

Aus dem Institut für Medizinische Immunologie  
der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(Direktorin: Prof. med. habil. Dr. rer. nat. B. Seliger)

Durchflusszytometrische Charakterisierung des Phänotyps tumorinfiltrierender  
Lymphozyten beim Nierenzellkarzinom

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

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

von Katharina Geißler

geboren am 13.07.1985 in Zwickau

Betreuerin: PD Dr. med. D. Riemann

Gutachter: 1. PD Dr. med. D. Riemann

2. Prof. Dr. med. P. Fornara

3. Prof. Dr. D. Reinhold (Magdeburg)

Tag der Eröffnung: 05.10.2011

Tag der Verteidigung: 23.04.2012

In memoriam meiner lieben Oma Anita

## Referat

In dieser Arbeit wurden die phänotypischen Eigenschaften tumorinfiltrierender Lymphozyten von Patienten mit tumorösen Nierenerkrankungen untersucht. Das Ziel war es, Zusammenhänge zwischen bestimmten lymphozytären Oberflächenexpressionsmustern in Tumor und Blut und dem histologischen Tumortyp, Grading, TNM-Staging, Alter und der Überlebenszeit der Patienten zu erfassen.

Die gesamte Untersuchungsgruppe umfasste 119 Patienten mit Tumordiagnose der Niere (davon 92 hellzellige Nierenzellkarzinome), welche sich in der Klinik für Urologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg einer chirurgischen Tumorthherapie unterzogen. Nach Gewinnung und Aufbereitung der frischen Tumorresektate sowie der Blutproben erfolgten die Immunfluoreszenzfärbungen mit einer Kombination verschiedener monoklonaler Antikörper und die anschließende Analyse der markierten Zellen mittels 4-Farbmessung am Durchflusszytometer. Die in 70 Fällen parallel durchgeführten immunhistochemischen Färbungen von repräsentativen Paraffinschnitten zeigten unterstützend die Absolutzahlen der Lymphozyten sowie die regionale Verteilung der Immunzellinfiltrate auf. Die Resultate wurden mit uni- und multivariaten Analysemodellen statistisch ausgewertet.

Für Nierenzellkarzinompatienten mit hohen Anteilen an CXCR3<sup>+</sup> T-Zellen und HLA-DR<sup>+</sup> T-Zellen im Tumor war eine höhere Überlebenswahrscheinlichkeit nachweisbar. Zugleich war ein hoher intratumoraler Anteil an Natürlichen-Killer (NK)-Zellen mit einem geringeren Sterberisiko verbunden. CD69<sup>+</sup> T-Zellen und CTLA-4<sup>+</sup> T-Zellen, die mit immunsuppressiver Aktivität assoziiert werden, waren in höheren Anteilen in schlecht differenzierten Tumoren zu finden. Andererseits zeigten die für Immunseneszenz charakteristischen CD57<sup>+</sup> T-Zellen und CD4<sup>+</sup>CD7-negativen T-Zellen höhere Anteile in kleinen, gut differenzierten Tumoren. Anhand der immunhistochemischen Färbung der Paraffinschnitte war ersichtlich, dass die Anzahl der T-Zellen (CD3<sup>+</sup>) mit zunehmender Entdifferenzierung der Tumoren ansteigt. Bei der vergleichenden Analyse der lymphozytären Infiltrationen in hellzelligen Nierenzellkarzinomen und benignen Onkozytomen wurden höhere Anteile an CD4<sup>+</sup>, CD13<sup>+</sup>, CD26<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup>, CD107<sup>+</sup> und HLA-DR<sup>+</sup> T-Zellen für hellzellige Nierenzellkarzinome ermittelt. NK-Zellen wurden in höheren Anteilen in Onkozytomen entdeckt.

Die vorliegende Arbeit bietet Hinweise dafür, dass die Ermittlung der tumoralen Anteile einiger Lymphozytensubpopulationen wie NK-Zellen, CXCR3<sup>+</sup> und HLA-DR<sup>+</sup> T-Zellen bei der Prognoseabschätzung erkrankter Patienten vorteilhaft ist.

Geißler, Katharina: Durchflusszytometrische Charakterisierung des Phänotyps tumorinfiltrierender Lymphozyten beim Nierenzellkarzinom, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 79 Seiten, 2011

**Inhaltsverzeichnis**

I.	Abbildungsverzeichnis .....	III
II.	Tabellenverzeichnis .....	IV
III.	Abkürzungsverzeichnis .....	VI
<b>1.</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Das Nierenzellkarzinom – Epidemiologie, Pathogenese, Diagnostik, Therapie, Prognose .....	1
1.2	Immunsystem und Nierenzellkarzinom .....	3
1.3	Relevanz der durchflusszytometrischen und immunhistochemischen Färbungen von Nierentumorgewebe .....	5
1.3.1	Durchflusszytometrie als Methode zur Immunzellcharakterisierung .....	5
1.4	Oberflächenmoleküle zur Charakterisierung von Immunzellen .....	6
1.4.1	T-, B-, NK- und NKT-Zellmarker .....	6
1.4.2	Funktions-assoziierte Marker .....	7
1.4.3	Chemokinrezeptoren .....	8
1.4.4	Immunseneszenzmarker .....	9
1.4.5	Marker myeloischer Zellen und Blutgefäße .....	10
<b>2.</b>	<b>Zielstellung</b> .....	<b>11</b>
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>12</b>
3.1	Monoklonale Antikörper für durchflusszytometrische Analysen und immunhistochemische Färbungen .....	12
3.2	Chemikalien .....	13
3.3	Puffer und Lösungen .....	13
3.4	Verbrauchsmaterialien .....	13
3.5	Geräte .....	13
3.6	Datenverarbeitungsprogramme .....	14
3.7	Tumormaterial .....	14
3.8	Gewinnung und Präparation der TIL und PBL .....	14
3.9	Anfertigung ultradünner Paraffingewebeschnitte .....	17
3.9.1	Immunhistochemische Färbungen an Paraffinschnitten .....	17
3.10	Statistische Analysen .....	18
3.10.1	Mittelwertvergleiche .....	18
3.10.2	Überlebensstatistik .....	18
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>20</b>
4.1	Charakterisierung der Tumorproben .....	20
4.2	Durchflusszytometrische Charakterisierung der TIL .....	21

4.2.1	Vergleich der Expressionsmuster in histologisch differentiellen Nierentumoren .....	21
4.2.2	Korrelation des TIL-Phänotyps mit dem Grading .....	23
4.2.3	Korrelation des TIL-Phänotyps mit dem TNM-Staging .....	24
4.2.4	Korrelation des TIL-Phänotyps mit dem Patientenalter .....	25
4.3	Durchflusszytometrische Charakterisierung der PBL .....	25
4.3.1	Korrelation des PBL-Phänotyps mit dem Grading .....	26
4.3.2	Korrelation des PBL-Phänotyps mit dem TNM-Staging .....	26
4.3.3	Korrelation des PBL-Phänotyps mit dem Patientenalter .....	28
4.4	Vergleich des TIL- und PBL-Phänotyps .....	29
4.5	Anfärbung der Immunzellinfiltrate in Paraffinschnitten und Korrelation mit Grading, TNM-Staging und Patientenalter .....	30
4.6	Überlebensanalysen beim hellzelligem Nierenzellkarzinom .....	32
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>35</b>
5.1	Charakterisierung der Patienten mit hellzelligem Nierenzellkarzinom ....	35
5.1.1	Risikostratifizierung der erkrankten Patienten .....	35
5.2	TIL-Vergleich zwischen Onkozytom und hellzelligem Nierenzellkarzinom .....	36
5.3	Prognostische Relevanz von Lymphozyteninfiltraten im Nierenzellkarzinom .....	37
5.3.1	Prognostische Relevanz der B-, T- und NK-Zellen .....	38
5.3.2	Prognostische Relevanz der Aktivierungsmarker auf T-Zellen .....	41
5.3.3	Prognostische Relevanz der Immunsuppressions- und Immuneszenzmarker .....	43
5.3.4	Prognostische Relevanz der Makrophageninfiltration, der Blutgefäßdichte sowie des Patientenalters .....	45
5.4	Ausblick .....	46
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>47</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>49</b>
<b>8.</b>	<b>Tabellenanhang</b> .....	<b>58</b>
<b>9.</b>	<b>Thesen</b> .....	<b>77</b>
IV.	Curriculum vitae	
V.	Selbstständigkeitsklärung	
VI.	Erklärung über frühere Promotionsversuche	
VII.	Danksagung	

**I. Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1:	Visualisieren von TIL mittels durchflusszytometrischer Gatingstrategien .....	16
Abb. 2:	Vergleich der T-, B-, NK- Zellanteile zwischen Onkozytom und hellzelligem NZK .....	22
Abb. 3:	Unterschiede in der Lymphozyteninfiltration zwischen Onkozytom und hellzelligem NZK .....	22
Abb. 4:	Zusammenhänge zwischen TIL-Phänotyp und Grading beim hellzelligen NZK .....	23
Abb. 5:	Zusammenhänge zwischen TIL-Phänotyp und T-Stadien beim hellzelligen NZK .....	24
Abb. 6:	Zusammenhänge zwischen TIL-Phänotyp und Metastasierung beim hellzelligen NZK .....	25
Abb. 7:	Zusammenhänge zwischen PBL-Phänotyp und Grading beim hellzelligen NZK .....	26
Abb. 8:	Zusammenhänge zwischen PBL-Phänotyp und T-Stadien beim hellzelligen NZK (Absolutzahlen) .....	27
Abb. 9:	Zusammenhänge zwischen PBL-Phänotyp und T- Stadien sowie Metastasierung beim hellzelligen NZK (prozentuale Anteile) .....	28
Abb. 10:	Zusammenhänge zwischen PBL-Phänotyp und Patientenalter beim hellzelligen NZK (Absolutzahlen) .....	28
Abb. 11:	Zusammenhänge zwischen PBL-Phänotyp und Patientenalter beim hellzelligen NZK (prozentuale Anteile) .....	29
Abb. 12:	Beispiele für Unterschiede zwischen TIL- und PBL-Phänotyp beim hellzelligen NZK .....	29
Abb. 13:	Immunhistochemische CD3-Färbung im hellzelligen NZK .....	30
Abb. 14:	Immunhistochemische CD34-Färbung im hellzelligen NZK .....	30
Abb. 15:	Zusammenhänge zwischen Immunzellinfiltraten und Grading beim hellzelligen NZK (Immunhistochemie) .....	31
Abb. 16:	Zusammenhänge zwischen Immunzellinfiltraten und T-Stadien beim hellzelligen NZK (Immunhistochemie) .....	31
Abb. 17:	Zusammenhänge zwischen Immunzellinfiltraten und Metastasierung sowie Patientenalter beim hellzelligen NZK (Immunhistochemie) .....	32
Abb. 18:	Überlebenskurven .....	33

<b>II.</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	
Tabelle 1:	Verwendete mAk für die Durchflusszytometrie .....	12
Tabelle 2:	Verwendete, paraffingängige mAk für die Immunhistochemie .....	13
Tabelle 3:	TIL- Antikörperpanel .....	15
Tabelle 4:	Vorbehandlung der Paraffinschnitte für die paraffingängigen Antikörper .....	17
Tabelle 5:	Histologische Klassifikation der untersuchten Tumoren .....	20
Tabelle 6:	Geschlechtsverteilung der Patienten mit hellzelligem NZK .....	20
Tabelle 7:	Gradingstadien beim hellzelligen NZK .....	20
Tabelle 8:	T-Stadien beim hellzelligen NZK .....	20
Tabelle 9:	Vergleich der PBL-Absolutwerte mit altersentsprechenden Normwerten .....	26
Tabelle 10:	TNM-Klassifikation des Nierenzellkarzinoms (UICC 2002) .....	58
Tabelle 11:	Vergleich der Lymphozytencharakteristika verschiedener Tumorsubtypen der Niere .....	59
Tabelle 12:	Vergleich der Lymphozytencharakteristika zwischen Onkozytom und hellzelligem NZK .....	61
Tabelle 13:	Vergleich des TIL-Phänotyps in verschiedenen Gradingstadien beim hellzelligen NZK .....	62
Tabelle 14:	Vergleich des TIL-Phänotyps in verschiedenen T-Stadien beim hellzelligen NZK .....	63
Tabelle 15:	Vergleich des TIL-Phänotyps in verschiedenen M-Stadien beim hellzelligen NZK .....	64
Tabelle 16:	Korrelation des TIL-Phänotyps mit dem Patientenalter beim hellzelligen NZK .....	65
Tabelle 17:	Vergleich des PBL-Phänotyps in verschiedenen Gradingstadien beim hellzelligen NZK .....	66
Tabelle 18:	Vergleich des PBL-Phänotyps in verschiedenen T-Stadien beim hellzelligen NZK .....	67
Tabelle 19:	Vergleich des PBL-Phänotyps in verschiedenen M-Stadien beim hellzelligen NZK .....	68
Tabelle 20:	Korrelation des PBL-Phänotyps mit dem Patientenalter beim hellzelligen NZK .....	69
Tabelle 21:	TIL- und PBL-Phänotypvergleich beim hellzelligen NZK .....	70
Tabelle 22:	Histologische Klassifikation der zusätzlich mit Paraffinschnitten untersuchten Tumoren .....	71

Tabelle 23:	Korrelation der Immunzellinfiltrate in Paraffinschnitten mit dem Grading beim hellzelligen NZK .....	71
Tabelle 24:	Korrelation der Immunzellinfiltrate in Paraffinschnitten mit den T-Stadien beim hellzelligen NZK .....	72
Tabelle 25:	Korrelation der Immunzellinfiltrate in Paraffinschnitten mit den M-Stadien beim hellzelligen NZK .....	73
Tabelle 26:	Korrelation der Immunzellinfiltrate in Paraffinschnitten mit dem Patientenalter beim hellzelligen NZK .....	73
Tabelle 27:	Vergleich zwischen Onkozytom und hellzelligem NZK anhand der Paraffinschnitte .....	73
Tabelle 28:	Überlebensanalyse für TIL beim hellzelligen NZK .....	74
Tabelle 29:	Überlebensanalyse beim hellzelligen NZK in Paraffinschnitten ....	76



<b>III.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>
APC	<b>A</b> llophycocyanin
APN	<b>A</b> mino <b>p</b> eptidase <b>N</b>
CCR	<b>C-C</b> -Motiv-Chemokin- <b>R</b> ezeptor
CD	zelluläres Differenzierungsantigen ( <b>C</b> luster of <b>D</b> ifferentiation)
CTLA	<b>c</b> ytolytic <b>T</b> -lymphocyte-associated <b>a</b> ntigen
CXCR	<b>CXC</b> -Motiv-Chemokin- <b>R</b> ezeptor
et al.	und andere ( <b>e</b> t <b>a</b> lii)
Fas/FasL	<b>F</b> as/ <b>F</b> as <b>L</b> igand
FITC	<b>F</b> luorescein <b>i</b> sothiocyant
FL	<b>F</b> luoreszenz
FSC	Vorwärtsstreulicht ( <b>f</b> orward light <b>s</b> catter)
FU	<b>F</b> luorouracil
g	Erdbeschleunigung
HLA	<b>H</b> umanes <b>L</b> eukozyten <b>a</b> ntigen
hNZK	<b>h</b> ellzellige(s) <b>N</b> ierenzell <b>k</b> arzinom(e)
IFN	<b>I</b> nter <b>f</b> eron
Ig	<b>I</b> mmunglobulin
IL	<b>I</b> nterleukin
i. v.	<b>i</b> ntravenös
mAk	<b>m</b> onoklonaler <b>A</b> ntikörper
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <b>m</b> ajor <b>h</b> istocompatibility <b>c</b> omplex)
MIG	<b>m</b> onokine induced by IFN- <b>γ</b>
MIP	<b>m</b> onocyte inflammatory <b>p</b> rotein
MW	<b>M</b> ittelwert
n	Anzahl
NCAM	<b>n</b> eural <b>c</b> ell <b>a</b> dhesion <b>m</b> olecule (neurales Zelladhäsionsmolekül)
NK-Zellen	<b>N</b> atürliche <b>K</b> iller-Zellen
NKT-Zellen	<b>N</b> atürliche <b>K</b> iller- <b>T</b> -Zellen
n. s.	<b>n</b> icht <b>s</b> ignifikant
NZK	<b>N</b> ierenzell <b>k</b> arzinom(e)
OZT	<b>O</b> nkozytom(e)
p	Wahrscheinlichkeit ( <b>p</b> robability)
PBL	<b>P</b> eriphere <b>B</b> lutlymphozyten
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung ( <b>p</b> hosphate <b>b</b> uffered <b>s</b> aline)
PDGF	Blutplättchen-Wachstumsfaktor ( <b>p</b> lateled <b>d</b> erived <b>g</b> rowth <b>f</b> actors)
PE	<b>P</b> hycoerythrin

---

PerCP	<b>Peridiniumchlorophyll</b>
Q	<b>Quelle</b>
RR	<b>Relatives Risiko</b>
SEM	Standardfehler des Mittelwertes ( <b>Standard Error of the Mean</b> )
SSC	Seitwärtsstreulicht ( <b>side scatter</b> )
TIL	<b>Tumorinfiltrierende Lymphozyten</b>
TGF	<b>transforming growth factor</b>
TZR	<b>T-Zell-Rezeptor</b>
UICC	Internationale Vereinigung gegen Krebs ( <b>Union internationale contre le cancer</b> )
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor ( <b>vascular endothelial growth factor</b> )

## **1. Einleitung**

### **1.1 Das Nierenzellkarzinom – Epidemiologie, Pathogenese, Diagnostik, Therapie, Prognose**

Das Nierenzellkarzinom (NZK) ist mit 85 % die häufigste maligne Erkrankung der Niere (Husmann, 2010). Bei steigender Inzidenz in der Vergangenheit lag in Deutschland die geschätzte Neuerkrankungszahl im Jahr 2010 bei 17.400 (Husmann, 2010). Die Inzidenz betrug 2006 europaweit bei Männern 19,2/100.000 Einwohner und bei Frauen 9,9/100.000 Einwohner (Husmann, 2010). Laut Krebsatlas des Deutschen Krebsforschungszentrums war das NZK im Jahr 2008 bei Männern mit einem Anteil von 3,9 % die siebthäufigste Krebstodesursache, bei Frauen mit 2,5 % die Neunthäufigste (Becker et al., 2008). Der Altersgipfel des NZK liegt für Männer bei 65 Jahren, für Frauen bei 70 Jahren (Haferkamp et al., 2006).

Zu den Risikofaktoren für das Auftreten des NZK gehören Nikotin-, Analgetika- und Diuretikaabusus, Exposition gegenüber kanzerogenen Substanzen wie Cadmium und Trichlorethylen, Niereninsuffizienz, Adipositas und genetische Defekte wie die polyzystische Nierendegeneration und das von-Hippel-Lindau-Syndrom (Haferkamp et al., 2006). Beim hellzelligen NZK gilt als wichtigste chromosomale Aberration der Verlust des Tumorsuppressorgens von-Hippel-Lindau auf dem kurzen Arm des Chromosoms 3. Hingegen sind beim papillären NZK die bedeutendsten chromosomalen Aberrationen eine Trisomie der Chromosomen 7, 16, 17 sowie der Verlust des Y-Chromosoms beim Mann (Pomer et al., 1998).

Die Nierentumoren können histologisch in verschiedene Typen eingeteilt werden: in das hellzellige NZK mit einem Anteil von 70-80 % an allen renalen Tumoren, das papilläre NZK mit 10-20 % als zweithäufigste Tumorentität, das chromophobe NZK zu 5 %, das benigne Onkozytom mit einem fünfprozentigen Anteil sowie das Ductus-Bellini-Karzinom zu unter 1 % (Haferkamp et al., 2006).

Zur diagnostischen Abklärung werden heute obligat die Sonographie der Nieren mit Beurteilung anderer abdomineller Organe (wie z. B. der Leber), der Lymphknoten und der Blutgefäße, eine Urinzytologie sowie eine Computertomographie von Niere/Abdomen mit i.v.-Kontrastmittelgabe, fakultativ die Kavographie, die Magnetresonanzangiographie und -tomographie des Abdomens und die Ganzkörperszintigraphie durchgeführt (Kath, 2005). Bereits zum Zeitpunkt der Detektion des NZK weisen 25-30 % der Patienten Metastasen auf. Zu den häufigsten Lokalisationen hämatogener Metastasen des NZK zählen Lunge, Leber, Knochen, Gehirn und Nebenniere. Seltener treten Metastasen in der kontralateralen Niere, Pankreas, Harnleiter, Hoden, Schilddrüse und Herz auf (Kuroschi et al., 2007).

Die chirurgische Tumorentfernung stellt die wichtigste kurative Behandlungsmöglichkeit des lokalisierten NZK dar. Während früher fast ausschließlich bei Patienten mit Einzelniere, bilateralen Nierentumoren oder Schädigung der nicht tumorbefallenen Niere organerhaltene Nierentumorresektionen durchgeführt wurden, wird dieses Operationsverfahren heute bis zu einem Tumordurchmesser von 4 cm angewandt (Haferkamp et al., 2006). Sowohl die radikale als auch die partielle Tumornephrektomie können minimalinvasiv laparoskopisch erfolgen (Jurczok et al., 2006).

Die Therapie der Patienten mit metastasierten Tumoren gestaltet sich schwierig, da u.a. die Chemotherapie keinen ausreichenden Effekt bewirkt. Einige Ursachen liegen in der Überexpression des P-Membranglykoproteins 170 und der Gluthation-S-Transferase sowie in der Herunterregulierung der Topoisomerase 2 (Volm et al., 1993). Hohe Ansprechraten wurden für 5-Fluorouracil (5-FU) und Vinblastin angegeben (Amato, 2000). Viele Jahre lagen die Hoffnungen für Patienten mit lokal fortgeschrittenen oder metastasierten NZK in der Hormontherapie mit Medroxyprogesteronacetat und vor allem in der Immuntherapie mit IL-2, Interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) und 5-FU. Allerdings wurden in diversen Studien kein signifikanter Überlebensvorteil sowie massive Nebenwirkungen beschrieben (Pizzocaro et al., 1987; Atzpodien et al., 2005). Da beim hellzelligen NZK in über 80 % eine Deletion oder Mutation des von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressorgens besteht, die letztlich die Transkription wachstumsfördernder Gene induziert, sind Substanzen, wie die Multikinaseinhibitoren Sunitinib und Sorafenib, die Signalwege blockieren, in klinischer Anwendung (Furge et al., 2007). Ziel des Einsatzes von Multikinaseinhibitoren ist es, die Tyrosinkinaseaktivität der Wachstumsfaktoren „vascular endothelial growth factors“ (VEGF), „platelet derived growth factors“ (PDGF) und „transforming growth factor  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ )/epidermal growth factor receptor (EGFR) zu hemmen. Auf diese Weise wird die Aktivierung von Prozessen, die beispielsweise für die intratumorale Neoangiogenese und die Proliferation der Tumorzellen verantwortlich sind, verhindert (Kuczyk et al., 2007). Für die Entwicklung des hellzelligen NZK bedeutend kann zudem die reduzierte Expression des „phosphatase and tensin homolog“-Suppressorgens (PTEN-Suppressorgens) mit dem Schlüsselenzym „mammalian Target of Rapamycin“ (mTOR) sein. Die medikamentöse Blockade dieses Enzyms durch Temsirolimus und Everolimus stellt einen weiteren Therapieansatz dar (Schenck et al., 2010). Ebenso zeigte vor allem die Kombinationstherapie aus dem VEGF-Rezeptorblocker Bevacizumab und IFN- $\alpha$  eine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens. Sie wird deshalb in der Erstlinientherapie des metastasierten NZK neben Sunitinib und

Temsirolimus eingesetzt (Escudier et al., 2007). Sorafenib und Everolimus sind als Zweitlinientherapie in Deutschland seit 2009 zugelassen.

Das 5-Jahres-Überleben der Patienten mit NZK liegt stadienunabhängig bei 68,5 %. Stadienabhängig besteht für lokal begrenzte Karzinome (T1-T2, N0, M0) eine 5-Jahres-Überlebensrate von 71-97 %, für lokal fortgeschrittene (T3, N0-N2, M0) von 20-53 % und bei Fernmetastasen (alle T, alle N, M1) von unter 10 % (Autenrieth et al., 2010). In Tabelle 10 findet sich hierzu die TNM-Klassifikation von 2002, nach der die Tumoren in dieser Arbeit beurteilt wurden.

Um die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten mit NZK möglichst genau zu prognostizieren, eignen sich Faktoren wie anatomische (TNM-Klassifikation, Tumorgröße), histologische (Fuhrman-Grading, histologischer Tumorsubtyp), klinische und molekulare Merkmale (Volpe et al., 2010). Als klinisch relevante Prognoseparameter gelten der Allgemeinzustand des Patienten, die lokale Symptomatik, Kachexie und Anämie (Kim et al., 2003). Die Kombination mehrere dieser Prognosefaktoren kann die Vorhersagegenauigkeit verbessern (Volpe et al., 2010). Störkel und Motzer erarbeiteten bereits Prognosescores, deren Konzept in der Zusammenfassung mehrerer prognostisch relevanter Einzelparameter zu einem Summenscore besteht. Allerdings sind diese Einflussgrößen unspezifisch. Für das NZK stehen zurzeit keine spezifischen Prognosefaktoren zur Verfügung. Ein international anerkannter und einheitlich verwendeter Prognosescore liegt bisher nicht vor.

## **1.2 Immunsystem und Nierenzellkarzinom**

Analog zum Malignen Melanom stellt das NZK eine immunogene Tumorentität dar. Diese Annahme beruht auf der Infiltration des NZK durch T-Lymphozyten und NK-Zellen. Dem Immunsystem wird bei der Bekämpfung des NZK eine wesentliche Rolle zugesprochen (Belldegrun et al., 1988). Dabei sind die infiltrierten NK-Zellen und tumorspezifischen, zytotoxischen T-Zellen hauptverantwortlich für die Tumorerstörung. Beim NZK wurde eine relativ hohe Frequenz spontaner Remissionen beobachtet (Figlin et al., 1991). Das Immunsystem schützt zum einen vor Tumorentstehung und Metastasierung mit Hilfe seiner als Immunüberwachung oder „immune surveillance“ bezeichneten Fähigkeit, Tumorzellen aufzuspüren und zu vernichten. Zum anderen kann es die Tumorentwicklung durch die Beeinflussung der Tumormikroumgebung und das Ausbleiben einer gegen den Tumor gerichteten Immunantwort fördern.

Trotz einer starken Tumorentzündung durch Lymphozyten wachsen und/oder metastasieren die klinisch sichtbaren NZK. Meist besitzen die tumorinfiltrierenden

Lymphozyten (TIL) nur geringes lytisches Potential und eine eingeschränkte Proliferationskapazität (Alexander et al., 1993). Beim NZK konnten bereits viele Faktoren, die zu einem „immune escape“ führen, nachgewiesen werden (Frankenberger et al., 2007). Tumorzellen können eine fehlende oder herunterregulierte Expression der HLA-Klasse-I- und -II-Moleküle sowie eine defiziente Antigenprozessierung und -präsentation zeigen (Seliger et al., 2003). Durch eine aberrante Expression nicht-klassischer HLA-Antigene, wie z.B. HLA-G, können Tumorzellen mit inhibitorischen Rezeptoren auf NK-Zellen und zytotoxischen T-Lymphozyten interagieren und zur Blockierung ihrer zytotoxischen Aktivität führen (Cabestre et al., 1999). Renale Tumorzellen können ebenso das Immunsystem supprimierende Proteine, z.B. PD-L1 (programmed death ligand 1), synthetisieren oder Immunzellen anlocken, welche immunsuppressiv wirkende Zytokine, wie TGF- $\beta$  und IL-10, ausschütten. Über ein Vorhandensein von regulatorischen T-Zellen in Blut und Tumor wird bei Patienten mit NZK berichtet (Finke et al., 2008, Griffiths et al., 2007). Die Herunterregulation der CD3  $\zeta$ -Kette auf der Oberfläche der T-Effektorzellen bildet eine Ursache der Fehlfunktion der Lymphozyten in NZK (Frankenberger et al., 2007). Einen weiteren Grund für die Ineffizienz der antitumoralen Immunantwort kann die induzierte Apoptose und/oder Inhibierung der Effektorfunktion von aktivierten T-Zellen und NK-Zellen sein, wobei dies u.a. durch die Interaktion von Fas/FasL auf T-Zellen/Tumorzellen hervorgerufen wird (Whiteside und Rabinowich, 1998). Auch die Balance zwischen positiven und inhibitorischen kostimulatorischen Membranrezeptoren spielt sowohl bei der Induktion einer effektiven Immunantwort als auch bei der Aufrechterhaltung der T-Zell-Homöostase eine Rolle. Während beispielsweise CD28 auf der Oberfläche von T-Zellen Signale vermittelt, die die Tumorspezifische T-Zellantwort verbessern (Tumorangriff), fördert CTLA-4 die Entwicklung einer immunologischen Toleranz (Tumorwachstum) (Chambers et al., 1999). Da CTLA-4 mit dem CD28-Antigen um die Bindung an die B7-Moleküle auf antigenpräsentierenden Zellen konkurriert, begünstigt ein Überwiegen des inhibitorisch wirkenden CTLA-4 das Tumorwachstum.

Insgesamt ist das Zusammenspiel zwischen NZK und deren immunologischen Mikroumgebung komplex und schwer zu entschlüsseln. Jedoch ist das Verständnis dieser von grundlegender Bedeutung für die Entwicklung neuer prognostisch relevanter Marker sowie therapeutischer Strategien (Fridman et al., 2010).

### **1.3 Relevanz der durchflusszytometrischen und immunhistochemischen Färbungen von Nierentumorgewebe**

In dieser Arbeit erfolgte die Phänotypisierung der TIL in Nierentumoren sowohl mit Hilfe der Durchflusszytometrie als auch durch immunhistochemische Färbungen an Paraffinschnitten. Mittels Durchflusszytometrie können die Zellen mit 500 bis 2000 analysierten Zellen pro Sekunde gegenüber der Lichtmikroskopie schneller gemessen werden. Daher ermöglicht sie eine rasche Phänotypisierung der TIL. Zudem sind bei der Durchflusszytometrie gleichzeitig mehrere Fluoreszenzen messbar, die in mehr als 10000 Teilabstufungen quantifizierbar sind und mit deren Unterstützung die Lymphozytentypisierung durch mehrere gleichzeitig verwendete Antikörper erfolgen kann. Allerdings ist die Fluoreszenzverteilung auf einer Zelle nicht detektierbar. Des Weiteren kann mittels Durchflusszytometrie die Lokalisation der TIL in bestimmten Gewebsanteilen nicht genau bestimmt werden. Um die Absolutzahlen der Immunzellinfiltrate sowie deren regionale Verteilung und Zuordnung zu Strukturen im NZK aufzuzeigen, wurden parallel zu den durchflusszytometrischen Untersuchungen immunhistochemische Paraffinfärbungen durchgeführt. Allerdings konnten im Labor für Immunhistologie des Instituts für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Mehrfachfärbungen an Paraffinschnitten nicht angefertigt werden. Auch die Bandbreite der industriell hergestellten Antikörper gegen lymphozytäre Oberflächenmarker ist für durchflusszytometrische Messungen an nativen Zellen größer als für immunhistochemische Färbungen an fixierten und denaturierten Antigenen. Insgesamt ergänzen sich in dieser Arbeit die Durchflusszytometrie als zeiteffiziente Methode mit der Möglichkeit der Mehrfachfärbung sowie die immunhistochemischen Färbungen, durch die Absolutzahlen gemessen und die regionale Verteilung und Lokalisation der Immunzellen visualisiert werden können.

#### **1.3.1 Durchflusszytometrie als Methode zur Immunzellcharakterisierung**

Die Durchflusszytometrie ist eine automatisierte Streulicht- und Fluoreszenzmessung von Zellen/Partikeln in Suspension. Bei der Messung gelangen die Zellen einzeln in eine Messzelle, in der sie durch Laserlicht angeregt werden. Zum einen wird dabei das Streulicht, zum anderen das emittierte Fluoreszenzlicht der Antikörper-gekoppelten Fluochrome detektiert. Die Messdaten werden zur statistischen Auswertung im Computer gespeichert.

Die durchflusszytometrischen Ergebnisse der leukozytären Oberflächeneigenschaften in Nierentumorgewebe sowie Patientenblut wurden an einem 4-Farb-Durchflusszytometer gewonnen. Es wurden in vier verschiedenen Farben leuchtende, monoklonale Antikörper (mAk) genutzt, die mit zwei Lasern angeregt wurden. Die

beiden verwendeten Lichtquellen waren ein Argonlaser mit einer Wellenlänge von 488 nm und eine Helium-Neon-Laserdiode mit einer Anregungswellenlänge von 633 nm. Zu jeder Zelle erfolgte die Speicherung von 6 Parametern: Vorwärtsstreulicht-Eigenschaft (FSC), Seitwärtsstreulicht-Eigenschaft (SSC), Fluoreszenz 1 = Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Fluoreszenz 2 = R-Phycoerythrin (PE), Fluoreszenz 3 = Peridiniumchlorophyll-Protein (PerCP) und Fluoreszenz 4 = Allophycocyanin (APC). Dabei wurde FITC bei einer Wellenlänge von 535 nm, PE bei 585 nm, PerCP bei 675 nm und APC bei 650 nm gemessen (Tabelle 1 auf Seite 12).

## 1.4 Oberflächenmoleküle zur Charakterisierung von Immunzellen

### 1.4.1 T-, B-, NK- und NKT-Zellmarker

Das **CD3**-Antigen ist ein Komplex aus mindestens fünf Polypeptidketten auf allen reifen T-Lymphozyten, welcher mit dem T-Zell-Rezeptor (TZR) verbunden und in die Signaltransduktion der Antigenerkennung eingebunden ist (Murphy et al., 2009). CD3 wird zur T-Zellmarkierung verwendet. Das **CD4**-Antigen ist ein aus vier Ig-ähnlichen Domänen zusammengesetztes Transmembrannglykoprotein (<http://mpr.nci.nih.gov/prow/>) und wird auf T-Helferzellen exprimiert. Es verstärkt und selektiert für die Bindung an ein durch MHC-Klasse-II-Moleküle präsentiertes Antigen und spielt dadurch während der T-Zell-Aktivierung als akzessorisches Molekül des TZR eine entscheidende Rolle (Murphy et al., 2009). Die Tumordinfiltration durch CD4<sup>+</sup> Helferzellen kann die Aktivität CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch Zytokinsekretion steigern. T-Helferzellen sind aber auch als regulatorische Zellen in die Mechanismen der Immuntoleranz einbezogen (Kennedy et al., 2008). **CD8** wird als ein Heterodimer aus CD8 $\alpha$  und CD8 $\beta$  oder als ein CD8 $\alpha$  Homodimer exprimiert. Das u.a. für eine zytotoxisch wirkende T-Lymphozytensubpopulation charakteristische Zellmembranprotein CD8 verbindet sich mit MHC-Klasse-I-Molekülen und sensibilisiert auf diese Weise zytotoxische T-Lymphozyten für ein präsentiertes Antigen (Murphy et al., 2009).

Das **CD19**-Antigen wird auf allen humanen B-Lymphozyten exprimiert (Loken MR et al., 1987). Der zur Superfamilie der Ig gehörende Oberflächenmarker ist als Signaltransduktionsmolekül an der B-Zell-Entwicklung, -Aktivierung und -Differenzierung beteiligt (<http://mpr.nci.nih.gov/prow/>). Auch das **CD20**-Antigen ist in die B-Zell-Aktivierung und Regulation der B-Zell-Entwicklung involviert und fehlt nur auf Plasmazellen (Riley et al., 2000). Dabei stand in dieser Studie nur der CD20-Antikörper als paraffingängiger Antikörper zur Detektion der B-Zellen zur Verfügung.



Das **CD56/NCAM**-Antigen (neural cell adhesion molecule) ist ein membranständiges Glykoprotein, das zur Ig-Superfamilie gehört. Es wird auf den meisten zirkulierenden NK-Zellen (Lanier et al., 1986) exprimiert, die außerdem kein CD3 tragen.

Humane NKT-Zellen stehen hinsichtlich ihrer phänotypischen Erscheinung zwischen klassischen T- und NK-Zellen (Ohteki et al., 1992, Watanabe et al., 1995). Sie exprimieren einige charakteristische Oberflächenmoleküle der NK-Zellen (CD161, CD122) sowie den CD3/TZR-Komplex. Die NKT-Zellen verwenden in der  $\alpha$ -Kette des TZR unter anderem **V $\alpha$ 24**. NKT-Zellen sind zytotoxisch aktiv und ihre Beteiligung bei der Tumorabwehr („tumor surveillance“) ist in unterschiedlichsten Modellsystemen und Arbeiten vielfach belegt (Morita et al., 1995, Nakamura et al., 1997, Kitamura et al., 1999, Smyth et al., 2000).

#### 1.4.2 Funktions-assoziierte Marker

Bei den eingesetzten Antikörpern wurde zum einen Bezug auf die bereits in der Vergangenheit bei Analysen untersuchten Aktivierungs-assoziierten Oberflächenmoleküle, wie CD13 und CD26 (Riemann et al., 1997) genommen. Neben Funktions-assoziierten Molekülen (z.B. CXCR3 als T<sub>H</sub>1-assoziiierter Chemokinrezeptor) wurden Marker wie CD57 und CTLA-4 gewählt, die mit Immunseneszenz und Unterdrückung einer Immunantwort assoziiert sind.

Das als Aminopeptidase N (APN) bezeichnete **CD13**-Membranantigen ist ein ubiquitär vorkommendes Enzym, das auf Leukozyten als myeloischer Marker gilt, weil im Blut Monozyten und Granulozyten, jedoch nicht Lymphozyten, CD13 tragen. Allerdings wird CD13 auf T-Lymphozyten aus Tumoren, wie Lungen- und Nierenzellkarzinomen, exprimiert (Riemann et al., 1995). Seine Funktion im Tumorgeschehen ist weitgehend ungeklärt. Durch die Spaltung aktiver Peptide wie Neuropeptide, Kinine und Chemokine könnten CD13<sup>+</sup> TIL an deren Signalübertragung und Regelmechanismen beteiligt sein (Riemann et al., 1999).

Das Homodimer Dipeptidylpeptidase IV/**CD26** ist ebenfalls eine ubiquitär vorkommende Aminopeptidase und gilt auf T-Zellen als Aktivierungsmarker. Das CD26-Antigen spielt bei der CD3/TZR vermittelten T-Zell-Proliferation und bei Adhäsionsvorgängen eine entscheidende Rolle (von Bonin et al., 1998). CD26 ist nicht-kovalent mit dem Enzym Adenosindeaminase (ADA) assoziiert. Dieses reduziert die lokale Konzentration des Adenosins, einem Nukleosid, welches die T-Zell-Proliferation inhibiert (Ginés et al., 2002). Weiterhin wird diskutiert, dass diese Peptidase an der Veränderung der T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Balance zugunsten der T<sub>H</sub>1-Antwort mitwirkt (Annunziato et al., 1998).

Sowohl das **CD28**-Antigen als auch das **CTLA-4** (CD152)-Antigen besitzen als Liganden B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86), die von vielen Antigen-präsentierenden-Zellen exprimiert werden. Die Bindungsfähigkeit von CD28 an B7.1 und B7.2 ist zwar geringer als die von CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4), allerdings stellt das CD28-Antigen den einzigen konstitutiv exprimierten B7-Rezeptor dar (June et al., 1990). Die Bindung ans CD28-Antigen dient als kostimulatorisches Signal zur Produktion verschiedener Interleukine, wie z.B. IL-2 (Mondino et al., 1994). CTLA-4 gilt als Konkurrent des CD28-Antigens um die Bindung an die B7-Moleküle und übermittelt direkt inhibitorische Signale in die Zellen, die die CD28-induzierte T-Zell-Aktivierung herunterregulieren und auch an der Induktion der T-Zell-Apoptose beteiligt sind (Krummel et al., 1995). CTLA-4 ist ein bedeutender, inhibitorisch wirkender Regulator der T-Zell-vermittelten, antitumoralen Immunantwort (Tarhini und Iqbal, 2010).

Der Membranrezeptor **CD69** (AIM, activation inducer molecule) ist einer der frühesten Aktivierungsmarker auf der leukozytären Zelloberfläche. Es ist als kostimulatorisches Molekül an der T-Zell-Aktivierung und -Proliferation beteiligt (Ziegler et al., 1994). Jüngere Arbeiten diskutieren, dass CD69 im Tumor ein Marker suppressorischer T-Zellen sein könnte (Han et al., 2009).

Das **CD107**-Oberflächenantigen wird auch als „lysosomal associated membrane protein“ (LAMP) bezeichnet und gilt als Marker der Degranulation, da es sich in der Membran zytotoxischer Granula befindet und nach Degranulation auf der Zelloberfläche aktivierter T-Lymphozyten exprimiert wird (Betts et al., 2003).

**NKp44** ist ein Rezeptor mit Expression auf aktivierten NK-Zellen, der zur Ig-Superfamilie gehört (Vitale et al., 1998, Cantoni et al., 1999). NKp44 ist an zytotoxischen Reaktionen gegen verschiedene Tumorzellen, u.a. bei Neuroblastomen und Chorionkarzinomen, beteiligt (Vitale et al., 1998, Cantoni et al., 1999, Sivori et al., 2000).

**HLA-DR** ist ein MHC-Klasse-II-Molekül und bedeutend bei der Antigenerkennung durch T-Helferzellen (Murphy et al., 2009). HLA-DR gilt als Marker für T-Zell-Aktivierung. In Stimulationstests wurde beim Nachweis einer starken HLA-DR-Expression eine gesteigerte Immunaktivität im Tumormikromilieu festgestellt (Van den Hove et al., 1997).

### 1.4.3 Chemokinrezeptoren

**CXCR3** ist ein Chemokinrezeptor u.a. auf aktivierten T-Zellen und NK-Zellen. Er besteht wie alle Chemokinrezeptoren aus sieben Transmembrandomänen und ist intrazellulär an G-Proteine gekoppelt. CXCR3 stellt den Rezeptor für die angiostatischen Chemokinliganden IP-10 (interferon-inducible protein 10), MIG

(monokine induced by IFN- $\gamma$ ) und ITAC (interferon-inductible T-cell alpha chemoattractant) dar. CXCR3 stimuliert zudem die T<sub>H</sub>1-Antwort, die durch Produktion der Zytokine IL-2, IL-12, Lymphotoxin und IFN- $\gamma$  die zelluläre Immunität verbessert (Kim et al., 1999).

Der Chemokinrezeptor **CCR5** gilt als Rezeptor für die Chemokine RANTES (regulated upon activation normal t cell expressed and secreted) und MIP-1 $\alpha$  und - $\beta$  (monocyte inflammatory protein-1 $\alpha$  und - $\beta$ ). Er reguliert wie alle Chemokinrezeptoren die Wanderungsmechanismen der Lymphozyten während der Entzündungsreaktion. Die CCR5-Expression passt sich dem funktionellen Zustand der Lymphozyten an und wird als Ausdruck für Reife, Differenzierung und Aktivität angesehen (Sallusto et al., 1998). CCR5 hat Bedeutung bei der Stimulation einer T-Zell-Antwort vom T<sub>H</sub>1-Typ, die für eine antitumorale Antwort essentiell ist (McNicholl et al., 1997). Dabei wird die Sekretion von IFN- $\gamma$  aus NK- und T-Zellen induziert, aktivierte NK-Zellen zum Wachstum angeregt sowie deren zytotoxische Wirkung gesteigert und zytotoxische T-Zellen in ihrer Entwicklung unterstützt (Trinchieri, 1995).

#### 1.4.4 Immunseneszenzmarker

Immunseneszenz bedeutet die Alterung einer Zelle nach vorangegangener Proliferation. Immunseneszenz kann als Resultat einer kontinuierlichen Auseinandersetzung mit einer Vielfalt von Antigenen gesehen werden (Franceschi et al., 2000).

Das **CD7**-Molekül wird früh während der T-Zell-Entwicklung exprimiert und bleibt bis zum reifen T-Lymphozyten-Stadium erhalten. 1997 formulierten Reinhold und Abken, dass eine Herunterregulation der CD7-Expression auf T-Helferzellen ein stabiles, separates T-Zell-Differenzierungsstadium darstelle, welches erst spät während der Immunantwort auftritt. Eine Expansion CD7-negativer T-Zellen wird bei Erkrankungen manifest, die mit einer chronischen, wiederholten T-Zell-Stimulation einhergehen (Reinhold und Abken, 1997).

**CD57** auf T-Lymphozyten ist ebenfalls ein Seneszenzmarker, wobei CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup> T-Lymphozyten u.a. ein Resultat der persistierenden Stimulation mit tumorassoziierten Antigenen darstellen (Sze et al., 2001). In humanen, epithelialen Tumoren wurde beobachtet, dass sich in metastasenfreen regionalen Lymphknoten die Anteile fast aller Immunzellen, außer der CD57<sup>+</sup> T-Lymphozyten, reduzierten (Di Girolamo et al., 2008). In den letzten Jahren zeigten viele Arbeiten die Fähigkeit dieses Markers, die funktionelle Immundefizienz von Krebspatienten zu messen (Focosi et al., 2010).

#### 1.4.5 Marker myeloischer Zellen und Blutgefäße

Das **CD15**-Antigen wird auf myeloischen Zellen, hauptsächlich Granulozyten, nicht aber auf Lymphozyten exprimiert. **CD68** ist ein transmembranäres Glykoprotein, welches auf Monozyten und humanen Gewebsmakrophagen exprimiert wird (Holness et al., 1993).

Anti-**CD34**-Antikörper werden zur Detektion und Quantifizierung von Blutgefäßen jeder Größe verwendet. Allerdings wird auch ein Teil der Lymphgefäße miterfasst. Dennoch wird dem Nachweis von Gefäßen mit CD34 eine hohe Sensitivität und Spezifität zugesprochen (Vermeulen et al., 1996).

## 2. Zielstellung

Bislang wurden nur in wenigen Studien mit geringen Fallzahlen die Eigenschaften der TIL beim NZK untersucht. Deshalb war die Phänotypisierung der Lymphozyten im Tumor mittels durchflusszytometrischen Messungen und immunhistochemischen Färbungen ein Ziel dieser Arbeit. Es sollten Informationen zur Zusammensetzung der TIL beim NZK gesammelt werden. Einen weiteren Schwerpunkt stellte die Identifikation biologischer Marker dar, die eine bessere Prognosebeurteilung für Patienten mit hellzelligem NZK ermöglichen sollte. Aus diesem Grund wurden die Expressionsmuster verschiedener Markermoleküle auf TIL mit prognostischen Parametern wie Grading, TNM-Stadium, Alter sowie den Überlebensdaten der Patienten korreliert. Die Gegenüberstellung phänotypischer, lymphozytärer Merkmale bei verschiedenen Tumorentitäten der Niere diente dazu, die Besonderheiten des hellzelligen NZK vergleichend beispielsweise zu einem gutartigen Tumor, wie dem Onkozytom, herauszuarbeiten.

Um zu prüfen, inwieweit lymphozytäre Eigenschaften im Blut zur Prognosebeurteilung dienen können, sollte zudem nach Zusammenhängen zwischen den durchflusszytometrisch gewonnenen, prozentualen Anteilen sowie Absolutwerten der untersuchten Marker auf PBL und den beschriebenen Prognosefaktoren gesucht werden.

Die mikroskopische Analyse der Immunzellinfiltration in Paraffinschnitten sollte die Absolutwerte sowie die intra- und peritumorale Verteilung der Immunzellen in ausgewählten Tumorarealen verdeutlichen.

Da die steigende Inzidenz des NZK in den vergangenen Jahren zur verbesserten Beurteilung der individuellen Überlebenswahrscheinlichkeit neuer Prognosefaktoren bzw. einer Kombination aus prognostisch relevanten Parametern bedarf, sollten mit Hilfe der Überlebensanalyse prognostisch relevante Marker identifiziert werden. Diese könnten zukünftig als Komponenten anerkannter Prognosescores Verwendung finden. Die gewonnenen Ergebnisse sollten die Basis für weitere Studien darstellen.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Monoklonale Antikörper für durchflusszytometrische Analysen und immunhistochemische Färbungen

Zur Differenzierung der Immunzellen mittels Durchflusszytometrie wurden die in Tabelle 1 aufgeführten, monoklonalen Antikörper verwendet. Tabelle 2 fasst die in den immunhistochemischen Färbungen von Paraffinschnitten verwendeten Antikörper zusammen.

Tabelle 1: Verwendete mAk für die Durchflusszytometrie

Oberflächenmolekül	Farbe	Funktion	Ak-Isotyp	Klon	Quelle
CD3	FITC	assoziiert mit TZR, Signalübertragung	IgG1	UCHT1	A
CD3	APC		IgG1	UCHT1	A
CD3	PerCP		IgG1	SK7	B
CD4	PE	Korezeptor für MHC-Klasse-II-Moleküle, charakterisiert Helferzellen	IgG1	13B8.2	A
CD7	FITC	Fehlen von CD7 markiert immunseneszente T-Zelle	IgG2a	8H8.1	A
CD8	FITC	Korezeptor für MHC-Klasse-I-Moleküle, charakterisiert zytotoxische T-Zellen	IgG1	SK1	C
CD8	APC		IgG1	RPA-T8	B
CD13	PE	Aminopeptidase N	IgG	L138	B
CD19	PE	B-Zellmarker	IgG1	HD37	D
CD26	FITC	Dipeptidylpeptidase IV	IgG1	BA5	D
CD28	PE	Ligand für B7-Familie auf T-Zellen	IgG1	CD28.2	A
CD45	FITC	Panleukozytenmarker	IgG1	ALB12	A
CD45	PerCP		IgG1	2D1	B
CD56	FITC	Adhäsionsmolekül, NK-Zellmarker	IgG2b	NCAM16.2	B
CD57	FITC	Immunseneszenzmarker	IgG1	NC1	A
CD69	PE	frühes Aktivierungsantigen	IgG1	L78	B
CD107	FITC	Vesikel-assoziiert, wird nach Aktivierung an die Zelloberfläche verlagert	IgG1	H4A3	B
CCR5	PE	Chemokin-Rezeptor	IgG2a	2D7/CCR-5	B
CTLA-4	APC	Konkurrent von CD28 mit inhibitorischer Funktion	IgG2	BNI3	B
CXCR3	FITC	Chemokin-Rezeptor	IgG1	49.801	E
HLA-DR	PE	MHC-Klasse-II-Antigen	IgG2a	L243	B
NKp44	PE	Marker aktivierter NK-Zellen	IgG1	Z231	C
TZR Vα24	FITC	Marker für NKT-Zellen	IgG1	C15	C

A = Miltenyi Biotec (Berg. Gladbach), B = BD Biosciences (Heidelberg), C = Beckman Coulter (Krefeld), D = Dako Cytomation (Hamburg), E = R&D System (Wiesbaden)

Tabelle 2: Verwendete, paraffingängige mAk für die Immunhistochemie

Oberflächenmolekül	Funktion	Ak-Isotyp	Klon	Quelle
CD3	assoziiert mit TZR, Signalübertragung	IgG1	PS1	F
CD4	MHC-Klasse-II-Korezeptor	IgG1	4B12	G
CD8	MHC-Klasse-I-Korezeptor	IgG1	C8/144B	D
CD15	Marker myeloischer Zellen	IgM	BRA4F1	I
CD20	Kalziumkanal auf allen B-Zellen	IgG2a	L26	D
CD34	Gefäßmarker	IgG1	QBEnd/10	G
CD68	Marker für Makrophagen	IgG3	PG-M1	D

F = Novocastra Laboratories Ltd. (Newcastle Upon Tyne, UK), G = Lab Vision (Fremont, USA), H = Invitrogen (Darmstadt), I = BioGenex (San Ramon, USA)

### 3.2 Chemikalien

Azid	Quelle (Q): Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Chromogene Substrat-Pack für HRP (Horseradish peroxidase)	Q: Lab Vision (Fremont, USA)
Paraformaldehyd zur Synthese (CH <sub>2</sub> O) <sub>n</sub>	Q: MERCK- Schuchardt (Hohenbrunn)
Pronase E	Q: VWR (Darmstadt)
Streptavidin	Q: DCS/BioGenex (Hamburg)
Vitalitätsmarker FL3	Q: Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
ZytoChem Plus HRP-Kit	Q: Zytomed Systems (Berlin)

### 3.3 Puffer und Lösungen

Erythrozytenlyse	Q: BD Biosciences (Heidelberg)
Gelafundin 4 %, Wirkstoff: Gelatinepolysuccinat	Q: B. Braun Melsungen AG (Melsungen)
Natriumcitrat pH 6	
Natriumcitrat pH 9	
Paraformaldehyd 2 % in PBS, pH 7,2	
PBS, pH 7,2	
PBS 20 % Gelafundin + 0,1 % Azid	Q: B. Braun Melsungen AG (Melsungen)

### 3.4 Verbrauchsmaterialien

Einmalfilter 50 µm, 100 µm Durchmesser	Q: Partec CellTrics (Münster)
FACS-Röhrchen, 5 ml Polystyrene	Q: BD Biosciences (Heidelberg)
Pipettenspitzen 1-1000 µl	Q: Biozym (Hess. Oldendorf)
Pipettenspitzen original epT.I.P.S. Standard/Bulk 0,5-200 µl	Q: Eppendorf (Hamburg)
Probenröhrchen, 15 ml, 50 ml	Q: Greiner bio-one, cellstar (Frickenhausen)

### 3.5 Geräte

Durchflusszytometer Calibur	Q: BD Biosciences (Heidelberg)
Mikroskop Olympus CH-2	Q: Olympus (Hamburg)
Multipette plus 0,5-50 ml, 50 µl-5ml	Q: Eppendorf (Hamburg)

Pipettierhilfe, Akku-betrieben	Q: Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
Power Macintosh G 3	Q: Apple (Cupertino, CA, USA)
Forschungspipetten 0,5-10 µl, 5 µl, 10 µl, 10-100 µl, 50 µl, 500 µl	Q: Eppendorf (Hamburg)
Vortexer Julabo Paramix 3	Q: Julabo Labortechnik (Seelbach)
Vortexer Minishaker MS 2	Q: Ika Works, Inc. (Wilmington, NC, USA)
Zentrifuge Rotina 38, Universal 320	Q: Andreas Hettich Zentrifugen (Tuttlingen)
Zentrifuge Sorvall RT 6000 D	Q: DuPont (Bad Homburg)

### 3.6 Datenverarbeitungsprogramme

BD CellQuest Pro, Version 4.0.2	Q: BD Biosciences (Mountain View, CA, USA)
SigmaPlot 2002 for Windows Version 8.0	Q: SPSS Inc. (Chicago, Illinois, USA)
SPSS 19.0	Q: SPSS Inc. (Chicago, Illinois, USA)

### 3.7 Tumormaterial

Im Zeitraum von November 2005 bis Juli 2008 wurden am Institut für Medizinische Immunologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg bei 119 anonymisierten Patienten mit einer Tumorerkrankung der Niere Lymphozyten aus frischem Tumorgewebe durchflusszytometrisch differenziert. Mit Hilfe von Frau Dr. Fischer, Frau Schade (beide aus der Klinik für Urologie) und Herrn Dr. Schmidt (Tumorzentrum) wurden klinische Daten und Nebendiagnosen der Patienten erfasst.

Nach der Operation der Patienten in der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Halle wurde das Tumorgewebe im Schnellschnittlabor des Instituts für Pathologie untersucht. Die Mitarbeiter des Instituts für Pathologie klassifizierten die histologischen Nierentumortypen, TNM-Stadien, Grading sowie Lymphgefäßinfiltration (L-Stadium), Veneninfiltration (V-Stadium) und Resektionsgrad (R-Stadium).

### 3.8 Gewinnung und Präparation der TIL und PBL

Das Institut für Medizinische Immunologie erhielt vom Schnellschnittlabor ein etwa 0,5-1 cm<sup>3</sup> großes Tumorstück in mit Antibiotika versetztem, 4°C kaltem Transportmedium und zusätzlich 2 ml präoperativ abgenommenes, bei Zimmertemperatur aufbewahrtes Heparinblut der Patienten.

Das Tumorgewebe wurde für die TIL-Präparation verwendet. Dabei wurde dem Tumorgewebe keine Collagenase zugeführt, um eine Reduktion der Oberflächenmoleküle zu verhindern. Der Tumor wurde von seiner Schwarte bzw.



Fettkapsel freigelegt, mit einer Schere zerkleinert und mit Kulturmedium durch ein steriles Metallsieb (0,5 mm Porenweite) gerührt.

Das gewonnene Material wurde für 10 Minuten (min) und bei 400 g (Erdbeschleunigung) zentrifugiert. Danach wurde das Zellpellet durch einen Filter mit 100 µm Maschengröße von anderen Zellaggregaten getrennt. Die Zellzahl der Suspension wurde auf maximal  $10^7$  Zellen/ml eingestellt. Dann wurden 15 µl Antikörpergemisch (siehe Tabelle 3) und 100 µl Zellgemisch in die vorbereiteten Röhrchen gegeben (Ausnahme Röhrchen 10). Die antikörperversetzte Zellsuspension wurde gemischt und inkubiert 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur. Für Ansatz 10 wurde 1 µl des Vitalitätsmarkers getrennt von den Antikörpern zunächst 5 min mit 100 µl Nierentumormaterial unter einen Leuchtschirm gestellt. Anschließend wurden 5 µl des Antikörpergemisches aus CD45-FITC und CD3-APC zugegeben, gemischt und für 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach den 15 min Inkubation wurden in jedes Röhrchen 2 ml Lyse gegeben, um die Erythrozyten zu lysieren. Dieses Gemisch wurde erneut gevortext und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Hiernach wurde die Suspension für 5 min mit 360 g zentrifugiert, der Überstand abgegossen und 2 ml PBS Gelafundin hinzugegeben. Dieser Arbeitsschritt, bestehend aus Zentrifugieren, Abgießen und Zugabe von 2 ml PBS Gelafundin, wiederholte sich. Abschließend wurde das Zellgemisch erneut 5 min zentrifugiert, der Überstand abgegossen und 100 µl PBS dazugegeben. Die gefärbten Zellen befanden sich bis zur Messung am Durchflusszytometer im Kühlschrank.

Zur Analyse der peripheren Blutlymphozyten aus Heparinblut wurden zunächst zum Antikörpergemisch (Tabelle 3) 100 µl Patientenblut gegeben. Anschließend wurden die bei der TIL-Präparation bereits beschriebenen Arbeitsschritte durchgeführt.

Tabelle 3: TIL-Antikörperpanel:

	Gemisch aus							
	FITC	µl	PE	µl	PerCP	µl	APC	µl
Röhrchen 1	Iso	5	Iso	5	CD45	2,5	CD3	2,5
Röhrchen 2	CD26	5	CD13	5	CD45	2,5	CD3	2,5
Röhrchen 3	CD57	5	HLA-DR	5	CD45	2,5	CD3	2,5
Röhrchen 4	Va24	5	CD4	5	CD45	2,5	CD3	2,5
Röhrchen 5	CXCR3	5	CCR5	5	CD45	2,5	CD3	2,5
Röhrchen 6	CD56	5	NKp44	5	CD45	2,5	CD3	2,5
Röhrchen 7	CD8	5	CD28	5	CD45	2,5	CD3	2,5
Röhrchen 8	CD3	4,3	CD19	4,3	CD45	2,1	CTLA-4	4,3
Röhrchen 9	CD107	5	CD69	5	CD45	2,5	CD3	2,5
Röhrchen 10	CD45	2,5	-		Vitalitäts-Faktor		CD3	2,5
Röhrchen 11	CD7	3,75	CD4	3,75	CD3	3,75	CD8	3,75

Danach erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der vorbereiteten Proben in einer Geräteeinstellung für 4-Farbmessung. Gemessen wurden die Parameter FSC, SSC und die Fluoreszenzen FITC, PE, PerCP, APC. Das Lymphozytengate wurde im Dotplot CD45 (Panleukozytenmarker) versus SSC gesetzt (Abb. 1A). Meist erfolgte danach ein zusätzliches Gating auf CD3<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 1B). Ausnahme waren Röhrchen 6 und 8, in denen NK-Zellen bzw. B-Zellen untersucht wurden. Die meisten Marker wurden als prozentuale Anteile angegeben, wobei die Grenzen mit Hilfe der Isotypkontrolle gesetzt wurden. Ein Beispiel zeigt Abb. 1C. Im Fall von CXCR3 und CCR5 mit kontinuierlichen Intensitätsübergängen der Fluoreszenzen und annähernder Normalverteilung wurde neben der Prozentwertangabe auch der geometrische Mittelwert (Geo-Mean-Wert) des Fluoreszenzkanals berücksichtigt (Abb. 1D).

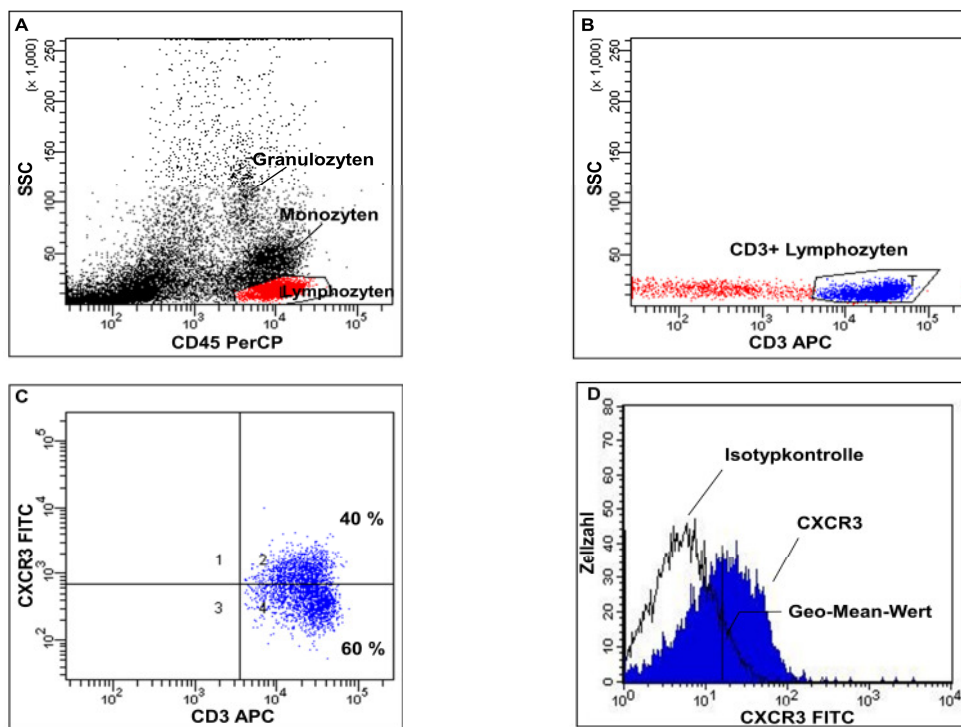


Abb. 1: Visualisieren von TIL mittels durchflusszytometrischen Gatingstrategien: Die Gruppe der Lymphozyten (rot) wird durch die CD45-Expression sowie die Seitwärtsstreulichteigenschaften (SSC) definiert (A). In B sind nur die Lymphozyten abgebildet, von denen die CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten (blau) gated werden. Nur die CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten werden zur Darstellung der CXCR3<sup>+</sup> T-Lymphozyten (rechter oberer Quadrant) verwendet (C). Im Histogramm (D) kann die Intensität der CXCR3-Fluoreszenz (blau) anhand des Geo-Mean-Wertes bestimmt werden, wobei die Isotyp-Kontrolle (weiß) als Vergleich dient.

### 3.9 Anfertigung ultradünner Paraffingewebeschnitte

Für alle immunhistochemischen Verfahren wurden von den formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebelöcken am Mikrotom 2 µm dünne Schnitte angefertigt, auf zuvor mit 0,1-prozentiger Poly-L-Lysin-Lösung beschichteten Objektträgern aufgebracht und bei 60°C über Nacht im Brutschrank getrocknet. Diese Arbeitsschritte wurden durch die Mitarbeiter des Instituts für Pathologie, Labor für Immunhistologie und Elektronenmikroskopie durchgeführt.

#### 3.9.1 Immunhistochemische Färbungen an Paraffinschnitten

Nach der Anfertigung der Paraffinschnitte wurden diese mit Xylol entparaffiniert (mindestens 2 x 5 min) und über eine absteigende Alkoholreihe bis zum Aqua dest. gebracht. Entsprechend der Tabelle 4 wurden die Paraffinschnitte vorbehandelt.

Danach wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser auf Objekthaltern aufgezogen und in einem Objekthalteständer befestigt. Das luftblasenfreie Aufziehen der Objektträger auf die Objekthalter wurde kontrolliert. Nach der erfolgreichen Kontrolle wurden drei Tropfen eines Blockers auf alle Schnitte gebracht und für 5 min inkubiert. Anschließend wurden 100 µl des jeweiligen Antikörpers auf die Schnitte pipettiert und für 30 min im Wärmeschrank aufbewahrt. Im Anschluss daran kühlten die Paraffinschnitte für 5 min ab. Dann wurden 2 ml PBS dazu gegeben. Nach 5 Minuten wurden drei Tropfen Biotinyl (Antikörper und Biotin) auf alle Schnitte getropft. Diese inkubierten für 15 min. Anschließend erfolgten die erneute Zugabe von 2 ml PBS und eine Wartezeit von 5 min. Nun wurden drei Tropfen Streptavidin zur 15-minütigen Inkubation sowie 2 ml PBS zugegeben, woran sich eine 5-minütige Inkubationszeit anschloss. Dann wurden pro Schnitt 1 ml AEC-Substrat (3-Amino-9-Ethylcarbazole-Substrat) dazu getropft und für 10 min inkubiert. Zum Schluss folgte eine Hämalaunfärbung. Zur mikroskopischen Untersuchung und Konservierung der gefärbten Schnitte wurden jeweils ein Tropfen eines Einschlussmediums und ein Deckglas auf die Objektträger aufgebracht.

Tabelle 4: Vorbehandlung der Paraffinschnitte für die paraffingängigen Antikörper

Oberflächenmolekül	Vorbehandlung	Verdünnung des Primärantikörpers
CD3	-	1:100
CD4	C	1:10
CD8	C	1:50
CD15	B	Gebrauchsfertig
CD20	A (Wasserbad)	1:100
CD34	-	1:500
CD68	D	1:100

Vorbehandlung:

A: 40 min in Natriumcitrat pH 6 (bei 94 °C), danach 20 min Abkühlen im Kochpuffer

B: 30 min in Natriumcitrat pH 6, welches zuvor für 20 min im Dampfgerar vorgewärmt wurde, danach 20 min Abkühlen im Kochpuffer

C: 30 min in Natriumcitrat pH 9, welches zuvor für 20 min im Dampfgerar vorgewärmt wurde, danach 20 min Abkühlen im Kochpuffer

D: 10 min 0,05 %-ige Pronase E in Tris-HCl + CaCl<sub>2</sub> bei 37° C

### **3.10 Statistische Analysen**

Die statistische Auswertung der ermittelten Ergebnisse erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS 19.0 für Windows. Dabei wurde für die dargestellten Resultate ein Signifikanzniveau von 5 % festgelegt.

#### **3.10.1 Mittelwertvergleiche**

Mit Hilfe der Mittelwertvergleiche wurden die Zusammenhänge zwischen den mittleren prozentualen Anteilen verschiedener Oberflächenmoleküle als abhängige Variablen und den Grading-, TNM-Staging sowie Patientenalter als Unabhängige berechnet. Zusätzlich wurde der Einfluss dieser unabhängigen Variablen als Kovariaten bei den entsprechenden Untersuchungen berücksichtigt. Die signifikanten Zusammenhänge wurden Bonferroni korrigiert angegeben. Dabei waren die prozentualen Anteile der Oberflächenmoleküle als normalverteilt anzusehen.

Zur grafischen Darstellung der Zusammenhänge zwischen den Expressionsmustern verschiedener Oberflächenmoleküle und Tumorgrading und -staging sowie Alter der Patienten wurden Fehlerbalken gewählt. Hierbei wurde der Mittelwert (MW) ± Standardfehler (SEM) abgebildet (Hatzinger und Nagel, 2009).

Für den Vergleich der Oberflächenexpression verschiedener Moleküle zwischen TIL und PBL wurde der t-Test für gepaarte Stichproben eingesetzt. Die grafische Darstellung der gewonnenen Unterschiede zwischen TIL und PBL erfolgte mit dem Programm Sigma Plot 8.0.

#### **3.10.2 Überlebensstatistik**

Um die Zusammenhänge der Expressionsmuster verschiedener lymphozytärer Oberflächenmoleküle mit dem Gesamtüberleben der Patienten zu analysieren, wurde die Methode nach Kaplan-Meier verwendet. Im Allgemeinen bestimmt der Kaplan-Meier-Schätzer (Produkt-Limit-Schätzer) die kumulative Wahrscheinlichkeit, dass innerhalb eines Zeitintervalls ein bestimmtes Ereignis (z.B. Tod) nicht eintritt (Ziegler et al., 2007). In dieser Studie ermittelte die Kaplan-Meier-Methode die kumulative

Wahrscheinlichkeit, dass ein Patient des Kollektivs innerhalb der festgelegten Nachbeobachtungszeit bis zum 31.12.2010 bis zum jeweiligen Zeitpunkt nicht verstorben war. Die Zeit von der Nierenentfernung durch die Operation bis zum Tod oder bis zum Ende der Nachbeobachtung ergab die Überlebenszeit des Patienten. Dabei handelte es sich um (rechts-) zensierte Daten, da am Ende der Nachbeobachtung nicht die Gesamtheit der Patienten verstorben war. Zur Untersuchung des Einflusses der verschiedenen Oberflächenmoleküle auf die Überlebenszeit wurden entsprechend ihrer prozentualen Expressionsanteile für jeden Marker 3 Gruppen gebildet. Die Einteilung gründete sich auf Erfahrungen einer Arbeitsgruppe des Instituts für Medizinische Immunologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg aus immunologischen Untersuchungen von Tumoren (u.a. Riemann, 1997). Zur Analyse der Signifikanz der gewonnenen Unterschiede zwischen den Gruppen wurde der Log-Rank-Test angewandt.

Mit der multivariaten Regressionsanalyse nach Cox wurde gleichfalls untersucht, welchen Einfluss bestimmte lymphozytäre Oberflächenmoleküle auf die Überlebenswahrscheinlichkeit hatten. Dabei wurde zusätzlich die Einflussnahme der Kovariaten Grading, TNM-Stadium der Nierentumoren sowie Patientenalter zum Operationszeitpunkt auf die Überlebenswahrscheinlichkeit überprüft (Ziegler et al., 2007).

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung der Tumorproben

Im Folgenden wurden die Daten aus 119 Nierentumoren ausgewertet. Die Pathologen klassifizierten darunter 92 als hellzellige NZK (Tabelle 5).

Tabelle 5: Histologische Klassifikation der untersuchten Tumoren

Histologische Klassifikation	Häufigkeit	Prozent
Hellzelliges NZK (A)	92	77,3
Papilläres NZK (B)	6	5,1
Onkozytom (C)	6	5,1
Hellzelliges und papilläres NZK (D)	4	3,4
Hellzelliges, fokal sarkomatoides NZK (E)	3	2,6
Unklassifizierbarer Nierentumor	2	1,7
Papilläres Urothelkarzinom	1	0,8
Sarkomatoides NZK	1	0,8
Chromophobes NZK (F)	1	0,8
Nebennierenrindenkarzinom	1	0,8
Medulläres Nierenkarzinom	1	0,8
Hellzelliges, sarkomatoides und papilläres NZK	1	0,8
Gesamt	119	100

Die Gesamtheit der Nierentumorpatienten befand sich zum Operationszeitpunkt zwischen 41 und 91 Jahren mit einem Altersmittelwert von  $66,8 \pm 0,9$  Jahren. Das Durchschnittsalter der Patienten mit hellzelligem NZK lag mit  $67,6 \pm 0,9$  Jahren höher. 4 von 10 Patienten mit hellzelligem NZK waren Frauen (Tabelle 6).

Tabelle 6: Geschlechtsverteilung der Patienten mit hellzelligem NZK

	Hellzelliges NZK
Frauen	39 (42,4 %)
Männer	53 (57,6 %)

Der Großteil der hellzelligen NZK wurde als G2-Tumoren (Tabelle 7) im T1-Stadium (Tabelle 8) eingestuft (entsprechend TNM-Klassifikation der UICC, Tabelle 10 im Anhang).

Tabelle 7: Gradingstadien beim hellzelligen NZK

	G1	G2	G3	G4	Gesamt
Hellzelliges NZK	11	62	15	3	91

Tabelle 8: T-Stadien beim hellzelligen NZK

	T1a	T1b	T2	T3	T3a	T3b	T4	Gesamt
Hellzelliges NZK	27	26	8	3	10	18	0	92

Die Klassifikation der befallenen regionären Lymphknoten ergab 15 Patienten ohne befallene Lymphknoten im Stadium N0 (16,3 %) sowie 76 mit unbekanntem Lymphknotenstadium NX (83,7 %).

Nach Beurteilung der Fernmetastasierung waren 9 Patienten im M0-Stadium (9,8 %), 8 im M1-Stadium (8,7 %), ein Patient im M2-Stadium (1,1 %), 74 im MX-Stadium (80,4 %), wobei die Fernmetastasen in Lunge (58,3 %) bei 7 Patienten, Leber (16,6 %) bei 2, Nebenniere (16,6 %) bei 2 und kontralateralen Niere (8,3 %) bei einem Patienten gefunden wurden.

Der Tumor konnte bei 76 Patienten (82,6 %) vollständig entfernt werden. Bei 2 Patienten (2,2 %) wurde der Tumor als R1-Stadium und bei 3 Patienten (3,3 %) als R2-Stadium nicht komplett reseziert. Für 11 Patienten (12 %) wurden diesbezüglich keine Angaben gefunden.

Alle Daten der folgenden Ergebnisse finden sich im Tabellenanhang ab Seite 59.

#### **4.2. Durchflusszytometrische Charakterisierung der TIL**

Für T-Zellen (CD3<sup>+</sup>), B-Zellen (CD20<sup>+</sup>), NK-Zellen (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>) erfolgten alle Angaben in Prozent der Lymphozyten, für die Oberflächenantigene CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD13<sup>+</sup>, CD26<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup>, CD57<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup>, CD107<sup>+</sup>, CCR5<sup>+</sup>, CXCR3<sup>+</sup>, CTLA-4<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, Vα24<sup>+</sup> in Prozent der T- Lymphozyten, für CD4<sup>+</sup>CD7<sup>-</sup> und Vα24<sup>+</sup> in Prozent der T-Helferzellen, für NKp44<sup>+</sup> in Prozent der NK-Zellen und für CD8<sup>+</sup>CD7<sup>-</sup> sowie CD28<sup>+</sup> in Prozent der CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Die Bestimmung der Zellvitalität ergab einen Anteil von 97,6 ± 0,35 % vitaler Zellen an allen T-Zellen.

##### **4.2.1 Vergleich der Expressionsmuster in histologisch differenten Nierentumoren**

Nachfolgend wurden Lymphozyten aus histologisch verschiedenen Nierentumortypen verglichen. In diesen Vergleich wurden neben gemischtzelligen Karzinomen (D, E) auch das benigne Onkozytom (C) einbezogen (Tabelle 5 auf Seite 20 und Tabelle 11 im Anhang).

Beim Vergleich des hellzelligen NZK mit dem Onkozytom (t-Test bei unabhängigen Stichproben) wurden für den Anteil an NK-Zellen signifikant höhere Werte im Onkozytom als im hellzelligen NZK erfasst. Im Gegensatz dazu wurden für folgende Oberflächenmoleküle signifikant höhere Anteile beim hellzelligen NZK gemessen (Abb. 3, Tabelle 12): T-Zellen, CD4<sup>+</sup> T-Zellen, CD13<sup>+</sup> T-Zellen, CD26<sup>+</sup> T-Zellen, CD28<sup>+</sup> T-Zellen, CD69<sup>+</sup> T-Zellen, CD107<sup>+</sup> T-Zellen, HLA-DR<sup>+</sup> T-Zellen, CD8<sup>+</sup>/CD28<sup>+</sup> T-Zellen. Abb. 2 visualisiert die Anteile an NK-, B- und T-Zellen vergleichend zwischen Onkozytom und hellzelligem NZK in einem Kreisdiagramm. Während 75 % der

Lymphozyten im hellzelligen NZK T-Zellen waren, fand sich im Onkozytom ein fast ausgeglichenes Verhältnis von T- und NK-Zellen. Dabei ist zu beachten, dass die anhand der Paraffinschnitte ermittelten Absolutwerte der T-Zellen im Onkozytom geringer waren als die im hellzelligen NZK (Tabelle 27). Während in dem einen untersuchten Onkozytom 20 intratumorale und 30 peritumorale T-Zellen beobachtet wurden, waren es in den hellzelligen NZK 105 intra- bzw. 74 peritumorale T-Zellen. Weiterhin wurde im hellzelligen NZK eine höhere Anzahl an Makrophagen ( $CD68^+$ ) als im Onkozytom detektiert. Dabei überstieg die Makrophagenanzahl im hellzelligen NZK deutlich die der T-Zellen. Zudem wurde im Vergleich zum hellzelligen NZK vor allem der peritumorale Gefäßreichtum ( $CD34^+$ ) des Onkozytoms deutlich.

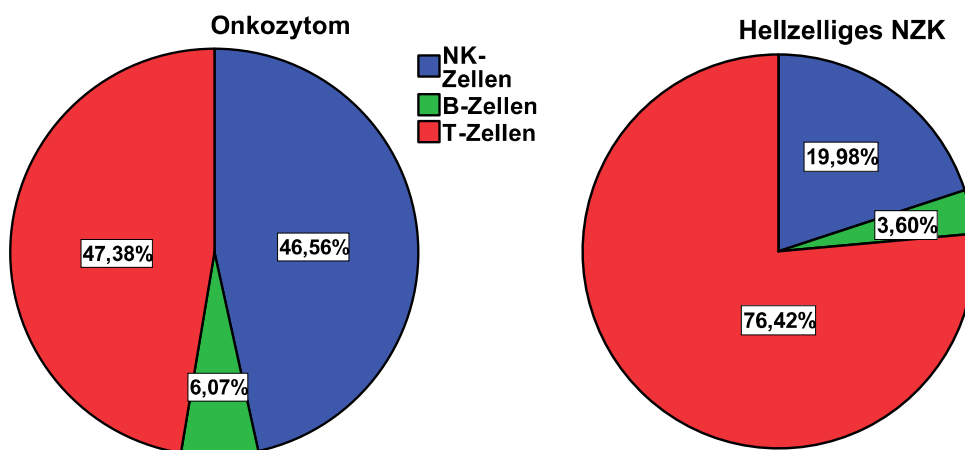


Abb. 2: Vergleich der T-, B-, NK- Zellanteile zwischen Onkozytom und hellzelligem NZK (in % der Lymphozyten)

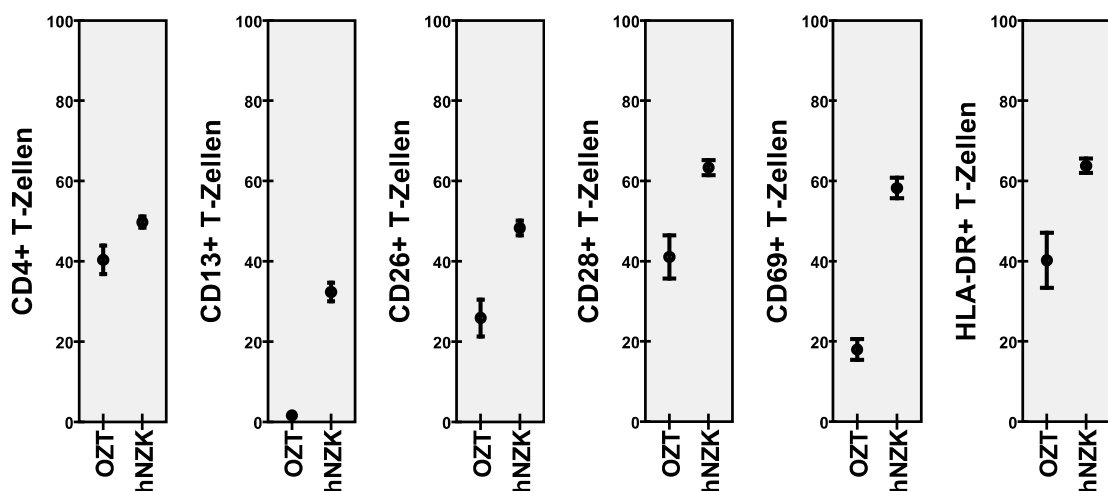


Abb. 3: Unterschiede in der Lymphozyteninfiltration zwischen Onkozytom (OZT) und hellzelligem NZK (hNZK) (in % der T-Zellen, MW  $\pm$  SEM)



#### 4.2.2 Korrelation des TIL-Phänotyps mit dem Grading

Zur Darstellung der Zusammenhänge zwischen den prozentualen Anteilen verschiedener zellulärer Oberflächenmarker und den Gradingstadien wurden univariate Varianzanalysen mit den adjustierten Faktoren T-Stadium und Patientenalter durchgeführt (Tabelle 13 im Anhang). Dabei wurden die drei Gruppen Grading 1, Grading 2 und Grading 3/4 miteinander verglichen. Aufgrund der geringen Patientenzahl mit Grading 4 wurden Grading 3- und Grading 4-Tumoren zu einer Gruppe zusammengefasst. Um die Immunzellinfiltration eines dem nicht tumorös veränderten Nierengewebe ähnlichen Gewebes zu erfassen, wurden parallel zu den Ergebnissen des hellzelligen NZK die prozentualen Anteile der Lymphozytensubpopulationen für das benigne Onkozytom dargestellt (Abb. 4). Allerdings gingen die Daten der Onkozytome nicht in die univariate Varianzanalyse ein. Im Folgenden sind signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Grading- und TNM-Stadien sowie Altersgruppen mit folgendem Symbol gekennzeichnet: \*.

Patienten mit gut differenzierten Tumoren (Grading 1) zeigten einen höheren prozentualen NK-Zellanteil als solche mit schlecht differenzierten Tumoren (Grading 3/4), wobei das benigne Onkozytom den höchsten Anteil an NK-Zellen aufwies. Weiterhin fanden sich bei den Grading 1-Tumoren höhere Anteile immunseneszenter Zellen, wie  $CD57^+$  T-Zellen und  $CD4^+CD7^-$  T-Zellen. Für schlecht differenzierte Tumoren wurden höhere Anteile an  $NKp44^+$  NK-Zellen, an  $CD69^+$  T-Zellen sowie an  $CTLA-4^+$  T-Zellen erfasst.

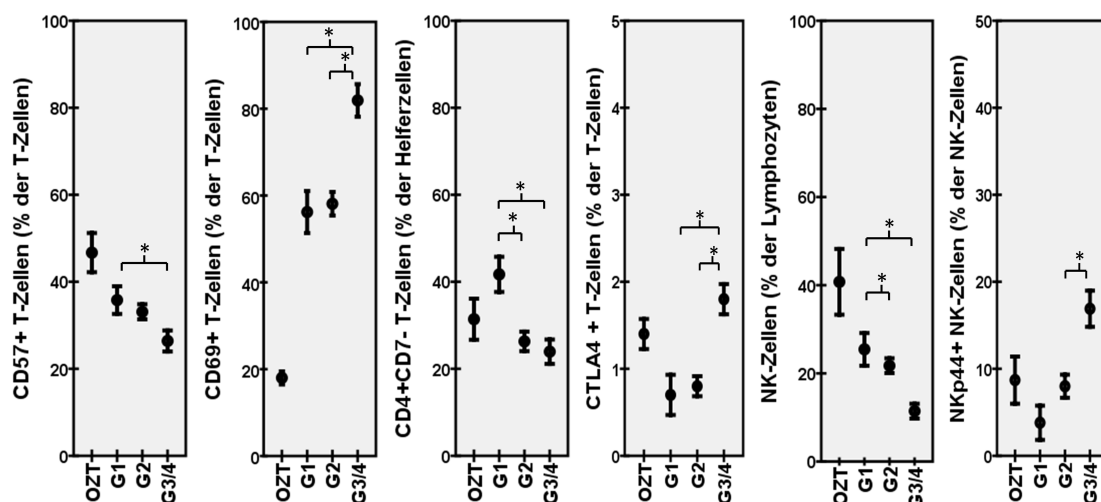


Abb. 4: Zusammenhänge zwischen TIL-Phänotyp und Grading beim hellzelligen NZK (MW  $\pm$  SEM)

### 4.2.3 Korrelation des TIL-Phänotyps mit dem TNM-Staging

Nach der TNM-Klassifikation (Tabelle 10 auf Seite 58) sind T1- und T2-Tumore auf die Niere begrenzt, wobei solche im Stadium T1a kleiner 4 cm, die im T1b-Stadium zwischen 4 und 7 cm und T2-Tumore mehr als 7 cm messen. Tumoren im Stadium T3 infiltrieren das umliegende Gewebe, wie größere Venen, Nebenniere(n) oder das perirenale Gewebe, breiten sich jedoch nicht über die Gerota-Faszie aus. Die folgenden Ergebnisse wurden mittels univariater Varianzanalyse und Adjustierung des Gradings und Patientenalters ermittelt.

Durch die Analyse der Zusammenhänge zwischen lymphozytärem Phänotyp und T-Stadium konnte gezeigt werden, dass sich die Anteile NKp44<sup>+</sup> NK-Zellen, CD69<sup>+</sup> T-Zellen und CD107<sup>+</sup> T-Zellen mit der Tumorgöße erhöhten (Tabelle 14). Tumore im T1a-Stadium wiesen einen höheren Anteil an CD4<sup>+</sup>CD7<sup>-</sup> T-Zellen als T3-Tumore auf. Dagegen waren bei T3-Tumoren höhere prozentuale Anteile an CTLA-4<sup>+</sup> T-Zellen zu finden, wobei durchschnittlich nur 1 % der T-Zellen CTLA-4 trugen (Abb. 5).

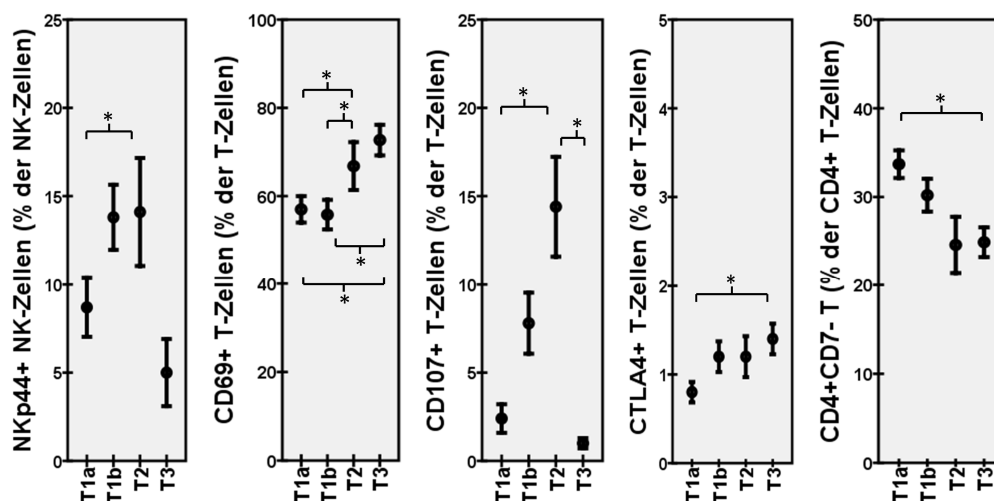


Abb. 5: Zusammenhänge zwischen TIL-Phänotyp und T-Stadien beim hellzelligen NZK (MW ± SEM)

Um die Anteile verschiedener Oberflächenmoleküle im Zusammenhang mit einer Metastasierung abzuschätzen, wurden die Beziehungen zwischen TIL und M-Stadien untersucht (Tabelle 15). Dabei ist darauf hinzuweisen, dass die exakte M-Klassifikation häufig nicht bekannt war. Die Berechnung der Zusammenhänge zwischen TIL-Phänotyp und Metastasierungsstadien erfolgte nach der univariaten Varianzanalyse ohne Adjustierung. Aufgrund der geringen Fallzahl mit bekannter Metastasierung und dem daraus resultierenden Zusammenschluss der metastasierten Tumoren (M1 und M2) zu einer Gruppe, konnten nur zwei Gruppen miteinander verglichen werden. Dadurch war eine Adjustierung statistisch nicht möglich.

Innerhalb des kleinen Kollektivs mit bekanntem Metastasierungsverhalten ( $n = 18$ ) ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen M0- und M1/M2-Stadien für HLA-DR<sup>+</sup> T-Zellen und für die mittlere Fluoreszenzintensität von CXCR3 auf T-Zellen (Mean-Wert) mit jeweils höheren Anteilen bei nicht metastasierten Tumoren (Abb. 6).

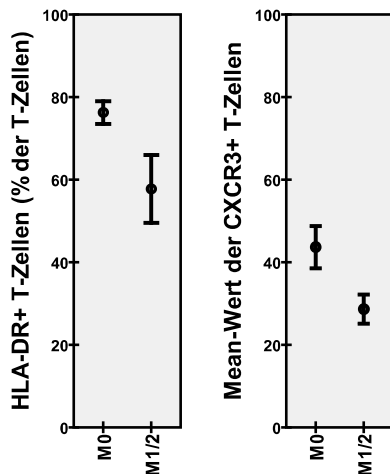


Abb. 6: Zusammenhänge zwischen TIL-Phänotyp und Metastasierung beim hellzelligem NZK (MW  $\pm$  SEM)

#### 4.2.4 Korrelation des TIL-Phänotyps mit dem Patientenalter

Tabelle 16 zeigt die Ergebnisse, bei denen beim Vergleich verschiedener Oberflächenmoleküle auf TIL bei Patienten unter 58 Jahren ( $n = 12$ ) mit denen über 70 Jahren ( $n = 34$ ) keine signifikanten Unterschiede ermittelt wurden. Die Berechnungen erfolgten mittels univariater Varianzanalyse und Adjustierung für Grading und T-Stadium. Beschreibend wurden Tumoren jüngerer Patienten von höheren Anteilen CD26<sup>+</sup> T-Zellen und CD28<sup>+</sup> T-Zellen infiltriert. Patienten über 70 Jahren verfügten über höhere Anteile CD8<sup>+</sup> T-Zellen, CD57<sup>+</sup> T-Zellen und CD69<sup>+</sup> T-Zellen.

#### 4.3 Durchflusszytometrische Charakterisierung der PBL

Parallel zu Nierentumoren wurden 57 Blutproben untersucht. Dabei waren 44 (77,2 %) von Patienten mit hellzelligem NZK. Die Patienten mit hellzelligem NZK wiesen ein Durchschnittsalter von  $65,1 \pm 1,4$  Jahren auf. Die Absolutwerte der Lymphozyten lagen im altersentsprechenden Normbereich (Tabelle 9). Als Kontrollgruppe dienten dabei 20 gesunde Patienten ohne Tumorerkrankung mit einem Durchschnittsalter von 59 Jahren (Spanne 40-78 Jahre, Hase et al., 2011).

Tabelle 9: Vergleich der PBL-Absolutwerte mit altersentsprechenden Normwerten (MW  $\pm$  SEM, Hase et al., 2011)

	Patientenblut (Zellen/ $\mu$ l)	Normwert (Zellen/ $\mu$ l)
NK-Zellen	395 $\pm$ 49	223 $\pm$ 27
B-Zellen	205 $\pm$ 22	197 $\pm$ 21
T-Zellen	1.395 $\pm$ 89	1.251 $\pm$ 90
CD4+ Helferzellen	844 $\pm$ 48	817 $\pm$ 68
CD8+ zytotoxische T-Zellen	533 $\pm$ 54	434 $\pm$ 50
Ratio CD4:CD8	1,58 $\pm$ 0,2	1,88 $\pm$ 0,06

Die Berechnung der Zusammenhänge zwischen PBL-Phänotyp und Grading, TNM-Staging sowie Patientenalter erfolgten analog der Berechnungen zum TIL-Phänotyp (Seiten 22-25).

#### 4.3.1 Korrelation des PBL-Phänotyps mit dem Grading

Patienten mit gut und mäßig differenzierten G1/G2-Tumoren (n = 30) zeigten im Blut einen geringeren prozentualen Anteil NKp44<sup>+</sup> NK-Zellen im Vergleich zu schlecht differenzierten und undifferenzierten G3/G4-Tumoren (n = 13). Dabei boten Onkozytome den geringsten Anteil an NKp44<sup>+</sup> NK-Zellen. Weiterhin wurde ein höherer Anteil Va24<sup>+</sup> T-Zellen im Patientenblut bei gut und mäßig differenzierten im Vergleich zu schlecht differenzierten und undifferenzierten G3/G4-Tumoren gemessen. Aufgrund der geringen Anzahl an G1-Tumoren wurden G1- und G2-Tumoren zu einer Gruppe zusammengefasst (Abb. 7, Tabelle 17).

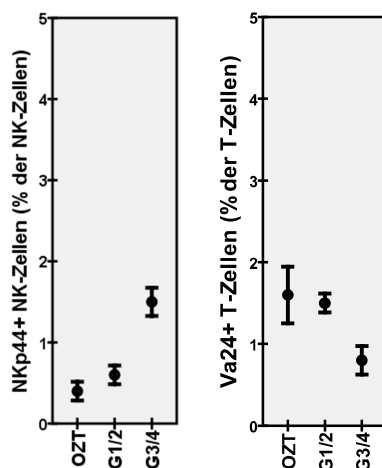


Abb. 7: Zusammenhänge zwischen PBL-Phänotyp und Grading beim hellzelligem NZK (MW  $\pm$  SEM)

#### 4.3.2 Korrelation des PBL-Phänotyps mit dem TNM-Staging

Bei der Darstellung der Lymphozytensubpopulationen in den einzelnen T-Stadien (Abb. 8 und 9, Tabelle 18) nahmen die Absolutwerte für B- und T-Zellen sowie für CD4<sup>+</sup> T-

Zellen im Blut bei lokal fortgeschrittenen T2-Tumoren im Vergleich zu T1a- und T1b-Tumoren ab. Im Gegensatz dazu stiegen sowohl die prozentualen Anteile als auch die Absolutwerte für Va24<sup>+</sup> NKT-Zellen mit zunehmender lokaler TumorgroÙe an. Sowohl für CD26<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup> als auch CXCR3<sup>+</sup> T-Zellen wurden höhere Anteile in lokal begrenzten Tumoren als in infiltrativ wachsenden Tumoren festgestellt (Tabelle 18).

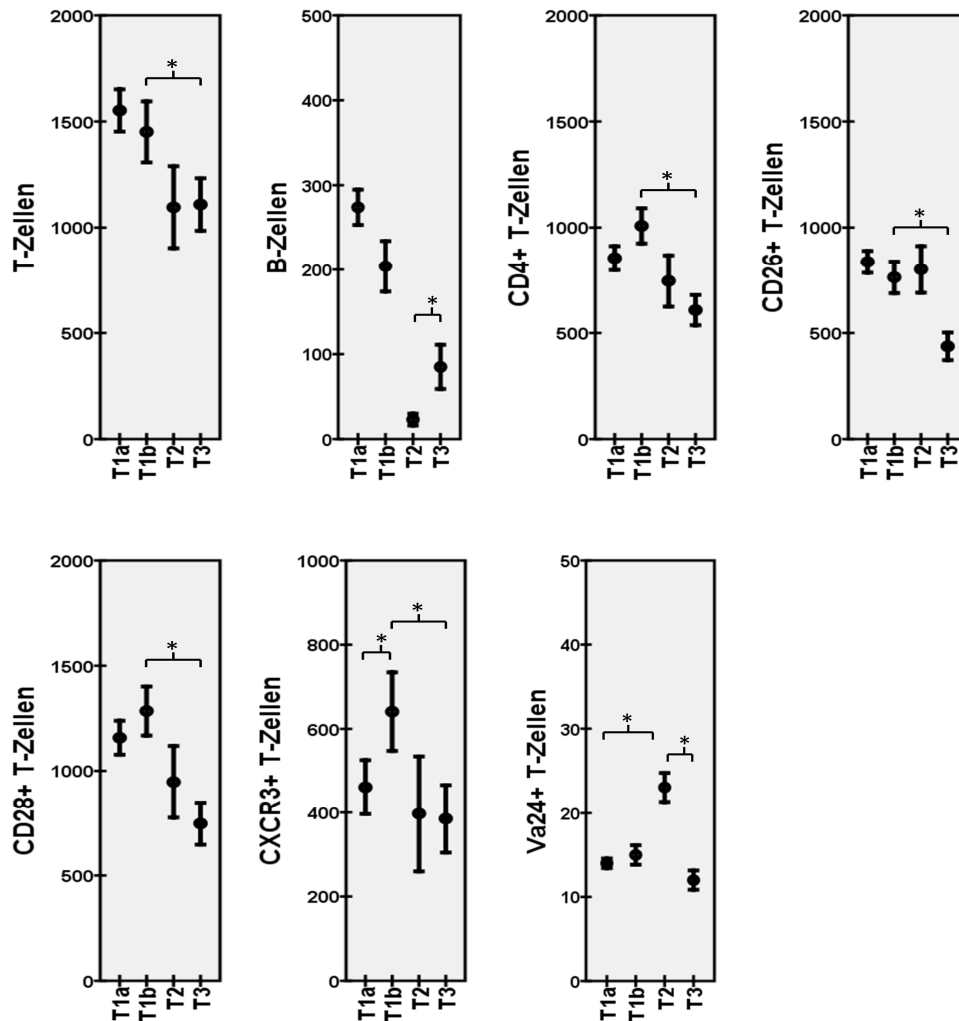


Abb. 8: Zusammenhänge zwischen PBL-Phänotyp und T-Stadien beim hellzelligem NZK (Absolutzahlen, MW  $\pm$  SEM in Zellen/ $\mu$ l)

CTLA-4<sup>+</sup> T-Zellen und die mittlere Fluoreszenzintensität von CXCR3 auf T-Zellen unterschieden sich zwischen M0 (n = 2) und M1/2 (n = 5), indem metastasierte Tumoren einen höheren Anteil CTLA-4<sup>+</sup> T-Zellen und einen geringeren (Geo-) Mean-Wert für CXCR3<sup>+</sup> T-Zellen aufwiesen (Abb. 9, Tabelle 19). Ebenso korrelierte eine sinkende CXCR3-Fluoreszenzintensität auf TIL mit der Tumormetastasierung (siehe Abb. 6).

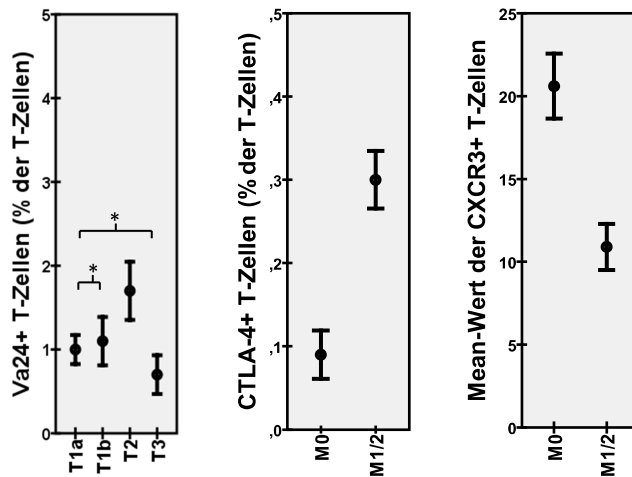


Abb. 9: Zusammenhänge zwischen PBL-Phänotyp und T-Stadien sowie Metastasierung beim hellzelligem NZK (prozentuale Anteile, MW  $\pm$  SEM)

#### 4.3.3 Korrelation des PBL-Phänotyps mit dem Patientenalter

Der Vergleich der PBL zwischen Patienten unter 58 Jahren mit Patienten über 70 Jahren zeigte bei den jüngeren Patienten für T-Zellen, CD8<sup>+</sup> T-Zellen, CD57<sup>+</sup> T-Zellen, CCR5<sup>+</sup> T-Zellen, HLA-DR<sup>+</sup> T-Zellen und CD4<sup>+</sup>CD7<sup>-</sup> T-Zellen höhere Absolutwerte (Abb. 10, Tabelle 20). Im Blut der über 70-Jährigen mit hellzelligem NZK wurden geringere Anteile an CD8<sup>+</sup> T-Zellen und CD57<sup>+</sup> T-Zellen sowie höhere prozentuale Anteile an B-Zellen, CD4<sup>+</sup> T-Zellen, CD28<sup>+</sup> T-Zellen und CD8<sup>+</sup>/CD28<sup>+</sup> T-Zellen gemessen (Abb. 11).

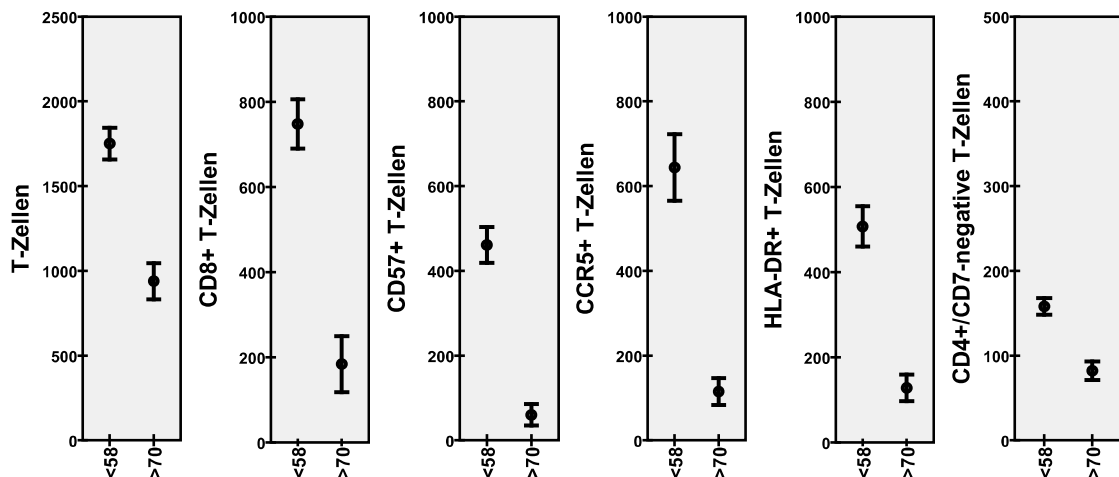


Abb. 10: Zusammenhänge zwischen PBL-Phänotyp und Patientenalter beim hellzelligem NZK (Absolutzahlen, MW  $\pm$  SEM in Zellen/ $\mu$ l)

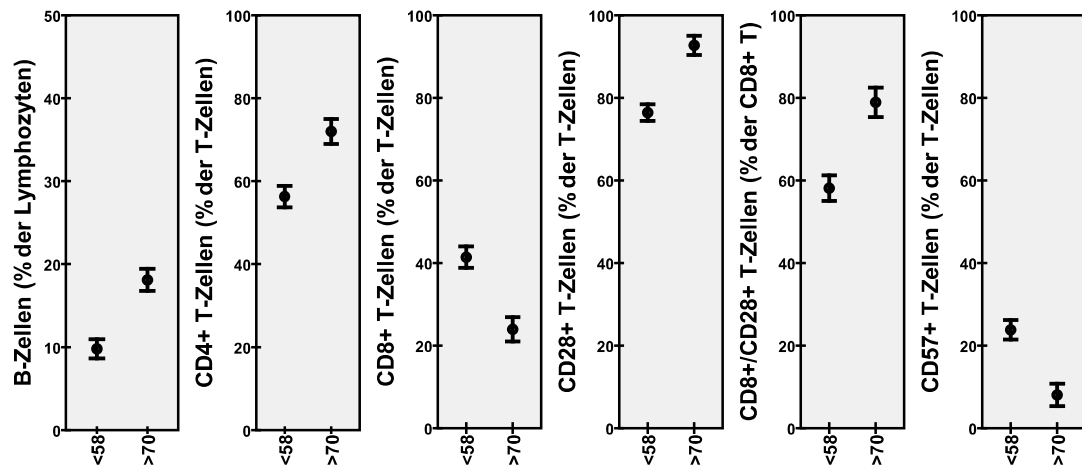


Abb. 11: Zusammenhänge zwischen PBL-Phänotyp und Patientenalter beim hellzelligem NZK (prozentuale Anteile, MW  $\pm$  SEM)

#### 4.4 Vergleich des TIL- und PBL-Phänotyps

Die vergleichenden Berechnungen zur Erfassung der unterschiedlichen prozentualen Anteile verschiedener Oberflächenantigene auf TIL und PBL wurden mit dem t-Test für gepaarte Stichproben durchgeführt (Tabelle 21). Zusammenfassend waren die prozentualen Anteile für folgende Oberflächenantigene signifikant höher bei TIL als bei PBL: T-Zellen, CD8<sup>+</sup>, CD13<sup>+</sup>, CD57<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup>, CD107<sup>+</sup>, CCR5<sup>+</sup>, CXCR3<sup>+</sup>, CTLA-4<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, NKp44<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD7<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>CD7<sup>+</sup>. Bei nachstehenden Markermolekülen verhielt es sich anders mit signifikant höheren Anteilen bei PBL als bei TIL: B-Zellen, CD4<sup>+</sup>, CD26<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup> (Abb. 12). Für CD56<sup>+</sup> NK-Zellen und Va24<sup>+</sup> NKT-Zellen konnten keine signifikanten Unterschiede errechnet werden.

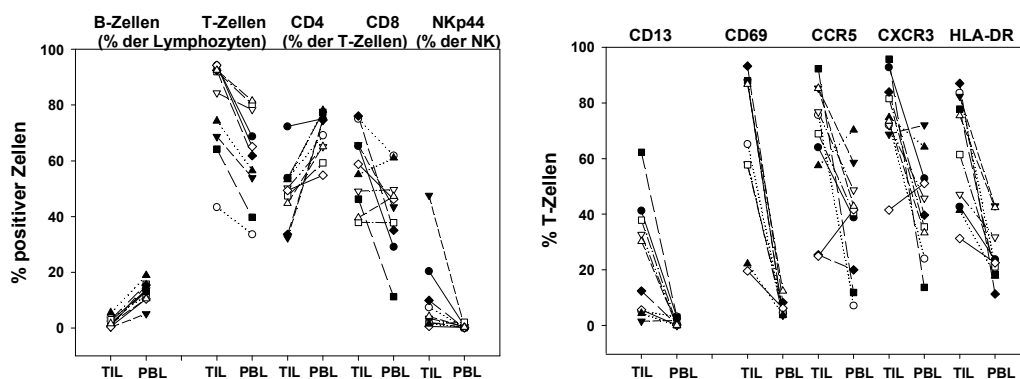


Abb. 12: Beispiele für Unterschiede zwischen TIL- und PBL-Phänotyp beim hellzelligem NZK

#### 4.5 Anfärbung der Immunzellinfiltrate in Paraffinschnitten und Korrelation mit Grading, TNM-Staging und Patientenalter

Aufgrund der Ergebnisdarstellung verschiedener Oberflächenmoleküle auf TIL und PBL in prozentualen Angaben wurden Zusatzinformationen in Form absoluter Immunzellwerte mit Hilfe der immunhistochemischen Anfärbung von Paraffinschnitten verschiedener Nierentumoren gewonnen (Tabelle 22). Die folgenden Resultate ergänzten die mit der Durchflusszytometrie gewonnenen relativen Anteile. Zusätzlich wurden Makrophagen (CD68), myeloide Zellen (CD15) und Gefäße (CD34) angefärbt. Die mikroskopische Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Paraffingewebeschnitte erfolgte bei 100-facher Vergrößerung in 2,5 mm<sup>2</sup> messenden Bildausschnitten. Dabei wurden die gezählten, positiv gefärbten Zellen mit Grading, TNM-Staging und Patientenalter korreliert. Es wurden separat die Zellen im Tumor (intratumoral) und um den Tumor in den Bindegewebssepten (peritumoral) in jeweils 10 Ausschnitten gemessen und für jeden Tumor der Mittelwert aus diesen Einzelausschnitten erfasst. Die Abb. 13 und 14 zeigen beispielhaft Ausschnitte aus angefärbten Paraffinschnitten.

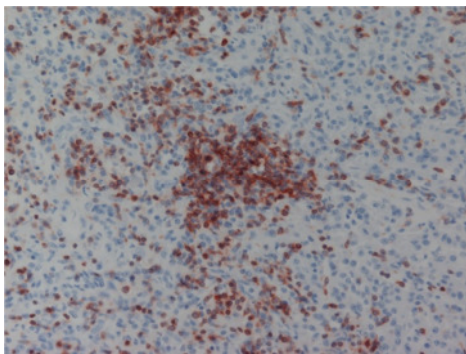


Abb. 13: Immunhistochemische CD3-Färbung im hellzelligen NZK (200-fach vergrößert)

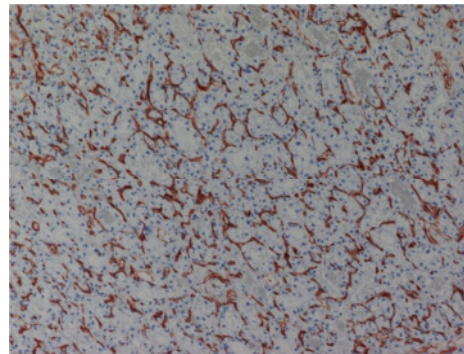


Abb. 14: Immunhistochemische CD34-Färbung im hellzelligen NZK (100-fach vergrößert)

Für CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD68<sup>+</sup>, CD15<sup>+</sup> Zellen ließ sich im hellzelligen NZK eine signifikant höhere intratumorale Anzahl vergleichend mit der peritumoralen Infiltration messen. Bei CD20<sup>+</sup> Zellen war die peritumorale Anzahl signifikant höher. Für T-Helferzellen (CD4<sup>+</sup>) und Gefäße (CD34<sup>+</sup>) wurden keine signifikanten Unterschiede gewonnen.

Zur statistischen Auswertung der Zusammenhänge zwischen intra- und peritumoralen Immunzellinfiltraten und Grading, TNM-Staging sowie Alter wurde die univariate Varianzanalyse mit adjustierten Faktoren Grading, T-Stadium und Alter angewandt.

Dabei wurden für schlecht differenzierte Tumoren (n = 9) eine höhere Anzahl an T-Zellen im Tumor und um den Tumor, an CD4<sup>+</sup> Zellen peritumoral, an CD8<sup>+</sup>



intratumoralen Zellen, an CD20<sup>+</sup> intratumoralen Zellen sowie an CD68<sup>+</sup> Zellen peritumoral erfasst (Abb. 15, Tabelle 23).

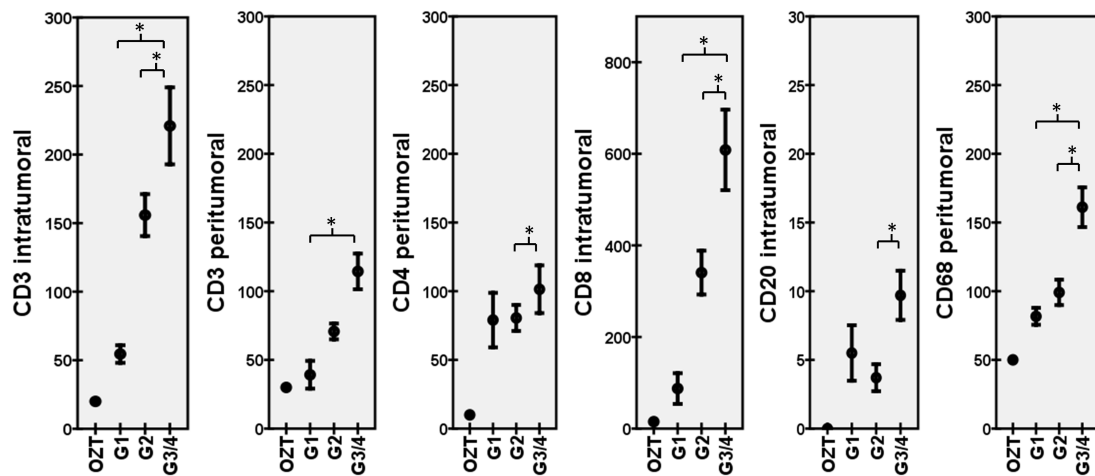


Abb. 15: Zusammenhänge zwischen Immunzellinfiltraten und Grading beim hellzelligem NZK (Immunhistochemie, MW  $\pm$  SEM)

Bei der Untersuchung möglicher Zusammenhänge zwischen der Immunzellinfiltration und der Tumorgöße (Abb. 16, Tabelle 24) wurde festgestellt, dass kleine T1b-Tumoren (n = 18) eine signifikant niedrigere Anzahl CD3<sup>+</sup> Zellen im Tumor und um den Tumor aufwiesen als T2-Tumoren (n = 6). Im Vergleich zu Tumoren größer 7 cm (T2) wurde in solchen kleiner 7 cm (T1) eine signifikant geringere Anzahl CD68<sup>+</sup> Zellen peritumoral gemessen. Der Gefäßstatus war in T1-Tumoren spärlicher ausgeprägt als bei infiltrativ wachsenden T3-Tumoren (n = 20).

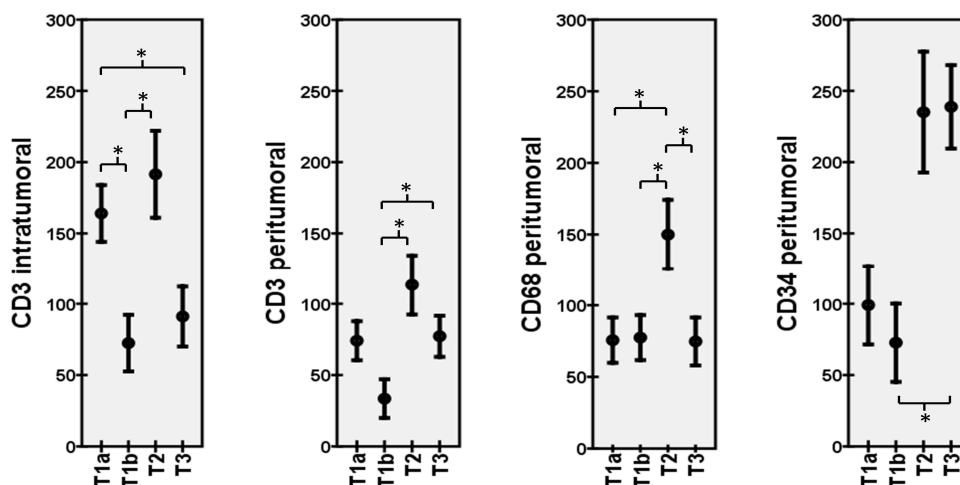


Abb. 16: Zusammenhänge zwischen Immunzellinfiltraten und T-Stadien beim hellzelligem NZK (Immunhistochemie, MW  $\pm$  SEM)

Beim Vergleich der Paraffinschnitte von Patienten ohne (M0) und mit Metastasen (M1/M2) konnte peritumoral eine signifikant höhere Anzahl an T-Helferzellen (CD4<sup>+</sup>) und an Gefäßen (CD34<sup>+</sup>) bei M0 (n = 9) als bei M1/M2 (n = 7) gefunden werden. Weiterhin wurde peritumoral eine höhere Anzahl an Makrophagen (CD68<sup>+</sup>) bei metastasierten als bei nicht metastasierten Tumoren gemessen (Abb. 17, Tabelle 25). Patienten unter 58 Jahren (n = 7) wiesen eine signifikant höhere Anzahl an peritumoralen CD8<sup>+</sup> Zellen als Patienten über 70 Jahren auf (n = 23, Tabelle 26).

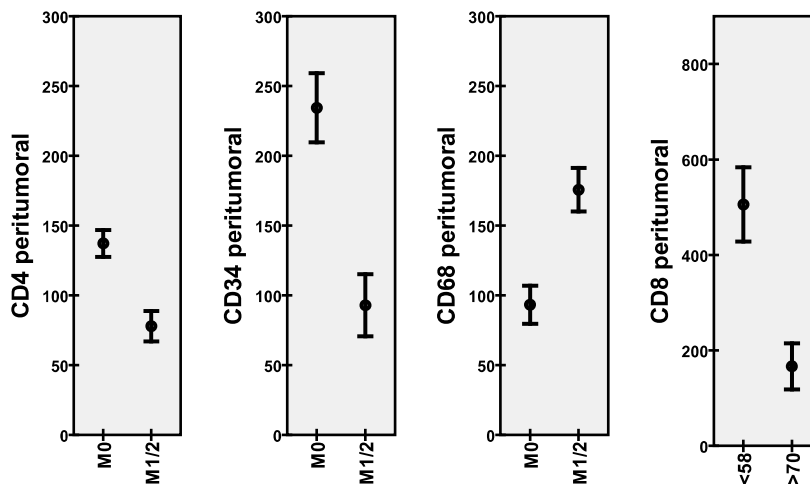


Abb. 17: Zusammenhänge zwischen Immunzellinfiltraten und Metastasierung sowie Patientenalter beim hellzelligem NZK (Immunhistochemie, MW  $\pm$  SEM)

#### 4.6 Überlebensanalysen beim hellzelligem Nierenzellkarzinom

Um prognostisch relevante lymphozytäre Oberflächenmoleküle zu identifizieren, wurden die Zusammenhänge zwischen der Gesamtüberlebenszeit der Patienten mit hellzelligem NZK und der Tumorerinfiltration durch Immunzellen analysiert. Die Überlebensdauer ergab sich aus dem Zeitraum vom Operationstag bis zum Todestag bzw. zur letzten Vorstellung bei den behandelnden Urologen oder Hausärzten und lag durchschnittlich bei 25,6 Monaten (Spanne: 0-58 Monate). Es erfolgte für jedes Oberflächenantigen eine Einteilung in drei Gruppen, um einen möglichen Einfluss auf das Überleben der Patienten darzustellen. Die Festlegung der Grenzen basierte auf Erfahrungswerten. Die Zuordnung in die jeweilige Gruppe richtete sich nach den prozentualen Anteilen verschiedener Oberflächenantigene auf Lymphozyten und erfolgte in die Gruppen gering (Gruppe 1), moderat (Gruppe 2) und stark (Gruppe 3). Die Ergebnisse wurden sowohl mit der univariaten Analyse (Kaplan-Meier-Schätzung) als auch mit der multivariaten Analyse (Cox-Regressionsmodell) und den adjustierten Faktoren Grading, T-Stadium und Patientenalter berechnet. Bis zum festgelegten

Stichtag der letzten Nachkontrolle (31.12.2010) lebten 63 Patienten (68,5 %) und waren 18 Patienten verstorben (19,6%). Für 11 Patienten (12,0 %) waren keine Informationen zum Überleben verfügbar.

Nach den durchgeführten multivariaten Analysen wiesen Patienten mit hohen Anteilen an CD56<sup>+</sup> NK-Zellen, CXCR3<sup>+</sup> T-Zellen und HLA-DR<sup>+</sup> T-Zellen eine signifikant höhere Überlebenswahrscheinlichkeit als Patienten mit geringeren Anteilen auf (Abb. 18, Tabelle 28 im Anhang). Dabei zeigten Patienten mit einem unter 15-prozentigen Anteil an CD56<sup>+</sup> NK-Zellen vergleichend mit Patienten mit Anteilen über 25 % ein 10-fach erhöhtes relatives Risiko, am hellzelligem NZK zu versterben. Für Patienten mit einem unter 55-prozentigen Anteil an CXCR3<sup>+</sup> T-Zellen wurde ein 3-fach erhöhtes relatives Sterberisiko als für die mit einem über 80-prozentigen Anteil errechnet. Ein sogar 21-fach erhöhtes relatives Risiko wurde für am NZK Erkrankte mit einem Anteil an HLA-DR<sup>+</sup> T-Zellen unter 55 % im Vergleich zu denen mit über 70 % ermittelt.

Sowohl für CD13<sup>+</sup> T-Zellen als auch für CD26<sup>+</sup> T-Zellen wurde für moderate Anteile (Gruppe 2) die schlechteste Überlebenswahrscheinlichkeit berechnet. Hohe Anteile an Vα24<sup>+</sup> T-Zellen waren ebenfalls mit einer schlechten Überlebenswahrscheinlichkeit assoziiert.

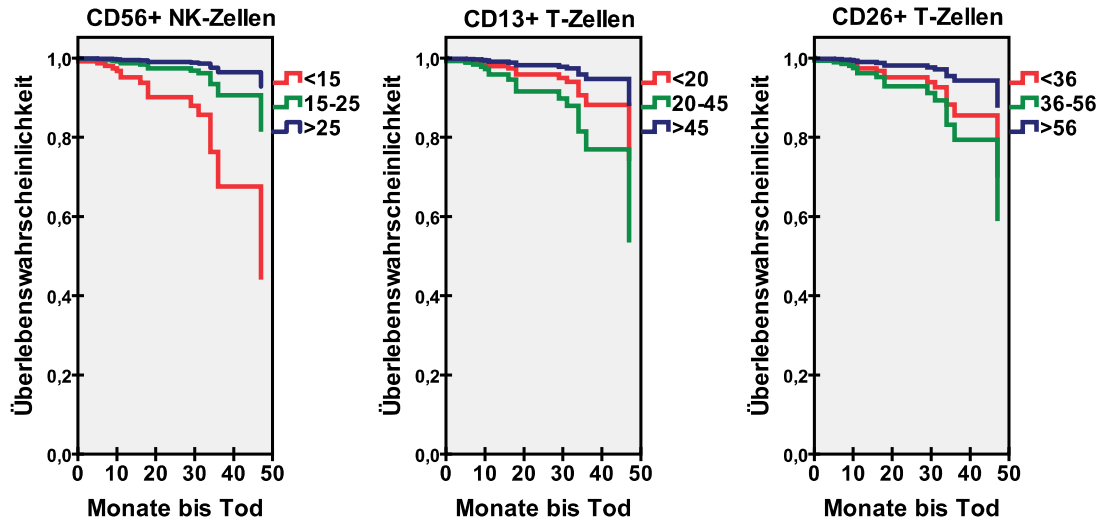
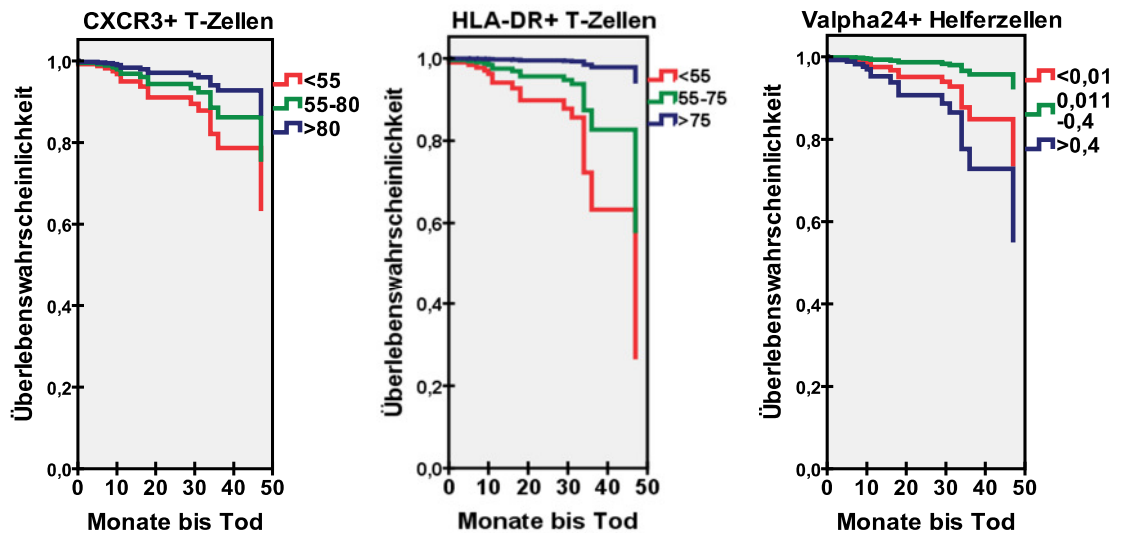


Abb. 18: Überlebenskurven: Ergebnisse der multivariaten Analyse (Cox-Regression) für verschiedene Lymphozytensubpopulationen bei Patienten mit hellzelligem NZK. Es wird die Wahrscheinlichkeit gezeigt, dass ein Patient eine Zeit nach OP (in Monaten) überlebt.



Fortsetzung Abb. 18: Überlebenskurven

Abschließend ließen sich mittels Kaplan-Meier-Schätzung folgende Tendenzen ableiten: Patienten mit geringeren Anteilen an  $CD4^+$  T-Zellen lebten länger als Patienten mit höheren Anteilen. Weiterhin könnte ein hoher Anteil  $CD107^+$  T-Zellen sowie  $CD8^+CD7^-$  negativer T-Zellen mit einer höheren Überlebenswahrscheinlichkeit assoziiert sein.

Neben der Überlebensanalyse mit den durchflusszytometrisch gewonnenen Daten der TIL wurden zusätzlich Statistiken zur Überlebenswahrscheinlichkeit anhand der ausgezählten Immunzellen in Paraffinschnitten berechnet. Nach den univariaten und multivariaten Analysen konnten keine signifikanten Zusammenhänge zwischen Gesamtüberleben und Anzahl der intratumoral und peritumoral gemessenen, mit Oberflächenmolekülen besetzten Zellen gesichert werden (Tabelle 29).

## **5. Diskussion**

### **5.1 Charakterisierung der Patienten mit Nierenzellkarzinom**

Im Patientenkollektiv dieser Arbeit waren 77 % aller gewonnenen Tumoren hellzellige NZK. Dies entsprach dem in der Literatur beschriebenen Anteil (Zigeuner, 2009). Außerdem glich der Altersmittelwert der Patienten dieser Studie dem gezeigten Altersgipfel dieser Tumorerkrankung zwischen 50 und 70 Jahren (Wechsel et al., 2000). Ferner wurde das bekannte Geschlechtsverhältnis von 3 erkrankten Männern zu 2 erkrankten Frauen deutlich (Husmann, 2010). Diese Ergebnisse belegen, dass in dieser Untersuchung ein repräsentatives Patientenkollektiv geprüft wurde.

#### **5.1.1 Risikostratifizierung erkrankter Patienten**

Eine Prognoseeinschätzung kann durch die postoperativ vorliegenden Informationen über Tumorstadium, Grading und histologischen Subtyp vorgenommen werden. Dadurch können Risikopatienten identifiziert werden. Bereits durch das lokale Tumorwachstum können Aussagen bezüglich des tumorspezifischen 5-Jahres-Überleben getroffen werden (Frank et al., 2005). Dabei überleben Patienten mit einem pT1a-Tumor zu 97 %, Patienten mit pT1b-Tumor zu 87 %, bei pT2-Tumor 71 %, bei pT3a-Tumor 53 % und bei pT3b-Tumor 44 % der Patienten. Nur noch 20 % der Patienten mit pT4-Tumoren sind nach den nächsten 5 Jahren am Leben (Frank et al., 2005). Zur Beurteilung der Prognose hinsichtlich des progressionsfreien oder tumorspezifischen Überlebens stehen mittlerweile detailliertere Prognosescores zur Verfügung, die durch Kombination verschiedener klinischer Parameter eine Risikostratifizierung ermöglichen. Der Mainzer-Prognose-Score stellt einen umfassenden Ansatz zur Prognoseabschätzung bei Patienten mit hellzelligem NZK dar (Störkel, 1993). Dabei werden die Patienten nach anatomischer Tumorausbreitung, Grading, Zelltyp, Wachstumsform des Tumors und Alter stratifiziert. Für jeden Parameter wird jeweils ein Punktwert vergeben. Die Addition der Einzelpunkte ergibt eine Gesamtpunktzahl mit der dazugehörigen 5-Jahres-Überlebenschance. Die Prognose der Patienten mit metastasierter Nierentumorerkrankung schätzt man nach den Motzer-Kriterien des Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC) ein. Robert Motzer definierte 5 wichtige Risikofaktoren: erhöhter Laktatdehydrogenasewert, erniedrigter Hämoglobinwert, erhöhte korrigierte Serumkalziumwerte, reduzierter Allgemeinzustand (niedriger Karnofsky-Index), Zeit zwischen Tumornephrektomie und Metastasenentstehung weniger als ein Jahr. Für Patienten ohne Risikofaktor wurde eine mittlere Überlebenszeit (MÜZ) von 30 Monaten, mit 1 oder 2 Risikofaktoren eine MÜZ von 14 Monaten und mit 3 oder mehr Risikofaktoren eine MÜZ von 5 Monaten ermittelt (Motzer et al., 2002). Problematisch ist, dass bisher kein internationaler

Konsens über die Verwendung einer einheitlichen Risikoklassifizierung besteht. Zudem stellen viele dieser Risikofaktoren unspezifische Laborwerte dar, die bei einer Reihe von Erkrankungen verändert sein können. Nicht zuletzt aus diesen Gründen wurden in dieser Arbeit die prozentualen Anteile verschiedener Oberflächenmarker im Tumor und Blut als potentielle Prognosefaktoren untersucht.

## **5.2 TIL-Vergleich zwischen Onkozytom und hellzelligem Nierenzellkarzinom**

Das Onkozytom leistet mit 5,1 % aller in dieser Studie untersuchten Tumoren neben dem papillären NZK den größten Beitrag zu den nicht hellzelligen Nierentumoren. Der Anteil der erkrankten Patienten von etwa 5 % stimmt dabei mit dem in der Literatur beschriebenen überein (Yusenko et al., 2010). Weiterhin ist bekannt, dass Patienten mit Onkozytom zum Zeitpunkt der Diagnose älter sind als Patienten mit hellzelligem NZK (Yusenko et al., 2010). In dieser Untersuchung ließ sich der Unterschied mit einem Durchschnittsalter von 70,2 Jahren bei Patienten mit Onkozytom und 67,6 Jahren bei Patienten mit hellzelligem NZK erkennen. Allerdings wurde beobachtet, dass Onkozytome sehr langsam wachsen und der Krankheitsbeginn meist bereits zwischen 30 und 50 Jahren liegt (Yusenko et al., 2010).

Als benigner Tumor bietet sich das Onkozytom zum Vergleich der Lymphozyteninfiltration mit malignen Nierentumoren an. Anhand der Studienresultate wurde verdeutlicht, dass sich das Onkozytom und das hellzellige NZK sowohl in ihrer lymphozytären Zusammensetzung als auch in der Expression funktioneller Markermoleküle unterscheiden. In der Literatur sind bisher nur wenige Daten zur lymphozytären Infiltration beim Onkozytom bekannt. Störkel und Mitarbeiter zeigten anhand von Paraffinschnitten eine geringere lymphozytäre Infiltration in Onkozytomen im Vergleich zu hellzelligen NZK (1992). In der vorliegenden Arbeit wurde beim Vergleich der Immunzellinfiltration anhand von Paraffinschnitten im hellzelligen NZK eine höhere Anzahl an T-Zellen (CD3<sup>+</sup>), CD4<sup>+</sup> T-Zellen, CD8<sup>+</sup> T-Zellen, Makrophagen (CD68<sup>+</sup>) und myeloiden Zellen (CD15<sup>+</sup>) als im Onkozytom gemessen. Allerdings war für diese Gegenüberstellung nur ein Onkozytom verfügbar. Die beschriebenen Ergebnisse müssen zukünftig durch ein größeres Onkozytomkollektiv gestützt werden, da letztlich die erhaltenen Daten aufgrund der geringen Fallzahl nicht repräsentativ sein könnten. Insgesamt veranschaulichen die durch immunhistochemische Färbungen an Paraffinschnitten gewonnenen Resultate, dass das benigne Onkozytom im Vergleich zum hellzelligen NZK in geringerem Maße von aktivierten und zytotoxischen T-Lymphozyten, Makrophagen (CD68<sup>+</sup>) und myeloiden Zellen (CD15<sup>+</sup>) infiltriert wird.

Dank der durchflusszytometrischen Ergebnisse wurde offensichtlich, dass das hellzellige NZK im Vergleich zum Onkozytom zu höheren prozentualen Anteilen von

CD4<sup>+</sup>, CD13<sup>+</sup>, CD26<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup>, CD107<sup>+</sup> und HLA-DR<sup>+</sup> T-Zellen infiltriert wird. Dagegen wurden im Onkozytom höhere Anteile an NK-Zellen entdeckt. Leider konnten, aufgrund fehlender Kompatibilität zwischen CD56-Antikörper und Färbetechnik, NK-Zellen nicht an Paraffinschnitten untersucht werden. Deshalb bleibt unklar, ob der prozentuale T-Zellanstieg beim hellzelligem NZK zu einem prozentualen NK-Zell-Rückgang führt oder ob das hellzellige NZK tatsächlich von einer geringeren Anzahl an NK-Zellen infiltriert wird. Die protektive Funktion der NK-Zellen während der Krankheitsentwicklung (Kowalczyk et al., 1997) könnte eine stärkere NK-Zellinfiltration im benignen Onkozytom im Vergleich zum malignen, hellzelligem NZK erklären.

Da es nicht möglich war, Lymphozyten aus gesundem Nierenparenchym zu analysieren, könnten die Ergebnisse der Onkozytome eine gute Basis für den Vergleich zwischen Normalgewebe und NZK bieten. Schließlich bildet das Onkozytom als benigner Tumor den histologischen Typ, welcher aus dem Kollektiv der untersuchten Tumoren dem nicht-tumoralen Nierenparenchym am meisten ähnelt. Aus der Literatur ist bekannt, dass das gesunde Nierenparenchym, ähnlich dem Onkozytom, kaum von T-Lymphozyten infiltriert wird (Schlösser, 2008). In zukünftigen Arbeiten könnte eine vergleichende Charakterisierung der Immunzellinfiltration zwischen hellzelligem NZK und Normalgewebe der Niere erprobt werden. Dies wäre ein Versuch, den Einfluss des Tumors auf die Immunzellinfiltration der Niere stärker abzubilden. Aber auch in Zukunft wird sich die Gewinnung von Nierennormalgewebe schwierig gestalten. Eine Möglichkeit bestände, indem Gewebeproben von Patienten mit NZK durch radikale Tumornephrektomie gewonnen, Tumormaterial von einem Nierenpol und Normalgewebe von einem möglichst fern liegenden, anderen Pol reseziert würden. Allerdings ist dieses Prozedere nicht bei Patienten praktikabel, die durch die zunehmend häufiger angewandte, partielle Tumornephrektomie operiert werden. Es ist zudem nicht sicher, inwieweit „normales/gesundes“ Gewebe auch wirklich „normal/gesund“ ist. Außerdem würde diese Methode den Einsatz von Kollagenase bedingen und dadurch zur Reduktion der Oberflächenmoleküle führen.

### **5.3 Prognostische Relevanz von Lymphozyteninfiltraten im Nierenzellkarzinom**

Die Lymphozytenphänotypisierung ermöglicht es, Aussagen über den Zustand des Immunsystems und die Überlebenschancen der Patienten mit NZK zu treffen. Die gewonnenen Erkenntnisse könnten in zunehmendem Maße in die Beratung der Patienten und in die Therapieentscheidung einfließen. Da im klinischen Alltag Blutproben einfacher als Tumorsektate zu gewinnen sind, war es wichtig, neben dem Expressionsverhalten verschiedener Oberflächenmoleküle auf TIL auch deren

Zusammensetzung im peripheren Blut zu erfassen. Dadurch konnte kontrolliert werden, inwieweit TIL-relevante Zusammenhänge auch für PBL zutreffen. Schließlich können wachsende Tumoren die Aktivität der Effektorlymphozyten beeinflussen, die Zusammensetzung der Immunzellinfiltrate modulieren, wobei sich diese regulatorischen Effekte während der Krankheitsprogression auf die periphere Blutzirkulation ausbreiten können.

In Übereinstimmung mit anderen Autoren nahmen T-Zellen unter den TIL in der vorliegenden Untersuchung den größten Anteil ein, gefolgt von B- und NK-Zellen (Li et al., 1998, Ruffell et al., 2010). Mittels Überlebensanalysen wurde geprüft, inwieweit ein Zusammenhang zwischen der Gesamtüberlebenszeit der Patienten mit hellzelligem NZK und den prozentualen Anteilen bestimmter Oberflächenmoleküle auf TIL sowie der Häufigkeit verschiedener Immunzellen in Paraffinschnitten besteht. In einige Arbeiten wurden bereits Zusammenhänge zwischen der Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten mit hellzelligem NZK und dem TIL-Phänotyp erfasst – mit gegensätzlichen Ergebnissen. So verwies Tomita et al. darauf, dass die Anwesenheit von Lymphozyten im NZK auf eine günstige Prognose schließen lässt (1996). Im Widerspruch dazu erkannten Kolbeck und Mitarbeiter 1992 einen Zusammenhang zwischen wachsender Tumordinfiltration durch T-Zellen und einer höheren Tumorrezidivrate. Die Gruppe um Igarashi stellte für Patienten im Stadium III und IV bei steigender Infiltration durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen sowie fallender Infiltration durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine bessere Prognose fest (2002).

### **5.3.1 Prognostische Relevanz der B-, T- und NK-Zellen**

Durch diese Arbeit ergab sich für Patienten mit geringeren Anteilen an NK-Zellen (< 15 % der Lymphozyten) im Vergleich zu denen mit Anteilen über 25 % ein signifikant höheres Sterberisiko. Es ist bisher nicht bekannt, welcher Zusammenhang zwischen der NK-Zellinfiltration und der Überlebenswahrscheinlichkeit bei Patienten mit hellzelligem NZK besteht. Bereits bei Kolon- und Bronchialkarzinomen wurde beschrieben, dass Patienten mit einer hohen tumoralen NK-Zellinfiltration eine bessere Prognose hatten als die mit geringem Anteil (Ishigami et al, 2000, Villegas et al, 2002). Allerdings zeigten Dong et al. eine mit der NK-Zellinfiltration assoziierte schlechte Überlebensprognose beim metastasierten Ovarialkarzinom. NK-Zellen scheinen in verschiedenen Tumorlokalisationen und –entitäten unterschiedliche Bedeutung zu besitzen. In der vorliegenden Untersuchung wurden für G1- und G2-Tumoren signifikant höhere Anteile an NK-Zellen im Vergleich zu G3/G4-Tumoren gemessen. Ein ähnliches Resultat präsentierten Kowalczyk et al. 1997, indem sie bei Patienten mit NZK über einen signifikant höheren NK-Zellanteil in gut als in schlecht differenzierten



Tumoren berichteten. Ferner wies diese Arbeitsgruppe auf die protektive Funktion der NK-Zellen bei der Krankheitsentwicklung hin, indem sie zeigten, dass ein geringer Anteil an NK-Zellen in Tumor und Blut mit Metastasierung assoziiert war. Damit wird deutlich, dass NK-Zellen während der Tumorentwicklung besonders wirksam abnormale Zellen zerstören können. Jedoch konnten die vorliegenden Analysen nicht erfassen, inwieweit der sinkende Anteil infiltrierender NK-Zellen in schlecht differenzierten Tumoren durch das Fehlen der NK-Zellen oder indirekt durch den T-Zellzahlanstieg bedingt war. Der in dieser Arbeit verwendete, paraffingängige Antikörper für NK-Zellen harmonisierte nicht mit der angewandten Färbemethode. Deshalb konnte keine absolute NK-Zellzahl ermittelt werden. Wäre dies möglich gewesen, hätte untersucht werden können, ob die hohen NK-Zellanteile in frühen Gradingstadien durch einen echten Zuwachs von NK-Zellen oder durch ein Fehlen der T-Zellen bedingt sind. Für zukünftige Studien sollten deshalb geeignete, paraffingängige NK-Zellantikörper verwendet werden, um nicht nur Anteile, sondern auch Absolutzahlen zu erfassen und schließlich die Lokalisation der NK-Zellinfiltration in bzw. um den Tumor zu ergründen. Die auf diese Weise gewonnenen Ergebnisse könnten anschließend mit den Ergebnissen dieser Arbeit verglichen werden und möglicherweise die immense Bedeutung der NK-Zellen für die Tumorabwehr untermauern.

Die durchflusszytometrischen Analysen zeigten in schlecht differenzierten Tumoren einen höheren Anteil an T-Zellen als in gut differenzierten Tumoren. Zudem stieg die anhand immunhistochemischer Paraffinfärbungen gemessene, intra- und peritumorale T-Zellzahl mit dem Grading an. Damit war mit Hilfe der Färbung der Paraffinschnitte zu erkennen, dass der mit zunehmender Entdifferenzierung des Tumors steigende T-Zellanteil durch eine absolute T-Zellzunahme bedingt war. Dieser Zusammenhang verdeutlicht, dass sich trotz der Anwesenheit der T-Zellen im und um die Tumorzellen des hellzelligen NZK keine effektive antitumorale Antwort zu entwickeln scheint. Diese Beobachtung ist durch einen Funktionsverlust der tumoralen T-Zellen erklärbar. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen wurde in einer Studie von Reichert et al. 1989 eine Abnahme der T-Lymphozyten, markiert mit UCHL 1 (CD45 RO), mit steigendem Grading gezeigt. Allerdings ermittelte diese Arbeitsgruppe die Ergebnisse an nur 30 hellzelligen NZK sowie mittels eines anderen Antikörpers zur Detektion der T-Zellen. Die aufgeführten Unterschiede könnten die widersprüchlichen Resultate begründen. Auch die B-Zellzahl (Paraffin) wuchs in unserer Untersuchung mit dem Grading an, obwohl bei den durchflusszytometrischen Daten keine Unterschiede im B-Zellanteil zwischen den verschiedenen Differenzierungsstufen gefunden werden konnten. Ferner wurden für Patienten mit unterschiedlichen B- und T-Zellanteilen keine signifikanten

Unterschiede im Sterberisiko berechnet. Allerdings lebten Patienten mit geringen peritumoralen T-Zellanteilen ( $< 30$  Zellen/ $2,5 \text{ mm}^2$ ) tendenziell länger als die mit über  $100$  Zellen/ $2,5 \text{ mm}^2$  (nach Kaplan-Meier). Durch größere Patientenkollektive und eine längere Nachbeobachtungszeit könnte die beschriebene Tendenz in zukünftigen Arbeiten reproduziert werden und der T-Zellanteil möglicherweise als neuer, prognostisch ungünstiger Marker Bedeutung erlangen.

Für die wichtigen Gruppen der tumorinfiltrierenden  $\text{CD4}^+$  T-Zellen und  $\text{CD8}^+$  T-Zellen wurden mit dem Grading steigende Absolutzahlen bzw. prozentuale Anteile gemessen. Weiterhin reicherten sich signifikant mehr  $\text{CD8}^+$  T-Zellen intratumoral als peritumoral an. Auch Kasper et al. zeigten 2009, dass sich bei hepatozellulären und cholangiozellulären Karzinomen  $\text{CD8}^+$  T-Zellen intratumoral und  $\text{CD4}^+$  T-Zellen peritumoral konzentrierten. Dabei könnte der Grund für die erhöhte intratumorale Anzahl  $\text{CD8}^+$  T-Zellen im engen Kontakt zu Tumorzellen liegen. Mit ihrer zytotoxischen Funktion können  $\text{CD8}^+$  T-Zellen einen direkten apoptotischen Effekt auf Tumorzellen beispielsweise über den FAS/FAS-Ligand-Signalweg entwickeln. In diesem Zusammenhang wurde bereits in vielen klinischen Studien gezeigt, dass das Ansprechen und der Erfolg einer Immuntherapie mit der Anwesenheit antitumoral wirkender  $\text{CD8}^+$  T-Lymphozyten assoziiert ist (Benchetrit et al., 2003). Allerdings können  $\text{CD8}^+$  Zellen ihre zytotoxische Effektorfunktion auch nach der Tumorinfiltration verlieren. Trotz großer Anteile  $\text{CD8}^+$  T-Lymphozyten kann es zur zunehmenden Entdifferenzierung und Progression des Tumors kommen. Dabei können Tumoren selbst immune-escape-Mechanismus entwickeln, um den Angriff durch  $\text{CD8}^+$  T-Zellen standzuhalten, indem sie Tumorantigene herunterregulieren, immunsuppressive Faktoren ausschütten, anti-apoptotische Moleküle zur Förderung des Tumorwachstums oder pro-apoptotische Faktoren, die den T-Zell-Tod induzieren, exprimieren (Benchetrit et al., 2003). Darauf bezugnehmend berichteten Nakano et al. (2001) bei Patienten mit NZK über eine Assoziation zwischen geringer Überlebenswahrscheinlichkeit und hoher Infiltration durch  $\text{CD8}^+$  T-Lymphozyten. Dementgegen konnte anhand der Resultate dieser Arbeit kein Zusammenhang zwischen der Infiltration  $\text{CD8}^+$  T-Lymphozyten und der Überlebenswahrscheinlichkeit bei Patienten mit hellzelligem NZK beschrieben werden. Diese Diskrepanz könnte durch eine größere Fallzahl ( $n = 147$ ) in Nakano's Untersuchung und unterschiedliche Methoden der T-Zellzählung bedingt sein. Zudem muss bemerkt werden, dass in Paraffinschnitten wesentlich mehr  $\text{CD8}^+$  Zellen als  $\text{CD3}^+$  Zellen gemessen wurden. Diese Beobachtung könnte durch eine unspezifische Bindung der  $\text{CD8}$ -Antikörper an NK-Zellen in Paraffinschnitten verursacht worden sein.

Wie bereits beschrieben, wird das peritumorale Gewebe bevorzugt von CD4<sup>+</sup> T-Zellen infiltriert. Damit scheint die Tumorentwicklung von einer Reaktion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen begleitet zu sein. Dazu zeigten Schreiber und Kollegen 2008, dass Tumorzellen CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten benutzen, um ein tumorfreundliches Milieu zu schaffen. Somit könnte die Infiltration durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen als Zeichen für die Anpassung des Tumors an die Umgebung gelten und das Tumorstadium begünstigen. In einer Arbeit von Bromwich et al. (2003) wird deutlich, dass schlecht differenzierte und größere Tumoren durch einen höheren Anteil CD4<sup>+</sup> T-Zellen infiltriert werden und dies mit einem schlechteren, krankheitsspezifischen Überleben assoziiert ist. Hinsichtlich Grading und T-Stadium konnte in der vorliegenden Arbeit, mittels immunhistochemischen Färbungen an Paraffinschnitten, eine höhere Anzahl CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei G3/G4- und T2-Tumoren gezeigt werden. Allerdings wurden keine Assoziationen mit dem Sterberisiko gefunden. Dies könnte an der geringeren Anzahl an Patienten mit hellzelligem NZK liegen, wobei in der vorliegenden Studie 57 Patienten und durch die Gruppe um Bromwich 73 Patienten untersucht wurden. Insgesamt stützen die Daten die Vermutung, dass tumorinfiltrierende CD4<sup>+</sup> T-Zellen dem Tumor eine günstige Umgebung zur Entwicklung bieten und dadurch die Entdifferenzierung und das Wachstum des Tumors begünstigen. In diesem Zusammenhang wurde bereits gezeigt, dass die Subpopulation der CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen in die Tumor-induzierte-Immunsuppression involviert ist (Han et al., 2009). Bei einer weiteren Untergruppe der T-Helferzellen, die der regulatorischen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> (Forkhead-Box-Protein P3) T-Zellen, ist bekannt, dass diese eine effektive, antitumorale Immunität beeinträchtigen und dadurch zur reduzierten Überlebenschance für Patienten mit Erkrankung am NZK beitragen kann (Liotta et al., 2011). Deshalb sollte in zukünftigen Untersuchungen die Gruppe der CD4<sup>+</sup> T-Zellen nicht zuletzt durch den Einsatz der 8- oder 10-Farb-Durchflusszytometrie differenzierter analysiert werden.

### **5.3.2 Prognostische Relevanz der Aktivierungsmarker auf T-Zellen**

Die Aktivierung von CXCR3 fördert die durch T-Helferzellen vermittelte T<sub>H</sub>1-Antwort (Loetscher et al., 1998, Belperio et al., 2000). Im Tumorgebiet wird die Produktion von T<sub>H</sub>1-assoziierten Chemokinen wie IP-10, MIG und MIP-1 $\beta$  angeregt. Dadurch werden T<sub>H</sub>1-Zellen in dieses Gebiet gelockt (Baggiolini, 2001). T<sub>H</sub>1-Zellen produzieren IFN- $\gamma$  und unterstützen die antitumorale Immunität durch Aktivierung von Makrophagen und CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Lymphozyten. Weiterhin beruht die T<sub>H</sub>1-Antwort auf einer IL-2-Sekretion (Kurt-Jones et al., 1987). Im Gegensatz dazu wird die T<sub>H</sub>2-Immunantwort durch Sekretion von IL-4, -5, -10 und -13 charakterisiert (Murphy et al., 2009). T<sub>H</sub>1-Zytokine inhibieren die Entwicklung der T<sub>H</sub>2-Immunität und umgekehrt. Auf diese

Weise kommt es zu einem Gleichgewicht zwischen beiden Populationen, bei dem entweder T<sub>H</sub>1- oder T<sub>H</sub>2-Zellen überwiegen und somit die Immunantwort bestimmen (Murphy et al., 2009).

Laut Kondo et al. (2006) ist eine Hochregulierung der T<sub>H</sub>1-Immunantwort im hellzelligen NZK mit einer besseren Prognose verbunden, die vor allem durch T<sub>H</sub>1-assoziierte Chemokine vermittelt wird. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bekräftigen diese Beobachtung. Denn für Patienten mit höherer CXCR3-Expression (> 80 %) wurde ein signifikant geringeres Sterberisiko im Vergleich zu denen mit geringerer CXCR3-Expression (< 55 %) erfasst. Analog zeigten Klatt und Mitarbeiter im hellzelligen NZK, dass Patienten mit geringer CXCR3-Expression (< 30 %) eine signifikant schlechtere Prognose hatten als die mit hoher Expression. Diese Arbeitsgruppe beschrieb CXCR3 als unabhängigen Faktor für erkrankungsfreies Überleben bei lokalisierten Tumoren. Dabei untersuchten sie ausschließlich Tumormaterial von Patienten, bei denen keine Lymphknoteninfiltrationen oder Metastasen diagnostiziert wurden (N0M0). Auch Crispen und Mitarbeiter brachten zum Ausdruck, dass eine verringerte CXCR3-Expression mit einem verkürzten progressionsfreien Überleben assoziiert ist und somit als unabhängiger Faktor für progressionsfreies Überleben nach Nephrektomie bei Patienten mit lokal begrenzten Tumoren gilt (Crispen et al., 2008). Zur umfassenden Erweiterung der aufgeführten Arbeiten wurden in unseren Überlebensanalysen Patienten jedes Grading- und TNM-Stadiums einbezogen. Deshalb kann CXCR3 als Prognosefaktor für das Gesamtüberleben der Patienten mit hellzelligem NZK beschrieben werden, ungeachtet der bei ihnen diagnostizierten Grading- und TNM-Stadien. Weiterhin ergaben die Analysen sowohl im Tumor als auch im Blut eine signifikant höhere mittlere Fluoreszenzintensität von CXCR3 auf T-Zellen bei Patienten mit nicht metastasierten Tumoren im Vergleich zu denen mit Metastasen. Durch diese ähnlichen Zusammenhänge zwischen CXCR3-Expression und Metastasierungsverhalten in Tumor und Blut könnte CXCR3 in der klinischen Routine als Faktor dienen, der, im Patientenblut abgenommen, immunologische Prozesse im Körper widerspiegelt und die Einschätzung der Prognose verbessert. Die Arbeitsgruppen von Cózar (2004) und Kitamura (2008) beschrieben ebenfalls einen geringeren Anteil CXCR3<sup>+</sup> T-Zellen im Blut bei Patienten mit metastasierten NZK. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass sich die bevorzugt wirkende T<sub>H</sub>1-Immunantwort bei lokalisierten Tumoren während der Progression des NZK ändert und eine sinkende T<sub>H</sub>1-Antwort, wie bei Patienten mit metastasierten Tumoren, eine geringere antitumorale Antwort bewirkt (Cózar et al., 2004). Ein Grund für diese Entwicklung der T<sub>H</sub>1-Antwort könnte darin liegen, dass Tumoren von Patienten mit Metastasierung zumeist größer sind als bei Patienten ohne Metastasen. Aufgrund der größeren

Tumormasse könnten die Tumorzellen über Produktion von IL-10 oder TGF- $\beta$  die Differenzierung der T-Helferzellen in T<sub>H</sub>1-Richtung hemmen. Obwohl in dieser Arbeit das Patientenkollektiv mit Metastasen (n = 9) gering war, lassen die Ergebnisse eine Änderung der TIL-Zusammensetzung mit sinkenden Anteilen T<sub>H</sub>1-assoziiierter Oberflächenmoleküle erkennen, welche das Tumorwachstum begünstigt und zur Suppression einer effektiven, zytotoxischen Antwort beiträgt. Auf der Basis des Vermögens einer Interferon-induzierten Chemokinproduktion, die die T<sub>H</sub>1-Antwort fördert und die Angiogenese inhibiert, könnte eine Kombination aus Immuntherapie mit Interferon und lokaler Induktion dieser Chemokine eine Rolle für die Tumorregression bei Patienten mit NZK spielen (Reckamp et al., 2008).

Für Patienten mit relativ geringer HLA-DR-Expression auf T-Zellen (< 55 %) wurde ein höheres Sterberisiko vergleichend mit denen mit starker Expression (> 80 %) errechnet. Weiterhin zeigten die Untersuchungen bei metastasierten Tumoren geringere Anteile HLA-DR<sup>+</sup> T-Zellen als bei nicht metastasierten Tumoren. Diese Resultate könnten auf die beachtliche Wirksamkeit HLA-DR<sup>+</sup> T-Zellen im Rahmen der antitumoralen Immunantwort hinweisen. Diese Beobachtung ist durch die Dominanz der T<sub>H</sub>1- über die T<sub>H</sub>2-Zellen zu begründen, da HLA-DR<sup>+</sup> T-Zellen als Marker der T-Zell-Aktivierung eine T<sub>H</sub>1-Antwort reflektieren. Zudem deutet eine Expression des Aktivierungsmarkers HLA-DR auf TIL an, dass diese Zellen durch IFN- $\gamma$  stimuliert wurden. Dies könnte durch eine IFN- $\gamma$ -Freisetzung im Tumor erklärbar sein. Van der Hove beschrieb, dass eine Stimulation mit anti-CD3-Antikörpern, welche eine Aktivierung der T-Zellen bewirkt, mit einer Hochregulation der HLA-DR-Expression assoziiert ist und dadurch die antitumorale Antwort verstärken könnte. Folgerichtig sind hohe Anteile HLA-DR<sup>+</sup> T-Zellen bei Patienten mit hellzelligem NZK aufgrund einer erfolgreichen Immunantwort gegen Tumorzellen mit einer besseren Überlebensprognose assoziiert (Van der Hove, 1997).

### **5.3.3 Prognostische Relevanz der Immunsuppressions- und Immunseneszenzmarker**

Sowohl mit wachsender Tumorgroße als auch mit zunehmender Tumorentdifferenzierung erhöhte sich der T-Zellanteil mit dem Oberflächenmarker CD69. Auch Han et al. beschrieben 2009 einen mit Tumorprogredienz steigenden Anteil CD69<sup>+</sup> T-Zellen. Dabei unterstützten CD69<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen die Suppression der CD4-T-Zell-Proliferation, dadurch die Insuffizienz der antitumoralen Antwort und letztlich das Wachstum und die Entdifferenzierung des Tumors (Han et al., 2009). In einer früheren Studie aus unserem Institut (Riemann et al., 1997) wurde eine geringe Expression CD25<sup>+</sup> Zellen im NZK gezeigt (8,4 % der T-Zellen). Deshalb ist auch in

dieser aktuellen Arbeit von einer geringen CD25-Expression auszugehen. Darausfolgend könnte der mit Grading und Tumorgröße steigende Anteil der CD69<sup>+</sup> T-Zellen auf die Beteiligung der CD69<sup>+</sup> T-Zellen als regulatorische Zellen an der Tumor-induzierten-Immunsuppression zurückzuführen sein.

Ferner wiesen schlecht differenzierte Tumoren eine signifikant höhere CTLA-4-Expression vergleichend mit gut und mäßig differenzierten Tumoren auf, wobei maximal 1,4 % der T-Zellen CTLA-4 trugen. Auch bei T3-Tumoren, die umgebende Gewebe infiltrierten, wurden signifikant höhere Anteile CTLA-4<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu kleinen T1a-Tumoren gemessen. Im Blut waren die Anteile bei Patienten mit Metastasen höher als bei denen ohne Metastasen. Diese Zusammenhänge können durch die inhibitorische Funktion des CTLA-4 im Rahmen der T-Zell-Aktivierung erklärt werden. Ein höherer CTLA-4<sup>+</sup> T-Zell-Anteil scheint mit einer gestörten antitumoralen Antwort assoziiert. Zudem wird CTLA-4 konstitutiv auf regulatorischen T-Zellen exprimiert. Wing und Mitarbeiter stellten 2008 dar, dass durch einen Mangel von CTLA-4 auf regulatorischen T-Zellen eine potente antitumorale Immunität erreicht wird. Überdies wiesen Versuche darauf hin, dass auch eine experimentelle CTLA-4-Blockade eine antitumorale Aktivität hervorruft. Infolgedessen bewirkten therapeutische Versuche mit dem blockierenden Antikörper Ipilimumab bei Patienten mit metastasiertem, hellzelligem NZK eine Tumorregression (Yang et al., 2007).

Neben wichtigen Faktoren der Immunsuppression wurden zusätzlich Marker immunseneszenter Zellen untersucht. Dabei gilt der Verlust von CD7 auf Helferzellen als Zeichen einer T-Zellalterung nach wiederholter Zellteilung (Reinhold und Abken, 1997). Bei Grading 1-Tumoren wurden höhere Anteile dieser Zellen als bei schlecht differenzierten Tumoren gefunden. Dieser Zusammenhang wäre dadurch erklärbar, dass schlecht differenzierte Tumorzellen direkt oder indirekt einen hemmenden Einfluss auf die T-Zellproliferation nehmen, während in gut differenzierten Tumoren infiltrierte T-Zellen eine optimale Umgebung zur Proliferation vorfinden. Deshalb weisen gut differenzierte Tumoren einen höheren Anteil CD4<sup>+</sup>CD7<sup>-</sup> T-Zellen auf. Weiterhin wurde für die ebenfalls mit Immunseneszenz in Verbindung stehende Lymphozytensubpopulation der CD57<sup>+</sup> T-Zellen ein höherer Anteil in gut als in schlecht differenzierten Tumoren erfasst. Dieses Ergebnis unterstützt den für CD4<sup>+</sup>CD7<sup>-</sup> T-Zellen dargestellten Zusammenhang der mit zunehmender Entdifferenzierung sinkenden Anteile immunseneszenter Zellen.

Insgesamt kann zusammenfassend dargestellt werden, dass schlecht differenzierte Tumoren durch geringere Anteile an NK-Zellen, immunseneszenten T-Zellen und T<sub>H</sub>1-assoziierten Immunzellen sowie erhöhte Anteile an CD3<sup>+</sup> Zellen und regulatorisch wirkenden T-Zellen infiltriert werden.

#### **5.3.4 Prognostische Relevanz der Makrophageninfiltration, der Blutgefäßdichte sowie des Patientenalters**

In Paraffinschnitten wurde eine signifikante Zunahme der Makrophagen (CD68<sup>+</sup>) mit Tumorgröße sowie –grading gefunden. Auch Toge et al. zeigten 2009, dass tumorinfiltrierende Makrophagen, markiert durch einen CD68-Antikörper, bei großen Tumoren und in höheren Tumorstadien einen höheren Anteil aufwiesen. Ebenso beschrieben Reichert und Kollegen 1989 eine Zunahme der intra- und peritumoralen Makrophagenzahl mit steigendem Gradingstadium. Dabei können Makrophagen im Tumor im Wesentlichen zwei verschiedene Funktionen übernehmen (Mantovani et al., 2002). Zum einen können sie „zytotoxisch“ und tumorzerstörend wirken, zum anderen „symbiotisch“ und dadurch zur Tumorproliferation und –metastasierung beitragen. In den hier dargestellten Untersuchungen könnte es sich um vorwiegend suppressiv wirkende Makrophagen handeln, die die T<sub>H</sub>1-Antwort unterdrücken sowie Vaskularisierung und dadurch Metastasierung fördern. Bereits 1993 wurde von Swisher et al. an pulmonalen Makrophagen gezeigt, dass diese die TIL-Proliferation und –Zytotoxizität supprimieren können. Komohara et al. konstatierten einen Zusammenhang zwischen einer starken Infiltration durch CD163<sup>+</sup> Zellen (antiinflammatorischer Makrophagentyp) und schlechter Prognose der Patienten mit hellzelligem NZK (Komohara et al., 2011).

Durch Toge wurde weiterhin deutlich, dass die Blutgefäßdichte, anhand der CD34-Expression gemessen, im NZK bei gut differenzierten und kleinen Tumoren am höchsten ist. Anhand der erhaltenen Daten konnte bei Grading 1/2 im Vergleich zu Grading 3/4 eine höhere peritumorale CD34-Expression verdeutlicht werden. Weiterhin wurde in nicht metastasierten Tumoren im Vergleich zu metastasierten Fällen eine signifikant höhere Anzahl peritumoraler Gefäße gefunden. Nicht zuletzt zeigt dieses Ergebnis, dass, wie bereits von Shu-Hui am squamösen Zellkarzinom der Mundhöhle beschrieben, die intratumorale Vaskularisierung für die Tumorprogression und –metastasierung bedeutsamer ist als die peritumorale (Shu-Hui et al., 2009). Während die intratumoralen Blutgefäße die Ausbreitung der Tumorzellen begünstigen, scheinen die peritumoralen einer Metastasierung entgegen zu wirken.

Ferner wurden die krankheitsspezifischen Unterschiede zwischen jungen und alten Patienten untersucht. Dabei zeigten sich bei den jüngeren Patienten unter 58 Jahren für T-Zellen, CD8<sup>+</sup> T-Zellen, CD57<sup>+</sup> T-Zellen, CCR5<sup>+</sup> T-Zellen, HLA-DR<sup>+</sup> T-Zellen und CD4<sup>+</sup>CD7<sup>-</sup> T-Zellen signifikant höhere Absolutwerte im Blut. Im Gegensatz dazu wurden für Patienten älter 70 Jahren höhere Anteile an B-Zellen, CD4<sup>+</sup> T-Zellen, CD28<sup>+</sup> T-Zellen und CD8<sup>+</sup>/CD28<sup>+</sup> T-Zellen im Blut gemessen. Weiterhin lebten die Patienten unter 58 Jahren länger (30,5 ± 6,2 Monate) als die älteren Patienten über 70

Jahren ( $20,6 \pm 2,3$  Monate). Allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant. Ein nicht signifikanter Unterschied im krankheitsspezifischen Überleben zwischen jungen und alten Patienten mit Erkrankung an einem NZK wurde bereits von anderen Autoren dargestellt (Gillett et al., 2005). Einige Gruppen berichteten beim NZK über ein signifikant längeres Überleben jüngerer Patienten (Sanchez-Ortiz et al., 2004). Während bei den jüngeren Patienten 42 % der Tumoren im Stadium T1a und 8 % als T3-Tumoren klassifiziert wurden, wurden bei den über 70-jährigen Krebspatienten 26 % der Tumoren im T1a- und 44 % im T3-Stadium entfernt. Insgesamt konnten anhand der Tumorproben der Patienten nur wenige Unterschiede zwischen den einzelnen Altersgruppen festgestellt werden. Eine Ursache könnte in der Festlegung ungeeigneter Altersgrenzen liegen. Es wurde eine nur geringe Anzahl erkrankter Patienten unter 50 Jahren untersucht. Gelingt es zukünftig in Arbeiten mit höheren Fallzahlen mehr Patienten unter 50 Jahren zu rekrutieren, könnten sich möglicherweise vielfältigere Unterschiede zwischen den Patientengruppen ergeben.

#### **5.4 Ausblick**

Eine vielfältigere, phänotypische und funktionelle Charakterisierung der Lymphozytensubpopulationen könnte Rückschlüsse auf ihre Aufgaben und Fähigkeiten im Tumor und eventuelle Gründe für ausbleibende, tumorzerstörende Aktivitäten aufdecken. In der Zeit von Beginn der Anfertigung dieser Arbeit bis heute sind weitere Lymphozytensubpopulationen mit dafür charakteristischen Oberflächenmarkern erkannt wurden, die in den Prozess der antitumoralen Abwehr eingreifen könnten und zu Beginn dieser Analyse noch nicht hinreichend bekannt waren. Es sollten beispielsweise  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  T-Zellen und  $CD4^+CD69^+CD25^-$  T-Zellen in zukünftigen Studien analysiert werden, nicht zuletzt um die in dieser Arbeit vermuteten Zusammenhänge zu bestätigen oder zu verwerfen. Ebenso könnte die durchflusszytometrische Charakterisierung tumorinfiltrierender Makrophagen das Verständnis intratumoraler Immunprozesse erleichtern, wobei Makrophagen u.a. durch die Anwendung der Oberflächenmoleküle CD163 und CD204 gemessen werden könnten. Insgesamt sollte zukünftig die Möglichkeit der 8- bzw. 10-Farbmessung zur genaueren Darstellung der tumorinfiltrierenden Immunzellen genutzt werden.

Ebenso sollten die nächsten Analysen an Paraffinschnitten mit einer breiteren Vielfalt etablierter, paraffingängiger Antikörper durchgeführt werden.

In spe sollten größere Patientenkollektive mit hellzelligem NZK und anderen Tumorentitäten untersucht werden, um vergleichende Beobachtungen beispielsweise zwischen hellzelligem NZK und Onkozytom durch größere Stichproben zu stützen.



## 6. Zusammenfassung

Mit Hilfe der Immunphänotypisierung der TIL und PBL bei Patienten mit NZK wurde versucht, eine Momentaufnahme des Infiltrationsmusters verschiedener Immunzellen abzubilden, um daraus Schlussfolgerungen für die Überlebensprognose zu ziehen. Bei der Interpretation der gewonnenen Daten fanden klinische und histologische Parameter Berücksichtigung.

Im Vergleich zu ähnlichen Studien wurde in dieser Arbeit ein größeres Kollektiv geprüft, das 119 Patienten umfasste und für die Gruppe der Patienten mit Nierentumorerkrankungen repräsentativ war. Dabei wurden Tumoren häufiger histologischer Typen der Niere untersucht, die sich zum Zeitpunkt der operativen Entfernung in unterschiedlichen Grading- und TNM-Stadien befanden. Es wurde anders als in vielen anderen Arbeiten, in denen sich die Untersuchungen auf hellzellige NZK in bestimmten Tumor- und Metastasierungsstadien beschränkten, in dieser Dissertation die gesamte Vielfalt der tumorösen Nierenerkrankungen analysiert.

Bei den durchflusszytometrischen Messungen der Tumor- und Blutproben und immunhistochemischen Färbungen der Paraffinschnitte wurde eine Fülle an mAk verwendet, die ein umfangreiches Spektrum lymphozytärer Oberflächenmoleküle sowie Makrophagen und Blutgefäße detektierten.

Durch die Ergebnisse dieser Arbeit wurde deutlich, dass sich Onkozytome und hellzellige NZK sowohl in ihrer lymphozytären Zusammensetzung als auch in der Expression funktioneller Markermoleküle unterscheiden. Da Informationen zum Lymphozytenvorkommen in Nierengewebe von Gesunden nicht verfügbar waren, sollten die Immunzellinfiltrate des benignen Onkozytoms als Vergleichsparameter für die in hellzelligen NZK nachgewiesenen Lymphozytenpopulationen dienen.

Für einen hohen Anteil an tumorinfiltrierenden NK-Zellen wurde eine höhere Überlebenswahrscheinlichkeit als für die NZK-Patienten mit geringen Anteilen ermittelt. Dies könnte auf eine protektive Wirkung der NK-Zellen im Rahmen des Tumorwachstums hinweisen. Inwieweit der prozentuale Anteil der NK-Zellen vom T-Zellanteil abhängt, könnte nur durch die Zählung der NK-Zellen in Paraffinschnitten in zukünftigen Untersuchungen festgestellt werden. Ebenso war ein hoher Anteil der Aktivierungsmarker CXCR3 und HLA-DR auf T-Zellen günstig für die Überlebensprognose. Deshalb scheint eine hohe Expression dieser Oberflächenmoleküle mit einer wirksamen antitumoralen Aktivität assoziiert. Für CD69 und CTLA-4 wurden höhere Expressionen bei schlecht differenzierten Tumoren im Vergleich zu gut differenzierten Tumoren gemessen. Daher könnten CD69<sup>+</sup> T-Zellen und CTLA-4<sup>+</sup> T-Zellen in die tumorale Immunsuppression integriert sein. Durch diese Ergebnisse wird deutlich, dass bestimmte Markermoleküle prognostisch relevant sind

und zukünftig eine Grundlage in der Beratung und patientenorientierten Therapieentscheidung bilden könnten, indem sie als Marker zur Prognose der Überlebenswahrscheinlichkeit in die Behandlung einbezogen werden. Schließlich ist eine möglichst genaue Einschätzung des individuellen Risikos der Tumorprogression und -mortalität essentiell, um Patienten zu beraten, individualisierte Beobachtungsprotokolle zu erstellen und Patienten für geeignete Therapiepläne und neue klinische Studien auszuwählen.

In zukünftigen Studien sollten die Ursachen für die beschriebenen Zusammenhänge zwischen der Tumordinfiltration bestimmter Lymphozytenpopulationen und der Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten ergründet werden. Dies könnte die Chance bieten, neben der Prognosebeurteilung das Langzeitüberleben der Patienten durch ein geeignetes Therapieverfahren zu verbessern.

## 7. Literaturverzeichnis

- Alexander J**, Kudoh S, Melsop K, Hamilton TA, Edinger MG, Tubbs RR, Sica D, Tuason L, Klein E, Bukowski RM (1993) T cells infiltrating renal cell carcinoma display a poor proliferative response even though they can produce interleukin 2 and express interleukin 2 receptors. *Cancer Res* 53:1380-1387.
- Amato RJ** (2000) Chemotherapy for renal cell carcinoma. *Semin Oncol* 27:177-186.
- Annunziato F**, Galli G, Cosmi L, Romagnani P, Manetti R, Maggi E, Romagnani S (1998) Molecules associated with human T<sub>H</sub>1 or T<sub>H</sub>2 cells. *Eur Cytokine Netw* 9:12-16.
- Atzpodien J**, Schmitt E, Gertenbach U, Fornara P, Heynemann H, Maskow A, Ecke M, Woltjen HH, Jentsch H, Wieland W, Wandert T, Reitz M (2005) Adjuvant treatment with interleukin-2- and Interferon-alpha2a-based chemoimmunotherapy in renal cell carcinoma post tumor nephrectomy: Results of a prospectively randomised Trial of the German Cooperative Renal Carcinoma Chemoimmunotherapy Group (DGCIN). *Br J Cancer* 92:843-846.
- Autenrieth M**, Kübler H, Gschwend JE (2010) Adjuvante postoperative Therapie beim Nierenzellkarzinom. *Onkologie* 16:150-156.
- Baggiolini M** (2001) Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med* 250:91-104.
- Becker N**, Wahrendorf J (2008) Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland. Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg (<http://www.dkfz-heidelberg.de>)
- Beldegrun A**, Muul LM, Rosenberg SA (1988) Interleukin 2 expanded tumor infiltrating lymphocytes in human renal cell cancer: isolation, characterization, and antitumor activity. *Cancer Res* 48:206-214.
- Belperio JA**, Keane MP, Arenberg DA, Addison CL, Ehlert JE, Burdick MD, Strieter RM (2000) CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol* 68:1.
- Benchetrit F**, Gazagne A, Adotevi O, Haicheur N, Godard B, Badoual C, Fridman WH, Tartour E (2003) Cytotoxic T lymphocytes: role in immunosurveillance and in immunotherapy. *Bull Cancer* 90:677-685.
- Betts MR**, Brenchley JM, Price DA, De Rosa SC, Douek DC, Roederer M, Koup RA (2003) Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods* 281:65-78.
- Bromwich EJ**, McArdle PA, Canna K, McMillan DC, McNicol A-M, Brown M, Aitchison M (2003) The relationship between T-lymphocyte infiltration, stage, tumour grade and survival in patients undergoing curative surgery for renal cell cancer. *British J of Cancer* 89:1906-1908.

- Cabestre FA**, Lefebvre S, Moreau P, Rouas-Friess N, Dausset J, Carosella ED, Paul P (1999) HLA-G expression: immune privilege for tumour cells? *Semin Cancer Biol* 9:27.
- Cantoni C**, Bottino C, Vitale M, Pessino A, Augugliaro R, Malaspina A, Parolini S, Moretta L, Moretta A, Biassoni R (1999) NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily. *J Exp Med* 189:787-796.
- Chambers CA**, Allison JP (1999) Costimulatory regulation of T cell function. *Curr Opin Biol* 11:203.
- Cózar JM**, Canton J, Tallada M, Concha A, Cabrera T, Garrido F, Osuna FRC (2005) Analysis of NK cells and chemokine receptors in tumor infiltrating CD4 T lymphocytes in human renal carcinomas. *Cancer Immunol Immunother* 54:858-866.
- Crispen PL**, Boorjian SA, Lohse CM, Leibovich BC, Kwon ED (2008) Predicting disease progression after nephrectomy for localized renal cell carcinoma: the utility of prognostic models and molecular biomarkers. *Cancer* 113:450-460.
- Di Girolamo W**, Coronato S, Portiansky E, Laguens G (2008) Profile of immune cells in lymph nodes draining human malignant tumors. *Medicina (B. Aires)* 68:423-427.
- Dong HP**, Elstrand MB, Holth A, Silins I, Berner A, Trope CG, Davidson B, Risberg B (2006) NK- and B-Cell infiltration correlates with worse outcome in metastatic ovarian carcinoma. *Am J Clin Pathol* 125:451-458.
- Escudier B**, Choueiri TK, Oudard S, Szczylik C, Négrier S, Ravaud A, Chevreau C, Venner P, Champagne P, Croteau D, Dupont E, Hariton C, Bukowski RM (2007) Prognostic factors of metastatic renal cell carcinoma after failure of immunotherapy: new paradigm from a large phase III trial with shark cartilage extract AE 941. *J Urol* 178:1901-1905.
- Figlin RA**, Abi-Aad AS, Belldegrun A, de Kernion JB (1991) The role of interferon and interleukin-2 in the immunotherapeutic approach to renal cell carcinoma. *Semin Oncol* 18:102.
- Finke JH**, Rini B, Ireland J, Rayman P, Richmond A, Golshayan A, Wood L, Elson P, Garcia J, Dreicer R, Bukowski R (2008) Sunitinib reverses type-1 immune suppression and decreases T-regulatory cells in renal cell carcinoma patients *Clin Cancer Res* 14:6674-6682.
- Focosi D**, Bestagno M, Burrone O, Petrini M (2010) CD57<sup>+</sup> T lymphocytes and functional immune deficiency. *J Leukoc Biol* 87:107-116.
- Franceschi C**, Bonafè M, Valensin S (2000) Human immunosenescence: the prevailing of innate immunity, the failing of clonotypic immunity, and the filling of immunological space. *Vaccine* 18:1717-1720.

- Frank I**, Blute ML, Leibovich BC, Cheville JC, Lohse CM, Zinke H (2005) Independent validation of the 2002 American Joint Committee on Cancer primary tumor classification for renal cell carcinoma using a large, single institution cohort. *J Urol* 173:1889-1892.
- Frankenberger B**, Noessner E, Schendel DJ (2007) Immune suppression in renal cell carcinoma. *Semin Cancer Biol* 17:330–343.
- Fridman WH**, Galon J, Dieu-Nosjean MC, Cremer I, Fisson S, Damotte D, Pagès F, Tartour E, Sautès-Fridman C (2011) Immune infiltration in human cancer: prognostic significance and disease control. *Curr Top Microbiol Immunol* 344:1-24.
- Furge KA**, Dykema K, Petillo D, Westphal M, Zhang Z, Kort EJ, Teh BT (2007) Combining differential expression, chromosomal and pathway analyses for the molecular characterization of renal cell carcinoma. *Can Urol Assoc J* 1:21-27.
- Gillett MD**, Cheville JC, Karnes RJ, Lohse CM, Kwon ED, Leibovich BC, Zinke H, Blute ML (2005) Comparison of presentation and outcome for patients 18 to 40 and 60 to 70 years old with solid renal masses. *J Urol* 173:1893.
- Ginés S**, Marino M, Mallol J, Canela EI, Morimoto C, Callebaut C, Hovanessian A, Casado V, Lluís C, Franco R (2002) Regulation of epithelial and lymphocyte cell adhesion by adenosine deaminase-CD26 interaction. *Biochem J* 361:203-209.
- Griffiths RW**, Elkord E, Gillham DE, Ramani V, Clarke N, Stern PL, Hawkins RE (2007) Frequency of regulatory T cells in renal cell carcinoma patients and investigation of correlation with survival. *Cancer Immunol Immunother* 56:1743-1753.
- Haferkamp A**, Rohde D, Müller SC, Rübber H, Hohenfellner M (2006) Das Nierenzellkarzinom. *Urologe* 45:74-84.
- Han Y**, Guo Q, Zhang M, Chen Z, Cao X (2009) CD69<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells, a new subset of regulatory T cells, suppress T cell proliferation through membrane-bound TGF- $\beta$ 1. *J Immunol* 182:111-120.
- Hase S**, Weinitschke K, Fischer K, Fornara P, Hoda R, Unverzagt S, Seliger B, Riemann D (2011) Monitoring peri-operative immune suppression in renal cancer patients. *Oncology reports* 25:1455-1464.
- Hatzinger R**, Nagel H: PASW Statistics: Statistische Methoden und Fallbeispiele. Pearson Education Deutschland GmbH, München, 2009.
- Holness CL**, Simmons DL (1993) Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood* 81:1607-1613.

- Husmann G**, Kaatsch P, Katalinic A, Bertz J, Haberland J, Kraywinkel K, Wolf U: Krebs in Deutschland 2005/2006 Häufigkeiten und Trends. 7. Aufl. Robert-Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., Berlin, 2010.
- Igarashi T**, Takahashi H, Tobe T, Suzuki H, Mizoguchi K, Nakatsu HO, Ito H (2002) Effect of tumor-infiltrating lymphocyte subsets on prognosis and susceptibility to interferon therapy in patients with renal cell carcinoma. *Urol Int* 69:51-56.
- Ishigami S**, Natsugoe S, Tokuda K, Nakajo A, Che X, Iwashige H, Aridome K, Hokita S, Aikou T (2000) Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer* 88:557.
- June CH**, Ledbetter JA, Linsley PS, Thompson CB (1990) Role of the CD28 receptor in T-cell activation. *Immunol Today* 11:211.
- Jurczok A**, Hamza A, Nill A, Gerbershagen HP, Fornara P (2006) The value of laparoscopic kidney surgery in urology. *Urologe A* 45:1114-1117.
- Kath R** (2005) Nierenzellkarzinom: Diagnostik und systemische Therapieoptionen *Onkologe* 11:593-606.
- Kennedy R**, Celis E (2008) Multiple roles for CD4<sup>+</sup> T cells in antitumor immune response. *Immunol Rev* 222:129-144.
- Kim CH**, Broxmeyer HE (1999) Chemokines: signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function. *J Leukoc Biol* 65:6-15.
- Kim HL**, Beldegrun AS, Freitas DG, Bui MH, Han KR, Dorey FJ, Figlin RA (2003) Paraneoplastic signs and symptoms of renal cell carcinoma: implications for prognosis. *J Urol* 170:1742–1746:
- Kitamura H**, Iwakabe K, Yahata T, Nishimura S, Ohta A, Ohmi Y, Sato M, Takeda K, Okumura K, Van Kaer L, Kawano T, Taniguchi M, Nishimura T (1999) The natural killer T (NKT) cell ligand alpha-galactosylceramide demonstrates its immunopotentiating effect by inducing interleukin (IL)-12 production by dendritic cells and IL-12 receptor expression on NKT cells. *J Exp Med* 189:1121-1128.
- Kitamura H**, Tsukamoto T (2008) Prognostic biomarkers of renal cell carcinoma: recent advances. *Indian J Urol* 24:10-15.
- Klatte T**, Seligson DB, Leppert JT, Riggs SB, Yu H, Zomorodian N, Kabbinavar FF, Strieter RM, Beldegrun AS, Pantuck AJ (2008) The chemokine receptor CXCR3 is an Independent prognostic factor in patients with localized clear cell renal cell carcinoma. *T J of Urology* 179:61-66.
- Kolbeck PC**, Kaveggia FF, Johansson SL, Grune MT, Taylor RJ (1992) The relationships among tumor-infiltrating lymphocytes, histopathologic findings, and long-term clinical follow-up in renal cell carcinoma. *Mod Pathol* 5:420-425.

- Komohara Y**, Hasita H, Ohnishi K, Fujiwara Y, Suzu S, Eto M, Takeya M (2011) Macrophage infiltration and its prognostic relevance in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Sci* 10:1349.
- Kondo T**, Nakazawa H, Ito F, Hashimoto Y, Osaka Y, Futatsuyama K, Toma H, Tanabe K (2006) Favorable prognosis of renal cell carcinoma with increased expression of chemokines associated with a T<sub>H</sub>1-type immune response. *Cancer Sci* 97:780-786.
- Kowalczyk D**, Skorupski W, Kwias Z, Nowak J (1997) Flow cytometric analysis of tumour infiltrating lymphocytes in patients with renal cell carcinoma. *Br J Urol* 80:543-547
- Krummel MF**, Allison JP (1995) CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med* 182:459-465.
- Kuczyk M**, Kruck S, Merseburger AS (2007) Wirksamkeit von Multikinaseinhibitoren in der Therapie des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms. *Urologe* 46:504-510.
- Kuroschi M**, Buse S, Bedke J, Wagener N, Haferkamp A, Hohenfellner M (2007) Palliative und supportive Therapie des Nierenzellkarzinoms. *Urologe* 46:40-44.
- Kurt-Jones EA**, Hamberg S, Ohara J, Paul WE, Abbas AK (1987) Heterogeneity of helper/inducer T lymphocytes. I. Lymphokine production and lymphokine responsiveness. *J Exp Med* 166:1774.
- Lanier LL**, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH (1986) The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *Journal of Immunol* 136:4480-4486.
- Li Y**, Hou S, Zhang X, Zhang G, Zhu J, Wang X (1998) Subpopulations of TIL in renal cell carcinoma and their clinical significance. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 36:314-316.
- Liotta F**, Gacci M, Frosali F, Querci V, Vittori G, Lapini A, Santarasci V, Serni S, Cosmi L, Maggi L, Angeli R, Mazzinghi B, Romagnani P, Maggi E, Carini M, Romagnani S, Annunziato F (2011) Frequency of regulatory T cells in peripheral blood and in tumour-infiltrating lymphocytes correlates with poor prognosis in renal cell carcinoma. *BJU Int* 107:1500-1506.
- Loetscher M**, Loetscher P, Brass N, Meese E, Moser B (1998) Lymphocyte-specific chemokine receptor CXCR3: regulation, chemokine binding and gene localization. *Eur J Immunol* 28:3696.
- Loken MR**, Shah VO, Dattilio KL, Civin CI (1987) Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B lymphocyte development. *Blood* 70:1316-24.
- Mantovani A**, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A (2002) Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 23:549-555.

- McNicholl JM**, Smith DK, Qari SH, Hodge T (1997) Host genes and HIV: the role of the chemokine receptor gene CCR5 and its allele. *Emerg Infect Dis* 3:261-271.
- Mondino A**, Jenkins MK (1994) Surface proteins involved in T cell costimulation. *J Leukoc Biol* 55:805-815.
- Morita M**, Motoki K, Akimoto K, Natori T, Sakai T, Sawa E, Yamaji K, Koezuka Y, Kobayashi E, Fukushima H (1995) Structure-activity relationship of alpha-galactosylceramides against B16-bearing mice. *J Med Chem* 38:2176-2187.
- Motzer RJ**, Bacik J, Murphy BA, Russo P, Mazumdar M (2002) Interferon-alfa as a comparative treatment for clinical trials of new therapies against advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 20:289-96.
- Murphy KM**, Travers P, Walport M: *Janeway Immunologie*. 7. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2009.
- Nakamura E**, Kubota H, Sato M, Sugie T, Yoshida O, Minato N (1997) Involvement of NK1<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> alpha beta T cells and endogenous IL-4 in non-MHC-restricted rejection of embryonal carcinoma in genetically resistant mice. *J Immunol* 158:5338-5348
- Nakano O**, Sato M, Naito Y, Suzuki K, Orikasa S, Aizawa M, Suzuki Y, Shintaku I, Nagura H, Ohtani H (2001) Proliferative activity of intratumoral CD8<sup>+</sup> T lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity. *Cancer Res* 61:5132-5136.
- Ohteki, T**, Okuyama R, Seki S, Abo T, Sugiura K, Kusumi A, Ohmori T, Watanabe H, Kumagai K (1992) Age-dependent increase of extrathymic T cells in the liver and their appearance in the periphery of older mice. *J Immunol* 149:1562-1570.
- Pizzocaro G**, Piva L, Di Fronzo G, Giongo A, Cozzoli A, Dormia E, Minervini S, Zanollo A, Fontanella U, Longo G (1987) Adjuvant medroxyprogesteron acetate to radical nephrectomy in renal cancer: 5-year results of a prospective randomized study. *J Urol* 138:1379-1381.
- Pomer S**, Staehler G (1998) Biologische Marker beim Nierenzellkarzinom. *Onkologe* 4: 229-236.
- Reckamp KL**, Strieter RM, Figlin RA (2008) Chemokines as therapeutic targets in renal cell carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 8:887-893.
- Reichert T**, Störkel S, Kipping G, Thoenes W (1989) Lymphozyten- und Makrophageninfiltration in Nierenzellkarzinomen und Onkozytomen. *Verh Dtsch Ges Path* 73:639.
- Reinhold U**, Abken H (1997) CD4<sup>+</sup> CD7<sup>-</sup> T cells: a separate subpopulation of memory T cells?. *J Clin Immunol* 17:265-271.



- Riemann D**, Kehlen A, Langner J (1995) Stimulation of the expression and the enzyme activity of aminopeptidase N/CD13 and dipeptidylpeptidase IV/CD26 on human renal cell carcinoma cells and renal tubular epithelial cells by T cell-derived cytokines, such as IL-4 and IL-13. *Clin Exp Immunol* 100:277-283.
- Riemann D**, Wenzel K, Schulz T, Hofmann S, Neef H, Lautenschläger C, Langner J (1997) Phenotypic analysis of T lymphocytes isolated from non-small-cell lung cancer. *Int Arch Allergy Immunol* 114:38-45.
- Riemann D**, Kehlen A, Langner J (1999) CD13-not just a marker in leukemia typing. *Immunol Today* 20:83-88.
- Riley JK**, Sliwkowski MX (2000) CD20: a gene in search of a function. *Semin Oncol* 27:17-24.
- Ruffell B**, DeNardo DG, Affara NI, Coussens LM (2010) Lymphocytes in cancer development: Polarization towards pro-tumor immunity. *Cytokine Growth Factor Rev* 21:3-10.
- Sallusto F**, Lanzavecchia A, Mackay CR (1998) Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-mediated responses. *Immunol Today* 19:568-574.
- Sanchez-Ortiz RF**, Rosser CJ, Madsen LT, Swanson DA, Wood CG (2004) Young age is an independent prognostic factor for survival of sporadic renal cell carcinoma. *J Urol* 171:2160.
- Schenck M**, Muegge LO (2010) "Targeted therapy" bei metastasiertem Nierenzellkarzinom. *Onkologie* 16:157-167.
- Schlösser H** (2008) Phänotypische Charakterisierung des Immuneffektorzellinfiltrates beim primären Nierenzellkarzinom
- Schreiber H**, Wu TH, Nachman J, Rowley DA (2000) Immunological enhancement of primary tumor development and its prevention. *Semin Cancer Biol* 10:351-357.
- Seliger B**, Atkins D, Bock M, Ritz U, Ferrone S, Huber C, Störkel S (2003) Characterization of human lymphocyte antigen class I antigen-processing machinery defects in renal cell carcinoma lesions with special emphasis on transporter-associated with antigen-processing down-regulation. *Clin Cancer Res* 9:1721-1727.
- Shu-Hui Li**, Pei-Hsin Hung, Kuo-Chou Chou, Su-Hua Hsieh, Yi-Shing Shieh (2009) Tumor angiogenesis in oral squamous cell carcinomas: the significance of endothelial markers and hotspot selection. *J Med Sci* 29:067-074.
- Sivori S**, Parolini S, Marcenaro E, Millo R, Bottino C, Moretta A (2000a) Triggering receptors involved in natural killer cell-mediated cytotoxicity against choriocarcinoma cell lines. *Hum Immunol* 61:1055-1058.

- Sivori S**, Parolini S, Marcenaro E, Castriconi R, Pende D, Millo R, Moretta A (2000b) Involvement of natural cytotoxicity receptors in human natural killer cell-mediated lysis of neuroblastoma and glioblastoma cell lines. *J Neuroimmunol* 107:220-225.
- Smyth MJ**, Godfrey DI (2000) NKT cells and tumor immunity--a double-edged sword. *Nat Immunol* 1:459-460.
- Störkel S**, Keymer R, Steinbach F, Thoenes W (1992) Reaction patterns of tumor infiltrating lymphocytes in different renal cell carcinomas and oncocytomas. *Prog Clin Biol Res* 378:217-23.
- Störkel S** (1993) *Karzinome und Onkozytome der Niere*, Fischer, Stuttgart.
- Swisher SG**, Kiertscher SM, Golub SH, Holmes EC, Roth MD (1993) Pulmonary macrophages suppress the proliferation and cytotoxicity of tumor-infiltrating lymphocytes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 8:486-492.
- Sze DMY**, Giesajtis G, Brown RD, Raitakari M, Gibson J, Ho J, Baxter AG, Fazekas de St Groth B, Basten A, Joshua DE (2001) Clonal cytotoxic T cells are expanded in myeloma and reside in the CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> compartment. *Blood* 98:2817-2827.
- Tarhini AA**, Iqbal F (2010) CTLA-4 blockade: therapeutic potential in cancer treatments. *Onco Targets and Therapy* 3:15-25.
- Toge H**, Inagaki T, Kojimoto Y, Shinka T, Hara I (2009) Angiogenesis in renal cell carcinoma: the role of tumor-associated macrophages. *Int J Urol* 16:801-817.
- Tomita K**, Okui N, Kimura A, Kawamura T, Teshima S, Itami M (1996) Prognostic significance of histopathological findings (including lymphocyte infiltration) in renal cell carcinoma. *Hinyokika Kiyo* 42:925-930.
- Trinchieri G** (1995) Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Ann Rev Immunol* 13:251-76.
- Van den Hove LE**, Van Gool SW, Van Poppel H, Baert L, Coorevits L, Van Damme B, Ceuppens JL (1997) Phenotype, cytokine production and cytolytic capacity of fresh (uncultured) tumour-infiltrating T lymphocytes in human renal cell carcinoma. *Clin Exp Immunol* 109:501-509.
- Vermeulen PB**, Gasparini G, Fox SB, Toi M, Martin L, McCulloch P, Pezzella F, Viale G, Weidner N, Harris AL, Dirix LY (1996) Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer* 32:2474-2484.
- Villegas FR**, Coca S, Villarrubia VG, Jimenez R, Chillon MJ, Jareno J, Zuñiga M, Callol L (2002) Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset X<sup>+</sup>CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer* 35:23.

- Vitale M**, Bottino C, Sivori S, Sanseverino L, Castriconi R, Marcenaro E, Augugliaro R, Moretta L, Moretta A (1998) NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J Exp Med* 187:2065-2207.
- Volm M**, Kastel M, Mattern J, Efferth T (1993) Expression of resistance factors (P glycoprotein, glutathione S-transferase-pi, and topoisomerase II) and their interrelationship to proto-oncogene products in renal cell carcinomas. *Cancer* 7:3981-3987.
- Volpe A**, Patard JJ (2010) Prognostic factors in renal cell carcinoma. *World J Urol* 28:319-27.
- Von Bonin A**, Hühn J, Fleischer B (1998) Dipeptidyl-peptidase IV/CD26 on T cells: analysis of an alternative T-cell activation pathway. *Immunol Rev* 161:43-53.
- Watanabe H**, Miyaji C, Kawachi Y, Iiai T, Ohtsuka K, Iwanage T, Takahashi-Iwanaga H, Abo T (1995) Relationships between intermediate TZR cells and NK1.1<sup>+</sup> T cells in various immune organs. NK1.1<sup>+</sup> T cells are present within a population of intermediate TZR cells. *J Immunol* 155:2972-2983.
- Wechsel HW**, Becker G, Bichler KH, Bokemeyer C, Feil G, Kortmann RD, Loeser W, Pfannenbergl C, Pressler H, Sötker: Nierenzellkarzinom, Empfehlung zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Interdisziplinäres Tumorzentrum, Eberhard-Karls-Universität Tübingen 2000
- Whiteside T**, Rabinowich R (1998) The role of Fas/FasL in immunosuppression induced by human tumors. *Cancer Immunol Immunother* 46:175-184.
- Wing K**, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, Nomura T, Sakaguchi S (2008) CTLA-4 control over Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell function. *Science* 322:271-275.
- Yang JC**, Hughes M, Kammula U, Royal R, Sherry RM, Topalian SL, Suri KB, Levy C, Allen T, Mavroukakis S, Lowy I, White DE, Rosenberg SA (2007) Ipilimumab (anti-CTLA-4 antibody) causes regression of metastatic renal cell cancer associated with enteritis and hypophysitis. *J Immunother* 30:825-830.
- Yusenkov MV** (2010) Molecular pathology of renal oncocytoma: A review. *International J of Urology* 17:602-614.
- Ziegler A**, Lange S, Bender R (2007) Überlebensanalyse: Eigenschaften und Kaplan-Meier Methode. *Dtsch Med Wochenschr* 132: 36-38.
- Ziegler SF**, Ramsdell F, Alderson MR (1994) The activation antigen CD69. *Stem Cells* 12:456-465.
- Zigeuner R**, Pummer K (2009) Aktuelle chirurgische Aspekte des Nierenzellkarzinoms. *Wien Med Wochenschr* 159:535-542.

## 8. Tabellenanhang

Tabelle 10: TNM-Klassifikation des Nierenzellkarzinoms (UICC 2002)

T	Primärtumor
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Hinweis auf einen primären Nierentumor
T1	Tumor begrenzt auf die Niere und < 7 cm
T1a	Tumor begrenzt auf die Niere und < 4 cm
T1b	Tumor begrenzt auf die Niere und > 4 cm und < 7 cm
T2	Tumor begrenzt auf die Niere und > 7 cm
T3	Tumor infiltriert das umliegende Gewebe wie größere Venen, Nebenniere oder das perirenale Gewebe, breitet sich jedoch nicht über die Gerota-Faszie aus
T3a	Tumor infiltriert das perirenale Gewebe oder Nebenniere
T3b	Tumor infiltriert die Nierenvene(n) oder Vena cava unterhalb des Zwerchfells
T3c	Tumor infiltriert die Vena cava oberhalb des Zwerchfells, Wandinfiltration Vena cava
T4	Tumor infiltriert die Gerota-Faszie
N	Regionäre Lymphknoten
NX	Regionärer Lymphknotenstatus kann nicht beurteilt werden
N0	Keine Lymphknotenmetastasen
N1	Lymphknotenmetastase < 2 cm
N2	Lymphknotenmetastase(n) 2-5 cm
N3	Lymphknotenmetastase(n) > 5 cm
M	Fernmetastase
MX	Unbekannter Fernmetastasenstatus
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
G	Grading
GX	Differenzierungsgrad unbekannt
G0	Nierenadenom
G1	Gut differenziertes Nierenzellkarzinom
G2	Mäßig differenziertes Nierenzellkarzinom
G3	Schlecht differenziertes Nierenzellkarzinom
G4	Undifferenziertes/anaplastisches Nierenzellkarzinom

Tabelle 11: Vergleich der Lymphozytencharakteristika verschiedener Tumorsubtypen der Niere

			Subtypen des Nierentumors					
			A	B	C	D	E	F
% der Lymphozyten	B-Zellen	MW±SEM	3,6±0,4	5,0±2,3	6,1±2,5	6,5±4,2	1,3±0,4	0,4
		Median	2,6	2,2	3,8	2,9	1,5	0,4
		Spanne Anzahl	0,3–27,7 91	1,1–15,0 6	0,2–15,8 6	1,2–19,0 4	0,6–1,8 3	1
% der Lymphozyten	NK-Zellen	MW±SEM	20,0±1,3	24,4±3,4	46,6±5,6	22,8±5,6	12,9±7,5	7,7
		Median	18,8	25,6	46,0	23,1	10,7	7,7
		Spanne Anzahl	2,4–69,1 91	10,7–34,1 6	28,4–64,9 6	10,5–34,4 4	1,0–26,8 3	1
% der Lymphozyten	T-Zellen	MW±SEM	76,4±1,4	70,5±4,1	47,4±7,9	70,7±4,3	85,9±7,8	91,9
		Median	77,2	67,1	50,2	69,3	87,8	91,9
		Spanne Anzahl	28,4–96,2 91	61,7–88,3 6	19,3–69,9 6	61,9–82,3 4	71,4–98,4 3	1
% NK	NK p44	MW±SEM	9,3±1,2	36,0±14,5	8,7±4,7	17,3±4,5	28,1±16,2	12,6
		Median	5,0	27,8	5,2	17,4	16,8	12,6
		Spanne Anzahl	0,0–66,8 92	3,2–85,3 6	1,6–31,8 6	6,2–28,2 4	7,4–60,0 3	1
% der T-Zellen	CD4	MW±SEM	49,7±1,4	55,5±5,1	40,3±3,6	57,0±7,4	46,2±10,2	48,2
		Median	50,4	54,7	42,4	55,7	48,5	48,2
		Spanne	16,1–80,3	34,2–68,8	28,2–52,4	40,6–76,0	27,5–62,6	
		Anzahl	92	6	6	4	3	1
	CD8	MW±SEM	55,3±1,7	51,3±4,2	55,4±3,3	46,1±8,5	65,2±7,8	45,5
		Median	53,9	52,9	56,1	48,2	67,4	45,5
		Spanne	17,6–93,5	38,6–66,2	44,9–67,7	24,1–63,9	50,8–77,4	
		Anzahl	92	6	6	4	3	1
	Ratio CD4/CD8	MW±SEM	1,06±0,07	1,13±0,2	0,74±0,09	1,5±0,6	0,7±0,2	1,1
		Median	0,97	1,16	0,7	1,2	0,8	1,1
Spanne		0,2–4,6	0,6–1,8	0,6–1,2	0,6–3,2	0,4–1,0		
Anzahl		92	6	6	4	3	1	
CD13	MW±SEM	32,4±2,3	25,7±5,6	1,6±0,5	26,4±16,0	29,6±18,8	0,8	
	Median	29,8	25,3	1,2	12,8	19,9	0,8	
	Spanne	0,3–89,8	2,5–40,9	0,7–4,1	5,9–74,0	3,0–65,8		
	Anzahl	92	6	6	4	3	1	
CD26	MW±SEM	48,3±1,8	49,3±5,8	25,9±4,6	53,6±9,7	26,3±2,5	4,8	
	Median	49,9	50,0	22,4	49,8	25,6	4,8	
	Spanne	7,3–88,3	32,7–73,3	17,0–47,5	35,5–79,3	22,4–30,8		
	Anzahl	92	6	6	4	3	1	
CD28	MW±SEM	63,3±1,9	70,1±7,6	41,0±5,4	64,1±7,1	73,4±10,6	70,9	
	Median	68,0	73,9	38,3	64,6	76,3	70,9	
	Spanne	9,9–90,4	45,5–91,4	27,7–64,7	46,6–80,4	53,7–90,1		
	Anzahl	92	6	6	4	3	1	
CD57	MW±SEM	32,5±1,5	23,4±3,0	46,7±7,8	32,8±4,5	26,2±1,3	11,6	
	Median	30,9	22,6	51,9	33,8	27,4	11,6	
	Spanne	2,6–67,9	14,9–33,7	13,8–69,7	22,5–41,2	23,7–27,5		
	Anzahl	92	6	6	4	3	1	
CD69	MW±SEM	58,2±2,5	78,0±4,1	18,0±2,6	68,7±4,7	87,1±4,6	51,3	
	Median	59,4	79,8	16,6	70,6	83,0	51,3	
	Spanne	10,2–97,4	58,5–87,0	10,8–25,4	55,8–78,0	82,0–96,3		
	Anzahl	82	6	6	4	3	1	
CD 107	MW±SEM	6,1±1,1	1,8±0,4	2,0±0,6	8,1±4,5	5,8±4,6	0,3	
	Median	2,0	1,7	1,5	4,3	2,4	0,3	
	Spanne	0,03–58,9	0,5–2,9	0,2–4,5	2,5–21,4	0,2–15,0		
	Anzahl	82	6	6	4	3	1	
CCR5	MW±SEM	55,7±2,9	54,7±13,8	52,2±9,1	67,6±6,3	80,6±7,5	88,9	
	Median	62,0	60,6	53,8	69,7	81,2	88,9	
	Spanne	0,3–95,1	14,4–91,0	19,2–79,5	50,6–80,5	67,2–93,3		
	Anzahl	92	6	6	4	3	1	

A = hellzelliges NZK, B = papilläres NZK, C = Onkozytom, D = hellzelliges und papilläres NZK, E = hellzelliges und sarkomatoides NZK, F = chromophobes NZK

Fortsetzung Tabelle 11: Vergleich der Lymphozytencharakteristika verschiedener Tumorsubtypen der Niere

			Subtypen des Nierentumors					
			A	B	C	D	E	F
% der T-Zellen	CTLA-4	MW±SEM Median Spanne Anzahl	1,0±0,1 0,6 0,04–4,8 91	2,7±0,9 1,8 0,4–6,1 6	1,4±0,3 1,3 0,5–2,5 6	2,0±0,6 1,6 0,9–3,8 4	0,8±0,3 1,0 0,3–1,2 3	0,3 0,3 1
	CXCR3	MW±SEM Median Spanne Anzahl	68,7±2,1 73,3 14,7–99,3 92	62,7±13,0 67,8 16,9–93,7 6	52,0±7,6 56,0 25,1–72,8 6	81,9±5,3 84,0 68,5–91,4 4	70,5±16,9 86,8 36,8–87,9 3	2,6 2,6 1
	HLA-DR	MW±SEM Median Spanne Anzahl	63,8±1,8 66,0 11,5–95,8 92	60,7±8,1 62,8 27,9–81,7 6	40,2±6,8 43,9 20,4–60,1 6	65,3±3,8 67,2 54,7–72,3 4	71,3±16,3 81,4 39,5–93,1 3	45,7 45,7 1
	Vα24	MW±SEM Median Spanne Anzahl	1,4±0,2 0,7 0,1–12,3 92	4,0±2,2 2,3 0,1–14,7 6	3,6±1,5 1,6 0,7–9,7 6	6,2±2,8 4,7 1,2–14,0 4	0,4±0,1 0,4 0,2–0,6 3	1,6 1,6 1
% der Helferzellen	CD4 <sup>+</sup> CD7 <sup>-</sup>	MW±SEM Median Spanne Anzahl	29,3±1,6 27,8 9,7–60,3 48	21,0±5,7 20,4 7,8–35,6 4	31,4±8,2 29,8 13,4–52,6 4	17,3±4,4 17,3 12,8–21,7 2	16,5 16,5 16,5 1	64,4 64,4 1
	CD4 <sup>+</sup> Vα24	MW±SEM Median Spanne Anzahl	0,4±0,1 0,02 0,0–7,5 92	0,8±0,4 0,5 0,02–2,5 6	2,0±0,9 1,2 0,0–5,0 6	1,1±0,6 1,1 0,02–2,4 4	0,7±0,7 0,01 0,0–2,1 3	0,01 0,01 1
% zytotoxischer T-Zellen	CD8 <sup>+</sup> CD7 <sup>-</sup>	MW±SEM Median Spanne Anzahl	13,7±1,2 12,3 3,5–37,2 36	5,6±1,5 5,6 4,1–7,1 2	13,7±5,7 13,7 8,0–19,5 6	9,3 9,3 9,3 1	10,0 10,0 10,0 1	25,0 25,0 1
	CD28	MW±SEM Median Spanne Anzahl	44,8±2,2 46,6 2,6–86,9 92	48,1±12,4 44,9 11,1–87,3 6	25,7±5,0 29,3 6,7–37,5 6	41,0±10,1 39,2 18,5–67,0 4	66,8±10,6 69,6 47,2–83,6 3	52,0 52,0 1

A = hellzelliges NZK, B = papilläres NZK, C = Onkozytom, D = hellzelliges und papilläres NZK, E = hellzelliges und sarkomatoides NZK, F = chromophobes NZK

Tabelle 12: Vergleich der Lymphozytencharakteristika zwischen Onkozytom (OZT) und hellzelligem NZK (MW±SEM)

		OZT n=6	Hellzelliges NZK n=92	p
% der Lymphozyten	CD56 <sup>+</sup> NK	46,6±5,6	20,0±1,3	0,004
	B-Zellen	6,1±2,5	3,6±0,4	n. s.
	T-Zellen	47,4±7,9	76,4±1,4	0,014
% der NK	NKp44 <sup>+</sup>	8,7±4,7	9,3±1,2	n. s.
% der T-Lymphozyten	CD4 <sup>+</sup>	40,3±3,6	49,7±1,4	0,046
	CD8 <sup>+</sup>	55,4±3,3	55,3±1,7	n. s.
	Ratio CD4/CD8	0,7±0,09	0,9±0,07	n. s.
	CD13 <sup>+</sup>	1,6±0,5	32,4±2,3	<0,0001
	CD26 <sup>+</sup>	25,9±4,6	48,3±1,8	0,003
	CD28 <sup>+</sup>	41,0±5,4	63,3±1,9	0,007
	CD57 <sup>+</sup>	46,7±7,8	32,5±1,5	n. s.
	CD69 <sup>+</sup>	18,0±2,6	58,2±2,5	<0,0001
	CD107 <sup>+</sup>	2,0±0,6	6,1±1,1	0,002
	CCR5 <sup>+</sup>	52,2±9,1	55,7±2,9	n. s.
	CTLA-4 <sup>+</sup>	1,4±0,3	1,0±0,1	n. s.
	CXCR3 <sup>+</sup>	52,0±7,6	68,7±2,1	n. s. (0,079)
	HLA-DR <sup>+</sup>	40,2±6,8	63,8±1,8	0,017
	Vα24 <sup>+</sup>	3,6±1,5	1,4±0,2	n. s.
% Helferzellen	CD4 <sup>+</sup> CD7 <sup>-</sup>	31,4±8,2	29,3±1,6	n. s.
	Vα24 <sup>+</sup>	2,0±0,9	0,4±0,1	n. s.
% zytotoxischer T-Zellen	CD8 <sup>+</sup> CD7 <sup>-</sup>	13,7±5,7	13,7±1,2	n. s.
	CD28 <sup>+</sup>	25,7±5,0	44,8±2,2	0,010
Mean	CCR5	16,8±4,4	22,4±1,5	n. s.
	CXCR3	29,1±4,0	32,9±1,8	n. s.

Tabelle 13: Vergleich des TIL-Phänotyps in verschiedenen Gradingstadien beim hellzelligen NZK (MW±SEM)

		G1 n=11	G2 n=62	G3+4 n=18	p	Differenz
% der Lymphozyten	CD56 <sup>+</sup> NK	17,5±4,9	19,3±2,8	10,1±3,8	0,004 0,003	G1/G3+4 G2/G3+4
	B-Zellen	3,4±1,6	2,3±0,9	5,8±1,2	n. s.	
	T-Zellen	79,1±5,4	78,5±3,0	84,1±4,2	0,015 0,021	G1/G3+4 G2/G3+4
% der NK	NKp44 <sup>+</sup>	3,8±1,4	8,0±2,3	16,9±3,6	n. s. (0,068) 0,023	G1/G3+4 G2/G3+4
% der T-Lymphozyten	CD4 <sup>+</sup>	51,8±5,5	52,9±3,1	48,1±4,3	n. s.	
	CD8 <sup>+</sup>	47,3±6,4	53,1±3,5	62,0±5,0	n. s.	
	Ratio CD4/CD8	1,1±0,2	1,0±0,1	0,8±0,3	n. s.	
	CD13 <sup>+</sup>	36,7±8,4	41,2±4,7	34,5±6,5	n. s.	
	CD26 <sup>+</sup>	54,6±7,5	53,7±4,1	45,0±5,8	n. s.	
	CD28 <sup>+</sup>	64,2±7,3	68,5±4,1	73,2±5,7	n. s. (0,078)	G1/G3+4
	CD57 <sup>+</sup>	35,8±5,5	33,1±3,0	26,4±4,2	0,029 n. s. (0,063)	G1/G3+4 G2/G3+4
	CD69 <sup>+</sup>	56,2±8,4	58,1±4,7	81,9±6,5	<0,0001 <0,0001	G1/G3+4 G2/G3+4
	CD107 <sup>+</sup>	2,5±2,1	7,9±2,5	8,6±3,4	n. s.	
	CCR5 <sup>+</sup>	40,1±10,9	60,9±6,1	54,0±8,5	n. s. (0,069)	G1/G2
	CTLA-4 <sup>+</sup>	0,7±0,4	0,8±0,2	1,8±0,3	0,042 0,038	G1/G3+4 G2/G3+4
	CXCR3 <sup>+</sup>	70,5±8,7	77,6±4,8	71,3±6,7	n. s.	
	HLA-DR <sup>+</sup>	65,6±6,9	68,7±3,8	67,0±5,3	n. s.	
	Vα24 <sup>+</sup>	0,7±0,6	1,5±0,4	0,8±0,6	n. s.	
% Helferzellen	CD4 <sup>+</sup> CD7	41,7±7,0	26,3±3,9	23,9±4,8	0,045 0,013	G1/G2 G1/G3+4
	Vα24 <sup>+</sup>	0,4±0,4	0,5±0,2	0,2±0,3	n. s.	
% zytotoxischer T-Zellen	CD8 <sup>+</sup> CD7	16,5±5,3	17,0±3,0	8,5±3,8	0,044	G2/G3+4
	CD28 <sup>+</sup>	43,9±8,9	49,6±4,9	55,7±6,9	n. s.	
Mean	CCR5	20,6±5,0	26,8±2,7	25,8±3,9	n. s.	
	CXCR3	35,0±7,5	35,8±4,1	31,6±5,9	n. s.	



Tabelle 14: Vergleich des TIL-Phänotyps in verschiedenen T-Stadien beim hellzelligen NZK (MW±SEM)

		T1a n=27	T1b n=26	T2 n=8	T3 n=31	p	Diffe- renz
% der Lympho- zyten	CD56 <sup>+</sup> NK	19,9±3,1	18,6±3,4	13,1±5,6	14,1±3,5	n. s. (0,088)	T1b/T2
	B-Zellen	3,5±1,0	5,9±1,1	4,2±1,7	3,4±1,1	n. s.	
	T-Zellen	76,6±3,5	75,5±3,8	82,7±6,2	82,5±3,9	n. s. (0,089)	T1b/T2
% der NK	NKp44 <sup>+</sup>	8,7±2,9	13,8±3,2	14,1±5,3	5,0±3,3	0,033	T1a/T2
% der T- Lympho- zyten	CD4 <sup>+</sup>	50,0±3,5	50,2±3,9	50,4±6,3	52,3±4,0	n. s.	
	CD8 <sup>+</sup>	56,2±4,1	53,6±4,5	58,2±7,3	48,4±4,6	n. s.	
	Ratio CD4/CD8	0,9±0,2	0,9±0,2	0,9±0,3	1,1±0,2	n. s.	
	CD13 <sup>+</sup>	31,1±5,3	36,0±5,9	41,1±9,5	39,7±6,0	n. s.	
	CD26 <sup>+</sup>	46,2±4,7	53,5±5,2	54,6±8,4	51,4±5,3	n. s.	
	CD28 <sup>+</sup>	64,6±4,7	66,2±5,1	71,9±8,4	69,1±5,2	n. s.	
	CD57 <sup>+</sup>	34,5±3,5	31,3±3,8	32,6±6,2	28,8±3,9	n. s. (0,085) n. s. (0,083)	T1a/T2 T1a/T3
	CD69 <sup>+</sup>	57,0±5,2	55,8±5,8	66,8±9,4	72,7±6,0	0,013 0,045 0,002 0,033	T1a/T2 T1b/T2 T1a/T3 T1b/T3
	CD107 <sup>+</sup>	2,4±1,4	7,8±3,0	14,4±4,9	1,0±0,5	0,011 n. s. (0,082) 0,014	T1a/T2 T1b/T2 T2/T3
	CCR5 <sup>+</sup>	46,2±7,0	50,0±7,6	45,2±12,5	63,0±7,8	n. s.	
	CTLA-4 <sup>+</sup>	0,8±0,2	1,2±0,3	1,2±0,4	1,4±0,3	0,010	T1a/T3
	CXCR3 <sup>+</sup>	68,1±5,5	65,7±6,1	78,9±9,9	72,8±6,2	n. s.	
	HLA-DR <sup>+</sup>	63,9±4,3	70,8±4,8	72,1±7,8	64,3±4,9	n. s.	
	Vα24 <sup>+</sup>	1,1±0,5	1,2±0,6	0,7±0,7	0,4±0,3	n. s.	
% Helfer- zellen	CD4 <sup>+</sup> CD7	33,7±2,7	30,2±3,2	24,6±5,5	24,9±2,9	0,049	T1a/T3
	Vα24 <sup>+</sup>	0,3±0,3	0,4±0,4	0,6±0,6	0,4±0,4	n. s.	
% zytoto- xischer T- Zellen	CD8 <sup>+</sup> CD7	15,3±2,9	13,2±5,7	15,9±10,0	9,8±4,1	n. s.	
	CD28 <sup>+</sup>	46,3±5,7	46,7±6,2	50,8±10,1	52,1±6,4	n. s.	
Mean	CCR5	19,7±3,2	18,9±3,5	27,5±5,7	26,0±3,5	n. s.	
	CXCR3	28,6±4,8	38,0±5,2	40,4±8,3	31,9±5,5	n. s.	

Tabelle 15: Vergleich des TIL-Phänotyps in verschiedenen M-Stadien beim hellzelligen NZK (MW±SEM)

		M0 n=9	M1+2 n=9	p
% der Lymphozyten	CD56 <sup>+</sup> NK	25,4±4,3	17,2±4,3	n. s.
	B-Zellen	3,3±1,3	3,8±1,3	n. s.
	T-Zellen	71,2±4,6	79,0±4,6	n. s.
% der NK	NKp44 <sup>+</sup>	18,7±3,8	12,3±3,8	n. s.
% der T-Lymphozyten	CD4 <sup>+</sup>	45,3±4,5	46,9±4,5	n. s.
	CD8 <sup>+</sup>	60,4±5,4	50,3±5,4	n. s.
	Ratio CD4/CD8	0,9±0,5	1,0±0,4	n. s.
	CD13 <sup>+</sup>	28,9±7,5	33,5±7,5	n. s.
	CD26 <sup>+</sup>	54,5±6,0	51,1±6,0	n. s.
	CD28 <sup>+</sup>	73,0±5,9	72,2±5,9	n. s.
	CD57 <sup>+</sup>	28,0±4,8	28,0±4,8	n. s.
	CD69 <sup>+</sup>	67,7±8,7	59,4±8,2	n. s.
	CD107 <sup>+</sup>	12,4±3,1	6,2±2,9	n. s.
	CCR5 <sup>+</sup>	53,4±9,5	48,2±9,5	n. s.
	CTLA-4 <sup>+</sup>	1,5±0,3	1,5±0,3	n. s.
	CXCR3 <sup>+</sup>	71,6±7,0	64,7±7,0	n. s.
	HLA-DR <sup>+</sup>	76,2±2,6	57,7±5,6	0,021
	Vα24 <sup>+</sup>	1,0±0,7	1,0±0,7	n. s.
	% Helferzellen	CD4 <sup>+</sup> CD7 <sup>-</sup>	29,8±11,3	20,5±4,6
Vα24 <sup>+</sup>		0,6±0,4	0,9±0,4	n. s.
% zytotoxischer T-Zellen	CD8 <sup>+</sup> CD7 <sup>-</sup>	32,5±6,4	4,7±4,5	n. s.
	CD28 <sup>+</sup>	56,8±7,2	51,2±7,2	n. s.
Mean	CCR5	23,5±4,9	19,9±4,9	n. s.
	CXCR3	43,6±5,8	28,6±4,8	0,033

Tabelle 16: Korrelation des TIL-Phänotyps mit dem Patientenalter beim hellzelligen NZK (MW±SEM)

		<58 n=12	>70 n=34	p
% der Lymphozyten	CD56 <sup>+</sup> NK	17,2±4,3	15,4±3,6	n. s.
	B-Zellen	3,0±0,8	3,1±0,7	n. s.
	T-Zellen	79,8±4,3	81,4±3,6	n. s.
% der NK	NKp44 <sup>+</sup>	12,3±3,5	12,8±2,9	n. s.
% der T-Lymphozyten	CD4 <sup>+</sup>	50,1±4,7	48,2±3,9	n. s.
	CD8 <sup>+</sup>	52,9±5,9	61,5±4,9	n. s.
	Ratio CD4/CD8	0,9±0,3	0,8±0,2	n. s.
	CD13 <sup>+</sup>	35,6±8,3	32,3±6,9	n. s.
	CD26 <sup>+</sup>	49,0±6,0	40,5±5,0	n. s.
	CD28 <sup>+</sup>	71,3±5,7	65,9±4,8	n. s.
	CD57 <sup>+</sup>	25,3±5,3	30,8±4,4	n. s.
	CD69 <sup>+</sup>	60,1±6,5	71,0±5,5	n. s.
	CD107 <sup>+</sup>	4,8±1,8	5,5±1,5	n. s.
	CCR5 <sup>+</sup>	53,7±9,2	55,2±7,6	n. s.
	CTLA-4 <sup>+</sup>	1,0±0,4	1,4±0,3	n. s.
	CXCR3 <sup>+</sup>	75,5±7,0	73,3±5,8	n. s.
	HLA-DR <sup>+</sup>	63,5±5,1	60,0±4,2	n. s.
	Vα24 <sup>+</sup>	0,5±0,2	0,8±0,4	n. s.
	% Helferzellen	CD4 <sup>+</sup> CD7 <sup>-</sup>	27,0±4,0	26,8±4,8
Vα24 <sup>+</sup>		0,2±0,1	0,07±0,05	n. s.
% zytotoxischer T-Zellen	CD8 <sup>+</sup> CD7 <sup>-</sup>	12,6±3,8	15,7±4,7	n. s.
	CD28 <sup>+</sup>	49,0±7,4	49,0±6,1	n. s.
Mean	CCR5	18,3±5,9	24,6±4,6	n. s.
	CXCR3	35,7±5,4	34,4±4,5	n. s.

Tabelle 17: Vergleich des PBL-Phänotyps in verschiedenen Gradingstadien beim hellzelligem NZK (MW±SEM)

	Absolutzahlen (Zellen/ $\mu$ l)				Prozentuale Anteile		
	G1+G2 n=26	G3+4 n=11	P		G1+G2 n=30	G3+4 n=13	p
CD56 <sup>+</sup> NK	547±91	274±129	n. s.	% der Lymphozyten	23,1±4,1	16,1±5,3	n. s.
B-Zellen	193±37	200±52	n. s.		8,5±1,7	13,1±2,2	n. s.
T-Zellen	1520±139	1224±196	n. s.		68,4±3,5	70,7±4,7	n. s.
NKp44 <sup>+</sup>	2	2±1	n. s.	% der NK-Zellen	0,6±0,2	1,5±0,3	n. s. (0,057)
CD4 <sup>+</sup>	990±91	733±128	n. s.	% der T-Lymphozyten	64,9±4,5	56,4±5,9	n. s.
CD8 <sup>+</sup>	501±80	496±113	n. s.		33,4±4,2	43,6±5,5	n. s.
CD13 <sup>+</sup>	10±10	25±14	n. s.		0,3±0,2	2,1±0,6	n. s. (0,068)
CD26 <sup>+</sup>	787±70	667±98	n. s.		52,1±4,0	55,4±5,2	n. s.
CD28 <sup>+</sup>	1237±118	962±167	n. s.		81,4±3,7	78,6±4,9	n. s.
CD57 <sup>+</sup>	300±57	294±81	n. s.		19,2±2,6	23,0±3,4	n. s.
CD69 <sup>+</sup>	70±24	60±34	n. s.		5,1±1,4	5,1±1,8	n. s.
CD107 <sup>+</sup>	3±2	2±2	n. s.		0,3±0,1	0,3±0,1	n. s.
CCR5 <sup>+</sup>	446±127	392±179	n. s.		29,1±4,8	29,1±6,3	n. s.
CTLA-4 <sup>+</sup>	2	2±1	n. s.		0,1±0,04	0,2±0,06	n. s.
CXCR3 <sup>+</sup>	554±89	492±125	n. s.		37,4±3,6	38,9±4,8	n. s.
HLA-DR <sup>+</sup>	372±76	404±107	n. s.		23,6±2,7	31,2±3,5	n. s.
V $\alpha$ 24 <sup>+</sup>	19±1	15±2	n. s.		1,5±0,2	0,8±0,3	n. s. (0,091)
CD4 <sup>+</sup> CD7 <sup>-</sup>	158±23	146±33	n. s.	% Helferzellen	16,5±2,3	20,0±3,2	n. s.
V $\alpha$ 24 <sup>+</sup>	1±1	1±1	n. s.	0,1±0,08	0,1±0,1	n. s.	
CD8 <sup>+</sup> CD7 <sup>-</sup>				% zytotoxischer T-Zellen	6,5±0,5	4,7±0,7	n. s.
CD28 <sup>+</sup>	285±36	318±52	n. s.	60,5±5,0	66,8±6,5	n. s.	
CCR5				Mean	5,5±1,2	4,1±1,7	n. s.
CXCR3					13,7±2,7	11,9±2,9	n. s.

Tabelle 18: Vergleich des PBL-Phänotyps in verschiedenen T-Stadien beim hellzelligem NZK (MW±SEM)

	Absolutzahlen (Zellen/ $\mu$ l)							Prozentuale Anteile					
	T1a n=13	T1b n=8	T2 n=4	T3 n=11	P	Differenz		T1a n=13	T1b n=10	T2 n=5	T3 n=15	p	Differenz
CD56 <sup>+</sup> NK	291±115	511±166	501±245	262±144	n. s.		% der Lymphozyten	15,7±5,5	26,3±8,4	19,9±10,0	16,6±6,8	n. s.	
B-Zellen	274±36	204±52	23±12	85±45	n. s. (0,096) n. s. (0,058) 0,029	T1a/T2 T1b/T2 T2/T3		11,4±2,1	9,8±3,2	4,3±3,8	8,0±2,5	n. s.	
T-Zellen	1552±172	1451±249	1076±365	1109±215	n. s. (0,063) 0,024	T1a/T1b T1b/T3		72,9±4,6	63,9±7,1	75,8±8,4	75,4±5,6	n. s.	
NKp44 <sup>+</sup>	3±1	2±1	1±1	2±1	n. s.		% der NK	1,2±0,3	0,8±0,5	0,4±0,6	1,3±0,4	n. s. (0,092)	T1b/T2
CD4 <sup>+</sup>	855±99	1008±144	746±211	608±124	n. s. (0,065) 0,019	T1a/T1b T1b/T3	% der T-Lymphozyten	62,6±6,1	69,2±9,3	63,2±11,1	56,9±7,4	n. s.	
CD8 <sup>+</sup>	641±108	570±156	372±229	482±135	n. s.			36,7±5,7	32,6±8,8	39,6±10,4	41,7±6,9	n. s.	
CD13 <sup>+</sup>	21±12	16±16	6±6	11±10	n. s.			1,7±0,6	0,9±0,5	0,1±0,1	0,8±0,4	n. s. (0,069)	T1b/T2
CD26 <sup>+</sup>	837±90	763±131	801±192	437±113	n. s. (0,052) 0,041	T1a/T3 T1b/T3		59,0±5,3	55,9±8,1	63,9±9,6	42,1±6,4	n. s. (0,074)	T1a/T3
CD28 <sup>+</sup>	1158±140	1285±202	947±297	747±175	n. s. (0,076) 0,018	T1a/T1b T1b/T3		80,4±5,0	88,7±7,7	85,7±9,1	71,1±6,1	n. s.	
CD57 <sup>+</sup>	290±75	261±109	188±160	350±94	n. s.			16,8±3,3	9,9±5,1	15,8±6,1	29,4±4,1	n. s.	
CD69 <sup>+</sup>	54±29	21±42	42±62	63±37	n. s.			3,9±1,8	2,5±1,7	4,8±3,2	5,7±2,2	n. s.	
CD107 <sup>+</sup>	1±1	7±3	2±2	0	n. s.			0,2±0,1	0,5±0,1	0,4±0,2	0,2±0,09	n. s.	
CCR5 <sup>+</sup>	449±165	451±239	120±352	434±207	n. s.			28,1±6,5	22,0±10,0	27,8±11,8	39,8±7,9	n. s.	
CTLA-4 <sup>+</sup>	3±1	1±1	3±1	2±1	n. s.			0,2±0,06	0,2±0,05	0,2±0,07	0,2±0,04	n. s.	
CXCR3 <sup>+</sup>	461±112	641±162	397±238	385±140	0,030 0,035	T1a/T1b T1b/T3		30,8±4,9	42,8±7,6	42,7±9,0	38,1±6,0	n. s.	
HLA-DR <sup>+</sup>	561±99	463±143	288±211	373±124	n. s.			35,7±2,9	24,9±4,5	26,7±5,3	34,9±3,5	n. s.	
V $\alpha$ 24 <sup>+</sup>	14±1	15±2	23±3	12±2	0,0001 0,029	T1a/T2 T2/T3		1,0±0,3	1,1±0,5	1,7±0,6	0,7±0,4	0,025 n. s. (0,077) 0,033	T1a/T1b T1a/T2 T1a/T3
CD4 <sup>+</sup> CD7 <sup>+</sup>	120±31	183±53	119±70	174±39	n. s.		% Helferzellen	12,3±2,7	19,4±4,6	20,0±6,0	27,3±3,4	n. s.	
V $\alpha$ 24 <sup>+</sup>	0	1±1	0	0	n. s.			0,1±0,09	0,2±0,08	0,3±0,1	0,2±0,07	n. s.	
CD8 <sup>+</sup> CD7 <sup>+</sup>					n. s.		% zytotoxischer T-Zellen	6,6±0,7	5,7±0,9	4,9±1,6	6,2±0,7	n. s.	
CD28 <sup>+</sup>	311±49	383±71	238±105	259±62	n. s.			61,1±6,4	76,2±9,8	71,5±11,7	59,9±7,8	n. s.	
CCR5							Mean	4,2±2,4	3,4±2,5	2,3±1,7	8,2±3,4	n. s.	
CXCR3								8,7±2,5	12,3±5,2	16,5±5,5	14,3±4,5	n. s.	

Tabelle 19: Vergleich des PBL-Phänotyps in verschiedenen M-Stadien beim hellzelligen NZK (MW±SEM)

	Absolutzahlen (Zellen/μl)				Prozentuale Anteile		
	M0 n=2	M1+2 n=2	p		M0 n=2	M1+2 n=5	p
CD56 <sup>+</sup> NK	245±53	200±53	n. s.	% der Lympho-zyten	17,1±9,1	19,8±5,8	n. s.
B-Zellen	130±36	170±36	n. s.		9,4±3,8	8,3±2,4	n. s.
T-Zellen	1030±177	1510±177	n. s.		73,5±9,4	71,9±5,9	n. s.
NKp44 <sup>+</sup>	1±1	3±1	n. s.	% der NK	0,3±0,9	1,3±0,6	n. s.
CD4 <sup>+</sup>	780±108	885±108	n. s.	% der T-Lympho-zyten	76,3±9,0	61,9±5,7	n. s.
CD8 <sup>+</sup>	325±299	655±299	n. s.		30,0±9,5	35,9±6,0	n. s.
CD13 <sup>+</sup>	21±1	26±5	n. s.		2,0±1,1	1,3±0,7	n. s.
CD26 <sup>+</sup>	670±168	795±304	n. s.		67,5±10,8	50,9±6,9	n. s.
CD28 <sup>+</sup>	855±67	1125±67	n. s.		84,3±9,7	80,3±6,1	n. s.
CD57 <sup>+</sup>	190±190	355±196	n. s.		17,5±8,3	20,6±5,3	n. s.
CD69 <sup>+</sup>	34±18	87±18	n. s.		3,2±3,4	5,0±2,2	n. s.
CD107 <sup>+</sup>	10±5	1±1	n. s.		0,9±0,2	0,4±0,1	n. s. (0,073)
CCR5 <sup>+</sup>	420±222	500±222	n. s.		38,9±12,7	32,9±8,1	n. s.
CTLA-4 <sup>+</sup>	1	3	n. s.		0,09±0,05	0,3±0,06	0,037
CXCR3 <sup>+</sup>	515±228	470±228	n. s.		46,8±9,9	32,1±6,3	n. s.
HLA-DR <sup>+</sup>	320±223	535±223	n. s.		29,8±8,4	27,7±5,3	n. s.
Vα24 <sup>+</sup>	5±1	6±1	n. s.		0,5±1,1	0,5±0,7	n. s.
CD4 <sup>+</sup> CD7 <sup>+</sup>	90±14	150±10	n. s.	% Helfer-zellen	12,9±8,8	15,2±5,1	n. s.
Vα24 <sup>+</sup>	4	0	0,020		0,4±0,2	0,3±0,1	n. s.
CD8 <sup>+</sup> CD7 <sup>+</sup>				% zytoto-xischer T-Zellen	6,2±2,4	5,1±1,7	n. s.
CD28 <sup>+</sup>	205±124	360±124	n. s.		63,9±13,6	62,7±8,6	n. s.
CCR5				Mean	10,1±2,4	6,1±1,7	n. s.
CXCR3					20,6±3,4	10,9±2,4	0,027

Tabelle 20: Korrelation des PBL-Phänotyps mit dem Patientenalter beim hellzelligem NZK (MW±SEM)

	Absolutzahlen (Zellen/ $\mu$ l)				Prozentuale Anteile		
	<58 n=6	>70 n=12	p		<58 n=6	>70 n=13	P
CD56 <sup>+</sup> NK	472±128	465±146	n. s.	% der Lympho-zyten	19,7±5,8	25,1±6,6	n. s.
B-Zellen	265±55	358±63	n. s.		9,8±2,0	18,1±2,3	0,014
T-Zellen	1751±162	939±185	0,005		70,5±5,5	56,8±6,3	n. s.
NKp44 <sup>+</sup>	5±1	1±1	n. s.	% der NK	2,2±0,6	1,1±0,7	n. s.
CD4 <sup>+</sup>	979±104	705±119	n. s. (0,095)	% der T-Lympho-zyten	56,3±4,5	72,0±5,2	0,034
CD8 <sup>+</sup>	748±100	184±114	0,002		41,4±4,5	23,9±5,1	0,019
Ratio CD4/CD8	1,3±0,5	3,8±0,5	n. s.		1,5±0,5	2,8±0,5	n. s. (0,080)
CD13 <sup>+</sup>	6±10	23±11	n. s.		0,4±0,8	2,2±0,9	n. s.
CD26 <sup>+</sup>	847±127	573±144	n. s.		50,9±7,6	60,8±8,7	n. s.
CD28 <sup>+</sup>	1282±124	899±141	n. s. (0,055)		76,4±3,5	92,7±4,0	0,007
CD57 <sup>+</sup>	461±73	60±44	0,003		23,8±4,1	8,0±4,7	0,019
CD69 <sup>+</sup>	63±39	42±45	n. s.		3,8±2,8	5,3±3,2	n. s.
CD107 <sup>+</sup>	3±1	1±1	n. s.		0,2±0,1	0,1±0,1	n. s.
CCR5 <sup>+</sup>	644±136	115±55	0,020		32,8±6,9	23,9±7,9	n. s.
CTLA-4 <sup>+</sup>	3±1	1±1	n. s.		0,2±0,06	0,02±0,06	n. s.
CXCR3 <sup>+</sup>	648±98	362±112	n. s. (0,068)		38,6±4,4	41,1±5,0	n. s.
HLA-DR <sup>+</sup>	507±82	128±54	0,008		27,4±3,8	19,0±4,4	n. s.
V $\alpha$ 24 <sup>+</sup>	7±15	20±17	n. s.		0,5±1,0	1,6±1,2	n. s.
CD4 <sup>+</sup> CD7 <sup>-</sup>	158±17	82±19	0,010		% Helferzellen	17,0±1,9	13,9±2,1
V $\alpha$ 24 <sup>+</sup>	1±1	1±1	n. s.	0,2±0,1	0,1±0,1	n. s.	
CD8 <sup>+</sup> CD7 <sup>-</sup>				% zytotoxischer T-Zellen	6,4±1,3	6,2±1,5	n. s.
CD28 <sup>+</sup>	361±50	186±57	0,032	58,1±5,4	78,9±6,2	0,021	
CCR5				Mean	5,7±0,7	4,1±0,9	n. s.
CXCR3					10,3±2,5	12,9±2,5	n. s.

Tabelle 21: TIL- und PBL-Phänotypvergleich beim hellzelligen NZK (MW±SEM)

		Hellzelliges NZK		
		TIL	PBL	p
% der Lymphozyten	CD56 <sup>+</sup> NK n=40	20,18±2,09	20,65±2,06	n. s.
	B-Zellen n=40	3,03±0,71	10,19±0,86	<0,0001
	T-Zellen n=40	76,78±2,22	69,16±2,05	0,006
% der NK	NKp44 <sup>+</sup> n=41	8,52±1,60	0,76±0,19	<0,0001
% der T-Lymphozyten	CD4 <sup>+</sup> n=41	52,26±1,96	61,18±1,99	0,002
	CD8 <sup>+</sup> n=41	52,26±2,55	37,64±1,99	<0,0001
	Ratio CD4/CD8	1,2±0,8	2,0±1,4	0,001
	CD13 <sup>+</sup> n=41	31,24±3,15	1,13±0,25	<0,0001
	CD26 <sup>+</sup> n=41	45,76±2,56	51,05±2,3	0,049
	CD28 <sup>+</sup> n=41	68,71±2,65	77,65±2,07	0,002
	CD57 <sup>+</sup> n=41	31,08±1,99	21,82±1,76	<0,0001
	CD69 <sup>+</sup> n=39	57,09±3,84	4,55±0,73	<0,0001
	CD107 <sup>+</sup> n=39	7,28±2,14	0,29±0,06	0,002
	CCR5 <sup>+</sup> n=41	69,46±3,58	33,13±2,70	<0,0001
	CTLA-4 <sup>+</sup> n=40	0,62±0,13	0,17±0,02	0,001
	CXCR3 <sup>+</sup> n=41	70,66±2,83	38,93±2,18	<0,0001
	HLA-DR <sup>+</sup> n=41	64,15±2,61	27,97±1,82	<0,0001
	Vα24 <sup>+</sup> n=41	1,50±0,27	0,99±0,25	n. s. (0,091)
	% Helferzellen	CD4 <sup>+</sup> CD7 <sup>-</sup> n=35	29,20±1,89	16,80±1,47
Vα24 <sup>+</sup> n=41		0,61±0,25	0,16±0,04	n. s. (0,058)
% zytotoxischer T-Zellen	CD8 <sup>+</sup> CD7 <sup>-</sup> n=30	13,65±1,14	6,04±0,43	<0,0001
	CD28 <sup>+</sup> n=41	52,71±2,95	59,20±2,93	n. s. (0,051)
Mean	CCR5 n=29	28,44±3,49	6,33±0,62	<0,0001
	CXCR3 n=29	26,20±1,84	12,74±0,97	<0,0001



Tabelle 22: Histologische Klassifikation der zusätzlich mit Paraffinschnitten untersuchten Tumoren

Histologische Klassifikation	Häufigkeit	Prozent
Hellzelliges NZK	62	88,6
Hellzelliges und papilläres NZK	3	4,3
Hellzelliges, fokal sarkomatoides NZK	2	2,9
Hellzelliges, sarkomatoides und papilläres NZK	1	1,4
Onkozytom	1	1,4
Unklassifizierbarer Nierentumor	1	1,4
Gesamt	70	100

Tabelle 23: Korrelation der Immunzellinfiltrate in Paraffinschnitten mit dem Grading beim hellzelligem NZK (in Zellen/2,5 mm<sup>2</sup>, MW±SEM)

	G1 n=6	G2 n=46	G3+4 n=9	p	Differenz
CD3 intratumoral	54,5±11,1	155,8±26,5	220,9±48,6	0,002 n. s. (0,080) 0,014	G1/G3+4 G1/G2 G2/G3+4
CD3 peritumoral	39,2±17,6	70,7±10,0	114,4±22,5	0,037 n. s. (0,077)	G1/G3+4 G2/G3+4
CD4 intratumoral	76,3±47,1	90,5±22,4	70,0±41,1	n. s.	
CD4 peritumoral	79,0±34,4	80,5±16,4	101,4±30,1	n. s. (0,074) 0,034	G1/G3+4 G2/G3+4
CD8 intratumoral	87,5±58,1	340,5±82,9	608,4±152,2	0,014 0,048	G1/G3+4 G2/G3+4
CD8 peritumoral	178,5±79,0	246,9±58,4	420,5±107,2	n. s.	
CD15 intratumoral	96,9±49,2	56,2±23,4	37,9±15,8	n. s. (0,081)	G1/G2
CD15 peritumoral	12,6±7,8	8,5±3,7	5,1±3,2	n. s.	
CD20 intratumoral	5,5±3,5	3,7±1,7	9,7±3,1	0,040	G2/G3+4
CD20 peritumoral	2,6±11,4	21,2±5,4	23,3±10,0	n. s. (0,066)	G1/G3+4
CD34 intratumoral	169,7±65,3	179,4±31,1	220,6±57,1	n. s.	
CD34 peritumoral	240,1±72,1	219,3±34,3	109,2±62,9	n. s.	
CD68 intratumoral	214,2±70,0	233,6±33,3	282,1±61,1	n. s. (0,056)	G2/G3+4
CD68 peritumoral	81,7±10,6	99,1±16,0	161,1±25,0	0,049 0,027	G1/G3+4 G2/G3+4

Tabelle 24: Korrelation der Immunzellinfiltrate in Paraffinschnitten mit den T-Stadien beim hellzelligen NZK (in Zellen/2,5 mm<sup>2</sup>, MW±SEM)

	T1a n=18	T1b n=18	T2 n=6	T3 n=20	p	Diffe- renz
CD3 intratumoral	164,0±34,5	72,4±34,3	191,5±52,8	91,1±36,5	0,001 0,005 0,021	T1a/T1b T1a/T3 T1b/T2
CD3 peritumoral	74,1±23,7	33,5±23,5	113,4±36,2	77,2±25,0	n. s. (0,088) 0,014 0,020	T1a/T1b  T1b/T2 T1b/T3
CD4 intratumoral	44,±19,2	52,2±21,2	114,1±48,1	76,7±33,2	n. s.	
CD4 peritumoral	67,8±23,0	75,5±22,8	105,8±35,1	86,0±24,3	n. s. (0,057)	T1b/T2
CD8 intratumoral	310,7±115,0	191,9±114,2	433,2±175,9	312,5±121,6	n. s. (0,063)	T2/T3
CD8 peritumoral	335,9±81,0	255,4±80,5	190,2±124,0	333,3±85,7	n. s.	
CD15 intratumoral	55,6±32,7	35,7±18,9	81,4±32,7	17,8±7,9	n. s.	
CD15 peritumoral	7,0±3,0	11,0±5,2	13,7±7,9	4,7±2,8	n. s.	
CD20 intratumoral	6,0±2,4	5,0±2,3	7,5±3,6	5,7±2,5	n. s.	
CD20 peritumoral	20,0±7,6	17,6±7,6	7,7±5,5	19,8±8,1	n. s.	
CD34 intratumoral	188,6±42,8	245,6±42,5	197,0±65,4	174,6±45,2	n. s.	
CD34 peritumoral	99,1±47,9	72,7±47,6	235,1±73,4	238,8±50,7	0,049	T1b/T3
CD68 intratumoral	251,3±46,7	233,0±46,4	282,1±71,4	199,6±49,4	n. s.	
CD68 peritumoral	75,6±27,4	77,4±27,2	149,9±42,0	74,7±29,0	0,003 0,008 0,008	T1a/T2 T1b/T2 T2/T3

Tabelle 25: Korrelation der Immunzellinfiltrate in Paraffinschnitten mit den M-Stadien beim hellzelligen NZK (in Zellen/2,5 mm<sup>2</sup>, MW±SEM)

	M0 n=9	M1+2 n=7	p
CD3 intratumoral	115,6±44,8	74,3±50,9	n. s.
CD3 peritumoral	88,9±22,9	90,7±26,0	n. s.
CD4 intratumoral	101,1±26,8	33,6±30,4	n. s.
CD4 peritumoral	137,2±16,8	77,9±19,0	0,023
CD8 intratumoral	325,6±110,4	109,4±75,9	n. s.
CD8 peritumoral	339,4±81,4	307,9±92,3	n. s.
CD15 intratumoral	23,4±22,6	66,4±25,7	n. s.
CD15 peritumoral	1,1±1,6	8,0±4,5	n. s.
CD20 intratumoral	3,4±2,0	0,9±2,3	n. s.
CD20 peritumoral	21,7±7,7	9,7±8,7	n. s.
CD34 intratumoral	171,1±37,9	268,6±42,9	n. s. (0,094)
CD34 peritumoral	234,4±43,0	92,9±38,7	0,033
CD68 intratumoral	288,9±44,8	217,1±50,8	n. s.
CD68 peritumoral	93,3±23,7	175,7±26,9	0,025

Tabelle 26: Korrelation der Immunzellinfiltrate in Paraffinschnitten mit dem Patientenalter beim hellzelligen NZK (in Zellen/2,5 mm<sup>2</sup>, MW±SEM)

	<58 Jahre n=7	>70 Jahre n=23	p
CD3 intratumoral	288,6±51,1	221,7±35,4	n. s.
CD3 peritumoral	131,4±36,2	113,0±25,1	n. s.
CD4 intratumoral	139,6±47,2	99,5±32,7	n. s.
CD4 peritumoral	114,6±33,0	63,4±22,9	n. s.
CD8 intratumoral	602,1±157,3	657,6±109,2	n. s.
CD8 peritumoral	505,7±134,7	166,7±83,5	0,015
CD15 intratumoral	35,0±34,3	58,6±23,8	n. s.
CD15 peritumoral	2,9±7,8	10,8±5,4	n. s.
CD20 intratumoral	8,1±2,4	8,4±1,7	n. s.
CD20 peritumoral	39,8±12,5	27,6±8,7	n. s.
CD34 intratumoral	186,6±50,2	184,0±34,8	n. s.
CD34 peritumoral	195,4±62,0	122,6±43,0	n. s.
CD68 intratumoral	354,4±71,2	296,0±49,4	n. s.
CD68 peritumoral	103,3±29,6	151,0±20,6	n. s.

Tabelle 27: Vergleich zwischen Onkozytom und hellzelligem NZK anhand der Paraffinschnitte (in Zellen/2,5 mm<sup>2</sup>, MW±SEM)

	Onkozytom n=1	Hellzelliges NZK n=62
CD3 intratumoral	20	105±17
CD3 peritumoral	30	74±9
CD4 intratumoral	0	61±10
CD4 peritumoral	10	71±8
CD8 intratumoral	15	290±41
CD8 peritumoral	100	249±30
CD15 intratumoral	10	48±10
CD15 peritumoral	1	8±2
CD20 intratumoral	0	4±1
CD20 peritumoral	0	19±3
CD34 intratumoral	130	204±15
CD34 peritumoral	350	161±17
CD68 intratumoral	20	239±17
CD68 peritumoral	50	106±10

Tabelle 28: Überlebensanalyse für TIL beim hellzelligen NZK

				Kaplan-Meier-Schätzung			Cox-Regression		
		Grenze	Gr.	n	MW±SEM	p	n	RR	p
% der Lymphozyten	CD56 <sup>+</sup> NK	<15	1	32	36,4±4,1	0,007	31	10,94	0,037
		15-25	2	24	46,7±4,2		24	2,75	0,40
		>25	3	24	48,4±1,5		24	1	
	B-Zellen	<2	1	32	42,6±3,8	0,985	31	1,36	0,66
		2-5	2	29	45,8±4,1		29	3,05	0,11
		>5	3	19	41,9±4,9		19	1	
	T-Zellen	<70	1	22	n. b.		22	n. b.	n. b.
		70-85	2	30			30	0,45	0,16
		>85	3	28			27	1	
% NK	NKp44 <sup>+</sup>	<2	1	23	43,6±2,1	0,115	23	0,31	0,33
		2-10	2	31	38,6±3,7		30	0,68	0,52
		>10	3	27	44,4±4,4		27	1	
% der T- Lymphozyten	CD4 <sup>+</sup>	<45	1	29	46,6±3,3	0,685	28	0,80	0,75
		45-55	2	28	43,6±4,3		28	0,58	0,36
		>55	3	24	42,5±4,4		24	1	
	CD8 <sup>+</sup>	<45	1	24	45,0±4,5	0,771	24	0,79	0,74
		45-65	2	33	42,6±4,0		33	0,80	0,74
		>65	3	24	44,8±4,0		23	1	
	CD13 <sup>+</sup>	<20	1	31	49,5±3,0	0,017	31	2,3	0,31
		20-45	2	25	35,5±4,9		24	4,9	0,02
		>45	3	25	45,4±3,8		25	1	
	CD26 <sup>+</sup>	<36	1	21	40,3±3,9	0,685	21	2,7	0,18
		36-56	2	31	43,5±4,3		30	4,0	0,04
		>56	3	29	46,2±3,1		29	1	
	CD28 <sup>+</sup>	<55	1	28	39,1±3,5	0,743	27	1,81	0,38
		55-75	2	28	44,4±4,1		28	0,46	0,24
		>75	3	25	46,0±3,5		25	1	
	CD57 <sup>+</sup>	<25	1	34	40,9±3,6	0,460	33	0,43	0,36
		25-40	2	30	46,7±4,0		30	0,64	0,61
		>40	3	17	41,4±3,1		17	1	
	CD69 <sup>+</sup>	<50	1	23	n. b.		15	n. b.	n. b.
		50-70	2	23			21	1,97	0,23
		>70	3	25			20	1	
	CD107 <sup>+</sup>	<1	1	22	35,7±2,8	0,992	22	1,25	0,76
		1-6	2	26	38,6±3,5		26	1,81	0,40
		>6	3	23	43,2±4,1		22	1	
	CCR5 <sup>+</sup>	<40	1	26	46,7±3,8	0,773	26	2,05	0,32
		40-70	2	21	40,3±4,4		21	2,1	0,23
		>70	3	34	44,6±4,0		33	1	
CTLA-4 <sup>+</sup>	<0,4	1	31	39,4±3,8	0,777	31	0,59	0,46	
	0,4-1,4	2	28	45,3±3,3		27	0,65	0,52	
	>1,4	3	21	40,9±5,3		21	1		
CXCR3 <sup>+</sup>	<55	1	22	34,2±4,4	0,188	22	3,2	0,049	
	55-80	2	25	44,4±3,0		25	2,0	0,37	
	>80	3	34	47,0±3,2		33	1		

n. b. = nicht berechenbar

Fortsetzung Tabelle 28: Überlebensanalyse für TIL beim hellzelligen NZK

				Kaplan-Meier-Schätzung			Cox-Regression		
		Grenze	Gr.	n	MW±SEM	p	n	RR	p
% der T-Lymphozyten	HLA-DR <sup>+</sup>	<55	1	23	41,1±4,4	0,096	23	21,0	0,007
		55-75	2	35	41,4±4,2		34	8,7	0,040
		>75	3	23	51,0±2,6		23	1	
	Vα24 <sup>+</sup>	<0,6	1	26	42,4±4,3	0,078	26	4,0	0,123
		0,6-1,3	2	33	35,9±3,2		32	2,6	0,256
		>1,3	3	22	54,0±2,6		22	1	
% Helferzellen	CD4 <sup>+</sup> CD7 <sup>-</sup>	<25	1	17	n. b.		17	1	
		25-35	2	15			15	1,01	0,99
		>35	3	10			10	n. b.	n. b.
	CD4 <sup>+</sup> Vα24 <sup>+</sup>	<0,01	1	32	45,3±3,6	0,611	32	0,52	0,38
		0,01-0,4	2	31	46,8±3,7		30	0,14	0,011
		>0,4	3	18	40,6±4,3		18	1	
% zytotoxische T-Zellen	CD8 <sup>+</sup> CD7 <sup>-</sup>	<10	1	8	22,8±5,2	0,242	8	1	
		10-15	2	14	30,5±2,9		14	0,15	0,12
		>15	3	8	33,3±0,7		8	0,41	0,57
	CD28 <sup>+</sup>	<35	1	26	39,9±3,6	0,950	25	2,4	0,23
		35-55	2	29	44,2±4,3		29	1,1	0,88
		>55	3	26	43,7±3,5		26	1	
Mean	CCR5	<15	1	26	41,8±3,2	0,910	26	1,22	0,78
		15-25	2	27	43,0±3,7		26	0,54	0,38
		>25	3	24	43,5±4,6		24	1	
	CXCR3	<25	1	29	33,3±3,9	0,565	29	2,96	0,069
		25-35	2	18	43,5±3,3		18	0,83	0,80
		>35	3	32	46,4±3,4		31	1	

n. b. = nicht berechenbar

Tabelle 29: Überlebensanalyse beim hellzelligen NZK in Paraffinschnitten

			Kaplan-Meier-Schätzung			Cox-Regression		
	Grenze	Gr.	n	MW±SEM	p	n	RR	p
CD3 intratumoral	<30	1	23	44,3±3,8	0,96	22	0,74	0,70
	31-140	2	20	42,4±4,6		20	0,67	0,63
	>141	3	14	46,7±4,2		14	1	
CD3 peritumoral	<30	1	22	53,4±3,1	0,087	22	1,4	0,73
	30-100	2	21	39,3±4,6		20	1,1	0,90
	>100	3	14	38,7±5,1		14	1	
CD4 intratumoral	<10	1	19	45,2±2,6	0,16	18	0,43	0,49
	10-60	2	23	37,9±4,0		23	1,1	0,89
	>60	3	15	47,0±5,2		15	1	
CD4 peritumoral	<30	1	18	47,9±6,2	0,65	18	1,2	0,83
	30-90	2	21	41,2±4,2		20	1,3	0,72
	>90	3	18	43,5±3,9		18	1	
CD8 intratumoral	<100	1	17	40,4±4,1	0,99	17	1,76	0,55
	100-300	2	24	44,4±3,6		23	2,23	0,33
	>300	3	16	46,1±4,9		16	1	
CD8 peritumoral	<100	1	21	49,8±4,3	0,30	21	0,54	0,52
	100-300	2	21	39,1±4,5		20	0,37	0,31
	>300	3	15	44,7±4,5		15	1	
CD15 intratumoral	<10	1	19	50,6±3,9	0,099	19	0,93	0,93
	10-50	2	24	35,3±3,5		23	2,5	0,31
	>50	3	14	40,9±3,3		14	1	
CD15 peritumoral	<1	1	15	47,3±3,8	0,49	15	0,32	0,16
	1-5	2	25	39,8±4,3		24	0,47	0,36
	>5	3	17	46,7±4,7		17	1	
CD20 intratumoral	<1	1	28	42,5±3,0	0,71	27	0,67	0,70
	1-8	2	17	41,8±4,2		17	1,40	0,69
	>8	3	12	44,1±5,8		12	1	
CD20 peritumoral	<5	1	21	42,2±3,5	0,56	20	1,06	0,94
	5-20	2	22	45,1±3,9		22	1,11	0,88
	>20	3	14	41,4±4,9		14	1	
CD34 intratumoral	<120	1	17	42,5±4,9	0,62	16	1,84	0,47
	120-220	2	19	44,2±4,1		19	0,54	0,44
	>220	3	21	45,8±4,1		21	1	
CD34 peritumoral	<75	1	19	47,3±3,5	0,21	19	0,55	0,49
	75-200	2	18	39,2±5,8		18	1,65	0,54
	>200	3	20	45,3±3,7		19	1	
CD68 intratumoral	<175	1	16	47,2±5,3	0,83	16	0,61	0,58
	175-300	2	24	42,2±4,0		23	1,94	0,39
	>300	3	17	44,7±4,0		17	1	
CD68 peritumoral	<80	1	25	49,2±4,0	0,67	24	0,51	0,44
	80-150	2	20	39,7±3,3		20	0,32	0,15
	>150	3	12	43,1±4,6		12	1	

## 9. Thesen

1. Immunreaktionen können die Tumorentwicklung hemmen. Wichtige am Immun- und Abwehrgeschehen beteiligte Zellpopulationen stellen die Lymphozyten dar. Sie werden als Tumordinfiltrierende Lymphozyten (TIL) in großer Zahl im Nierenzellkarzinom (NZK) nachgewiesen. Informationen zur Zusammensetzung der Immunzellinfiltrate innerhalb des Tumors lassen Rückschlüsse auf die Funktionalität der Immunabwehr zu und können zu einer Optimierung der Prognoseeinschätzung beitragen.
2. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie besteht die Möglichkeit, Zellpopulationen in ihrer intratumoralen Zusammensetzung u.a. anhand Funktions-assoziiierter Oberflächenmoleküle genauer zu charakterisieren. Dabei gleicht die Phänotypisierung der Immunzellinfiltrate einer Momentaufnahme des Immungeschehens zum Zeitpunkt der Tumorentnahme. In dieser Arbeit wurde bei 119 Patienten mit Tumorerkrankung der Niere (davon 92 hellzellige Nierenzellkarzinome) die Komposition der tumordinfiltrierenden Lymphozyten untersucht.
3. Immunhistochemische Paraffinfärbungen vervollständigen die Aussagen durchflusszytometrischer Untersuchungen, indem sie die Absolutzahlen der Immunzellinfiltrate sowie die regionale Verteilung und Zuordnung zu bestimmten Gewebsanteilen aufzeigen. Immunhistochemische Färbungen wurden parallel zu den durchflusszytometrischen Analysen exemplarisch an 70 Paraffinschnitten (davon 62 hellzellige NZK) der 119 Patienten mit Nierentumor angefertigt.
4. Mittels einer verbesserten Beurteilung der Überlebensprognose für Patienten mit hellzelligem NZK sowie durch die Entwicklung einheitlicher, international anerkannter Prognosescores kann die Beratung und Therapieentscheidung patientenorientierter gestaltet werden. In dieser Untersuchung wurde das Überleben der Patienten für durchschnittlich 25,6 Monate nachverfolgt. Die Überlebenswahrscheinlichkeit wurde mit der Kaplan-Meier-Methode sowie der multivariaten Regressionsanalyse nach Cox unter Berücksichtigung der Einflussnahme der Kovariaten Grading, T-Stadium und Patientenalter berechnet.
5. Das benigne Onkozytom und das maligne, hellzellige NZK unterscheiden sich sowohl in ihrer lymphozytären Zusammensetzung als auch in der Expression funktioneller Markermoleküle. In Paraffinschnitten wurden im untersuchten Onkozytom 20 intratumorale und 30 peritumorale T-Zellen, pro Gesichtsfeld bei 100-facher Vergrößerung (2,5 mm<sup>2</sup>), beobachtet. Unterdessen wurde das hellzellige NZK von einer mit 105 intra- und 74 peritumoralen T-Zellen höheren Zahl infiltriert.

Anhand der durchflusszytometrischen Resultate wurde deutlich, dass das Onkozytom zu einem hohen Anteil von NK-Zellen durchsetzt wird, während beim hellzelligem NZK höhere Anteile an T-Zellen, insbesondere  $CD4^+$  T-Zellen sowie T-Zellen mit Expression der Funktionsmoleküle CD69, CD107 und HLA-DR gemessen wurden. Dabei ist für  $HLA-DR^+$  T-Zellen eine wirksame, antitumorale Aktivität beschrieben. CD107 gilt als Marker der Degranulation.

6. Der Anteil der tumorinfiltrierenden  $CD56^+$  NK-Zellen ist ein wichtiger Prognosefaktor für das Überleben der Patienten mit hellzelligem NZK. Ein hoher Anteil an NK-Zellen war in der hier dargestellten Untersuchung mit einem geringeren Sterberisiko verbunden. Dies zeigt, dass auch NK-Zellen während der Tumorentwicklung besonders wirksam entdifferenzierte Zellen zerstören und damit eine immense Bedeutung für die Tumorabwehr besitzen. Hingegen ergaben sich in dieser Studie sowohl für die Anteile tumorinfiltrierender B-Zellen als auch  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen keine Zusammenhänge mit der Überlebenschance der Patienten. Diese Marker konnten sich deshalb nicht als Prognosefaktor etablieren.
7. HLA-DR und CXCR3 sind T-Zellmoleküle, die mit einer  $T_H1$ -gekoppelten Interferon- $\gamma$ -Sekretion assoziiert sind und die antitumorale Immunität unterstützen. Laut der Ergebnisse dieser Arbeit eignen sich die Anteile tumorinfiltrierender  $HLA-DR^+$  T-Zellen und  $CXCR3^+$  T-Zellen in Patienten mit hellzelligem NZK als Prognosemarker, wobei ein hoher Anteil dieser Markermoleküle mit einer höheren Überlebenschance verbunden war.
8. Im hellzelligen NZK existiert ein Zusammenhang zwischen den für Immunseneszenz charakteristischen  $CD57^+$  T-Zellen sowie CD7-negativen Helferzellen und Tumorgröße und -grading. Dabei wurden in G1-Tumoren hohe Anteile an immunseneszenten T-Zellen beobachtet, wobei dies auf optimale Proliferationsfähigkeiten der T-Zellen in diesen Tumordifferenzierungsstadien schließen lässt. Hingegen wurden schlecht differenzierte Tumoren durch einen geringeren Anteil immunseneszenter Zellen infiltriert, was durch eine hemmende Wirkung des Tumormilieus auf das Proliferationsvermögen der angelockten T-Zellen in G3/G4-Tumoren erklärt werden könnte.
9. Für die Anteile an mit Immunsuppression assoziierten  $CTLA-4^+$  T-Zellen und  $CD69^+$  T-Zellen wurden geringere Anteile in Grading 1 und T1-Stadien als in größeren, schlecht differenzierten Tumoren beobachtet.  $CTLA-4^+$  T-Zellen können als regulatorische Zellen einer potenten, antitumoralen Immunität entgegen wirken. Ebenso wird für CD69 diskutiert, dass dieses Oberflächenmolekül neben der Beteiligung an der T-Zell-Aktivierung und -Proliferation im Tumor ein Marker suppressorischer T-Zellen sein könnte.



10. Makrophagen können tumorzerstörend wirken, aber ebenso zur Tumorphiliferation und –metastasierung beitragen. Anhand immunhistochemischer Färbungen von Paraffinschnitten wurde in T2-Tumoren mit 150 peritumoralen Makrophagen (CD68<sup>+</sup>) eine höhere Anzahl als in T1a-Tumoren mit 76 Makrophagen gemessen. Weiterhin wurden schlecht differenzierte Tumoren von 161 peritumoralen Makrophagen infiltriert, während gut differenzierte Tumoren von 82 peritumoralen Makrophagen durchsetzt wurden. Im hellzelligem NZK war eine höhere Makrophagenanzahl als im Onkozytom nachweisbar, wobei die Makrophagenzahl die der T-Zellen deutlich überstieg. In einigen wissenschaftlichen Veröffentlichungen wird die suppressive Wirkung tumorinfiltrierender Makrophagen diskutiert.
11. In Grading 1/2-Tumoren wurden im Vergleich zu Grading 3/4-Tumoren eine höhere Anzahl an Gefäßneubildungen festgestellt, die mittels CD34-Expression im Paraffinschnitt getestet wurden. In der Literatur ist beschrieben, dass die intratumorale Vaskularisierung für die Tumorprogression und –metastasierung bedeutsamer ist als die peritumorale. Während die intratumoralen Blutgefäße die Ausbreitung der Tumorzellen begünstigen, wirken die peritumoralen einer Metastasierung entgegen.
12. Das Durchschnittsalter der Patienten mit hellzelligem NZK lag bei  $67,6 \pm 0,9$  Jahren (Altersspanne: 43-86 Jahre), wobei nur wenige Patienten unter 50 Jahren waren. Anhand der TIL-Daten der Patienten konnten nur wenige Unterschiede zwischen den einzelnen Altersgruppen festgestellt werden. Dabei zeigten Patienten unter 58 Jahren geringere Anteile tumorinfiltrierender CD8<sup>+</sup> T-Zellen und CD69<sup>+</sup> T-Zellen als ältere Patienten über 70 Jahren. Gelingt es zukünftig in Arbeiten mit höheren Fallzahlen mehr Patienten unter 50 Jahren zu rekrutieren, könnten sich möglicherweise vielfältigere Unterschiede zwischen den Patientengruppen ergeben.
13. Die Durchflusszytometrie stellt in Kombination mit immunhistochemischen Färbungen eine hervorragende Möglichkeit dar, tumorinfiltrierende Immunzellen schnell und umfassend zu charakterisieren. Zukünftig kann zusätzlich die Möglichkeit der 8- bzw. 10-Farbmessung sowie der Nachweis anderer Markermoleküle wie CD163 und CD204, die tumorinfiltrierende Makrophagen charakterisieren, zur Darstellung der Immunzellen genutzt werden. Zudem sollten weitere Lymphozytensubpopulationen wie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen und CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen untersucht werden, die in den Prozess der antitumoralen Immunität eingreifen.

**IV. Curriculum vitae**

Name	Katharina Geißler
Geburtsdatum	13.07.1985
Geburtsort	Zwickau
Familienstand	ledig
Anschrift	Querstraße 1 08115 Lichtentanne OT Schönfels
Eltern	Frank Geißler, Dipl. Ökonom Cornelia Geißler, Dipl. Ökonom
Schulbildung	1992-1996 Thomas-Müntzer-Grundschule in Schönfels 1996-2004 Gerhart-Hauptmann-Gymnasium in Zwickau
Studium	Oktober 2004-November 2010 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Prüfungen	08.09.2006 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: „gut“ 04.11.2010 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Gesamtnote: „gut“
Famulaturen	Februar/März 2007 Gemeinschaftspraxis Drs. Elvira und Albrecht Siegel, Schönfels Fachbereich: Allgemeinmedizin August/September 2007 Heinrich-Braun-Klinikum, Zwickau Fachbereich: Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie August/September 2008 Kantonsspital Luzern, Schweiz Fachbereich: Orthopädie Februar 2009 Universitätsklinikum Halle (Saale) Fachbereich: Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie

## Curriculum vitae

---

Praktisches Jahr	August-Dezember 2009 Berufsgenossenschaftliche Kliniken Bergmannstrost, Halle (Saale) Fachbereich: Unfallchirurgie
	Dezember 2009-März 2010 Universitätsklinikum Halle (Saale) Fachbereich: Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie
	März-Juli 2010 Berufsgenossenschaftliche Kliniken Bergmannstrost, Halle (Saale) Fachbereich: Innere Medizin
Beruf	seit März 2011 Assistenzärztin am Universitätsklinikum Jena Fachbereich: Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde

**V. Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorgelegte Dissertation mit dem Titel

„Durchflusszytometrische Charakterisierung des Phänotyps tumorinfiltrierender Lymphozyten beim Nierenzellkarzinom“

selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe sowie keine anderen als die in der Arbeit angegebenen Hilfsmittel in Anspruch genommen habe.

Halle (Saale), den

Katharina Geißler

**VI. Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Ich habe bisher an keiner anderen in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch wurde diese oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Halle (Saale), den

Katharina Geißler

### **VII. Danksagung**

Mein besonderer Dank gebührt Frau PD Dr. Dagmar Riemann für das in mich gesetzte Vertrauen und die Betreuung dieser Arbeit. Sie hat durch ihre lehrreiche und offene Unterstützung mich auf allen Ebenen gefördert. Ihr stetiges Interesse am Fortgang meiner Arbeit, ihre motivierenden Worte und ihre freundschaftliche Art haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ebenso danke ich Frau Prof. Dr. Barbara Seliger für die Überlassung des Themas und die ständige hilfsbereite Unterstützung.

Für die Beratung bei technischen und organisatorischen Problemen möchte ich mich bei den Mitarbeiterinnen des Routinelabors Sabrina Kießling, Steffi Turzer, Anita Rothhoff und Corinna Giersberg bedanken.

Den Mitarbeitern der Urologischen Klinik des Universitätsklinikums Halle unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Paolo Fornara möchte ich für die gute Kooperation und die Gewinnung der Gewebeproben danken. Dabei möchte ich Frau Dr. Kersten Fischer und Frau Martina Schade für die Ermittlung der klinischen Patientendaten besonders hervorheben.

Herrn Prof. Dr. Hans-Jürgen Holzhausen möchte ich für seine Hilfe bei der Auswahl geeigneter Paraffinschnitte und seine Erklärungen zur Pathologie des hellzelligen NZK sowie der Leiterin des Labors für Immunhistologie und Elektronenmikroskopie Frau Jana Beer und ihren Mitarbeiterinnen für die Unterstützung bei der Anfertigung und Färbung der Paraffinschnitte danken. Meine Dankbarkeit gilt ebenso den Mitarbeitern des Schnellschnittlabors, die stets über das Eintreffen des Tumormaterials informierten und dem Institut für Medizinische Immunologie ein charakteristisches Tumorstück zustellten.

Frau Dr. Christine Lautenschläger möchte ich für ihre unerschöpfliche Unterstützung und die hilfreichen Tipps bei der statistischen Auswertung der gewonnenen Daten danken.

Herrn Dr. Peter Schmidt vom Tumorzentrum der Universität Halle möchte ich für den Beitrag zur Ermittlung der Überlebensdaten der Patienten dank sagen. Ein großer Dank gilt allen niedergelassenen Ärzten, die an der Befragung zum Überleben der Patienten teilgenommen haben.

Ein großes Dankeschön geht an meine Familie und meine Freunde. Dafür dass sie immer für mich da sind und ich immer auf sie zählen kann. Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern, Oma Anita und Opa Rolf bedanken, ohne die das Studium und die Promotion nie möglich gewesen wären.