gewebeumbauprozesse beobachtet (Abbildung 5.8.1, rechtes Bild). Diese Areale wurden als „reaktives“ Nichttumor-Nierengewebe (rNKC) bezeichnet.

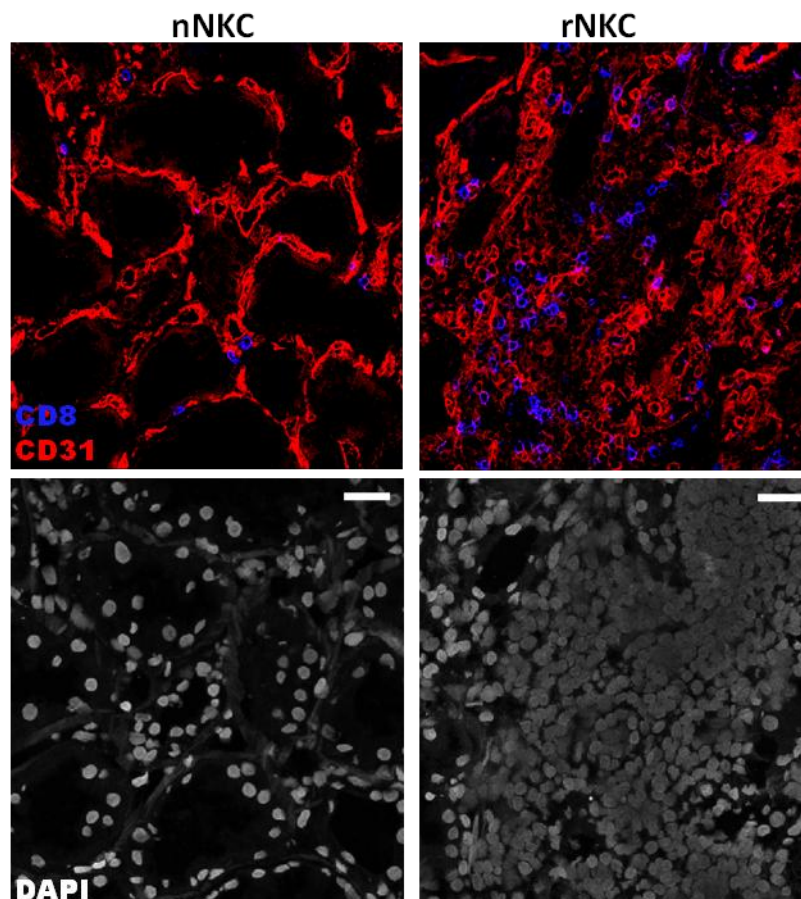


Abb. 5.8.1 Normale und reaktive Bereiche innerhalb des gleichen Nichttumornierengewebes. Immunfluoreszenzfärbung des NKC von Patient 2890 mit Antikörpern gegen CD8 (blau) und CD31 (rot), Kerne mit DAPI (grau) gefärbt. Die Bilder sind aus mehreren z-Ebenen zusammengefügt (Abstand zwischen den Ebenen 0,6 μ m). Links ist ein normales NKC-Gewebeareal mit Tubuli (nNKC), rechts ein Areal mit dichtem Lymphozyteninfiltrat und Gewebeumbau (rNKC) gezeigt. Balken = 20 μ m

Diese rNKC-Bereiche wurden separat hinsichtlich des Extravasationsmusters der CD3+ und CD8+ T-Zellen sowie der NK-Zellen, und des Perforingehalts der CD8+ T-Zellen ausgewertet und mit den untersuchten RCC- bzw. NKC-Geweben verglichen (Abbildung 5.8.2 A-D, Tabelle 8.4 im Anhang).

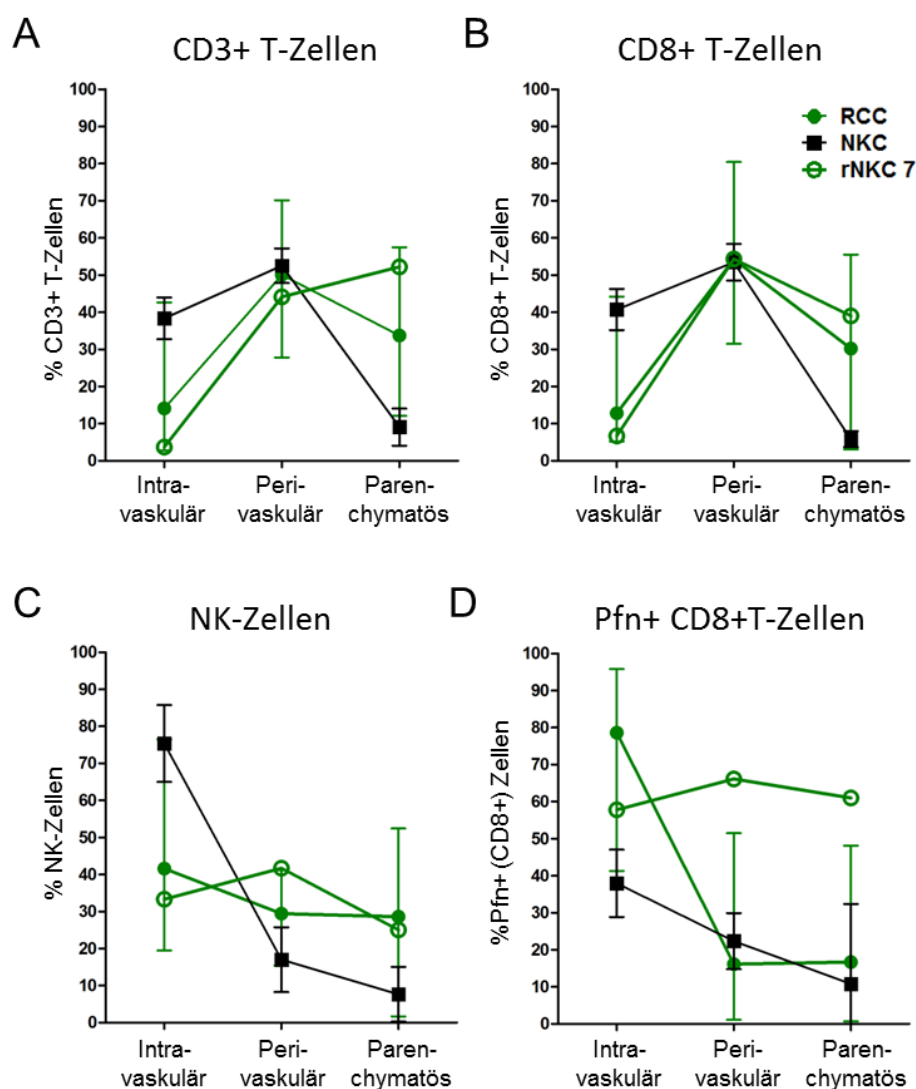


Abbildung 5.8.2 Extravasationsmuster der T- und NK-Zellen sowie Perforingehalt der CD8+ T-Zellen im reaktiven NKC-2890 Gewebeareal im Vergleich zum Nierenzellkarzinom und der Nichttumorniere.

Extravasationsmuster der CD3+ T (A) und CD8+ T-Zellen (B) sowie der NK-Zellen (C), und Prozentsatz der Perforin+ CD8+ T Zellen pro Kompartiment (D) beim reaktiven Gewebe NKC-2890 (rNKC-2890, n = 1) im Vergleich zum Median aller Nierenzellkarzinome (RCC, n = 19) und Nichttumornierengewebe (NKC, n = 9). Eine Gruppe von Symbolen, die durch eine Linie verbunden sind, gehört zu demselben Gewebetyp. Die Symbole sind der Median aus allen untersuchten Patienten eines Gewebetyps. Fehlerbalken sind die Streubreiten.

Im rNKC (grüne Kurve mit offenem Symbol) war die Mehrheit der CD8+ bzw. CD3+ T-Zellen extravasiert und die NK-Zellen zur Hälfte intravaskulär. Somit entsprach das Extravasationsmuster der CD3+ T Zellen (Abb. 5.8 A), CD8+ T Zellen (Abb. 5.8 B) und NK-Zellen (Abb. 5.8 C) im reaktiven Gewebe dem des RCC (grüne Kurve, ausgefüllte Symbole). Bezüglich des Perforins war der Prozentsatz an Perforin+ Zellen bei den intravaskulären CD8+ T-Zellen im rNKC wie beim RCC hoch. Jedoch im Gegensatz zum RCC reduzierte

sich der Anteil an Perforin+ CD8+ T-Zellen nach Extravasation nicht und verhielt sich wie das Nichttumor-NKC (Abb. 5.8, D). Die gute Extravasation der Lymphozyten ist somit unabhängig von der Tumorpathologie, sie scheint auch bei anderweitig entzündlicher Situation aufzutreten. Jedoch eine Perforinreduktion nach Extravasation ins Gewebeparenchym scheint ein tumorspezifisches Phänomen zu sein.

5.4 Zusammenhang zwischen dem Extravasationsmuster der Lymphozyten im RCC und Faktoren des Tumormilieus

5.4.1. Lösliche Faktoren des Tumormilieus

Chemokine und Zytokine sind wichtige Komponenten des Immunsystems, die sowohl das Ausmaß als auch die Art der Immunantwort beeinflussen. Chemokine spielen eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung und Migration der Immunzellen. Zytokine sind essentiell für das Wachstum, die Differenzierung und die Funktion der Immunzellen. Es wurde daher die Frage gestellt, ob ein bestimmtes Zytokin- oder Chemokinprofil die beobachtete unterschiedliche Verteilung und den Perforinstatus der CD8+ T-Zellen und NK-Zellen erklären könnte. Für die hier verwendeten Gewebeproben lagen Daten über die Transkriptmengen der Chemokine *CX₃CL1*, *CXCL16*, *CXCL10*, *CXCL12*, *CXCL8* und *CCL5*, sowie der Zytokine *IL2*, *IL4*, *IL10*, *IL12p40*, *IL15*, *Interferon γ (IFN γ)*, *Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF α)* und *Transforming-Growth-Faktor β (TGF β)* vor (Eckl 2012). Diese Daten wurden zur Gesamtanzahl der CD8+ und CD3+ T-Zellen sowie der NK-Zellen im RCC und zur Extravasationseffizienz (% extravasierte Zellen) in Relation gesetzt (Abbildung 5.9, A-G).

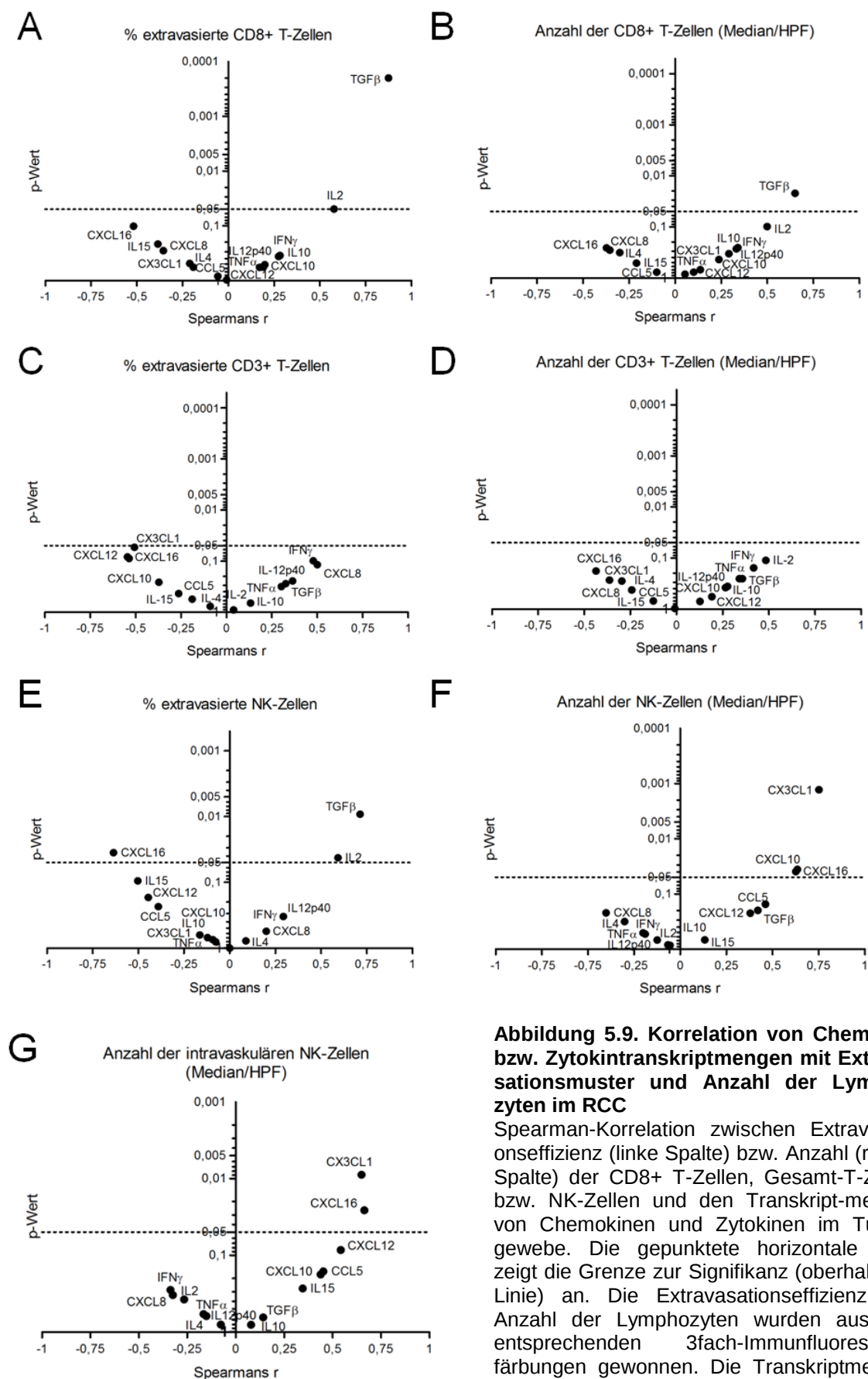


Abbildung 5.9. Korrelation von Chemokin- bzw. Zytokintranskriptmengen mit Extravasationsmuster und Anzahl der Lymphozyten im RCC

Spearman-Korrelation zwischen Extravasationseffizienz (linke Spalte) bzw. Anzahl (rechte Spalte) der CD8+ T-Zellen, Gesamt-T-Zellen bzw. NK-Zellen und den Transkriptmengen von Chemokinen und Zytokinen im Tumorgewebe. Die gepunktete horizontale Linie zeigt die Grenze zur Signifikanz (oberhalb der Linie) an. Die Extravasationseffizienz und Anzahl der Lymphozyten wurden aus den entsprechenden 3fach-Immunfluoreszenzfärbungen gewonnen. Die Transkriptmengen sind aus Eckl 2012.

Es zeigte sich, dass die Extravasationseffizienz der CD8⁺ T-Zellen signifikant positiv mit den Transkriptspiegeln von TGF- β ($p < 0,0001$) und IL-2 ($p = 0,05$) korrelierte (Abbildung 5.9, A). Die TGF- β Transkriptmenge korrelierte weiterhin positiv mit der Anzahl an CD8⁺ T-Zellen im Tumorgewebe (B). Für die CD3⁺ T-Zellen ergaben sich keine signifikanten Korrelationen (C, D). Wie bei den CD8⁺ T-Zellen zeigte auch die Extravasationseffizienz der NK-Zellen eine positive Korrelation mit den Transkriptspiegeln von TGF- β und IL-2. Zudem korrelierte die Extravasationseffizienz der NK-Zellen negativ mit CXCL16 (E). Die Anzahl der NK-Zellen korrelierte positiv mit dem Transkriptmengen der Chemokine CX₃CL1, CXCL16 und CXCL10 (F). Weiterhin korrelierte die Anzahl der intravaskulären NK-Zellen positiv mit den Transkriptspiegeln von CXCL16 und CX₃CL1 (G). Die positive Korrelation mit den Transkriptspiegeln der Chemokine CXCL16 und CX₃CL1 bestätigt vorherige Daten einer positiven Korrelation zwischen den Chemokintranskriptmengen und dem mittels FACS-Analyse ermittelten Anteil der NK-Zellen am Lymphozyteninfiltrat im RCC (Eckl 2012).

Somit scheinen die Chemokine NK-Zellen zum Tumor zu rekrutieren, die positive Korrelation mit der Anzahl an intravaskulären NK-Zellen deutet aber daraufhin, dass sie für die Extravasation nicht von Bedeutung sind. Vielmehr scheint CXCL16 sogar die Extravasation zu behindern (negative Korrelation mit der Extravasationseffizienz).

5.4.2. Zelluläre Komponenten des Tumormilieus

Mithilfe der Immunhistochemie wurden weitere Immunzellpopulationen gefärbt und quantifiziert. Im Speziellen wurden interstitielle dendritische Zellen (DZ) über den Marker CD209 nachgewiesen, CD14 wurde für den Nachweis von Makrophagen verwendet und Tregs wurden über den Marker FOXP3 detektiert. Um zusätzlich noch einen Einblick in den funktionellen Zustand der Immunzellen zu gewinnen, wurde PD-1 als Marker für Immunzellerschöpfung bzw. stattgefundene Aktivierung der Effektorlymphozyten im Tumor angefärbt (Crespo 2013). Weiterhin wurden Perforin als Beispiel für zytotoxische Ausstattung des Immunzellinfiltrats und TIA/GMP-17 zum Nachweis lytischer Granula gefärbt. Die beiden letztgenannten Marker sind charakteristisch für zytotoxische Effektorzellen (CD8⁺ T-Zellen

und NK-Zellen). Aus der Anzahl der jeweils gezählten positiven Zellen wurde für jeden gefärbten Tumor das Verhältnis Perforin/TIA (Pfn/TIA) gebildet, um den Prozentsatz Perforin+ Zellen innerhalb der zytotoxischer Lymphozyten (also die Qualität des zytotoxischen Infiltrats) für jedem Tumor darzustellen. Diese Daten wurden von 19 verschiedenen RCC-Geweben erhoben (Tabelle 8.2 im Anhang) und für jeden Tumor mit der Anzahl an CD8+, CD3+ T-Zellen bzw. NK-Zellen sowie mit der Extravasationseffizienz in Relation gesetzt. Weiterhin wurden die Marker mit dem Prozentsatz der Perforin+CD8+ T-Zellen aus den Immunfluoreszenzfärbungen korreliert (Abbildung 5.10 A-G).

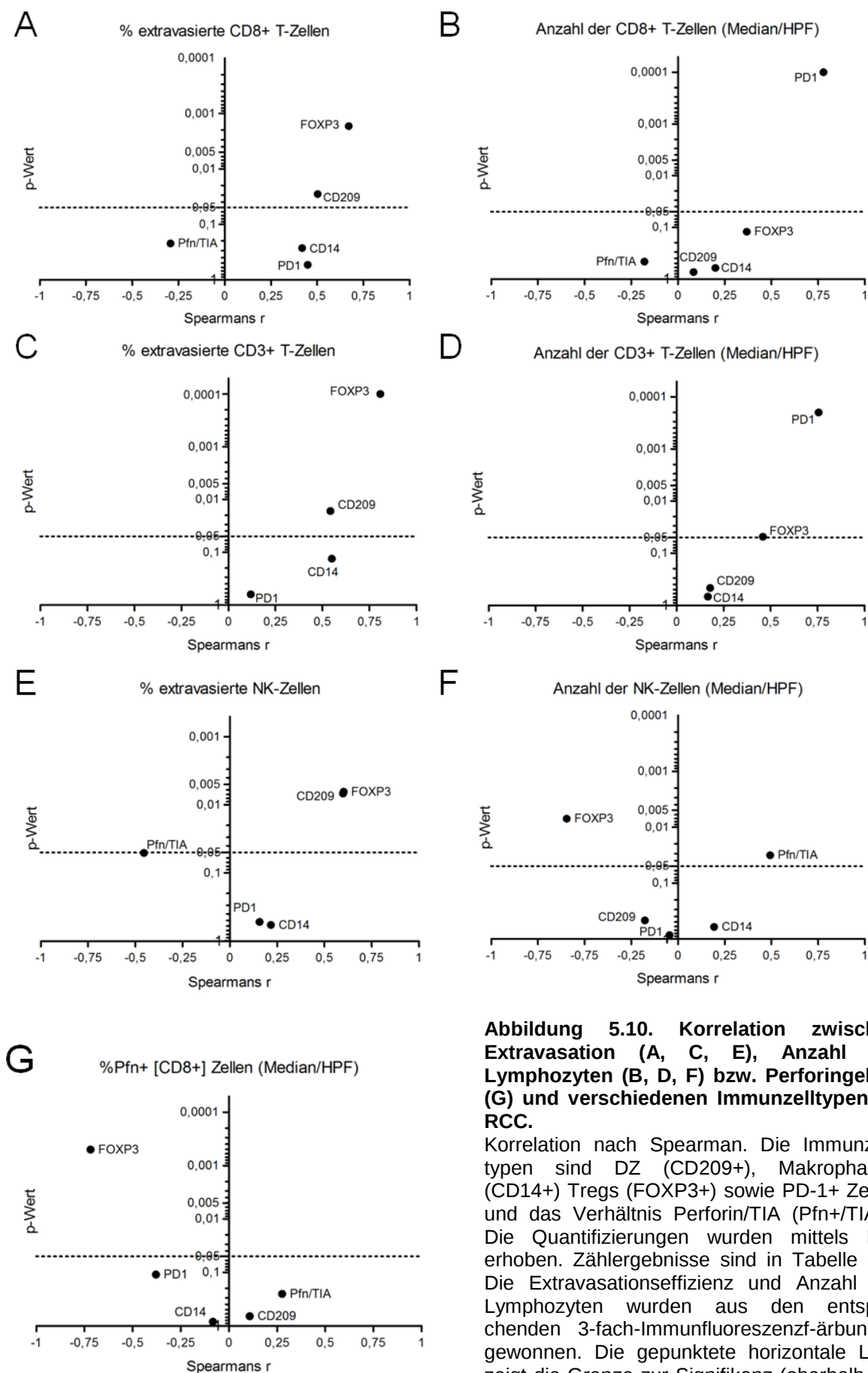


Abbildung 5.10. Korrelation zwischen Extravasation (A, C, E), Anzahl der Lymphozyten (B, D, F) bzw. Perforingehalt (G) und verschiedenen Immunzelltypen im RCC.

Korrelation nach Spearman. Die Immunzelltypen sind DZ (CD209+), Makrophagen (CD14+) Tregs (FOXP3+) sowie PD-1+ Zellen und das Verhältnis Perforin/TIA (Pfn+/TIA+). Die Quantifizierungen wurden mittels IHC erhoben. Zählergebnisse sind in Tabelle 8.2. Die Extravasationseffizienz und Anzahl der Lymphozyten wurden aus den entsprechenden 3-fach-Immunfluoreszenzfärbungen gewonnen. Die gepunktete horizontale Linie zeigt die Grenze zur Signifikanz (oberhalb der Linie) an.

Es zeigte sich, dass die Extravasationseffizienz der CD3+, CD8+ T-Zellen und NK-Zellen positiv mit der Anzahl an DZ (CD209+) und Treg (FOXP3+) korrelierte (A, C, E). Die Anzahl der CD3+, CD8+ bzw. NK-Zellen korrelierte dagegen nicht mit der Anzahl an DZ oder Treg im Tumor (B, D, F), jedoch gab es für die T-Zellpopulationen (CD3+, CD8+), aber nicht die NK-Zellen, eine positive Korrelation mit der Anzahl der PD-1+ Zellen (B, D). Für die Anzahl der NK-Zellen ergab sich eine positive Korrelation zum Verhältnis Perforin/TIA (F), d.h. je mehr NK-Zellen in einem Tumor waren desto größer war die zytotoxische Qualität der zytotoxischen Lymphozyten. Weiterhin zeigte sich eine negative Korrelation zwischen der Anzahl an FOXP3+ Zellen im Tumor und der Anzahl an NK-Zellen. Die Anzahl der FOXP3+ Zellen korrelierte auch negativ mit dem Anteil an Perforin+ CD8+ T-Zellen (G), d.h. wenn ein Tumor viele FOXP3+ Zellen enthielt, dann waren die CD8+ T-Zellen schlecht mit Perforin ausgestattet. Die hier quantifizierten Zellpopulationen (CD209+, FOXP3+, PD-1+ und Pfn+/TIA+ Zellen) korrelierten untereinander nicht, mit Ausnahme einer negativen Korrelation von Pfn+/TIA+ mit FOXP3+ Zellen (entsprechend der in G gezeigten negativen Korrelation der FOXP3+ Zellen mit dem Anteil an Perforin+ CD8+ T-Zellen).

5.5 Eigenschaften des Lymphozyteninfiltrats und histopathologische Charakteristika des Nierenzellkarzinoms

5.5.1 Gefäßmorphologie und Lymphozyteninfiltrat

Bei der Mikroskopie der Tumorgewebe fielen Unterschiede in der Gefäßmorphologie auf. Während sich in manchen RCC-Geweben das Gefäßnetzwerk mit retikulärer Morphologie und guter Vernetzung darstellte (bezeichnet als: retikulär intakt) (Abb. 5.11.1, links), war in anderen RCC-Geweben das Netzwerk teilweise aufgehoben unter Beibehaltung der retikulären Morphologie (bezeichnet als: retikulär geschädigt) (Abb. 5.11.1 Mitte) oder das Gefäßsystem bestand nur noch aus einzelnen meist länglichen Gefäßen (bezeichnet als: axial) (Abb. 5.11.1, rechts). Die Gefäßmorphologie aller untersuchten RCC-Gewebe ist im Anhang zusammengestellt (Kapitel 8.1).

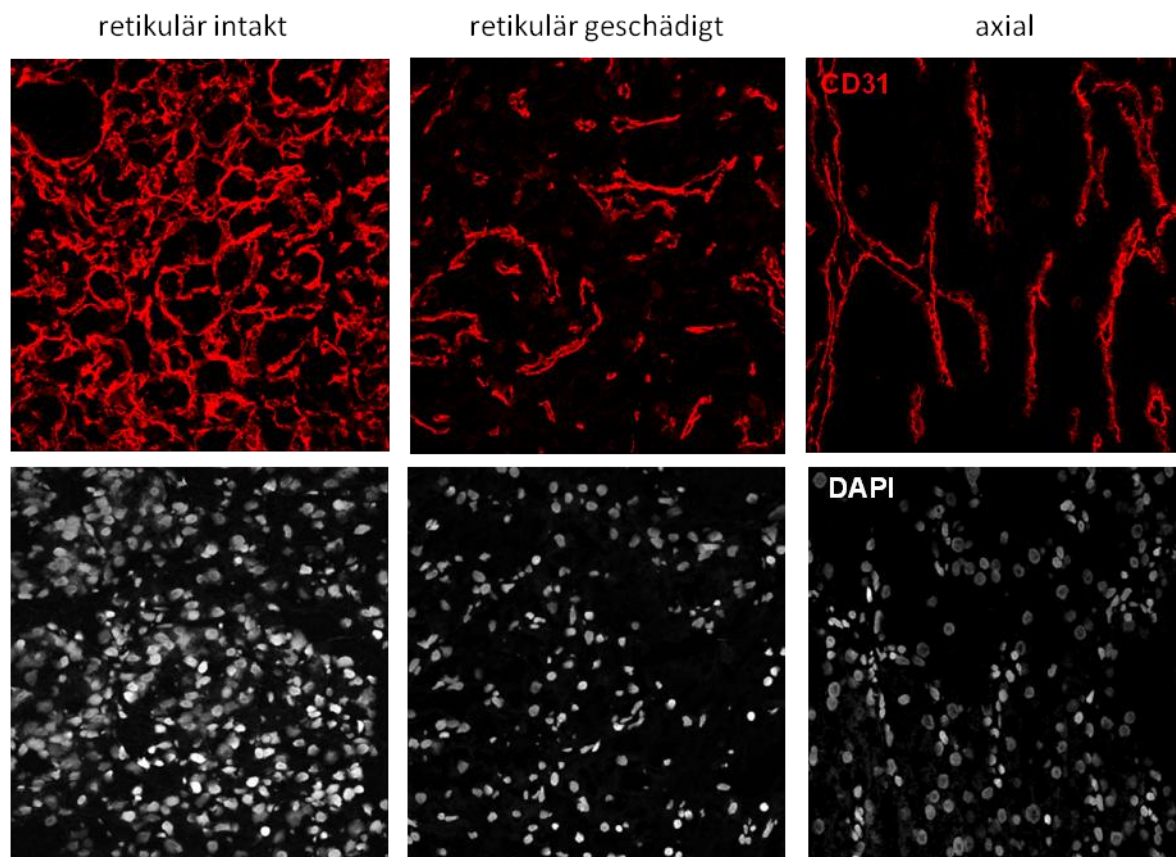


Abb.5.11.1. Gefäßmorphologie im Nierenzellkarzinom.

Immunfluoreszenzfärbung von Tumorgefäßen mit CD31 (rot). Die Tumoren wurden nach dem Gefäßmuster in retikulär intakt (links), retikulär geschädigt (Mitte) und axial (rechts) sortiert. Die unteren Bilder zeigen die Kernfärbung.

Um zu untersuchen, ob es zwischen der Gefäßmorphologie und dem Infiltrationsmuster der Lymphozyten einen Zusammenhang gibt, wurden die RCC-Gewebe entsprechend der Gefäßstruktur in die drei oben genannten Gruppen eingeteilt und mit den Eigenschaften des Lymphozyteninfiltrats korreliert. Folgende Parameter des Lymphozyteninfiltrats wurden verwendet: % extravasierte CD8+ T-Zellen bzw. NK-Zellen, Anzahl der CD8+ T-Zellen bzw. NK-Zellen, Anzahl der extravasierten CD8+ T-Zellen, Anzahl der intravaskulären NK-Zellen, Anzahl der Perforin+ CD8+ T-Zellen bzw. NK-Zellen sowie Anzahl der intravaskulären Perforin+CD8+ T-Zellen bzw. NK-Zellen. Die Werte der Tumoren wurden in einem rot-schwarz-blau Farbenkontinuum dargestellt, wobei rot hohe Werte, schwarz mittlere Werte und blau niedrige Werte repräsentieren. Die Darstellung erfolgte in einer Heatmap mit Gruppierung der Tumoren nach den Gefäßkategorien retikulär intakt, retikulär geschädigt und axial (Abbildung 5.11.2). Die Zusammenstellung zeigt, dass Tumoren mit retikulär

intaktem Gefäßsystem deutlich weniger (blaue Kodierung) Extravasation der T- und v. a. der NK-Zellen zeigten (oberste Zeile in Abb. 5.11.2) als Tumoren mit geschädigter Gefäßstruktur. Für die anderen Parameter zeigte sich eine entgegengesetzte Assoziation.

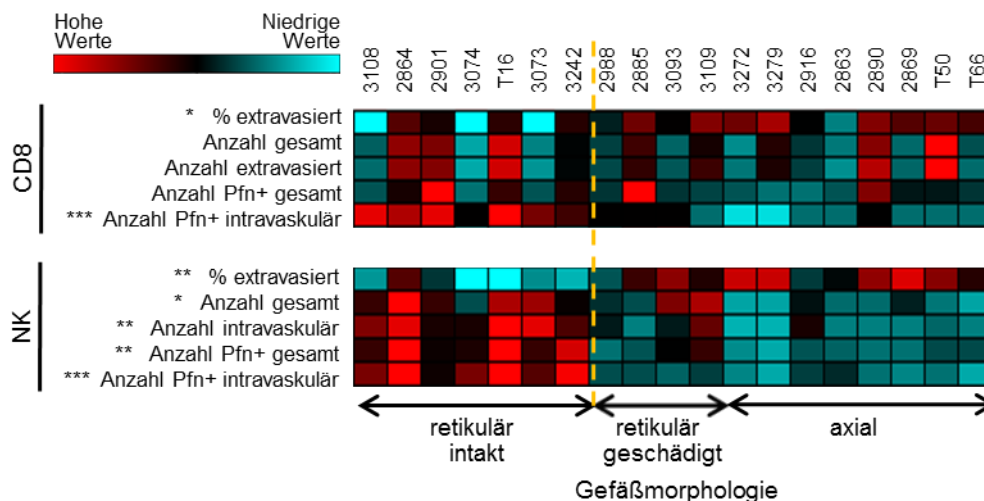


Abbildung 5.11.2 Assoziation zwischen Gefäßmorphologie und Eigenschaften des Lymphozyteninfiltrats.

Heatmap für verschiedene Parameter des Lymphozyteninfiltrats im Nierenzellkarzinom. Die über 3-fach-Immunfluoreszenzfärbung erhobenen Daten (Bezeichnung siehe linke Beschriftung, Originaldaten s. Tabellen 8.3.1 und 8.3.2) wurden in eine rot-schwarz-blaue Kodierung umgewandelt, wobei rot hohe Werte widerspiegelt, blau niedrige. Die Werte eines Tumorgewebes sind in einer Spalte untereinander angeordnet. Die Zahlen über der Spalte geben die Patienten-Identifikationsnummer an. Die Patienten wurden nach ihrer Tumor-Gefäßmorphologie sortiert. Für den statistischen Zweigruppenvergleich wurden die Kategorien axial und retikulär geschädigt zusammengefasst und gegen die retikulär intakte Kategorie verglichen. Die gestrichelte Linie zeigt die Grenze der zwei Vergleichsgruppen an. Die zwei Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney-U Test auf signifikante Unterschiede getestet; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Zur Signifikanzbestimmung wurden die Tumoren mit geschädigtem Gefäßnetzwerk, also die Gruppen axial und retikulär geschädigt, zusammengefasst und gegen die Tumoren mit retikulär intaktem Muster verglichen. Der Zweigruppenvergleich ergab, dass in RCC-Geweben mit einer retikulär intakten Gefäßstruktur der Prozentanteil der extravasierten CD8+ T-Lymphozyten und vor allem der extravasierten NK-Zellen signifikant niedriger war als in Tumoren mit retikulär geschädigtem oder axialem Gefäßsystem. In Tumoren mit intaktem Gefäßsystem waren weiterhin die Anzahl der NK-Zellen, die Anzahl der intravaskulären NK-Zellen sowie die Anzahl der Perforin+ NK-Zellen, gesamt (ohne Kompartimentalisierung) sowie intravaskulär, signifikant höher als in Tumoren mit

geschädigtem Gefäßsystem. Dagegen war für die CD8+ T-Zellen weder die Gesamtzahl, noch die Anzahl der extravasierten Zellen, noch die Anzahl der Perforin+ Zellen signifikant unterschiedlich. Für die CD8+T-Zellen zeigte sich nur eine hoch signifikante positive Korrelation zwischen intaktem Gefäßsystem und der Anzahl der intravaskulären Perforin+ CD8+ T-Zellen.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass in Tumoren mit intaktem Gefäßsystem mehr CD8+ T-Zellen und NK-Zellen im Gefäßsystem zurückgehalten wurden. Außerdem war die Anzahl der mit Perforin ausgestatteten Lymphozyten, intravaskulär deutlich höher, wenn die Tumoren ein intaktes Gefäßsystem zeigten.

5.5.2 Tumorstadium und Lymphozyteninfiltrat

Die Umwandlung von normalem Organendothel zum Tumorendothel geschieht allmählich während der Entwicklung und des Wachstums des Tumors. Die Tumorentwicklung wird durch die Kategorisierung in Stadien nach UICC widergespiegelt. Der Vergleich zwischen Tumorstadium und Gefäßmorphologie zeigte bei den hier untersuchten Tumoren, dass Tumoren in frühem Stadium meist eine retikulär intakte Morphologie zeigten, während bei späten Tumorstadien vermehrt geschädigte/axiale Gefäßmuster beobachtet wurden (Abb.5.12.1). Somit widerspiegelt sich der Tumorprogress im Verlust der Gefäßintegrität wider.

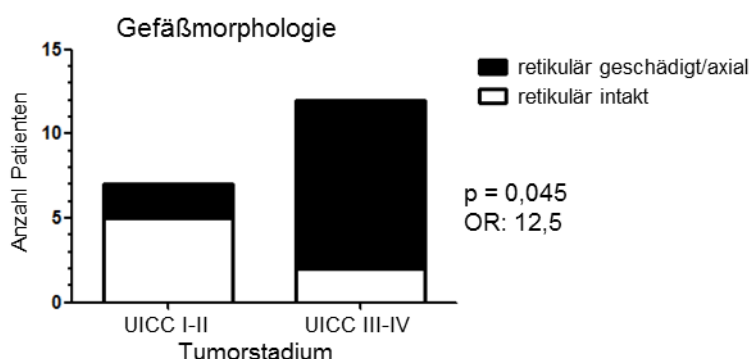


Abbildung 5.12.1. Assoziation zwischen Tumorstadium nach UICC und Gefäßmorphologie.

Vierfelder-Kontingenztafel (hier schematisch als Diagramm dargestellt) zum Vergleich der Gefäßmorphologie (retikulär intakt/geschädigt oder axial) in frühen und späten Tumorstadien. Die Assoziation wurde mit Fisher's exact Test auf Signifikanz untersucht. OR = Odds Ratio.

Um zu untersuchen, ob das unterschiedliche Infiltrationsverhalten der T- und NK-Zellen wie für die Gefäßnetzwerkintegrität beobachtet ebenfalls parallel zur Tumorprogression verläuft, wurden die Tumoren nach frühen (UICC I-II) und späten (UICC III-IV) Stadien sortiert. UICC I+II beinhaltet Tumoren, die relativ klein und auf die Niere begrenzt sind, während Tumoren, die lokal über die Nierengrenze hinaus wachsen oder metastasiert haben, den UICC III+IV zugeordnet werden. Die zwei Gruppen wurden hinsichtlich der Parameter des Infiltrats (wie in Abschnitt 5.5.1., Abb. 5.11) miteinander verglichen.

Der Zweigruppenvergleich (Abb. 5.12.2) zeigt, dass keine der CD8+ T-Zelleigenschaften zwischen Tumoren in frühen und späten Stadien signifikant unterschiedlich war. Im Gegensatz dazu waren alle NK-Zellparameter signifikant unterschiedlich außer der Gesamtzahl. In Tumoren der frühen Stadien war die Extravasationseffizienz der NK-Zellen signifikant geringer und die Anzahl der intravaskulären NK-Zellen höher. Weiterhin gab es in den Tumoren der frühen Stadien mehr Perforin-positive NK-Zellen, sowohl intravaskulär als auch als Gesamtzahl, betrachtet als in Tumoren der späten Stadien.

Diese Beobachtungen sind analog zu denen des Vergleichs der Gefäßmorphologien, welcher gezeigt hatte, dass in Geweben mit intaktem Netzwerk NK-Zellen bevorzugt intravaskulär lokalisiert sind und ein größerer Teil davon Perforin-positiv ist (Abb. 5.11.).

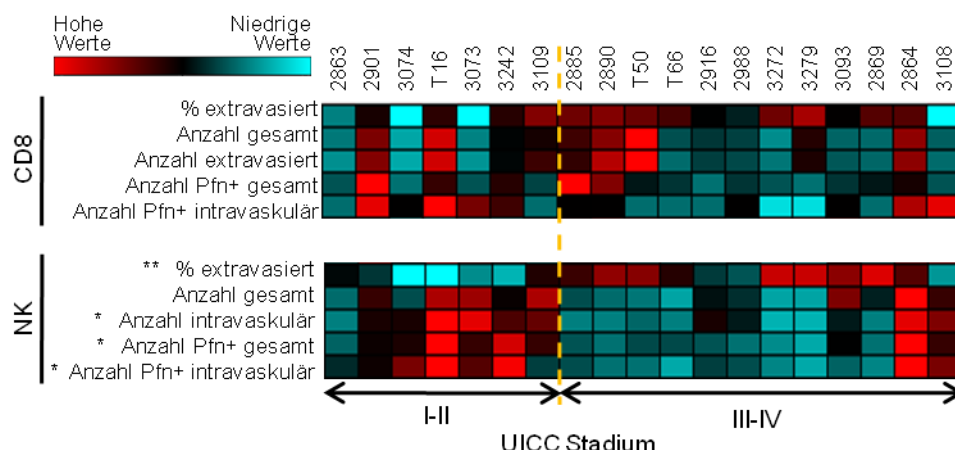


Abbildung 5.12.2. Assoziation zwischen UICC-Stadien und Eigenschaften des Lymphozyteninfiltrats.

Heatmap für verschiedene Parameter des Lymphozyteninfiltrats im Nierenzellkarzinom. Die über 3-fach-Immunfluoreszenzfärbung erhobenen Daten (Bezeichnung siehe linke Beschriftung, Originaldaten Tabellen 8.3.1 und 8.3.2) wurden in eine rot-schwarz-blau Kodierung umgewandelt, wobei rot hohe Werte widerspiegelt, blau niedrige. Die Werte eines Tumorgewebes sind in einer Spalte untereinander angeordnet. Die Zahlen über der Spalte geben die Patienten-Identifikationsnummer an. Die Patienten wurden nach dem UICC-Tumorstadium sortiert. Niedrige Stadien (UICC I-II) wurden mit hohen Stadien (UICC III-IV) verglichen. Die zwei Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney-U Test auf signifikante Unterschiede getestet; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

5.5.3 TNM-Klassifikation und Lymphozyteninfiltrat

Die TNM-Klassifikation ist derzeit der beste Prognosefaktor für das RCC (Ficarra 2009, Moch 2007) und die Basis für die Stadieneinteilung nach UICC. Die TNM-Klassifikation berücksichtigt die Tumorgöße (T) und die Metastasierung in die Lymphknoten (N) und in andere Organe (M). Eine weitere histomorphologische Einteilung der Tumorgewebe mit prognostischer Bedeutung, der Differenzierungsgrad der Tumorzellen, wurde hier nicht berücksichtigt, da die meisten Tumoren des hier untersuchten Patientenkollektivs von mittlerem Differenzierungsgrad (G2) und nur wenige von niedrigem Differenzierungsgrad (G3) waren.

Wie beim Vergleich zwischen UICC-Klassifikation und Gefäßmorphologie zeigte sich auch eine Beziehung zwischen Metastasierung und Gefäßmorphologie: Bei den meisten Patienten, deren Tumoren ein retikulär intaktes Gefäßmuster zeigten, war zum Zeitpunkt der Diagnose und UICC-Stadieneinteilung keine Metastasierung nachgewiesen, im Gegensatz zu den Tumoren mit retikulär geschädigtem oder axialem Muster (Abb. 5.13.1) ($p = 0,013$; OR: 28,3). Bei der Gegenüberstellung zwischen Gefäßmorphologie und Tumorgöße (T1/2

versus T3/4) zeigte sich trendweise eine Korrelation zwischen kleinen Tumoren und intakter Gefäßmorphologie, jedoch ohne Signifikanz zu erreichen.

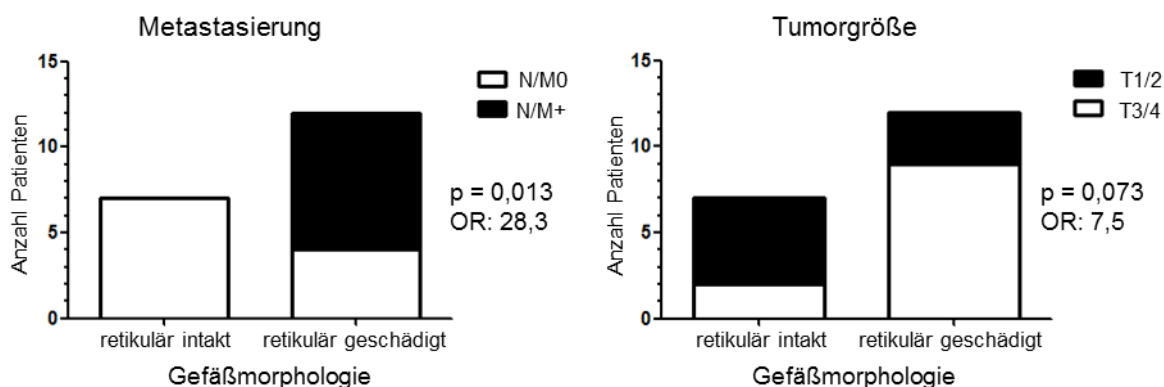


Abbildung 5.13. Assoziation zwischen Gefäßmorphologie und Metastasierung bzw. Tumorgroße.

Vierfelder-Kontingenztafel (hier schematisch als Diagramm dargestellt) zum Vergleich von Tumoren mit retikulär intaktem und retikulär geschädigtem/axialem Gefäßmuster bezüglich des Vorhandenseins von Metastasen bzw. der Tumorgroße. Die Berechnungen wurden mit dem Fisher's exact Test auf Signifikanz untersucht. OR = Odds Ratio.

Um mögliche Beziehungen zwischen den Komponenten der TNM-Klassifikation und Parametern des Immunzellinfiltrats zu erkennen, wurden die RCC-Tumoren zum einen nach ihrer Tumorgroße (T1/2 versus T3/T4) und zum anderen nach Metastasierung (N0M0 versus N+M+) eingeteilt und auf Parameter des Immuninfiltrats verglichen.

Weder die Eigenschaften der CD8+ T-Zellen noch der NK-Zellen zeigten einen signifikanten Unterschied zwischen den zwei nach Tumorgroße unterschiedenen Gruppen (Abb. 5.14).

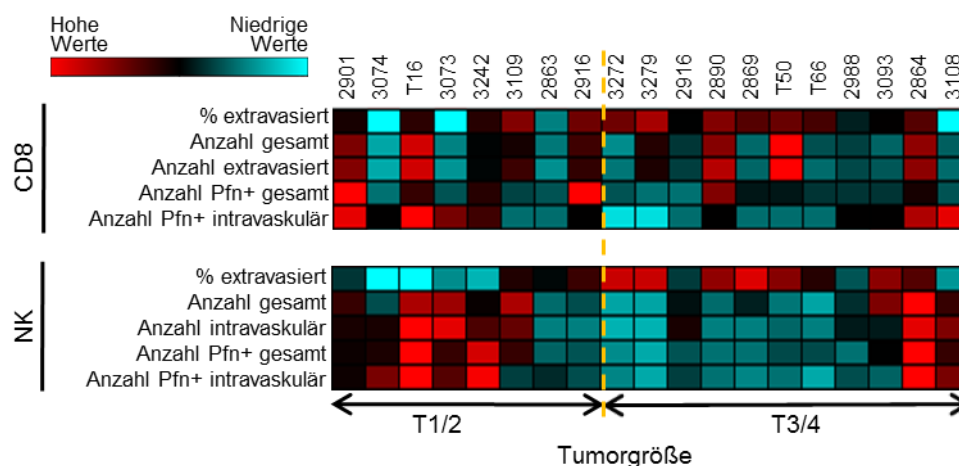


Abbildung 5.14 Assoziation von Eigenschaften des Lymphozyteninfiltrats mit der Tumorgroße. Heatmap für verschiedene Parameter des Lymphozyteninfiltrats im Nierenzellkarzinom. Die über 3-fach-Immunfluoreszenzfärbung erhobenen Daten (Bezeichnung siehe linke Beschriftung, Originaldaten Tabellen 8.3.1 und 8.3.2) wurden in eine rot-schwarz-blau Kodierung umgewandelt, wobei rot hohe Werte widerspiegelt, blau niedrige. Die Werte eines Tumorgewebes sind in einer Spalte untereinander angeordnet. Die Zahlen über der Spalte geben die Patienten-Identifikationsnummer an. Die Patienten wurden nach der Tumorgroße sortiert. Die zwei Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney-U Test auf signifikante Unterschiede getestet; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Der Vergleich der Immunzellparameter mit dem Metastasierungsstatus (Abb. 5.15) zeigte bei den hier untersuchten RCC-Tumoren bei Betrachtung der CD8+ T-Zellen nur die Anzahl der intravaskulären Perforin+ Zellen als signifikant unterschiedlich, mit mehr intravaskulären Perforin+ CD8+ T-Zellen in N0M0-Tumoren. Bei Betrachtung der NK-Zellen waren alle Parameter außer der Extravasationseffizienz signifikant unterschiedlich. Insbesondere waren die Anzahl der NK-Zellen sowie die Anzahl der Perforin+ NK-Zellen, jeweils als Gesamtzahl oder intravaskulär, höher, wenn die Tumoren zum Zeitpunkt der Diagnose nicht metastasiert hatten.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das intravaskuläre Kompartiment besondere Bedeutung bei der Metastasenkontrolle im RCC haben könnte.

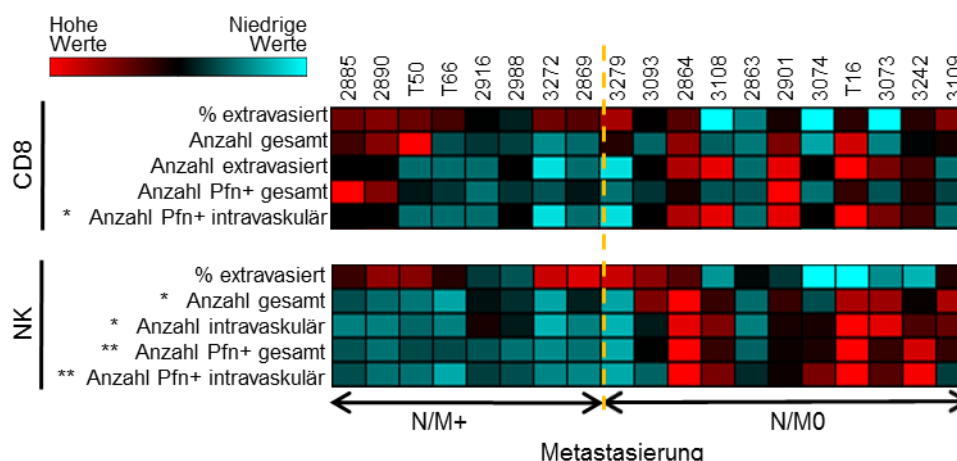


Abbildung 5.15 Assoziation zwischen Eigenschaften des Lymphozyteninfiltrats und Metastasierung.

Heatmap für verschiedene Parameter des lymphozytären Infiltrationsverhaltens im Nierenzellkarzinom. Die über 3-fach-Immunfluoreszenzfärbung erhobenen Daten (Bezeichnung siehe linke Beschriftung, Originaldaten Tabellen 8.3.1 und 8.3.2) wurden in eine rot-schwarz-blau Kodierung umgewandelt, wobei rot hohe Werte widerspiegelt, blau niedrige. Die Werte eines Tumorgewebes sind in einer Spalte untereinander angeordnet. Die Zahlen über der Spalte geben die Patienten-Identifikations-nummer an. Die Patienten wurden nach dem Vorhandensein von Lymphknoten- (N) und Organmetastasen (M) sortiert. Die zwei Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney-U Test auf signifikante Unterschiede getestet; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

5.6 Intravaskuläre NK-Zellen als Indikatoren für Metastasierung

Weil im nicht-metastasierten RCC die Lymphozytenzellzahl im intravaskulärem Kompartiment hoch war, wurde weiterführend getestet, ob dieser Parameter ein diagnostisches Werkzeug für das Metastasenrisiko sein könnte. In einer Vierfelder-Kontingenztafel wurden für folgende Parameter der positive und negative prädiktive Wert sowie die Odds Ratio für das Vorhandensein von Metastasen ermittelt, wobei eine allgemeine Metastasenprävalenz von 30% zum Zeitpunkt der Diagnose (Comprehensive Cancer Center, Uniklinik Ulm) zugrunde gelegt wurde: die Anzahl der intravaskulären NK-Zellen, die Anzahl der intravaskulären Perforin+ NK-Zellen, die Anzahl der intravaskulären Perforin+ CD8+ T-Zellen und die Anzahl der intravaskulären Perforin+ Zellen (CD8 plus NK). Die Patienten wurden für die einzelnen Parameter jeweils in zwei Gruppen mit dem Median als Grenze aufgeteilt. Abb. 5.16 zeigt, dass für Tumoren mit einer hohen Anzahl an intravaskulären NK-Zellen der negative prädiktive Wert bei fast 90% lag (Abb. 5.16, A). Betrachtete man die Anzahl der intravaskulären Perforin+ NK-Zellen so lag der negative prädiktive Wert sogar bei 100% (Abb. 5.16, B). Das heißt, bei Patienten, deren Tumoren eine

hohe Anzahl intravaskulärer NK-Zellen bzw. intravaskulärer Perforin+ NK-Zellen haben, sind mit 90%iger bzw. 100%iger Wahrscheinlichkeit keine Metastasen vorhanden. Der positive prädiktive Wert (d. h. die Assoziation einer niedrigen Anzahl intravaskulärer Zellen mit Metastasenpräsenz) war mit 70% bzw. 80% etwas niedriger. Das Risiko, Metastasen zu haben, war bei Patienten, deren Tumoren eine niedrige Anzahl an intravaskulären NK-Zellen bzw. intravaskulären Perforin+ NK-Zellen hatten, um 19- bzw. 65-fach erhöht gegenüber Patienten mit einer hohen intravaskulären NK- oder Pfn+ NK-Zellzahl.

Die Anzahl der intravaskulären Perforin+ CD8+ T-Zellen (Abb. 5.16, C) zeigte keinen signifikanten positiven und negativen prädiktiven Wert (63% bzw. 73%) und das Risiko, Metastasen zu haben, war bei Patienten, deren Tumoren weniger Perforin+ intravaskuläre CD8+ T-Zellen hatten, etwa 4-fach erhöht.

Betrachtete man alle Perforin+ intravaskulären Zellen ohne zwischen CD8+ T-Zellen und NK-Zellen zu unterscheiden, so lag der negative prädiktive Wert bei 100% und der positive bei ca. 67%. Für Patienten, deren Tumoren viele Perforin+ intravaskuläre Lymphozyten hatten, ergab sich ein 28-fach erhöhtes Metastasierungsrisiko.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Bestimmung der intravaskulären NK-Zellpräsenz durch mikroskopische Gewebefärbung als Indikator für das Vorhandensein von Metastasen geeignet sein könnte und vielleicht zukünftig den oftmals schwierigen Prozess des radiologischen Metastasennachweises unterstützen könnte.

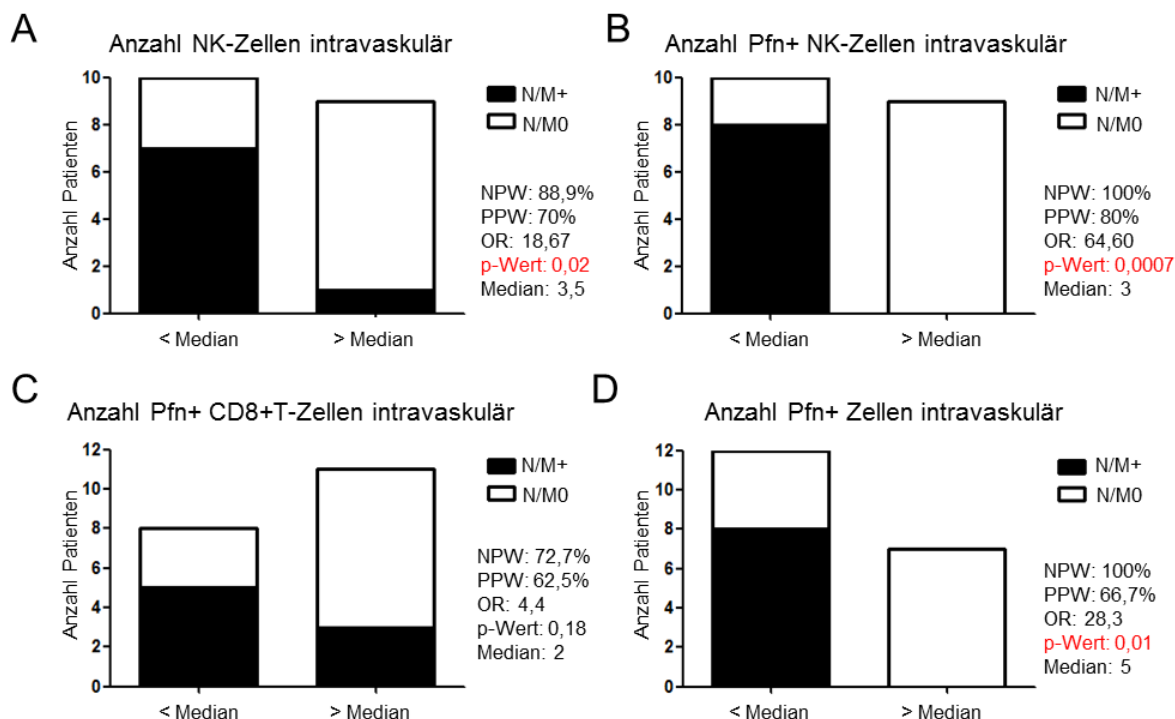


Abbildung 5.16. Intravaskuläre Lymphozyten als Prädiktoren für das Vorhandensein von Metastasen.

Mithilfe einer Vierfelder-Kontingenztafel (hier schematisch als Diagramm dargestellt) wurden der positive (PPW) und negative (NPW) prädiktive Wert sowie die Odds Ratio (OR) für die Anzahl von intravaskulären NK-Zellen (A), intravaskulären Perforin+ NK-Zellen (B), intravaskulären Perforin+ CD8+ T-Zellen (C) und intravaskulären Perforin+ Zellen (Summe aus intravaskulären Perforin+ CD8+ T-Zellen und NK-Zellen) (D) berechnet. Die Gruppen wurden jeweils nach dem Median der Zellzahl eingeteilt. Für die Berechnung wurde eine Metastasenprävalenz zum Zeitpunkt der Diagnose von 30% angenommen. Die Berechnungen wurden mit dem Fisher's exact Test auf Signifikanz untersucht (signifikante p-Werte rot markiert).

5.7 Eigenschaften des Lymphozyteninfiltrats und klinische Relevanz beim Nierenzellkarzinom

5.7.1 Eigenschaften des Lymphozyteninfiltrats und Patientenüberleben

Weil sich ein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Metastasen und den intravaskulär gelegenen Lymphozyten zeigte, und Metastasen ein Indikator für schlechte Prognose sind, wurde weiterführend untersucht, ob die in dieser Arbeit gefundenen Eigenschaften des Immuninfiltrats eine prognostische Relevanz für das Patientenüberleben haben. Dazu wurden die 16 Patienten, für welche klinische Follow-up Daten verfügbar waren (Tabelle 3.1), nach aufsteigendem Überleben sortiert. Mit dem medianen Überleben (79,5

Monate) als Grenze wurden zwei Gruppen gebildet und diese für einzelne Eigenschaften des Infiltrats (siehe auch Abschnitt 5.4.1.) miteinander verglichen.

Die Abb. 5.17.1 zeigt, dass die Gesamtzahl der CD8+ T-Zellen keine prognostische Relevanz für das Patientenüberleben hat. Ebenso wenig zeigte die Extravasationseffizienz der CD8+ T-Zellen eine Assoziation mit dem Überleben. Dagegen war eine hohe Anzahl an NK-Zellen, insbesondere an intravaskulären NK-Zellen, sowie eine hohe Anzahl an Perforin+ NK-Zellen signifikant mit längerem Überleben assoziiert. Ein interessanter Befund war darüber hinaus, dass auch eine hohe Anzahl intravaskulärer Perforin+ CD8+ T-Zellen, nicht aber die Gesamtzahl der Perforin+ CD8+ T-Zellen, signifikant mit längerem Überleben korrelierte. Offensichtlich spielt das vaskuläre Kompartiment, insbesondere die zytotoxische Ausstattung der Lymphozyten in diesem Kompartiment, eine besondere Rolle für das Patientenüberleben.

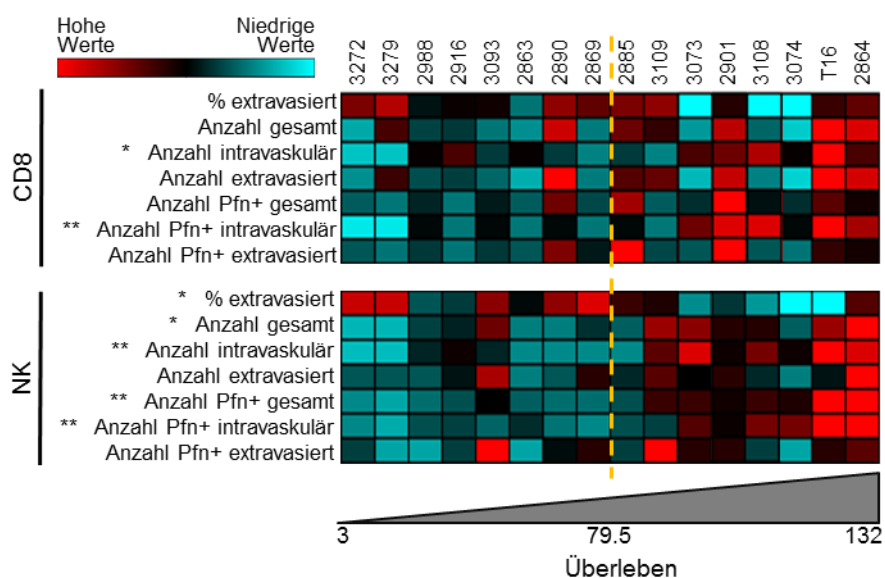


Abbildung 5.17.1 Zweigruppenvergleich zwischen Eigenschaften des Lymphozyteninfiltrats und Patientenüberleben

Heatmap für verschiedene Parameter des Lymphozyteninfiltrats (Bezeichnung siehe linke Beschriftung, Originaldaten Tabellen 8.3.1 und 8.3.2). Dafür wurden die über 3-fach-Immunfluoreszenzfärbung erhobenen Daten (Bezeichnung siehe linke Beschriftung, Originaldaten Tabellen 8.3.1 und 8.3.2) in eine rot-schwarz-blau Kodierung umgewandelt, wobei rot hohe Werte widerspiegelt, blau niedrige. Die Werte eines Tumorgewebes sind in einer Spalte untereinander angeordnet. Die Zahlen über der Spalte geben die Patienten-ID an. Die Patienten wurden nach aufsteigendem Überleben (in Monaten) sortiert. Zwei Gruppen wurden gebildet mit dem Median der überlebten Monate als Grenze (79,5, gestrichelte Linie). Die zwei Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney-U Test auf signifikante Unterschiede getestet; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Jeder Parameter des Immuninfiltrats, welcher eine signifikante Assoziation mit dem Überleben zeigte (Abb. 5.17.1), wurde zusätzlich entsprechend dem Median dichotomisiert und in Kaplan-Meier Überlebenskurven dargestellt. Die zwei resultierenden Kurven wurden mithilfe des Log-Rank (Mantel-Cox) Tests auf statistische Signifikanz getestet. Die Ergebnisse der Vergleiche mit p-Werten und Hazard Ratios sind in Tabelle 5.1. zusammengefasst. Es zeigte sich, dass sich die Überlebenskurven bei allen Parametern bis auf die Extravasationseffizienz der NK-Zellen im dichotomen Vergleich signifikant unterschieden und somit die Befunde aus der Abb. 5.17.1 bestärkten.

Infiltrat-Eigenschaften	Median	n	Log-Rank Mantel-Cox p-Wert	Hazard Ratio
Anzahl CD8+ T-Zellen intravaskulär	<3	9	0,02*	5,4
	>3	7		
Anzahl Pfn+ CD8+ T-Zellen intravaskulär	<2	10	0,0048**	8,1
	>2	6		
Anzahl NK-Zellen gesamt	<7	9	0,0168*	5,6
	>7	7		
Anzahl NK-Zellen intravaskulär	<3,5	8	0,004**	8,6
	>3,5	8		
% extravasierte NK-Zellen	<56	8	0,54	0,64
	>56	8		
Anzahl Pfn+ NK-Zellen gesamt	<5,5	8	0,008**	9,3
	>5,5	8		
Anzahl Pfn+ NK-Zellen intravaskulär	<3	9	0,0022**	10,1
	>3	7		

Tabelle 5.1. Log-Rank-Analyse für Eigenschaften des Immuninfiltrats und Patientenüberleben

Die in Abbildung 5.17.1 verwendeten Parameter des Immunzellinfiltrats, für die ein signifikanter Unterschied berechnet wurde, wurden jeweils in zwei Gruppen geteilt mit dem Median als Grenze. Die zwei daraus resultierenden Überlebenskurven wurden mithilfe des Mantel-Cox-Log-Rank Testes auf Signifikanz getestet. n = Anzahl der Tumoren in der Gruppe. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

In Abbildung 5.17.2. sind exemplarisch drei Parameter als Kaplan-Meier-Kurven gezeigt, die einen signifikanten Unterschied bezüglich des Überlebens zeigten: Anzahl der intravaskulären NK-Zellen (A), Anzahl der intravaskulären Perforin+ NK-Zellen (B) und Anzahl der intravaskulären Perforin+ CD8+ T-Zellen (C).

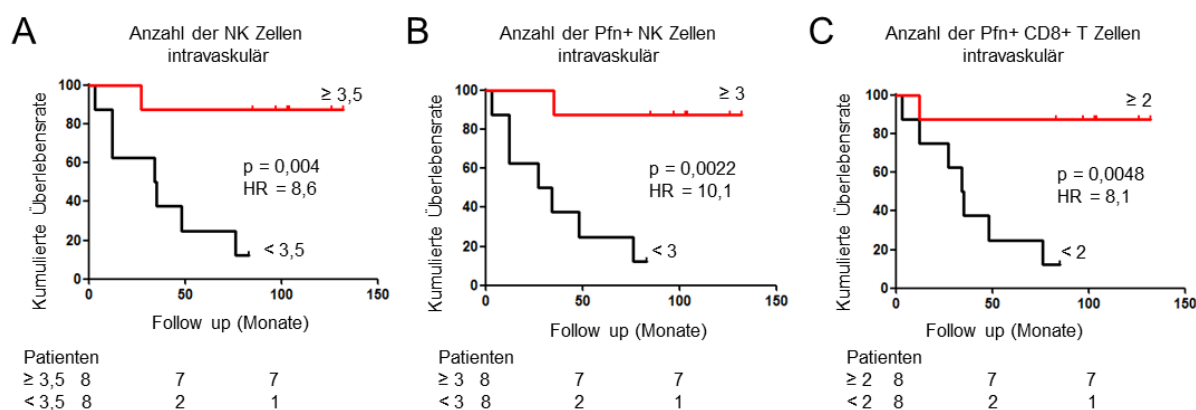


Abbildung 5.17.2 Patientenüberleben und Eigenschaften des Immunzellinfiltrats

Dargestellt ist das kumulative Überleben in Abhängigkeit von der Anzahl an intravaskulären NK-Zellen (A), Anzahl an intravaskulären Perforin+ NK-Zellen (B) und Anzahl an intravaskulären Perforin+ CD8+ T-Zellen (C). Die Patienten wurden nach dem Median der Immunzellparameter dichotomisiert. Die zwei Kurven wurden mit dem Mantel-Cox-Log-rank Test auf Signifikanz getestet. (HR = Hazard Ratio).

Von den etablierten histo-pathologischen Parametern zeigte die Stadienaufteilung nach UICC sowie das Vorhandensein von Metastasen, wie erwartet, eine prognostische Signifikanz bezüglich des Überlebens (Abb. 5.17.3), wobei Patienten mit späten Tumorstadien und Patienten mit Metastasen ein schlechteres Überleben hatten. Auch Patienten mit Tumoren, die ein retikulär geschädigtes oder axiales Gefäßmuster hatten, hatten kürzeres Überleben als Patienten mit Tumoren mit retikulär intaktem Muster (Abb. 5.17.3, C).

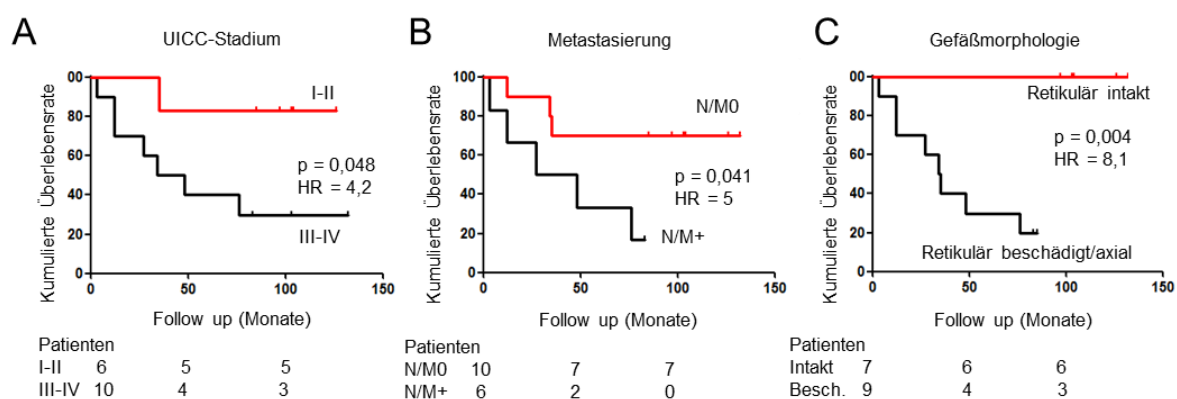


Abbildung 5.17.3 Patientenüberleben und Tumorstadium, Metastasierung sowie Gefäßmorphologie

Dargestellt ist das kumulative Überleben in Abhängigkeit vom UICC-Stadium (A), Vorhandensein von Metastasen (B) und Gefäßmorphologie (C). Die Patienten wurden nach frühen (I+II) und späten (III+IV) Stadien (A), mit/ohne Metastasen (B) und retikulär geschädigtem/axialem bzw. retikulär intaktem Gefäßmuster (C) dichotomisiert. Die daraus resultierenden Kurven wurden mit dem Mantel-Cox-Log-Rank Test auf Signifikanz getestet. (HR = Hazard Ratio).

In Abb. 5.17.4 wird noch einmal die Bedeutung des intravaskulären Kompartiments für das Patientenüberleben verdeutlicht.

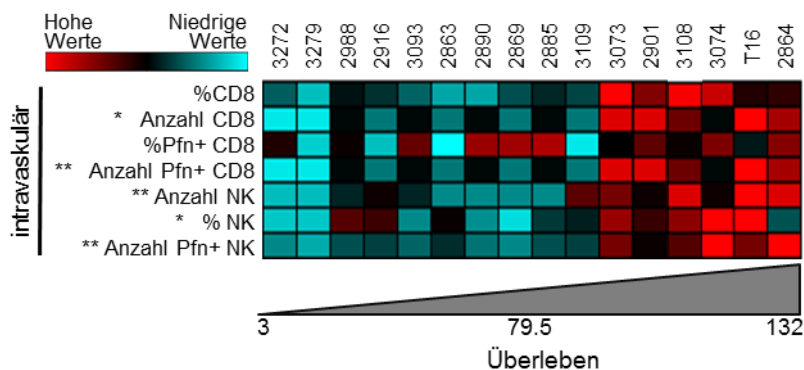


Abbildung 5.17.4 Zusammenhang zwischen Lymphozyteneigenschaften im intravaskulären Kompartiment und Überleben.

Heatmap für verschiedene Parameter des lymphozytären Infiltrats im intravaskulären Kompartiment. Die über 3-fach-Immunfluoreszenzfärbung erhobenen Daten (Bezeichnung siehe linke Beschriftung, Originaldaten Tabellen 8.3.1 und 8.3.2) wurden in eine rot-schwarz-blau Kodierung umgewandelt, wobei rot hohe Werte widerspiegelt, blau niedrige. Die Werte eines Tumorgewebes sind in einer Spalte untereinander angeordnet. Die Zahlen über der Spalte geben die Patienten-ID an. Die Patienten wurden nach aufsteigendem Überleben (in Monaten) sortiert.

5.7.2 Intravaskuläre NK-Zellen als unabhängiger prognostischer Faktor

Unter den Parametern des lymphozytären Infiltrats hatte die Anzahl der intravaskulären NK-Zellen in der univariaten Log-Rank Analyse den größten positiven Effekt auf das Überleben (Tabelle 5.1). Um das Potential als prognostischer Faktor neben den bereits etablierten Faktoren (UICC-Stadium, Metastasierung) zu bestimmen, wurde eine multivariate Cox-Regression verwendet. Die Gefäßmorphologie wurde wegen der ebenfalls sehr starken Assoziation mit dem Überleben (Abb. 5.15.3) auch berücksichtigt. Tabelle 5.2. zeigt die berechneten Hazard Ratios der einzelnen Variablen im multivariaten Modell, welches jeweils 3 Variablen einschloss: Variante A) intravaskuläre Anzahl NK-Zellen, Metastasierung und Gefäßmorphologie; Variante B) intravaskuläre Anzahl NK-Zellen, UICC-Stadium und Gefäßmorphologie. Die Patienten wurden für die genannten Variablen in zwei Gruppen eingeteilt. Bei den intravaskulären NK-Zellen erfolgte die Dichotomisierung nach der medianen Anzahl (> 3,5), beim UICC-Stadium wurden UICC I und II bzw. UICC III und IV jeweils zusammengefasst, bei der Gefäßmorphologie wurde retikulär intakt von geschädigt

unterschieden. Beim Metastasenstadium wurden einerseits alle Patienten ohne Lymphknoten und Organmetastasen gegen die mit Metastasen N/M+ (unabhängig von der Metastasenlokalisation) verglichen.

Kombination A	Hazard Ratio	95% CI	p
Intravaskuläre Anzahl NK-Zellen (<3,5/>3,5)	0,4	0,0 – 4,0	0,460
NOM0/NM+	0,9	0,2 – 4,2	0,855
Gefäßmorphologie (intakt/geschädigt)	$1,0 \times 10^6$	$0,0 – 8,9 \times 10^{243}$	0,961

Kombination B	Hazard Ratio	95% CI	p
Intravaskuläre Anzahl NK-Zellen (<3,5/>3,5)	0,6	0,1 – 8,9	0,832
UICC I-II/III-IV	2,4	0,2 – 27,8	0,484
Gefäßmorphologie (intakt/geschädigt)	$1,0 \times 10^6$	$0,0 – 2,0 \times 10^{243}$	0,961

Tabelle 5.1. Multivariate Cox-Regression

Im Cox-Regressionsmodell A wurde die drei Variablen intravaskuläre Anzahl NK-Zellen, Metastasenstatus und Gefäßmorphologie berücksichtigt. Im Modell B wurde anstelle des Metastasenstatus das UICC-Stadium verwendet. Berechnet wurde die Hazard Ratio der einzelnen Variablen mit dem 95%-Konfidenzintervall (CI) und dem p-Wert.

Bei gleichzeitigem Einschluss aller Variablen in das Regressionsmodell gab es in beiden Kombinationen keinen unabhängigen Prognosefaktor; bei schrittweisem Ein-/Ausschluss der einzelnen Variablen („stepwise model“) in den beiden Varianten blieb am Ende immer der NK-Gehalt als signifikanter Faktor übrig.

	Hazard Ratio	95% CI	p
Intravaskuläre Anzahl NK-Zellen (<3,5/>3,5)	0,08	0,01 – 0,69	0,022

Mit einer ermittelten Hazard Ratio von 0,08 bedeutet dies, dass Patienten mit Tumoren der mit einer hohen Anzahl an NK-Zellen ein um den Faktor 12,5 verringertes Sterberisiko haben als Patienten mit Tumoren mit einer niedrigen Anzahl. Somit hat der intravaskuläre NK-Gehalt mit einem Median von 3,5 als cut-off durchaus prognostische Bedeutung. Jedoch gilt anzumerken, dass die hier verfügbare Fallzahl an Patienten mit Überlebensdaten (n = 16;

medianes Follow-up von 80 Monaten) für eine multivariate Analyse mit 3 Variablen zu klein ist. Für eine belastbare Aussage bei einem Einschluss von 3 Variablen ist entsprechend der statistischen Literatur eine Anzahl von 60 Patienten nötig (nach der Formel: Fallzahl = $10 \times k/p$, mit k: Zahl der Variablen, p: Anteil der Fälle mit erreichtem Endpunkt).

5.7.3 Eigenschaften des Immunzellinfiltrats in Tumoren der späten Stadien

In dem hier untersuchten Patientenkollektiv, insbesondere in der Gruppe der Patienten mit Tumoren in spätem Tumorstadium (UICC III-IV), wurde eine große Spannweite im Überleben von 3 bis 132 Monaten beobachtet (Tabelle 3.1, S. 37). Daher wurde diese Patientengruppe gesondert hinsichtlich der Eigenschaften des Immunzellinfiltrats analysiert. Analog zur Analyse des gesamten Patientenkollektivs (Abschnitt. 5.7.1, S. 83) wurden die Patienten mit Tumoren des UICC III-IV Stadiums nach dem Medianen Überleben (41 Monate) als Grenze dichotomisiert und die zwei Gruppen hinsichtlich der Eigenschaften des Infiltrats miteinander verglichen (Abb. 5.18). Es zeigte sich, dass nur ein Parameter, die Anzahl der extravasierten Perforin+ CD8+ T-Zellen, zwischen den beiden Patientengruppen signifikant unterschiedlich war. Keiner der NK-Zellparameter zeigte eine signifikante Assoziation. Eine mögliche Erklärung, warum NK-Zellen bei den Tumoren des späten Stadiums die Prognose des RCC nicht mehr positiv beeinflussten, könnten die Beobachtungen sein, dass in Tumoren des späten Stadiums die NK-Zellen bevorzugt extravasiert vorliegen (Abschnitt 5.4.2.) und die NK-Zellen, wenn sie extravasiert sind, kein Perforin mehr besitzen. Abb.5.18, B Zeigte die Korrelationsanalyse zwischen dem Prozentanteil extravasierter NK-Zellen und der Gesamtzahl Perforin+ NK-Zellen im selben Tumor. Dabei wird deutlich, dass ein Tumor umso weniger Perforin+ NK-Zellen enthält, je mehr die NK-Zellen extravasiert vorliegen. Interessanterweise hing die Anzahl extravasierter Perforin+ T-Zellen mit dem Prozentsatz an Perforin+ CD8+ T-Zellen intravaskulär (5.18, C), d. h. Je besser ausgestattet die T-Zellen von der Peripherie im Tumor ankommen, desto mehr Zellen besitzen Perforin nach Extravasation.

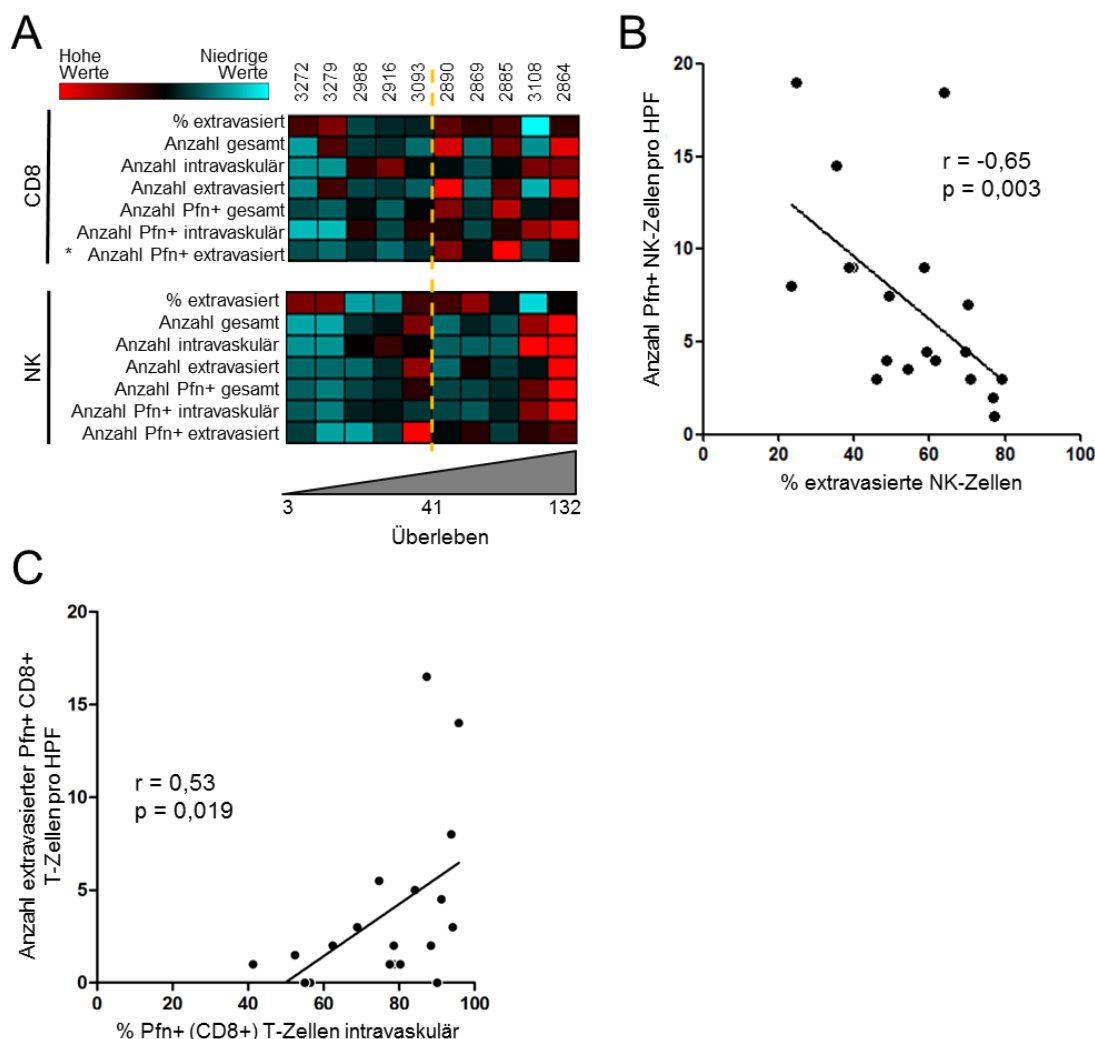


Abbildung 5.18. Überleben der Patienten mit RCC-Tumoren in spätem Tumorstadium (UICC III-IV) und Eigenschaften der tumoralen Lymphozyten

A. Heatmap für verschiedene Parameter des lymphozytären Infiltrats. Die über 3-fach-Immunfluoreszenzfärbung erhobenen Daten (Bezeichnung siehe linke Beschriftung, Originaldaten Tabellen 8.3.1 und 8.3.2) wurden in eine rot-schwarz-blau Kodierung umgewandelt, wobei rot hohe Werte widerspiegelt, blau niedrige. Die Werte eines Tumorgewebes sind in einer Spalte untereinander angeordnet. Die Zahlen über der Spalte geben die Patienten-ID an. Die Patienten in spätem Tumorstadium (UICC III-IV) wurden nach aufsteigendem Überleben (in Monaten) sortiert. Zwei Gruppen wurden gebildet mit dem Median der überlebten Monate als Grenze (41, gestrichelte Linie). Die zwei Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney-U Test auf signifikante Unterschiede getestet; * $p < 0,05$; **B, C.** Korrelation nach Spearman zwischen der Anzahl Perforin+ NK-Zellen und dem Prozentsatz an extravasiierten NK-Zellen (B) sowie zwischen der Anzahl extravasierter Perforin+ CD8+ T-Zellen und dem Prozentsatz an Perforin+ Zellen unter den CD8+ T-Zellen intravaskulär.

5.8 Mobilität der CD8+ T-Zellen im Tumormilieu in vitro

Im Verteilungsmuster der Lymphozyten im Nierenzellkarzinom fiel auf, dass sich die meisten extravasiierten T-Zellen in der Nähe der Gefäße befanden und nur ca. ein Drittel tiefer ins

Parenchym eingedrungen waren (Abb. 5.3). Ein Grund für die niedrigere Infiltrationstendenz der T-Zellen könnte eine verminderte Mobilität im Tumormilieu sein. In einem In-vitro Modell wurde zunächst getestet, ob von Tumorzellen produzierte lösliche Faktoren die Mobilität von T-Zellen beeinflussen. Dazu wurde eine Nierenzellkarziomzelllinie (KT-195) in unterschiedlichen Zelldichten jeweils für 40 Stunden kultiviert und danach das von den Tumorzellen metabolisierte Zellkulturmedium (zellfreies Tumormilieu, zTM) abgenommen. Die Zelldichten betrugen 1 Million Zellen pro ml (zTM1), 2 Millionen Zellen pro ml (zTM2), 5 Millionen Zellen pro ml (zTM5) und 10 Millionen Zellen pro ml (zTM10). Durch die Herstellung des Kollagengemisches wurden die Überstände ca. 1:2 verdünnt. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe war gezeigt worden, dass die Funktion (Degranulation und Zytokinsekretion) von zytotoxischen Lymphozyten in zTM1 nicht gestört war, während ab zTM2 die Zytokinsekretion verhindert und in zTM5 komplett unterdrückt wäre (Mendler et al.). Hier wurde der Einfluss auf die Mobilität von T-Zellen getestet. Dazu wurden die zTM zur Herstellung einer Kollagenmatrix verwendet, in welche die CD8+ zytotoxische T-Zelllinie JB4 eingebettet wurde. Die Kollagenmatrix bildet ein dem natürlichen Gewebe entsprechendes Gerüst, in welchem sich die T-Zellen dreidimensional bewegen können. Die T-Zellen wurden über 4 Stunden mikroskopisch beobachtet und anschließend die Anzahl der mobilen und immobilen T-Zellen zu festgelegten Zeitpunkten ausgezählt. Abb. 5.19.1 zeigt, dass die Anzahl der immobilen T-Zellen graduell in Abhängigkeit von der zur Herstellung des zTM verwendeten Tumorzelldichte zunahm: In zTM1 war die Beweglichkeit noch nicht beeinträchtigt. In zTM2 dagegen war die Anzahl der beweglichen T-Zellen um ca. 20% reduziert, in zTM5 und zTM10 um ca. 35%.

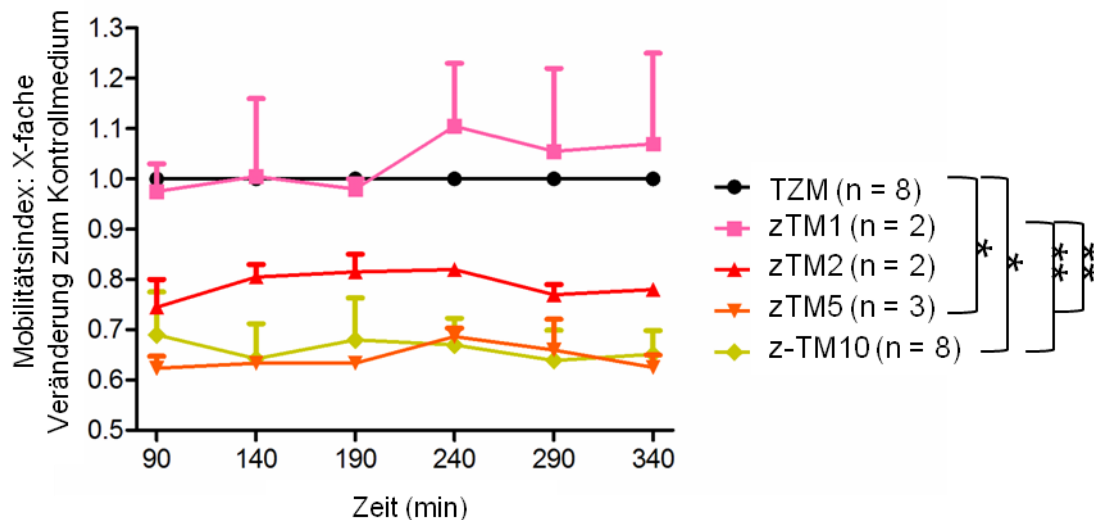


Abbildung 5.19.1 Einfluss des zellfreien Tumormilieus auf die Mobilität von T-Zellen

Tumorzellkulturüberstände (zTM1, 2, 5 und 10) wurden zur Herstellung einer 3D-Kollagenmatrix verwendet, in welche JB4 T-Zellen eingebettet wurden. Die T-Zellen wurden über 4 Stunden gefilmt (live cell imaging). Parallel zu den zTM wurde immer eine Kontrollkultur mit normalem T-Zellmedium (TZM) als Referenz mitgefilmt. Anschließend wurde der Film ausgewertet und alle 50 Minuten die mobilen und immobilen T-Zellen gezählt und der Quotient gebildet (Mobilitätsindex). Anschließend wurde für jeden Zeitpunkt der x-fache Unterschied des Mobilitätsindex in gegebenem Medium zum Kontrollmedium (TZM) berechnet und der Mittelwert aus den Experimentwiederholungen gebildet. Dieser ist zusammen mit der Standardabweichung auf der y-Achse aufgetragen. n zeigt die Anzahl der Experimente mit dem jeweiligen Milieu. Der Kruskal-Wallis-Test wurde verwendet. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Migration ist ein aktiver Prozess, welcher Energie benötigt. Der Glukosestoffwechsel ist der wichtigste Stoffwechselweg einer Zelle zur Energiegewinnung. Tumorzellwachstum führt zu einem hohen Verbrauch an Glukose, so dass ein Nährstoffmangel für die anderen Zellen entsteht. Um den Einfluss eines Glukosemangels auf die T-Zellmobilität zu untersuchen, wurde die T-Zellmobilität im 3D-Kollagen-Modell unter zwei Glukosemangelkonditionen beobachtet: a) Medium ohne Glukose; b) Medium mit Zusatz von 2-Deoxyglukose (2-DG). 2-DG ist ein Glukosemolekül, bei dem die 2-Hydroxy-Gruppe durch Wasserstoff ersetzt ist. Dadurch kann es zwar von der Hexokinase phosphoryliert werden, jedoch kann das dadurch gebildete 2-Desoxyglukose-6-phosphat nicht weiter verstoffwechselt werden, sondern reichert sich intrazellulär an. Konzentrationsabhängig wird dadurch die Glukoseaufnahme in die Zelle verhindert. Für die Experimente wurde die zehnfache 2-DG-Konzentration zur normalen Glukosekonzentration eingesetzt, um die vorhandene Glukose kompetitiv zu verdrängen. Wie in Abb. 5.19.2 zu sehen ist, war die T-Zellmobilität in beiden Glukosemangelkonditionen verringert und entsprach in etwa der in zTM5.

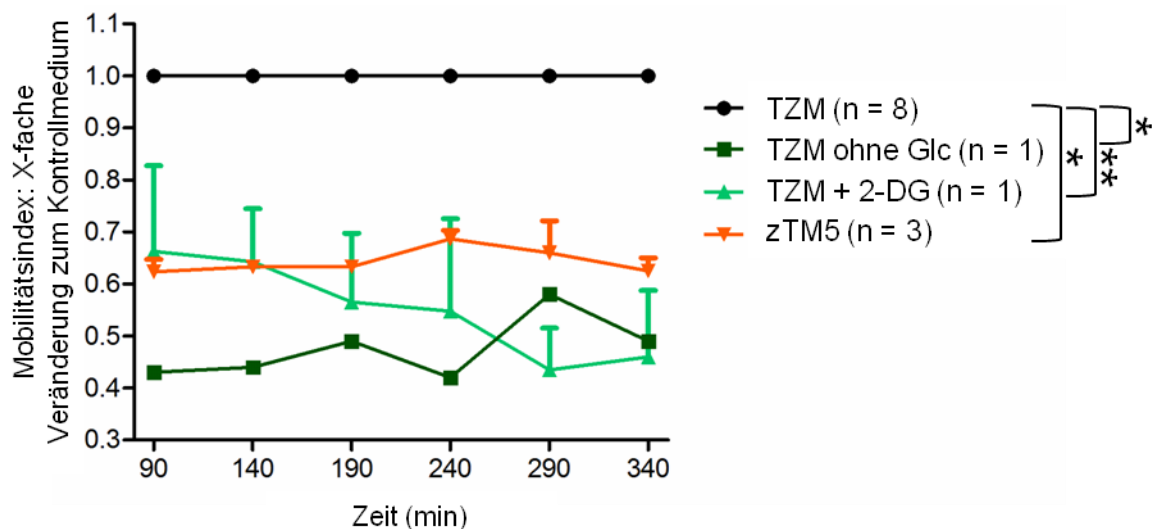


Abbildung 5.19.2 Mobilität der T-Zellen unter Glukosemangel

Verschiedene Medien (T-Zell-Medium/TZM, TZM ohne Glukose, TZM mit 2-Deoxyglukose, Tumorüberstand 5/zTM5) wurden zur Herstellung einer 3D-Kollagenmatrix verwendet, in welche JB4 T-Zellen eingebettet wurden. Die T-Zellen wurden über 4 Stunden gefilmt (live cell imaging). Anschließend wurde der Film ausgewertet und 50 Minuten die mobilen und immobilen T-Zellen gezählt und der Quotient gebildet (Mobilitätsindex). Anschließend wurde für jeden Zeitpunkt der x-fache Unterschied des Mobilitätsindex in gegebenem Medium zum Kontrollmedium (ZTM) berechnet und der Mittelwert aus den Experimentwiederholungen gebildet. Dieser ist zusammen mit der Standardabweichung auf der y-Achse aufgetragen. n zeigt die Anzahl der Experimente mit dem jeweiligen Milieu. Der Kruskal-Wallis-Test wurde verwendet. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Um zu testen, ob der inhibierende Faktor des zTMs tatsächlich Glukosemangel ist, wurde dem zTM5 Glukose in der dem Kontrollmedium vergleichbaren Konzentration zugesetzt. In parallelen Ansätzen wurde auch getestet, ob Aminosäuremangel im zTM die Mobilität beeinflusst. Dazu wurden dem zTM5 essentielle Aminosäuren (EA) als alternative Energiequelle bzw. Glukose plus essentielle Aminosäuren zugegeben. In Abb. 5.19.3 ist zu sehen, dass in zTM5, welches mit Glukose plus Aminosäuren rekonstituiert worden war, kein Mobilitätsverlust auftrat. Bei Rekonstitution mit nur Glukose oder Aminosäuren war zunächst immer noch ein Mobilitätsarrest sichtbar, der sich jedoch über die Zeit verringerte.

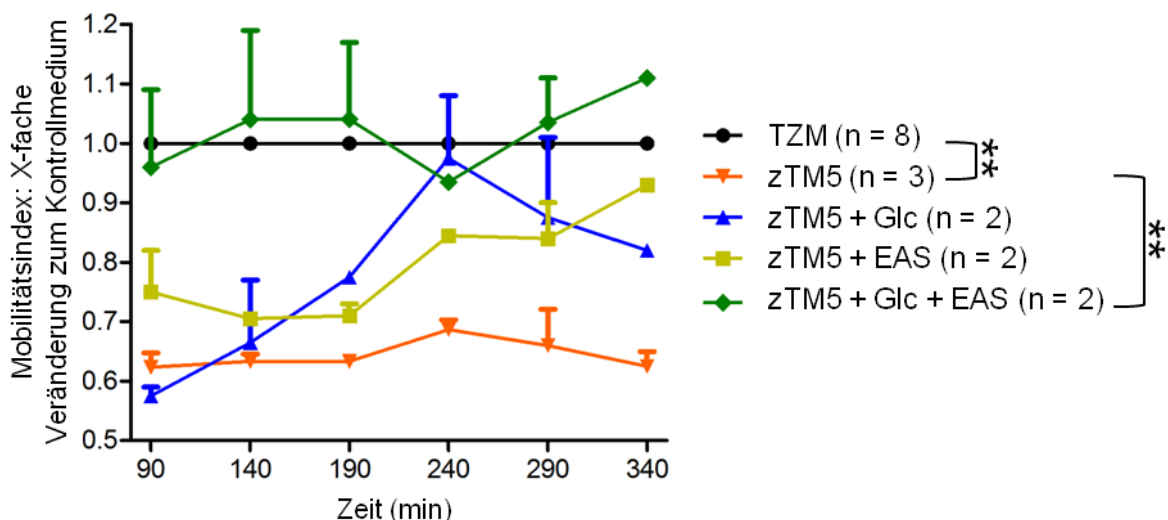


Abbildung 5.19.3 Mobilität der T-Zellen im Tumorüberstand unter Glukose- und Aminosäuresubstitution

Verschiedenen Medien (T-Zell-Medium/TZM, Tumorüberstand 5/zTM5, zTM5 mit Glukose/Glc, zTM5 mit essentiellen Aminosäuren/EAS, zTM5 mit Glc und EAS) wurden zur Herstellung einer 3D-Kollagenmatrix verwendet, in welche JB4 T-Zellen eingebettet wurden. Die T-Zellen wurden über 4 Stunden gefilmt (live cell imaging). Parallel zu den zTM wurde immer eine Kontrollkultur im normalen T-Zellmedium (TZM) als Referenz mitgefilmt. Anschließend wurde der Film ausgewertet und 50 Minuten die mobilen und immobilen T-Zellen gezählt und der Quotient gebildet (Mobilitätsindex). Anschließend wurde für jeden Zeitpunkt der x-fache Unterschied des Mobilitätsindex in gegebenem Medium zum Kontrollmedium (TZM) berechnet und der Mittelwert aus den Experimentwiederholungen gebildet. Dieser ist zusammen mit der Standardabweichung auf der y-Achse aufgetragen. n zeigt die Anzahl der Experimente mit dem jeweiligen Milieu. EAS = essentielle Aminosäuren, Glc = Glukose. Der Kruskal-Wallis-Test wurde verwendet. ** $p < 0,01$.

6. Diskussion

Die Rolle der CD8⁺ T-Zellen bei der Tumorumwehr und deren positive prognostische Bedeutung sind mittlerweile in vielen Tumortypen gezeigt (Kap. 1.4). Dagegen ist eine Beteiligung der NK-Zellen an der Kontrolle von soliden Tumortypen weniger gut belegt. Dies liegt v. a. daran, dass die NK-Zellen histologisch im Gewebe nicht zuverlässig nachgewiesen werden können. Jedoch gibt es Hinweise, dass auch die NK-Zellen prognostisch relevant sind. Unter den soliden Tumoren fällt insbesondere das Nierenzellkarzinom auf, weil hier die Menge des T-Zellinfiltrats keine prognostische Bedeutung zu haben scheint, während die NK-Zellen positiv mit längerem Überleben korreliert sind (Nakano 2001, Remark 2012, Eckl 2012). Um mögliche Ursachen dieser Eigenheit aufzudecken, wurden in dieser Arbeit zwei Hypothesen geprüft: 1) die beiden Zelltypen finden unterschiedlich gut Zugang zu Tumorzellen. Diesbezüglich ist beschrieben, dass z.B. das Tumorendothel durch Fehlen von Adhäsionsmolekülen eine Extravasationsbarriere für T-Zellen ist (Griffioen 1996, Buckanovich 2008). 2) die beiden Zellpopulationen unterscheiden sich in ihrer antitumoralen Qualität. So könnte es sein, dass die CD8⁺ T-Zellen möglicherweise nicht ausreichend differenziert sind oder anderweitig durch den Tumor geschädigt werden, während die NK-Zellen dies vielleicht nicht oder in geringem Maße sind. Diesbezüglich ist bereits bekannt, dass ein Großteil der CD8⁺ T-Zellen keine zytotoxischen Proteine besitzen (Prinz 2012), während NK-Zellen noch relativ gut damit ausgestattet sind (Schleypen 2006).

Um den Hypothesen nachzugehen, wurde eine neue histologische Immunfluoreszenzfärbemethode etabliert, um die NK-Zellen im Nierenzellkarzinomgewebe zu detektieren. Nachdem diese Methode etabliert und validiert war, wurde den beiden Hypothesen nachgegangen, indem eine Dreifachfärbung etabliert wurde, die neben den T- und NK-Zellen auch das Gefäßsystem sowie die Ausstattung mit Perforin darstellte. Bei der Auswertung der Färbungen und der Analyse der Ergebnisse unter Einbeziehung der klinisch-pathologischen Daten und des Überlebens ergaben sich unerwartete Ergebnisse, die eine Retention der NK-Zellen im Gefäßsystem zeigten und auf eine Rolle der NK-Zellen bei der Metastasenkontrolle hindeuteten. Weiterhin zeigte das Verteilungsmuster der beiden Lymphozytensubtypen eine

Assoziation mit dem Überleben, dem UICC-Stadium und der Gefäßmorphologie, wobei sich eine besondere Bedeutung des intravaskulären Kompartiments für das Überleben abzeichnete.

6.1 Nachweismethode für NK-Zellen im Gewebe

Die immunhistochemische Detektion von NK-Zellen ist problematisch, da singuläre Marker, die von allen NK-Zellen aber nicht von anderen Immunzellen exprimiert werden, bislang kein zufriedenstellendes Ergebnis erbrachten. Die NK-Zellen besitzen verschiedene Marker, wie Aktivierungs- und Inhibierungsrezeptoren (z. B. NKp30, NKp44, NKp46, NKG2D, KIR) oder CD16 und CD56, die oft zum Nachweis der NK-Zellen verwendet werden. Die meisten dieser Marker werden aber auch von anderen Zelltypen exprimiert. So werden z.B. die für NK-Zellen oft verwendeten Marker CD56 oder CD57 auch von einer T-Zell-Subgruppe exprimiert. Andere Marker wie z.B. CD16 sind nicht auf allen NK-Zellen vorhanden. Gängigerweise wird eine Mehrfachfärbung durchgeführt, bei welcher die NK-Zellen nach einem Ein- und Ausschlussprinzip nachgewiesen werden. Die beste Methode, um die Gesamtheit der NK-Zellen zu erfassen, ist die Durchflusszytometrie mit den Markern CD3 ϵ und CD56, wobei die NK-Zellen die CD3 ϵ negativen und CD56 positiven Zellen sind. Allerdings ist die Durchflusszytometrie nur mit Zellsuspensionen möglich und daher nicht zum Nachweis von NK-Zellen im histologischen Schnitt geeignet. Ein histologischer Nachweis der NK-Zellen erlaubt jedoch zusätzliche Aussagen, die mittels Durchflusszytometrie nicht getroffen werden können; so z.B. kann Information über die lokoregionäre Verteilung in Hinsicht zu anderen Immunzellen oder dem Gefäßsystem gewonnen werden. Auch ermöglicht eine histologische Methode die Quantifizierung des Immunzellinfiltrats an archivierten Gewebeproben, während die Durchflusszytometrie von Suspensionen aus Frischgewebe abhängig ist. So können mit einer histologischen Methode retrospektive Analysen hinsichtlich einer Korrelation mit Überleben, Metastasierung und Therapieansprechen gemacht werden.

Hier wurde eine histologische Mehrfachfärbung mit den Markern CD3 ϵ und CD3 ζ etabliert, wobei NK-Zellen CD3 ϵ -negativ und CD3 ζ -positiv sind. Dass mit dieser Antikörperkombination NK-Zellen nachgewiesen werden können war nur mit dem Wissen aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe, dass CD3 ζ im RCC auf den Immunzellen noch deutlich nachweisbar ist, möglich (Figel 2011; Rosmanit 2002, Anz 2007). Dies kann nicht automatisch angenommen werden; denn für viele Tumorentitäten ist beschrieben, dass CD3 ζ herunterreguliert ist, z.B. durch die Interaktion mit myeloischen Suppressorzellen (Yu 2011). Eine weitere Voraussetzung für die Etablierung einer histologischen NK-Nachweismethode war die Verfügbarkeit von Geweben, für welche der NK-Zellgehalt bekannt ist. Denn nur so konnte bewertet werden, ob die histologische Methode tatsächlich die NK-Zellpopulation in ihrer Gesamtheit erkennt. In der Arbeitsgruppe waren ca. 40 RCC-Gewebe asserviert, von welchen in einem parallelen Geweberesektat Zellsuspensionen angelegt und auf den NK-Zellgehalt mithilfe der Durchflusszytometrie (FACS, Kombination CD3 ϵ und CD56) getestet worden waren (Schleypen 2006, Eckl 2012, Prinz 2012).

Die Auszählung der CD3 ϵ -CD3 ζ + Zellen in der Mehrfachfluoreszenzfärbung wurde mit 19 RCC-Geweben durchgeführt und die Zellzahlen mit den per Durchflusszytometrie bestimmten NK-Zellfrequenzen verglichen. Es zeigte sich eine sehr gute Übereinstimmung (Abb. 5.1, S. 53 sowie Prinz 2014), so dass die CD3 ϵ CD3 ζ -Methode für die histologische Quantifizierung im RCC zuverlässig einsetzbar ist. Bei Anwendung dieser Methode auf andere Gewebe ist zunächst zu bestimmen, ob eine Herunterregulation der CD3 ζ vorliegt, wodurch die Detektion der NK-Zellen nicht möglich ist. Eine Herabregulation von CD3 ζ ist leicht daran zu erkennen, dass T-Zellen in diesem Fall nur CD3 ϵ positiv sind. Bei Analysen von peripheren Blutlymphozyten ist weiterhin zu beachten, dass einige NK-Zellen zytosolisches CD3 ϵ besitzen können (Lanier 1992), so dass in Blutaussstrichen gegebenenfalls NK-Zellen wie die T-Zellen auch CD3 ϵ positiv sind.

6.2 Lokoregionäre Verteilung der Lymphozyten im klarzelligen RCC und Nichttumor-Nierengewebe

Die Hypothese, ob T- und NK-Zellen unterschiedlich gut Zugang zu Tumorzellen finden, wurde mit der 3-Fachfärbung CD3ε/CD3ζ/CD31 untersucht. Diese 3-Fachfärbung, die mittels konfokaler Mikroskopie ausgewertet wurde, erlaubt im Gegensatz zu den bislang publizierten Arbeiten mit immunhistochemischen Einzelfärbungen die gleichzeitige Untersuchung der Lokalisation und der Qualität mehrerer Zelltypen, um deren komplexes Zusammenspiel zu verstehen. Hier wurde zum ersten Mal eine detailliertere Analyse der Verteilung der Lymphozyten in Relation zum Gefäßsystem des Tumors durchgeführt. Die Bestimmung der lokoregionären Verteilung in Relation zum Gefäßsystem sollte Informationen zur Fragestellung liefern, ob eine unterschiedliche Erreichbarkeit der Tumorzellen mit der Gefäßwand als Barriere die unterschiedliche prognostische Relevanz von T- und NK-Zellen beim RCC erklären könnte. Dabei wurde vermutet, dass das Tumorendothel für die T-Zellen eine Barriere sein könnte, so dass diese keinen Kontakt mit den Tumorzellen aufnehmen können und deshalb ihre Antitumoraktivität nicht ausüben können. Eine Behinderung der Extravasation der T-Zellen seitens des Tumorendothels durch z. B. verminderter Expression von Adhäsionsmolekülen ist publiziert (Griffioen 1996, Buckanovich 2008). Für NK-Zellen ist diesbezüglich wenig bekannt. Weil NK-Zellen bei RCC prognostische Relevanz zu haben scheinen, postulierten wir, dass das Endothel im RCC für NK-Zellen keine Barriere sein dürfte. Erstaunlicherweise zeigte sich, dass im RCC die meisten T-Zellen extravasiert im Tumorparenchym vorlagen, also das Tumorendothel kein Hindernis darstellte. Im Gegensatz dazu waren die NK-Zellen bevorzugt im Gefäßsystem lokalisiert.

Die weiteren Untersuchungen ergaben, dass das Ausmaß der Extravasation der NK-Zellen maßgeblich von der Gefäßmorphologie bestimmt wurde. Denn in Geweben mit relativ intaktem Gefäßnetzwerk waren die NK-Zellen in den Gefäßen lokalisiert, während in Geweben mit geschädigtem Gefäßsystem ein höherer Prozentsatz an NK-Zellen extravaskulär gefunden wurde. Die Gefäßmorphologie war signifikant mit dem UICC-Stadium der Tumoren assoziiert (Abb. 5.12.1, S. 76), wobei die Wahrscheinlichkeit für ein

geschädigtes Gefäßsystem bei UICC-III und -IV Stadien ca. 12-fach erhöht war. Wie aufgrund des Zusammenhangs zwischen Gefäßmorphologie und UICC sowie zwischen Gefäßmorphologie und NK-Zellextravasation zu vermuten war, korrelierte auch die NK-Zellextravasation signifikant mit dem UICC-Stadium, wobei höhere NK-Zellextravasation in den späten UICC-Stadien vorlag.

Der Vergleich der lokoregionären Verteilung der NK- und T-Zellen im Tumorgewebe und Nichttumornierengewebe zeigte, dass im Nichttumor-Gewebe beide Lymphozytentypen und v. a. die NK-Zellen mehr intravaskulär lokalisiert waren. Eine weitere Besonderheit bei den CD8⁺ und CD3⁺ T-Zellen war der vergleichsweise zum RCC sehr geringe parenchymatöse Anteil. Es ist vorstellbar, dass die T-Zellen aus dem Blut immer wieder in Gewebe eindringen und erstmal perivaskulär bleiben und bei fehlender Gefahr (wie hier bei der Nichttumorniere) wieder ins Blut zurückkehren. Weiterhin wurde beobachtet, dass in bestimmten Arealen von Nichttumor-Nierengewebe, welche massiv von Lymphozyten besiedelt waren und Zeichen von Gewebeumbau aufwiesen (als reaktiv bezeichnete Areale), die CD8⁺ T-Zellen wiederum extravasiert vorlagen, während die NK-Zellen weiterhin intravaskulär lokalisiert waren. Offensichtlich ist das im RCC gefundene Extravasationsmuster der T- und NK-Zellen nicht notwendigerweise tumorbedingt sondern eher inflammationsgetrieben. Um diese Aussage zu festigen, müssen jedoch weitere reaktive Gewebsareale und inflammatorische Nichttumor-Gewebe, wie z.B. Glomerulonephritiden oder fibrotische Nierengewebe, untersucht werden. Um das unterschiedliche Extravasationsmuster der T- und NK-Zellen im RCC zu erklären, wurden bereits vorliegende Ergebnisse zur Expression verschiedener Zytokine und Chemokine herangezogen (Eckl 2012, Dissertation Eckl 2009). Zytokine und Chemokine können die Rekrutierung, Proliferation und Aktivität von Immunzellen entscheidend steuern (Mantovani 2004). Diesbezüglich wurde bereits vorher beobachtet, dass eine hohe Transkriptmenge von CX₃CL1 mit einem höheren Anteil an NK-Zellen (bestimmt mittels FACS-Analyse der RCC-Gewebesuspensionen) korrelierte (Eckl 2012). Dieser Zusammenhang zeigte sich auch hier bei Quantifizierung der NK-Zellen mittels Zweifarbenimmunhistologie (CD3εCD3ζ, Abb. 5.9). Weiterhin wurde nun auch eine positive

Korrelation mit CXCL10 und CXCL16 festgestellt. CX₃CL1 und CXCL16 sind in löslicher Form Lockstoffe für Lymphozyten und Makrophagen, während sie an der Endothelzellmembran gebunden eine starke Adhäsion der Leukozyten bewirken (Ostuni 2014). Ein positiver Zusammenhang zwischen NK-Zellinfiltration und CXCL10 wurde in Psoriasis beschrieben (Otaviani 2006). Betrachtete man allerdings weiterführend, ob diese Chemokine auch die Extravasationseffizienz erklären können, so zeigte sich unerwarteterweise eine signifikante negative Korrelation zwischen der Extravasationseffizienz der NK-Zellen und CXCL16 (Abb. 5.9, G, S. 69). Dies muss in weiterführenden Arbeiten noch genauer untersucht werden. Möglicherweise kann CXCL16, weil es auch auf der Oberfläche von Endothelzellen vorkommt (Ludewig 2007), die Adhäsion der NK-Zellen und dadurch deren intravaskuläre Retention bedingen. Tatsächlich wurde beim Bronchialkarzinom eine Hochregulierung von CXCR6, dem Rezeptor für CXCL16, in tumorinfiltrierende NK-Zellen gezeigt (Gillard-Bocquet 2013). Es wäre somit interessant die CXCR6-Expression bei RCC-infiltrierenden NK-Zellen zu testen.

T- und NK-Zellen unterschieden sich nicht nur im Ausmaß der Extravasation sondern auch in der Verteilung im Tumorparenchym. Dabei waren die T-Zellen bevorzugt nahe am Gefäß, während sich die NK-Zellen, wenn sie extravasiert waren, öfter entfernt vom Gefäß befanden. Die Untersuchung der Mobilität von T-Zellen in vitro in einem 3D-Kollagenmodell zeigte, dass die T-Zellen immobil wurden, wenn der Kollagenmatrix lösliche, von Tumorzellen sezernierte Faktoren zugesetzt wurden. Die Anzahl der unbeweglichen T-Zellen war dabei konzentrationsabhängig umso höher je höher die Tumorzelldichte war, die zur Generierung des Tumorzellüberstands verwendet worden war. Auf der Suche nach Faktoren im Tumorzellüberstand, die für den Verlust der T-Zellmobilität verantwortlich sein könnten, wurden u.a. ein Mangel an Glukose und Aminosäuren identifiziert (Abb. 5.19). Ein Zusatz von Glukose zum Tumorzellüberstand konnte bereits deutlich den Verlust der Mobilität verhindern. Bei gleichzeitigem Zusatz von Glukose und essentiellen Aminosäuren zum Tumorkonditionierten Milieu war kein Mobilitätsverlust mehr messbar. Demzufolge ist das Nährstoffangebot ein essentieller Faktor für die T-Zellmobilität. Ein Mangel an Glukose und

Aminosäuren ist typisch für das Milieu solider Tumoren; denn Tumorzellen haben hohen Glukoseumsatz und verbrauchen Aminosäuren, um ihren DNA- und Lipidstoffwechsel aufrechtzuerhalten (Warburg 1956, Gambhir 2002, Betsunoh 2013). Die Glukosemenge ist umgekehrt proportional zum Abstand vom Tumorendothel (Chan 2012). Es ist daher denkbar, dass das tiefe Eindringen von T-Zellen ins Tumorparenchym aufgrund von Glukose- und Aminosäurenmangel behindert ist und sich die T-Zellen daher bevorzugt am Endothel befinden. Ob auch Laktat und Azidose, welche ebenfalls wichtige Faktoren des lokalen Tumormilieus sind (Gatenby 2004), Einfluss auf die Mobilität der T-Zellen nehmen, konnte im Kollagenmodell nicht untersucht werden, weil das Kollagen nur in basischem pH-Bereich polymerisiert. Mobilitätsversuche in Azidosebedingungen können daher nur in einem 2D-Modell durchgeführt werden, in welchem aber die Zellbewegungen weniger dem physiologischen Zustand ähneln. NK-Zellen wurden in dem in vitro Modell nicht getestet. Entsprechend der Beobachtung, dass NK-Zellen, wenn sie extravasieren, tiefer ins Tumorparenchym eindringen als T-Zellen, müsste man postulieren, dass deren Beweglichkeit weniger stark durch Glukose- und Aminosäuremangel beeinflusst wird. Interessanterweise gibt es erste Hinweise, dass die NK-Zellen im Gegensatz zu den T-Zellen zumindest für die IFN- γ -Produktion nicht immer auf die Glykolyse angewiesen sind (Keppel 2015). Jedoch sind bislang keine Arbeiten publiziert, die andere Funktionen, wie Migration oder Zytotoxizität, im Zusammenhang mit dem Metabolismus untersucht haben.

Ein weiterer Faktor, die die Mobilität der T- und NK-Zellen beeinflussen könnte, ist die Interaktion der T- bzw. NK-Zellen mit ihren Liganden auf den Tumorzellen. Für T-Zellen wurde z.B. beschrieben, dass sie nach Erkennung der MHC-Peptid-Komplexe arretieren (Kawakami 2005, Honda 2014). In einer anderen Arbeit wird weiterhin postuliert, dass sich T-Zellen in antigenpositiven Tumoren initial wenig bewegen und eher in der Peripherie des Tumors und nah an Gefäßen bleiben. In der späten Phase der Tumorabstoßung allerdings wurde ein Zugewinn an Mobilität, ausgelöst durch die antigenspezifische Stimulation, beobachtet (Boissonnas 2007). Interpretiert man die eigenen Daten auf dem Hintergrund dieser Literaturbeobachtungen, so könnte die bevorzugte perivaskuläre Lokalisation darauf

zurückzuführen sein, dass die T-Zellen im RCC nach Extravasation auf antigenpositive Tumorzellen treffen, diese erkennen, und dort festgehalten werden. Die vom Endothel entfernten T-Zellen könnten solche mit höherer Mobilität sein, weil sie durch die Antigenerkennung stimuliert wurden. Der Marker PD-1 wird bei Zielzellerkennung und T-Zellaktivierung auf den T-Zellen induziert. Tatsächlich zeigen die eigenen Daten eine positive Korrelation zwischen der Anzahl der parenchymatösen CD8+ T-Zellen und der Anzahl an PD-1+ Zellen (nicht gezeigt, $r = 0,69$; $p = 0,01$). Somit könnte die tiefe Infiltration die Konsequenz einer T-Zell/Tumor-Erkennung sein.

Interessanterweise ist für NK-Zellen publiziert, dass sich die NK-Zellen schnell im Tumor bewegen und die Kontaktzeiten zwischen NK- und Tumorzellen wesentlich kürzer sind als die zwischen T-Zellen und Tumorzellen (Deguine 2010). Dies könnte erklären, warum die NK-Zellen im RCC, falls sie extravasiert waren, weniger am Endothel sondern tiefer im Tumorparenchym gefunden wurden.

6.3 CD8+ T-Zellen und ihre zytotoxische Qualität

Die Untersuchung zur lokoregionären Verteilung der T-Zellen ergab, dass sich die Mehrzahl der T-Zellen im Tumorparenchym befand, also in günstiger Position, um Tumorzellen abzutöten. Weil aber das T-Zellinfiltrat keinen prognostischen Wert beim RCC hat, muss gefolgert werden, dass die T-Zellen nicht in der Lage sind, Tumorzellen effizient zu beseitigen. Eine mögliche Erklärung liefert die Beobachtung, dass die meisten der extravasierten CD8+ T-Zellen negativ für Perforin sind, welches ein zentrales Molekül für die Initiation der zytotoxischen Funktion ist. Die Assoziation zwischen extravaskulärer Lokalisation im Tumorparenchym und Perforinmangel sowie die Beobachtung, dass die intravaskulären T-Zellen in der Mehrzahl Perforin+ sind, legen nahe, dass das lokale Tumormilieu den Verlust von Perforin zumindest mitverschuldet. Der direkte Vergleich zwischen intravaskulären und extravaskulären CD8+ T-Zellen im RCC- Gewebe ergab, dass sich der Anteil Perforin positiver CD8+ T-Zellen vom intrazellulären zum extrazellulären Kompartiment um ca. 55% im Durchschnitt reduzierte. Innerhalb der extravasierten CD8+ T-

Zellen bestand kein Unterschied, ob sie nahe am Gefäß oder tief infiltriert waren. Der Perforinmangel bei den extravaskulär liegenden T-Zellen scheint durch das Tumormilieu bedingt zu sein; denn im reaktiven Areal der Nichttumorniere NKC-2890 lagen die CD8⁺ T-Zellen ebenfalls größtenteils extravasiiert vor. Hier war jedoch im Gegensatz zum RCC der Prozentanteil an Perforin-positiven CD8⁺ T-Zellen im intrazellulären und extrazellulären Kompartiment vergleichbar (Abb. 5.8, S. 67).

Möglichen Ursachen für den Tumormilieu-assoziierten Perforindefizit könnten TGF β und FOXP3⁺ Tregs sein. Darauf deutet die beobachtete signifikante Korrelation zwischen TGF β und der Extravasation der CD8⁺ T-Zellen hin. TGF β kann von regulatorischen T-Zellen gebildet werden und ist ein Faktor des Tumormilieus, welcher zum Verlust an Perforin führen kann (Skrablin 2008). Aber das Tumormilieu kann auch über andere Mechanismen Einfluss auf die Funktion der infiltrierenden Lymphozyten nehmen. So ist z.B. für tumorinfiltrierenden Lymphozyten des Nierenzellkarzinoms gezeigt, dass Diacylglycerolkinase (DGK) die Exozytose der zytotoxischen Granula und die Zytokinproduktion hemmen kann (Prinz 2012). Auch Laktatazidose, welche als Abbauprodukt der Glykolyse im Tumormilieu entsteht, schwächt die Lymphozytenfunktion (Mendler 2011). Im RCC scheinen somit die infiltrierenden zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen durch Verlust von Perforin, der Einschränkung der zytotoxischen Funktion und über Tregs funktionell in Schach gehalten zu werden, so dass sie ihre antitumorale Rolle nicht hinreichend ausüben können. Dies kann eine Erklärung sein, warum beim Nierenzellkarzinom das Ausmaß der CD8⁺ T-Zellinfiltration keinen positiven Effekt auf das Patientenüberleben hat. Letztendlich schließt sich nun die Frage an, ob in anderen Tumoren, bei welchen die CD8⁺ T-Zellinfiltration prognostische Signifikanz hat, z. B. dem kolorektalen Karzinom (Galon 2006), das Tumormilieu weniger ausgeprägte Funktionseinschränkungen bei den CD8⁺ T-Zellen verursacht.

6.4 Das intravaskuläre Kompartiment und seine Bedeutung für die Tumormetastasierung und das Überleben beim Nierenzellkarzinom

Im Einklang mit den bisher veröffentlichten Daten zeigte sich auch in dieser Arbeit, dass NK-Zellen positiv mit der klinischen Prognose des Nierenzellkarzinoms korrelieren, während T-Zellen keine prognostische Bedeutung haben. Durch das hier erstmals näher untersuchte Infiltrationsmuster der beiden Zelltypen und die Ausstattung mit Perforin in Abhängigkeit von der lokoregionären Verteilung wurden mögliche Mechanismen enthüllt, die dem unterschiedlichen prognostischen Wert der beiden Zelltypen zugrunde liegen könnten. Der Verlust der zytotoxischen Funktion bei Extravasation ins Tumorparenchym ist eine plausible Erklärung für den fehlenden positiven Effekt der CD8+ T-Zellen auf das Überleben.

Die UICC-Stadien, basierend auf der TNM-Klassifikation der Tumoren, spiegeln am besten die Tumorentwicklung und -progredienz wider und stellen das aktuell wichtigste prognostische Werkzeug dar (Ficarra 2009, Moch 2007). Bei den T-Zellen wurde keine wesentliche Änderung des Infiltrationsmusters oder des Perforingehalts zwischen den Tumorstadien beobachtet. Anders war das bei den NK-Zellen: Hier wurde eine signifikante Korrelation zwischen Extravasation und Tumorstadium gefunden, wobei geringe Extravasation bei Tumoren in frühem Stadium beobachtet wurde. Erst bei fortgeschrittenem Tumorstadium waren die NK-Zellen auch im Tumorparenchym lokalisiert. Interessanterweise korrelierte eine geringe NK-Zell-Extravasation positiv mit dem Überleben. Auch bei den T-Zellen zeigte die Anzahl der intravaskulären Zellen eine positive Korrelation mit dem Überleben. Offensichtlich ist das intravaskuläre Kompartiment und die darin befindlichen Lymphozyten von besonderer Bedeutung für das Patientenüberleben. Dies ist in Abb. 5.17.4 verdeutlicht.

Die wichtigste statistische Methode, um die prognostische Gewichtung eines Parameters auf das Überleben zu prüfen, ist die multivariante Cox-Regression. Hier wurde die intravaskuläre NK-Zellzahl gegenüber den UICC-Stadien, der Metastasierung und der Gefäßmorphologie untersucht. Es zeigte sich, dass bei Einschluss dieser Variablen keiner der Parameter unabhängig von den anderen prognostische Signifikanz hatte, was auf die geringe Fallzahl

(n=16) zurückzuführen sein dürfte. Jedoch bei schrittweisem Ein-/Ausschluss der einzelnen Variablen („stepwise model“) war die intravaskuläre NK-Zellzahl der einzige Faktor, der Signifikanz zeigte. Die Interpretation bei der derzeitigen Datenlage ist, dass Patienten mit Tumoren, die einen NK-Gehalt über dem Median von 3,5 Zellen pro HPF haben, ein 12,5-fach (1:0,08) verringertes Sterberisiko haben als Patienten mit Tumoren mit einem NK-Zellgehalt unter dem Median. Die Hinweise, dass die intravaskulären NK-Zellen eine große prognostische Bedeutung haben, sind demnach deutlich zu sehen. In weiterführenden Arbeiten werden zusätzliche RCC-Tumoren untersucht, um die Fallzahl zu erhöhen und die potentielle Bedeutung der NK-Zellen bei der Kontrolle des RCC insbesondere hinsichtlich der Metastasenkontrolle zu erhärten.

Die überraschende intravaskuläre Lokalisation der NK-Zellen zusammen mit der prognostischen Signifikanz der NK-Zellen im RCC ließen die Frage aufkommen, wie dieser Zusammenhang erklärt werden könnte. Aufgrund der signifikanten Korrelation zwischen der Anzahl intravaskulärer NK-Zellen, welche auch hauptsächlich Perforin-positiv waren, und der Abwesenheit von Lymphknoten- oder Organmetastasen (N0M0) kann man vermuten, dass die NK-Zellen eventuell den Metastasierungsprozess kontrollieren. Für andere Tumortypen wie dem Mamma- und Prostatakarzinom wurde in Mausmodellen eine inverse Korrelation zwischen der NK-Zellzahl im Gewebe und der Metastasierung beobachtet (Smyth 1999, Mamessier 2011, Liu 2013). Während in diesen Publikationen alleinig die Korrelation zwischen NK-Zellgehalt und Metastasierung beobachtet wurde, zeigen die Ergebnisse dieser Dissertation, dass hinter dem prognostischen Wert möglicherweise der höhere Perforinanteil der intravaskulären Lymphozyten liegen könnte. Insgesamt kann man vermuten, dass der überlebensverlängernde Effekt der NK-Zellen durch die intravaskuläre Überwachung und Elimination migrierender Tumorzellen zustande kommen könnte.

Die hier erhobten Daten deuten darauf hin, dass die Integrität des Tumorgefäßsystems eine wichtige Komponente für die Metastasenkontrolle zu sein scheint. Tatsächlich bestand keine Metastasierung bei Tumoren mit retikulär intaktem Gefäßsystem, unabhängig von der Tumorgroße (T). Außerdem werden über die Integrität des Gefäßsystems die Lymphozyten,

v. a. die NK-Zellen, intravaskulär gehalten. Die Anzahl der intravaskulären Lymphozyten zeigte einen sehr hohen negativen prädiktiven Wert für das Vorhandensein von Metastasen. Somit beeinflusst das Tumorendothel die Metastasierung, nicht nur über die Kontrolle der Tumorzellmigration, sondern auch über die Kontrolle der Lymphozytenlokalisation. damit die Lymphozyten und v. a. die NK-Zellen intravaskulär verbleiben.

6.5 In späten Tumorstadien gewinnen Extravasierte Perforin+ CD8+ T Zellen an Bedeutung

Patienten, die zum Zeitpunkt der Erstdiagnose Tumoren in spätem Stadium besitzen, haben schlechtere Prognose als Patienten mit Tumoren in frühem Tumorstadium. Bei dem in dieser Arbeit untersuchten Patientenkollektiv zeigte sich auch unter den Patienten mit Tumoren im späten Stadium (UICC III-IV) eine große Breite bezüglich des Überlebens (3 bis 132 Monate). Bei einer Gegenüberstellung zwischen Überleben und Eigenschaften der Lymphozyten fiel auf, dass hier die NK-Zellen keine prognostische Bedeutung mehr zeigten. Dagegen zeigte sich bei diesem Patientenkollektiv (Tumoren der späten Stadien) überraschenderweise, dass nun die Anzahl der extravasierten Perforin-positiven T-Zellen eine prognostische Signifikanz für das Überleben zeigte. Warum die NK-Zellen im späten Tumorstadium an Bedeutung verlieren, ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die NK-Zellen in Tumoren der späten Stadien bevorzugt extravaskulär vorlagen und die Anzahl an Perforin-positiven NK-Zellen gering war. Es ist davon auszugehen, dass NK-Zellen ohne Perforin geringe zytotoxische Funktion haben und für die Tumorbekämpfung unzureichend sind. Wenn in solchen Situationen eine ausreichende Anzahl an Perforin+ CD8+ T-Zellen extravasiert vorliegt, können diese offensichtlich eine gewisse Tumorkontrolle weiterhin gewährleisten. Die positive Korrelation zwischen dem Prozentsatz der intravaskulären Perforin+ CD8+-T-Zellen und der Anzahl der extravasierten Perforin+ CD8+ T-Zellen deutet darauf hin, dass die Anzahl der extravasierten Perforin+ CD8+ T-Zellen maßgeblich von der zytotoxischen Ausstattung der CD8+ T-Zellen abhängt, die in das Tumorbett rekrutiert werden.

6.6 Zusammenfassung und Ausblick: Bedeutung der Lymphozyten-infiltrationseigenschaften für die Immuntherapie des RCC

In dieser Arbeit wurden wesentliche neue Erkenntnisse zum Infiltrationsverhalten von T- und NK-Zellen im Nierenzellkarzinom gewonnen. Bezugnehmend auf die eingangs formulierten Hypothesen zur Bedeutung der Lokalisation und der zytotoxischen Ausstattung der Lymphozyten für ihre Funktion ergaben sich folgende Beobachtungen: 1) Die CD8⁺ T-Zellen im Tumorgewebe sind in ihrer Mehrheit extravasiiert, aber Perforin-negativ (Abb. 5.3 und 5.7.1) und somit für die Tumorkontrolle ungenügend ausgestattet. Dies könnte erklären, warum die Anzahl der intratumoralen CD8⁺ T-Zellen beim Nierenzellkarzinom keine prognostische Signifikanz hat; 2) Die NK-Zellen befinden sich bevorzugt intravaskulär und sind dabei Perforin-positiv. Es zeigte sich eine Korrelation zum Metastasierungsstatus, i.e. bei hoher Anzahl von intravaskulären und insbesondere bei hoher Anzahl Perforin-positiver intravaskulärer NK-Zellen waren die Patienten in einem N0M0-Status (Abb. 5.15). Dies widerspiegelte sich auch in einem längeren tumorspezifischen Überleben (Abb. 5.17.1). Daraus kann man die Hypothese ableiten, dass die intravaskuläre Lokalisation der NK-Zellen über die Metastasierungskontrolle einen positiven Effekt auf das Patientenüberleben hat. Dieses Szenario erscheint in Anbetracht der bevorzugt hämatogenen Metastasierungsroute des klarzelligen Nierenzellkarzinoms plausibel. Zur Verfestigung dieser Schlussfolgerung wird nun das untersuchte Patientenkollektiv erweitert, um die Statistik zu verfestigen und insbesondere belastbare multivariante Analysen durchführen zu können. Desweiteren sollen diese Untersuchungen auch bei anderen Tumortypen durchgeführt werden. Dabei ist ein Vergleich zwischen Tumorentitäten interessant, die sich in ihrer bevorzugten Metastasierungsart (hämatogen vs. lymphogen) unterscheiden. In primär hämatogen metastasierten Tumoren könnte man eine dem klarzelligen RCC vergleichbare intrazelluläre Lokalisation der NK-Zellen erwarten, wenn die untersuchte Tumorart NK-Zellen anlocken kann. Im klarzelligen RCC scheint die Anlockung der NK-Zellen über CXCL16, CXCL10 und CX₃CL1 zu erfolgen (Abb. 5.9). In primär lymphogen metastasierten Tumoren (z. B. dem Melanom) sollte die intravaskuläre Lokalisation der NK-Zellen keine große Rolle spielen.

Jedoch könnten die NK-Zellen auch die Metastasenkontrolle über die Lymphgefäße übernehmen, wenn sie ins Lymphsystem lokalisieren würden.

Als mögliche Erklärung für die positive prognostische Bedeutung der NK-Zellen für das Patientenüberleben wurden drei Faktoren identifiziert: Gefäßintegrität, intravaskuläre Lokalisation und Vorhandensein von Perforin. Ein intaktes Gefäßsystem ermöglicht die intravaskuläre Lokalisation und durch diese wird wiederum der Erhalt von Perforin möglich. In Tumoren mit beschädigtem Gefäßsystem wurden die NK-Zellen extravaskulär gefunden und die prognostische Signifikanz bestand nicht mehr. Der beobachtete Zusammenhang zwischen intravaskulärer Lokalisation und Tumorkontrolle hat Bedeutung für therapeutische Ansätze beim RCC. Um die Metastasenkontrolle zu unterstützen scheinen gefäßstabilisierende Substanzen sinnvoll, wie z. B. Antikörper gegen VEGF (Jain 2005, Johansson 2012), damit die NK-Zellen intravaskulär bleiben. Vermutlich kann man damit jedoch die Lokalisation der T-Zellen nicht beeinflussen. Denn diese lagen unabhängig von der Gefäßintegrität im Tumor immer bevorzugt extravaskulär. Im Nichttumor-befallenen Nierengewebe zeigten jedoch T- wie NK-Zellen eine ausgeprägte intravaskuläre Lokalisation (Abb. 5.3), so dass ein Unterschied zwischen intaktem Tumorendothel und solchem der Nichttumorniere zu bestehen scheint. Wenn man das Tumorgefäßsystem entsprechend dem der Nichttumorniere „normalisieren“ könnte, wäre es auch denkbar, dass man eine intravaskuläre Retention der T-Zellen erreichen könnte. Das vaskuläre Verteilungsmuster war Tumor-assoziiert.

Während ein positiver Effekt einer intravaskulären Lokalisation der zytotoxischen Lymphozyten für die Kontrolle der Metastasierung plausibel erscheint, sollte für eine lokale Tumorkontrolle eine parenchymatöse Lokalisation funktioneller Lymphozyten wichtig sein. Ein solcher Zusammenhang deutet sich in den hier durchgeführten Untersuchungen an, indem eine positive Korrelation zwischen der Anzahl Perforin-positiver extravasierter CD8+ T-Zellen und dem Überleben von Patienten mit Spätstadiumtumoren gefunden wurde (siehe Abb. 5.18). Weil die Lymphozyten nach Extravasation hauptsächlich Perforin-negativ waren, scheinen für eine Verbesserung der lokalen Tumorkontrolle Maßnahmen erforderlich, die die

zytotoxische Ausstattung der Lymphozyten nach Extravasation, d.h. in Konfrontation mit dem Tumormilieu verbessern. Dafür ist die weitere Entschlüsselung der Mechanismen essentiell, die zum Perforinverlust und weiteren funktionellen Defiziten im Tumormilieu führen. Es ist bekannt, dass Perforin in aus RCC isolierten CD8⁺ T-Zellen durch Behandlung mit IL-2 ex-vivo induziert werden kann (Prinz 2012). Auch klinisch zeigt die systemische IL-2 Therapie beim RCC und Melanom Erfolge (Zhi 2014, Hughes 2015), jedoch limitieren die zum Teil sehr schweren Nebenwirkungen den breiten Einsatz. Die positiven Effekte des IL-2 auf die Effektorfunktionen der zytotoxischen Lymphozyten machen einen therapeutischen Einsatz jedoch wünschenswert. Daher sollten verstärkt Anstrengungen unternommen werden, diese Wirksubstanz zu optimieren. Diesbezüglich gibt es auch Bestrebungen IL-2 so zu modifizieren, dass es gezielter an den Tumor gebracht wird, um die systemischen Effekte zu minimieren (Dubinet 1993, Kudo-Saito 2007).

7. Zusammenfassung

Die Rolle der Lymphozyten, besonders der CD8⁺ T-Zellen, bei der Tumorabwehr und deren positive prognostische Bedeutung für das Patientenüberleben sind in vielen Tumortypen belegt. Das Nierenzellkarzinom nimmt unter den soliden Tumoren eine Sonderstellung ein, da hier das CD8⁺ T-Zellinfiltrat keine prognostische Bedeutung zu haben scheint, während für die NK-Zellen eine positive Assoziation mit der klinischen Prognose besteht. In dieser Arbeit wurde mittels Immunhistochemie und konfokalen Laserscanningmikroskopie die Rolle der T- und NK-Zellen im Nierenzellkarzinom näher untersucht. Dazu wurden zwei Hypothesen geprüft: 1) Unterscheiden sich die beiden Lymphozytenklassen im Zugang zu den Tumorzellen? 2) Unterscheiden sie sich in ihrer zytotoxischen Ausstattung im Tumormilieu? Zunächst wurde eine histologische Nachweismethode für NK-Zellen etabliert, die auf einer Zweimarker-Kombination aus CD3 ϵ und CD3 ζ basiert. Hierbei konnten die NK-Zellen zuverlässig als CD3 ϵ -CD3 ζ ⁺ Zellen identifiziert und von den T-Zellen (CD3 ϵ +CD3 ζ [±]) unterschieden werden. Diese Kombination wurde durch Einbindung des anti-CD31 Antikörpers erweitert. In einer Dreifarbenhistologie wurde auch die zytotoxische Ausstattung der CD8⁺ T-Zellen in Bezug zur vaskulären Lokalisation quantifiziert.

Überraschenderweise zeigte sich, dass sich die NK-Zellen im RCC bevorzugt intravaskulär befanden, während die CD8⁺ T-Zellen mehrheitlich extravasiert, dabei aber gefäßnah vorlagen. Dieses Verteilungsmuster war Tumor-assoziiert. Denn in nicht von Tumor befallenen Nierengewebe waren T- und v. a. NK-Zellen mehr intravaskulär gelegen. Bezüglich der zytotoxischen Ausstattung zeigte sich unabhängig vom prozentualen Anteil an intravaskulären Perforin⁺ CD8⁺ T-Zellen eine signifikante Reduktion der Perforin⁺ CD8⁺ T-Zellen nach Extravasation ins Tumorparenchym. Chemokine sind wichtige Faktoren, die die Migration und Lokalisation von Lymphozyten steuern. Korrelationsvergleiche mit Transkriptmengen wichtiger Chemokine zeigten eine positive Korrelation von CXCL16 und CX3CL1 mit der Anzahl an intravaskulären NK-Zellen, jedoch keine mit der Extravasationseffizienz der NK-Zellen, d.-h. die Chemokine locken NK-Zellen ins Tumorgewebe, fördern die Überquerung der vaskulären Barriere jedoch nicht. Der Anteil

extravasierter CD8⁺ T-sowie NK-Zellen korrelierte positiv mit der Präsenz an Treg und CD209⁺ myeloischen Zellen im Tumor, sowie mit erhöhten Transkriptmengen an TGF β während die Anzahl der NK-Zellen mit einer niedrigeren Treg-Anzahl einherging. Der Anteil an Perforin⁺ T-Zellen (unabhängig von der Lokalisation) korrelierte negativ mit Tregs.

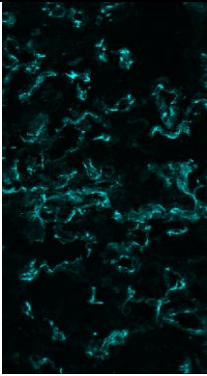
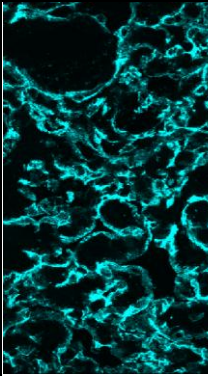
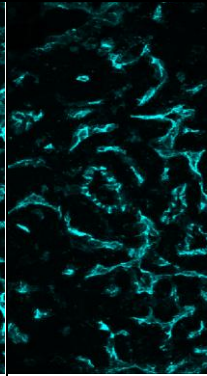
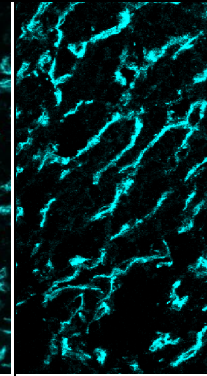
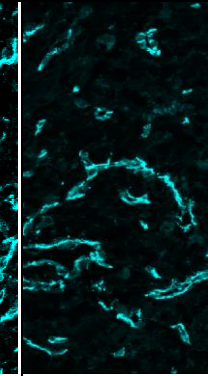
Die intravaskuläre Lokalisation der NK-Zellen und besonders die Perforin⁺ Fraktion sowie die Anzahl an intravaskulären CD8⁺ T-Zellen korrelierte mit retikulär intaktem Gefäßmuster und frühem Tumorstadium und korrelierte negativ mit dem Vorhandensein einer Lymphknoten- oder Organmetastasierung. Die intravaskulären NK-Zellen zeigten sich als starker Prädiktor für das Vorhandensein von Metastasen. In den späten Tumorstadien lagen die NK-Zellen vermehrt extravasiiert vor und es zeigte sich keine prognostische Signifikanz der NK-Zellen mehr. Dagegen zeigte sich dort eine prognostische Rolle der Anzahl an Perforin-positiven extravasiierten CD8⁺ T-Zellen.

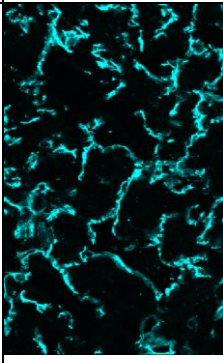
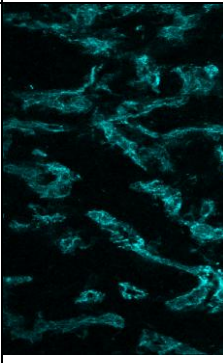
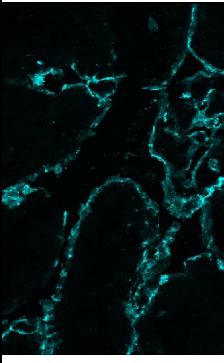
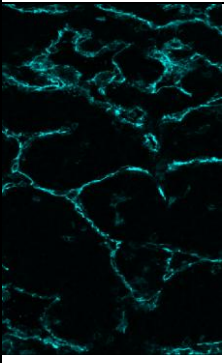
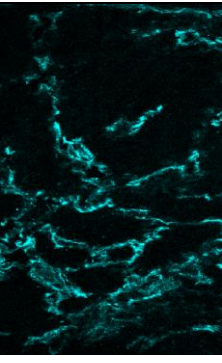
In einem Live-cell-imaging-Modell wurde beobachtet, dass sich die Mobilität der CD8⁺ T-Zellen verringerte, wenn die Kollagenmatrix von Tumorzellen produzierte lösliche Faktoren einhielt. Die Beweglichkeit konnte durch Zusatz von Glukose und Aminosäuren wieder hergestellt werden.

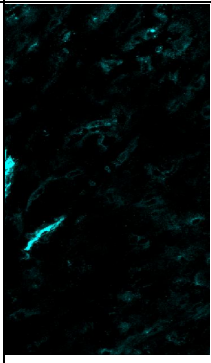
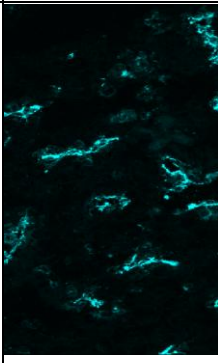
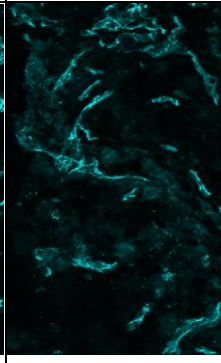
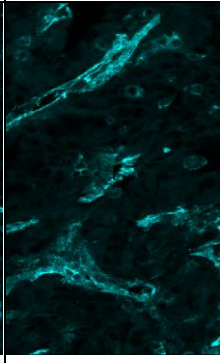
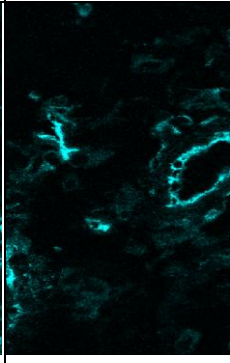
8. Anhang

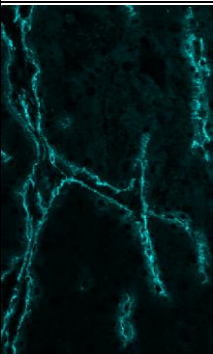
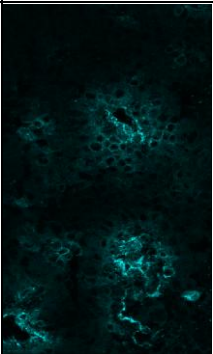
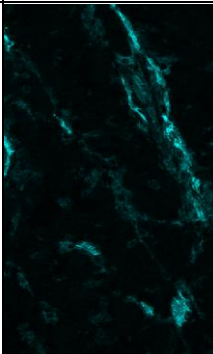
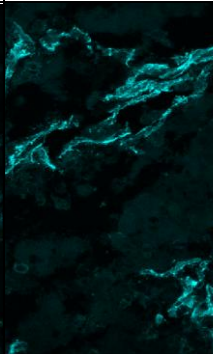
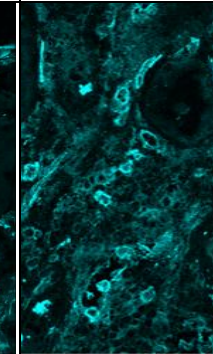
8.1 Histomorphologische Charakterisierung der Tumorgewebe der einzelnen Patienten

Für die histomorphologische Charakterisierung wurden die Nierenzellkarzinom- und Nichttumor-Nierengewebeschnitte mit den in Tabelle 4.1 erwähnten Färbekombinationen immunfluoreszent gefärbt. Anhand der aufgenommenen Bilder wurden die Gewebe nach Gewebeintegrität und -morphologie, Zellkernverteilung, Gefäßdichte und –morphologie, Vorhandensein von Lymphozytencluster und Homogenität der Lymphozytenverteilung beschrieben.

Bildausschnitt CD31-Färbung	Tumor-ID	Gewebe Integrität	Gewebe Morphologie	Gefäß Morphologie (CD31)	Homogenität der Verteilung (CD3/CD8/NK)
	3109	Gewebe kompakt Kerne homogen verteilt Kerndichte hoch	Tubulusstruktur gelegentlich erkennbar	Heterogen Mittlere Dichte Gefäßnetzwerk aufgehoben einzelne kleine bis mittelgroße längliche und teils rundliche Gefäße	Homogen keine Lymphozytencuster
	3073	Gewebe kompakt Kerne homogen verteilt Kerndichte hoch	Tubulusstruktur gelegentlich erkennbar	Homogen Hohe Dichte Gefäßnetzwerk weitgehend intakt kleine längliche schmale Gefäße	Homogen keine Lymphozytencuster
	3074	Gewebe kompakt Kerne inhomogen verteilt teilweise Gewebeareale mit wenigen Kernen Kerndichte mittel	Tubulusstruktur nicht erkennbar	Heterogen Hohe Dichte Gefäßnetzwerk teilweise vorhanden meistens kleine längliche oder rundliche Gefäße, vereinzelt mittelgroße Gefäße	Heterogen keine Lymphozytencuster
	2864	Gewebe kompakt Kerne homogen verteilt Kerndichte hoch	Tubulusstruktur nicht erkennbar	Homogen Hohe Dichte Gefäßnetzwerk teilweise intakt kleine längliche schmale Gefäße	Homogen keine Lymphozytencuster
	3093	Gewebe kompakt Kerne homogen verteilt Kerndichte niedrig bis mittel	Tubulusstruktur nicht erkennbar	Homogen Niedrige bis mittlere Dichte Gefäßnetzwerk nicht vorhanden viele einzelne kleine längliche und rundliche Gefäße	Homogen für CD8, NK Heterogen für CD3 keine Lymphozytencuster

Bildausschnitt CD31-Färbung	Tumor-ID	Gewebe Integrität	Gewebe Morphologie	Gefäß Morphologie (CD31)	Homogenität der Verteilung (CD3/CD8/NK)
	3108	Gewebe rissig Kerne homogen verteilt Kerndichte hoch	Tubulusstruktur nicht erkennbar	Hohe Dichte Gefäßnetzwerk intakt kleine längliche schmale Gefäße, Kapillarstruktur weitgehend intakt	Homogen Lymphozytencuster
	3242	Gewebe kompakt Kerne homogen verteilt Kerndichte hoch	Tubulusstruktur erkennbar	Mittlere Dichte Gefäßnetzwerk teilweise vorhanden kleine und mittelgroße längliche und runde Gefäße, Kapillarstruktur weitgehend aufgehoben	Homogen keine Lymphozytencuster
	2863	Gewebe kompakt Kerne inhomogen verteilt Kerndichte mittel	Tubulusstruktur teilweise noch erkennbar	Inhomogen Dichte niedrig bis hoch Gefäßnetzwerk teilweise vorhanden eher mittelgroße längliche und runde Gefäße im Netzwerk, vereinzelte rundliche und breite Gefäße	Homogen für CD8, NK Heterogen für CD3 keine Lymphozytencuster
	T16	Gewebe kompakt Kerne homogen verteilt Kerndichte mittel	Tubulusstruktur nicht erkennbar	Heterogen Hohe Dichte Gefäßnetzwerk teilweise vorhanden teilweise einzelne Gefäße, kleine längliche schmale Gefäße, auch einzelne runde mittelgroße Gefäße	Heterogen Lymphozytencuster
	2901	Gewebe kompakt Kerne homogen verteilt Kerndichte hoch	Tubulusstruktur nicht erkennbar	Homogen Mittlere Dichte Gefäßnetzwerk meistens vorhanden breite mittelgroße Gefäße in Verbindung, gelegentlich parallele Streifen im Gefäßnetzwerk	Heterogen Keine Lymphozytencuster

Bildausschnitt CD31-Färbung	Tumor-ID	Gewebe Integrität	Gewebe Morphologie	Gefäß Morphologie (CD31)	Homogenität der Verteilung (CD3/CD8/NK)
	2869	Gewebe kompakt Kerne inhomogen verteilt Kerndichte mittel	Tubulusstruktur nicht erkennbar	Homogen Niedrige Dichte Gefäßnetzwerk aufgehoben wenige einzelne große Gefäße Kapillarstruktur aufgehoben	Homogen Keine Lymphozytencluster
	2988	Gewebe rissig Kerne homogen verteilt Kerndichte an intaktem Gewebe hoch	Tubulusstruktur nicht erkennbar	Homogen Niedrige Dichte Gefäßnetzwerk nicht vorhanden nebeneinander liegende kleine und mittelgroße Gefäße Kapillarstruktur aufgehoben	Homogen Keine Lymphozytencluster
	2916	Gewebe kompakt Kerne homogen verteilt Kerndichte hoch	Tubulusstruktur erkennbar	Homogen Mittlere Dichte Gefäßnetzwerk aufgehoben, einzelne kleine und mittelgroße runde oder längliche Gefäße Kapillarstruktur aufgehoben	Heterogen Lymphozytencluster
	2890	Gewebe kompakt Kerne homogen verteilt Kerndichte mittel	Tubulusstruktur nicht erkennbar Übergangsgewebe mit degenerierter Nichttumorniere	Inhomogen Niedrige Dichte Gefäßnetzwerk nicht vorhanden kleine bis große isoliert liegende Gefäße Kapillarstruktur aufgehoben Gefäßmorphologie unscharf/unruhig	Heterogen Lymphozytencluster
	2885	Gewebe kompakt Kerne inhomogen verteilt Kerndichte mittel	Tubulusstruktur nicht erkennbar	Homogen Niedrige Dichte Gefäßnetzwerk aufgehoben mittelgroße bis große Gefäße, Kapillarstruktur aufgehoben	Homogen für CD8, NK Heterogen für CD3 Lymphozytencluster

Bildausschnitt CD31-Färbung	Tumor-ID	Gewebe Integrität	Gewebe Morphologie	Gefäß Morphologie (CD31)	Homogenität der Verteilung (CD3/CD8/NK)
	3272	Gewebe kompakt Kerne homogen verteilt Kerndichte mittel bis hoch	Tubulusstruktur nicht erkennbar	Homogen Mittlere Dichte Gefäßnetzwerk teilweise vorhanden mittelgroße bis große längliche dünne Gefäße, Kapillarstruktur aufgehoben	Homogen Keine Lymphozytencuster
	3279	Gewebe kompakt Kerne homogen verteilt Kerndichte hoch	Tubulusstruktur nicht erkennbar	Homogen Mittlere Dichte Gefäßnetzwerk teilweise vorhanden große bis mittelgroße längliche breite Gefäße, teilweise perivaskulär flau wabige CD31-Färbung, Kapillarstruktur aufgehoben	Heterogen Keine Lymphozytencuster
	T50	Gewebe kompakt Kerne homogen verteilt Kerndichte mittel	Tubulusstruktur vereinzelt noch erkennbar	Homogen Niedrige Dichte Gefäßnetzwerk nicht vorhanden große meist längliche Gefäße, Kapillarstruktur aufgehoben	Heterogen Lymphozytencuster
	T66	Gewebe kompakt Kerne inhomogen verteilt Kerndichte hoch	heterogenes Gewebe, große Areale mit Bindegewebsstraßen ohne Tumorzellen oder Immunzellen, dazwischen große Tumoringeln, Tubulusstruktur nicht erkennbar	Heterogen Mittlere Dichte Gefäßnetzwerk aufgehoben kleine bis große einzelne Gefäße, Kapillarstruktur aufgehoben	Heterogen Lymphozytencuster
	rNKC-2890	Gewebe kompakt Kerne homogen verteilt Kerndichte sehr hoch	zwischen normalen Nierengewebebereichen, dichte Areale mit Auflösung der normalen Gewebestruktur, Tubulusstruktur nicht erkennbar	Homogen Niedrige Dichte Gefäßnetzwerk aufgehoben kleine einzelne runde Gefäße, Kapillarstruktur aufgehoben	Homogen Keine Lymphozytencuster

8.2 Anzahl der T- und NK-Zellen und Berechnung des NK-Zell-Anteils an Lymphozyten ermittelt aus der CD3ε/CD3ζ Doppelmarker-Fluoreszenzfärbung

Tumor-ID	T-Zellen (Median pro HPF)	NK-Zellen (Median pro HPF)	% NK-Zellen nach IF	% NK-Zellen nach FACS (Prinz et al 2014)
3109	24	13,5	36	27,5
3073	17	13	43,3	32
3074	12,5	5	28,6	28,5
2864	46	19,5	29,8	34
3093	36	12	25	25
3108	33	9,5	22,4	26
3242	55	8	12,7	28
2863	34	4	10,5	9,5
T16	73	13,5	15,6	9
2901	59	9,5	13,9	14
2869	23	6,5	22	13
2988	37	6	14	10,7
2916	37,5	7	15,7	15
2890	71,5	4	5,3	7
2885	76,5	5	6,1	2
3272	16	2	11,1	10
3279	53	2	3,6	5
T50	86	3,5	3,9	7
T66	69	2	2,8	7
Median	37,5	6,5	14,0	13,0
Streubreite	12,5 - 86	2 - 19,5	2,8 - 43,3	2 - 34

Tabelle 8.1. Anzahl der T- und NK-Zellen in den einzelnen Tumorgeweben (als Median aller pro HPF) und Berechnung des prozentualen NK-Zellanteils an den Lymphozyten (Summe aus T- und NK-Zellen) aus der konfokalen Immunfluoreszenzfärbung sowie aus den FACS-Analysen der gleichen Tumoren. Der Median aller Tumorgewebe mit Streubreite ist in der untersten Zeile aufgeführt. HPF: Gesichtsfeld bei 400x Vergrößerung

8.3 Morphometrie verschiedener Immunzelltypen im RCC mittels

Einzelmarker-Immunhistochemie

Tumor	PD-1+ Zellen /HPF	CD209+ Zellen /HPF	FOXP3+ Zellen /HPF	CD14+ Zellen /HPF	PFN+/TIA+ /HPF
3109	1	26,5	2,5	16,5	0,46
3073	0	3	0	40	0,17
3074	1	9	0	6	0,28
2864	40,5	14,5	2,5	k. D.	0,06
3093	0	31,5	2	k. D.	0,39
3108	3	9	1	49	0,29
3242	6,5	28,5	1	k. D.	0,12
2863	1	11,5	3,5	k. D.	0,07
T16	37	3,5	2	3,5	0,55
2901	3	17,5	1	k. D.	0,17
2869	16,5	31,5	1	k. D.	0,21
2988	2,0	6	1,5	k. D.	0,21
2916	56,4	6	2,5	6	0,73
2890	29	14,5	4	14	0,17
2885	19,5	13,5	2,5	48	0,23
3272	0,5	15	5	k. D.	0,07
3279	3,5	5,5	13	k. D.	0,13
T50	52,5	44	27,5	25	0,22
T66	6	63,5	14	k. D.	0,11
Median	3,5	14,5	2,5	16,5	0,21
Streubreite	0 - 56,4	3 - 63,5	0 - 27,5	3,5 - 49	0,06 - 0,73

Tabelle 8.2. Anzahl (als Median pro HPF) von PD-1+, CD209+, FOXP3+, CD14+ und Pfn+/TIA+ Zellen in den immunhistochemisch gefärbten Tumorgeweben . Der Median aller Tumorgewebe mit Streubreite ist in der untersten Zeile aufgeführt. K. D.: keine Daten. Zellzahlen Perforin, TIA einzeln einfügen

8.4 Parameter des lymphozytären Infiltrates im RCC, ermittelt aus Fluoreszenzmehrfachfärbungen

Tumor-ID	CD8+T-Zellen			Pfn+CD8+T-Zellen	
	% extravasiert	Anzahl pro HPF	Anzahl extravasiert pro HPF	Anzahl pro HPF	Anzahl intravaskulär pro HPF
3109	94,7	26,5	26	2	1
3073	61,6	10	6	4	3
3074	55,8	6	4	4	2
2864	91,2	40	35,5	7	3,5
3093	84,2	13	12	5	2
3108	58,0	14	10	5,5	4
3242	87,3	24	20,5	7,5	2,5
2863	73,6	11	6,5	2	1
T16	87,6	47	42	10	4,5
2901	86,1	37,5	34,5	23	4
2869	91,1	12,5	10,5	3,5	1
2988	81,2	17	14	4,5	2
2916	84	18	15	1	1
2890	94,8	39	39,5	11	2
2885	93,3	31	26	13	2
3272	93,3	9	9	2	0
3279	97,7	28	24	1	0
T50	92,5	61,5	55,5	3	1
T66	89,7	15,5	10	4	1
Median	87,6	18	15	4	2
Streubreite	55,8 - 97,7	6 - 61,5	4 - 55,5	1 - 23	0 - 4,5

Tabelle 8.3.1. Parameter des CD8+ T-Zell-Infiltrats: % extravasierte Zellen, Anzahl gesamt und extravasiert, Anzahl der Perforin+ (Pfn+) Zellen gesamt und intravaskulär für die einzelnen Tumorgewebe (als Median pro HPF) ermittelt mithilfe der Multifluoreszenzmikroskopie. Der Median aller Tumorgewebe mit Streubreite ist in der untersten Zeile aufgeführt.

Tumor-ID	NK-Zellen			Pfn+ NK-Zellen (CD8-Pfn+)	
	% extravasiert	Anzahl pro HPF	Anzahl extravasiert pro HPF	Anzahl pro HPF	Anzahl intravaskulär pro HPF
3109	58,5	13,5	5,5	9	3
3073	39,5	13	8	9	7
3074	23,5	5	4	8	8
2864	63,9	19,5	8	18,5	14
3093	70,2	12	3	7	2
3108	38,7	9,5	6	9	8
3242	35,2	8	5	14,5	11,5
2863	54,2	4	1	3,5	3,5
T16	24,6	13,5	10	19	14
2901	49,2	9,5	4	7,5	5
2869	79,1	6,5	1	3	1
2988	45,9	6	3	3	2,5
2916	48,6	7	4	4	3
2890	70,9	4	1	3	1,5
2885	61,5	5	1	4	2,5
3272	76,9	2	0	2	1
3279	77	2	0	1	0
T50	69,5	3,5	1,5	4,5	1,5
T66	59,1	2	1	4,5	0
Median	58,5	6,5	3	4,5	3
Streubreite	23,5 - 79,1	2 - 19,5	0 - 10	1 - 19	0 - 14

Tabelle 8.3.2. Parameter des NK-Zell-Infiltrats: % extravasiierte Zellen, Anzahl der Zellen gesamt und extravasiiert, Anzahl der Perforin+ (Pfn+) Zellen gesamt und intravaskulär für die einzelnen Tumorgewebe (als Median pro HPF) ermittelt mithilfe der Multifluoreszenzmikroskopie. Die Perforin+ NK-Zellen wurden als Pfn+ Zellen, die nicht CD8+ waren ermittelt. Der Median aller Tumorgewebe mit Streubreite ist in der untersten Zeile aufgeführt.

CD3+ T-Zellen			
Tumor-ID	% extravasiiert	Anzahl pro HPF	Anzahl extravasiiert pro HPF
3109	87,8	24	21,5
3073	62,9	17	10
3074	66,6	12,5	9
2864	78,7	46	37
3093	90,2	36	33
3108	57,5	33	13,5
3242	81,7	55	44
2863	95,1	34	35
T16	79,6	73	56
2901	72	59	46
2869	88,5	23	20,5
2988	83,9	37	32
2916	85,9	37,5	33
2890	95,3	71,5	62,5
2885	85,3	76,5	49
3272	89,7	16	12
3279	97,2	53	52
T50	91,2	86	78
T66	94,6	69	49
Median	85,9	37,5	35
Streubreite	57,5 - 97,2	12,5 - 86	9 - 78

Tabelle 8.3.2. Parameter des CD3+ T-Zell-Infiltrats: % extravasiierte Zellen, Anzahl der Zellen gesamt und extravasiiert für die einzelnen Tumorgewebe (als Median pro HPF) ermittelt mithilfe der Multifluoreszenzmikroskopie. Der Median aller Tumorgewebe mit Streubreite ist in der untersten Zeile aufgeführt.

8.5 Parameter des lymphozytären Infiltrates im NKC und rNKC-2890

ermittelt aus Fluoreszenzmehrfachfärbungen

Tumor	T-Zellen (Median pro HPF)	NK-Zellen (Median pro HPF)	CD8+ T-Zellen (Median pro HPF)	%Pfn+ (CD8+)T-Zellen (Median pro HPF)
3073	2	2	2	25
3074	5,5	1	4	30
2864	3	1	2	16,7
3242	4	1	3	16,7
T16	5	1	3	44,2
2869	14	2	8	25
2890	21	2	11	38
2885	12	1	8	20
T50	n.d.	n.d.	1,5	0
Median	5,3	1	3	25
Streubreite	2 - 21	1 - 2	1,5 - 11	0 - 44,2
rNKC-2890	24	0	14	65,5

Tabelle 8.3.2. Parameter des Lymphozyteninfiltrats in den untersuchten Nichttumornieren und dem reaktiven Teil der NKC-2890: Anzahl der T-, NK- und CD8+ T-Zellen gesamt sowie Prozentsatz der Perforin+ (Pfn+) Zellen unter den CD8+ T-Zellen (als Median pro HPF), ermittelt mithilfe der Multifluoreszenzmikroskopie. Der Median aller Nichttumornierengewebe mit Streubreite ist in der untersten Zeile aufgeführt.

9. Literaturverzeichnis

Al-Shibli KI et al. Prognostic effect of epithelial and stromal lymphocyte infiltration in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2008 Aug 15; 14(16):5220-7.

Autorino R et al. An evolving role for immunotherapy in metastatic RCC. *Nat Rev Urol.* 2010 Jun;7(6):305-7.

Anz D. Aspekte der antitumoralen Effektorfunktion zytotoxischer T-Zellen und Betrachtungen ihres Zusammenspiels mit Makrophagen und dendritischen Zellen. Dissertation, LMU München: Medizinische Fakultät (2007).

Bates GJ et al. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J. Clin. Oncol.* 24, 5373–5380 (2006).

Beatty GL et al. Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res.* 2015 Feb 15; 21(4):687-92.

Betsunoh H et al. Increased expression of system large amino acid transporter (LAT)-1 mRNA is associated with invasive potential and unfavorable prognosis of human clear cell renal cell carcinoma. *BMC Cancer.* 2013 Oct 30; 13:509.

Bleumer I et al. Immunotherapy for renal cell carcinoma. *Eur Urol.* 2003 Jul; 44(1):65-75.

Boffetta P et al. Occupational exposure to arsenic, cadmium, chromium, lead and nickel, and renal cell carcinoma: a case-control study from Central and Eastern Europe *Occup Environ Med* 2011; 68:723-728.

Boissonnas A et al. In vivo imaging of cytotoxic T cell infiltration and elimination of a solid tumor. *J Exp Med.* 2007 Feb 19; 204(2):345-56.

Borghans JA et al. How specific should immunological memory be? *J Immunol* 163: 569-575 (1999).

Buckanovich RJ et al. Endothelin B receptor mediates the endothelial barrier to T cell homing to tumors and disables immune therapy. *Nat Med.* 2008 Jan; 14(1):28-36.

Burnet M. Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *Br Med J* 1: 779-786 (1957).

Chan JY et al. Microenvironments and Cellular Characteristics in the Micro Tumor Cords of Malignant Solid Tumors. *Int. J. Mol. Sci.* 2012, 13, 13949-13965.

Clemente CG et al. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer.* 1996 Apr 1; 77(7):1303-10.

Cho E et al. Prospective evaluation of analgesic use and risk of renal cell cancer. *Arch Intern Med.* 2011 Sep 12; 171(16):1487-93.

Crespo J et al. T cell anergy, exhaustion, senescence, and stemness in the tumor microenvironment. *Curr Opin Immunol.* 2013 Apr; 25(2):214-21.

Curiel TJ et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature Med.* 10 942–949 (2004).

Deguine J et al. Intravital imaging reveals distinct dynamics for natural killer and CD8(+) T cells during tumor regression. *Immunity.* 2010 Oct 29; 33(4):632-44.

Donskov F et al. Impact of immune parameters on long-term survival in metastatic renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 24, 1997–2005 (2006).

Dubinett SM, Patrone L, Tobias J, Cochran AJ, Wen DR, McBride WH Intratumoral interleukin-2 immunotherapy: activation of tumor-infiltrating and splenic lymphocytes in vivo. *Cancer Immunol Immunother.* 1993;36(3):156-62.

Dudley ME et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with anti-tumor lymphocytes. *Science.* 2002; 298:850–854.

Dunn GP et al. Cancer immunoediting: from Immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3: 991-998 (2002).

Dunn GP et al. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21: 137-148 (2004).

Eckl J et al. Transcript signature predicts tissue NK cell content and defines renal cell carcinoma subgroups independent of TNM staging. *J Mol Med (Berl).* 2012 Jan; 90(1):55-66.

Escudier B et al. Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 21 Suppl 5: v137-139 (2010)

Ficarra V et al. TNM staging system for renal-cell carcinoma: current status and future perspectives. *Lancet Oncol* 8:554-558 (2007).

Figel AM et al. Human renal cell carcinoma induces a dendritic cell subset that uses T-cell crosstalk for tumor-permissive milieu alterations. *Am J Pathol.* 2011 Jul; 179(1):436-51.

Fridman WH et al. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer.* 2012 Mar 15; 12(4):298-306.

Fu J et al. Increased regulatory T cells correlate with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *Gastroenterology* 132, 2328–2339 (2007).

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).

Galon J et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313: 1960-1964 (2006).

Gambhir SS. Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. *Nat Rev Cancer.* 2002 Sep; 2(9):683-93.

Garcia-Sanchez JE et al. 100 years of Dr. Ehrlich's magic bullet (1909-2009). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 28: 521-533 (2010).

Gatenby RA et al. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer.* 2004 Nov; 4(11):891-9.

Ghio M et al. Soluble HLA-I-mediated secretion of TGF-beta1 by human NK cells and consequent down-regulation of anti-tumor cytolytic activity. *Eur J Immunol.* 2009 Dec; 39(12):3459-68.

Ghiringhelli F et al Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med.* 2005 Oct 3; 202(7):919-29.

Gillard-Bocquet M et al. Lung tumor microenvironment induces specific gene expression signature in intratumoral NK cells. *Front Immunol.* 2013 Feb 4;4:19.

Gobert M et al. Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res.* 69.

Griffioen AW et al. Endothelial intercellular adhesion molecule-1 expression is suppressed in human malignancies: the role of angiogenic factors. *Blood.* 1996 Jul 15; 88(2):667-73.

Haymaker C et al PD-1 and BTLA and CD8(+) T-cell "exhaustion" in cancer: "Exercising" an alternative viewpoint. *Oncoimmunology*. 2012 Aug 1; 1(5):735-738.

Holder KA et al. Hepatitis C virus-infected cells downregulate NKp30 and inhibit ex vivo NK cell functions. *J Immunol*. 2013 Sep 15; 191(6):3308-18.

Honda T et al. Tuning of antigen sensitivity by T cell receptor-dependent negative feedback controls T cell effector function in inflamed tissues. *Immunity*. 2014 Feb 20;40(2):235-47.

Hosse J. Die molekulare Quantifizierung von NK-Zellen im klarzelligen Nierenzellkarzinom und die Bedeutung von CCL5 in NK-Zellen und für die Phagozytose. Dissertation, LMU München: Medizinische Fakultät (2007).

Hughes T, Klairmont M, Broucek J, Iodice G, Basu S, Kaufman HL. The prognostic significance of stable disease following high-dose interleukin-2 (IL-2) treatment in patients with metastatic melanoma and renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2015 Apr;64(4):459-65.

Hunt JD et al. Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies. *Int J Cancer* 114: 101-108. (2005).

Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science*. 2005 Jan 7; 307(5706):58-62.

Janiszewska AD et al. Spontaneous regression of renal cell carcinoma. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2013; 17(2):123-7.

Jantzer P et al. Human renal cell carcinoma antigen-specific CTLs: antigen-driven selection and long-term persistence in vivo. *Cancer Res* 58: 3078-3086 (1998).

Jensen HK et al. Increased intratumoral FOXP3-positive regulatory immune cells during interleukin-2 treatment in metastatic renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res*. 15, 1052–1058 (2009).

Johansson A et al. Tumor-targeted TNF α stabilizes tumor vessels and enhances active immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 May 15;109(20):7841-6

Jost S et al. Expansion of 2B4+ natural killer (NK) cells and decrease in NKp46+ NK cells in response to influenza. *Immunology*. 2011 Apr; 132(4):516-26.

Kantoff PW. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med*. 2010 Jul 29; 363(5):411-22.

Kawai O. et al. Predominant infiltration of macrophages and CD8+ T Cells in cancer nests is a significant predictor of survival in stage IV nonsmall cell lung cancer *Cancer* 11 3, 1387– 1395 (2008).

Kawakami N et al. Live imaging of effector cell trafficking and autoantigen recognition within the unfolding autoimmune encephalomyelitis lesion. *J Exp Med*. 2005 Jun 6; 201(11):1805-14.

Kelsh MA et al. Occupational trichloroethylene exposure and kidney cancer: a meta-analysis. *Epidemiology*, 21 (2010), pp. 95–102.

Keppel MP et al. Activation-Specific Metabolic Requirements for NK Cell IFN- γ Production. *J Immunol*. 2015 Feb 15; 194(4):1954-62.

Koch et al. Activating natural cytotoxicity receptors of natural killer cells in cancer and infection. *Trends in Immunology*, Volume 34, Issue 4, April 2013, Pages 182–19.

Kohidai L et al. Chemotaxis and chemotactic selection induced with cytokines (IL-8, RANTES and TNF- α) in the unicellular *Tetrahymena pyriformis*. *Cytokine* 10: 481-486 (1998).

Kudo-Saito C, Garnett CT, Wansley EK, Schlom J, Hodge JW. Intratumoral delivery of vector mediated IL-2 in combination with vaccine results in enhanced T cell avidity and anti-tumor activity. *Cancer Immunol Immunother*. 2007 Dec;56(12):1897-910.

Lanier LL et al. Expression of cytoplasmic CD3 epsilon proteins in activated human adult natural killer (NK) cells and CD3 gamma, delta, epsilon complexes in fetal NK cells. Implications for the relationship of NK and T lymphocytes. *J Immunol*. 1992 Sep 15; 149(6):1876-80.

Leisegang M et al. T-cell receptor gene-modified T cells with shared renal cell carcinoma specificity for adoptive T-cell therapy. *Clin Cancer Res* 16: 2333-2343 (2010).

Liu G et al. Perturbation of NK cell peripheral homeostasis accelerates prostate carcinoma metastasis. *J Clin Invest*. 2013 Oct 1; 123(10):4410-22.

Ludwig A et al. Transmembrane chemokines: versatile 'special agents' in vascular inflammation. *Thromb Haemost*. 2007 May; 97(5):694-703.

Mamessier E et al. Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. *J Clin Invest*. 2011 Sep; 121(9):3609-22.

Mantovani A et al (2004). Chemokines in the recruitment and shaping of the leukocyte infiltrate of tumors. *Semin Cancer Biol* 14:155–160.

Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296: 301-305 (2002).

Mauge L et al. Control of the adaptive immune response by tumor vasculature. *Front Oncol*. 2014 Mar 28; 4:61.

McLaughlin JK et al. International renal-cell cancer study. VIII. Role of diuretics, other antihypertensive medications and hypertension. *Int J Cancer* 63: 216-221 (1995).

Medley QG et al. Characterization of GMP-17, a granule membrane protein that moves to the plasma membrane of natural killer cells following target cell recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jan 23, 1996; 93(2): 685–689.

Medzhitov R et al. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 296: 298-300 (2002).

Mendler AN et al. Tumor lactic acidosis suppresses CTL function by inhibition of p38 and JNK/c-Jun activation. *Int J Cancer*. 2012 Aug 1;131(3):633-40.

Michel JJ et al. CD56-expressing T cells that have features of senescence are expanded in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2007 Jan; 56(1):43-57.

Milani V. Effects of intracellular and extracellular heat shock proteins on anti-tumor immune responses. LMU München: Medizinische Fakultät (2005).

de Miranda NF et al. DNA repair: the link between primary immunodeficiency and cancer. *Ann N Y Acad Sci*. 2011 Dec; 1246:50-63.

Mlecnik B et al. Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J. Clin. Oncol*. 29, 610–618 (2011).

Moch H et al. Reassessing the current UICC/AJCC TNM staging for renal cell carcinoma. *Eur Urol* 56:636-643 (2009).

Modrow S et al. *Molekulare Virologie*. 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 2010.

Mortarini R et al. Lack of terminally differentiated tumor-specific CD8+ T cells at tumor site in spite of antitumor immunity to self-antigens in human metastatic melanoma. *Cancer Res*. 2003 May 15; 63(10):2535-45.

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).

Nouh MA et al. Renal cell carcinoma in patients with end-stage renal disease: relationship between histological type and duration of dialysis *BJU Int*, 105 (2010), pp. 620–627.

Ostuni MA et al. CX3CL1, a chemokine finely tuned to adhesion: critical roles of the stalk glycosylation and the membrane domain. *Biol Open*. 2014 Nov 13;3(12):1173-82.

Ottaviani C et al. CD56bright CD16(–) NK cells accumulate in psoriatic skin in response to CXCL10 and CCL5 and exacerbate skin inflammation. *Eur J Immunol* (2006) 36:118–128

Pernot S et al. Colorectal cancer and immunity: what we know and perspectives. *World J Gastroenterol*. 2014 Apr 14; 20(14): 3738-50.

Platonova S et al. Profound coordinated alterations of intratumoral NK cell phenotype and function in lung carcinoma. *Cancer Res*. 71, 5412–5422 (2011).

Poggi A et al. Mechanisms of tumor escape: role of tumor microenvironment in inducing apoptosis of cytolytic effector cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2006 Sep-Oct; 54(5):323-33.

Prinz PU et al. High DGK- α and disabled MAPK pathways cause dysfunction of human tumor-infiltrating CD8+ T cells that is reversible by pharmacologic intervention. *J Immunol*. 2012 Jun 15; 188(12):5990-6000.

de Rham C et al. The proinflammatory cytokines IL-2, IL-15 and IL-21 modulate the repertoire of mature human natural killer cell receptors. *Arthritis Res Ther*. 2007;9(6):R125.

Remark R et al. Characteristics and clinical impacts of the immune environments in colorectal and renal cell carcinoma lung metastases: influence of tumor origin. *Clin Cancer Res*. 2013 Aug 1;19(15):4079-91.

Rosmanit M. In-vitro und in-situ-Untersuchungen an Tumor-infiltrierenden Lymphozyten aus Patienten mit Nierenzellkarzinom. LMU München: Tierärztliche Fakultät (2002).

Salnikova O et al. Endothelial plasticity governs the site-specific leukocyte recruitment in hepatocellular cancer. *Int J Cancer*. 2013 Nov 15; 133(10):2372-82.

Schendel DJ et al. Cellular and molecular analyses of major histocompatibility complex (MHC) restricted and non-MHC-restricted effector cells recognizing renal cell carcinomas: problems and perspectives for immunotherapy. *J Mol Med (Berl)*. 1997 Jun; 75(6):400-13.

Schleypen JS et al. Cytotoxic markers and frequency predict functional capacity of natural killer cells infiltrating renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 12: 718-725 (2006).

Schreiber RD et al. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331, 1565–1570 (2011).

Shankaran V et al. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*. 2001 Apr 26;410(6832):1107-11.

Skrablin P. Tumormilieu-induzierte Inaktivierung zytotoxischer Lymphozyten. LMU München: Fakultät für Biologie (2008).

Smyth MJ et al. Perforin is a major contributor to NK cell control of tumor metastasis. *J Immunol*. 1999 Jun 1;162(11):6658-62.

Sozzani S et al. Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J Immunol* 161: 1083-1086 (1998).

Tomita Y et al. Characterization of tumor-infiltrating mononuclear cells in renal cell cancer: quantitative analysis by immunoperoxidase staining. *Urol Int* 47 (1): 1-6 (1991).

Treiber U. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge: Urogenitale Tumoren 4. Auflage 2008 Herausgegeben vom Tumorzentrum München Zuckschwerdt Verlag .

Uniklinik Ulm Comprehensive Cancer Center Ulm (CCCU). <http://www.uniklinik-ulm.de/struktur/zentren/cccu/home/fuer-patienten-und-angehoerige/krebsbehandlung/krebs-spezifisch/nierenzellkarzinom.html>.

van Dijk BA, et al. Relation of height, body mass, energy intake, and physical activity to risk of renal cell carcinoma: results from the Netherlands Cohort Study. *Am J Epidemiol* 160: 1159-1167 (2004).

Veugelers K et al. Granule-mediated killing by granzyme B and perforin requires a mannose 6-phosphate receptor and is augmented by cell surface heparan sulfate. *Mol. Biol. Cell* 2006, 17, 623–633.

Yee C et al. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002.

Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* (Washington DC), 1956; 123: 309-314.

Wong MK. The current role of immunotherapy for renal cell carcinoma in the era of targeted therapeutics. *Curr Oncol Rep*. 2008 May;10(3):259-63.

Yoon J et al. Staging renal cell carcinoma with helical CT: the revised 1997 AJCC and UICC TNM criteria. *Crit Rev Comput Tomogr* 44: 229-249 (2003).

Yu B et al. Down-regulation of CD3zeta is a breast cancer biomarker associated with immune suppression. *Cell Biol Int*. 2011 Feb;35(2):165-9.

Zhi WI, Kim JJ. An update on current management of advanced renal cell cancer, biomarkers, and future directions. *Ann Cancer Res*. 2014;1(2):1-10.

Ziegler A et al. Überlebenszeitanalyse: Die Cox-Regression *Dtsch Med Wochenschr* 2007; 132: e42–e44 Georg Thieme Verlag KG Stuttgart - New York.

Zlotnik A et al. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12: 121-127 (2000).

10. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CCL	Chemokinrezeptor-Ligand (CC-Motiv)
CCR	Chemokinrezeptor (CC-Motiv)
CXCL	Chemokinrezeptor-Ligand (CXC-Motiv)
CD	Differenzierungscluster (Cluster of Differentiation)
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DZ	Dendritische Zelle
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Durchflusszytometrie (Fluorescence activated cell sorting)
FKS	Fötales Kälberserum
FOXP3	Forkhead box P3
GF	Gesichtsfeld
HPF	High power field
HS	Humanserum
IFN- γ	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
MHC	Haupthistokompatibilitäts-Komplex (major histocompatibility complex)
Min	Minute
NKC	Nichttumornierenrindengewebe (non-tumor kidney cortex)
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
PBMZ	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cells)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PFA	Paraformaldehyd

RCC	Nierenzellkarzinom (renal cell carcinoma)
Rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RPMI	1640 Roesewell Park Memorial Institute Medium 1640
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor- β (transforming growth factor- β)
TIL	Tumordinfiltrierende Lymphozyten
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TZR	T-Zell-Rezeptor
Treg	regulatorische T-Zelle
v. a.	vor allem
u. a.	Unter anderem
ZTL	Zytotoxische T Lymphozyten

11. Veröffentlichungen

Prinz PU, Mendler AN, Brech D, **Masouris I**, Oberneder R, Noessner E. NK-cell dysfunction in human renal carcinoma reveals diacylglycerol kinase as key regulator and target for therapeutic intervention. *Int J Cancer*. 2014 Oct 15; 135(8):1832-41.

Prinz PU, Mendler AN, **Masouris I**, Durner L, Oberneder R, Noessner E. High DGK- α and disabled MAPK pathways cause dysfunction of human tumor-infiltrating CD8⁺ T cells that is reversible by pharmacologic intervention. *J Immunol*. 2012 Jun 15;188(12):5990-6000.

Noessner E, Brech D, Mendler AN, **Masouris I**, Schlenker R, Prinz PU. Intratumoral alterations of dendritic-cell differentiation and CD8(+) T-cell anergy are immune escape mechanisms of clear cell renal cell carcinoma. *Oncoimmunology*. 2012 Nov 1; 1(8):1451-1453.

Gross H , Hennard C, **Masouris I**, Cassel C, Barth S, Stober-Grässer U, Mamiani A, Moritz B, Ostareck D, Ostareck-Lederer A, Neuenkirchen N, Fischer U, Deng W, Leonhardt H, Noessner E, Kremmer E, Grässer FA. Binding of the heterogeneous ribonucleoprotein K (hnRNP K) to the Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 (EBNA2) enhances viral LMP2A expression. *PLoS One*. 2012; 7(8):e42106

12. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich bei einer Vielzahl von Leuten bedanken, die mich während meiner Doktorarbeit begleitet und unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Elfriede Nößner, dass ich bei ihr meine Doktorarbeit mit einem sehr interessanten und spannenden Thema anfertigen konnte. Ich erinnere mich sehr gern an unseren unzähligen konstruktiven Ergebnisdiskussionen, an ihr Augenmerk für jegliche wissenschaftliche Details, an die vielen guten Vorschläge und ihr stets offenes Ohr für Fragen und Anregungen. Eine bessere Betreuung kann man sich nicht wünschen.

Frau Prof. Dolores Schendel und Herrn Prof. Ralph Mocikat möchte ich danken, dass sie es mir ermöglicht haben, am Institut für Molekulare Immunologie meine Doktorarbeit anzufertigen.

Bei Frau Anna Brandl und Herrn Dr. Bin Hu möchte ich mich ganz besonders für die tolle Einarbeitung sowie die Unterstützung bei vielen technischen und wissenschaftlichen Fragen und Probleme danken.

Meiner Arbeitsgruppe (Anna, Doro, Luis, Petra, Ramona) sowie allen ehemaligen Praktikanten, Doktoranden etc. danke ich für die wunderschöne gemeinsame Zeit! Das Arbeiten mit euch hat sehr viel Spaß gemacht, ich danke euch für die Unterstützung und Hilfe in guten wie in weniger guten Momenten. Nicht zu vergessen natürlich sind etliche gemeinschaftliche Aktivitäten, wie Lunch-Clubbing, After-Work, kulinarische Abenteuer etc., an die ich gerne zurück erinnere.

Zusätzlich möchte ich mich noch bei meinen Eltern bedanken, die mich immer bei allem, was ich getan habe, unterstützt haben. Sie waren und sind immer für mich da und haben immer an mich geglaubt.

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Verteilung und zytotoxische Qualität von T-Zellen und natürlichen Killerzellen im klarzelligen Nierenzellkarzinom: Gefäßsystem-bezogene Lokalisation und Ausstattung mit Perforin beeinflussen Metastasierung und Tumor-spezifisches Überleben“ selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 15.5.2016

Ilias Masouris