

Aus dem Institut für Molekulare Immunologie  
Helmholtz-Zentrum München  
Leitung: Prof. Dr. rer. nat. Dolores J. Schendel

**Phänotypische und funktionelle Eigenschaften der durch  
das Tumormilieu des klarzelligen Nierenzellkarzinoms  
konditionierten dendritischen Zellpopulation**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von  
Ulrike Katharina Lettenmeyer  
München

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Elfriede Nößner  
Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Lutz T. Weber  
Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders  
Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 17.11.2011

**Meinen Eltern und meiner Schwester Sabine**



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Das humane Immunsystem .....	1
1.1.1	Angeborenes und adaptives Immunsystem.....	1
1.2	Die dendritische Zelle .....	2
1.2.1	Ontogenie.....	2
1.2.2	Die Rolle von DZ bei der Induktion von peripherer Toleranz oder Immunität.....	4
1.3	MHC-restringierte Antigenpräsentation der DZ zur T-Zell-Stimulation.....	5
1.4	Chemokine und Chemokinrezeptoren.....	7
1.4.1	Die Rolle der Chemokine bei der Migration von klassischen DZ.....	8
1.5	Tumorimmunologie.....	9
1.5.1	Das inflammatorische Tumormikromilieu.....	10
1.5.2	Die DZ im Tumorkontext und in der Immuntherapie.....	12
1.6	Das humane Nierenzellkarzinom .....	13
<b>2</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit.....</b>	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>Material.....</b>	<b>18</b>
3.1	Geräte und Verbrauchsmaterial.....	18
3.2	Chemikalien und fertige Lösungen .....	19
3.3	Zellkultur.....	20
3.3.1	Verbrauchsmedien und Zusätze.....	20
3.3.2	Medien .....	21
3.3.3	Lösungen und Puffer.....	22
3.4	Zellen und Zelllinien .....	23
3.5	Antikörper .....	23
3.5.1	Primäre Antikörper für die Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz.....	23
3.5.2	Sekundäre Antikörper für die Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz.....	24
3.6	Reagenziensysteme und synthetische Peptide.....	25

3.6.1	Zytokinbestimmung .....	25
3.6.2	Phagozytose .....	25
3.6.3	Zellzahlbestimmung.....	25
3.6.4	Antigen-Kreuzpräsentation.....	25
3.7	Patientenmaterial .....	25
<b>4</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>27</b>
4.1	Allgemeine Methoden der Zellkultur .....	27
4.1.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen .....	27
4.1.2	Bestimmung der Zellzahl anhand der Neubauer-Methode .....	27
4.1.3	Kryokonservierung von Zellen .....	27
4.1.4	Auftauen von Zellen .....	28
4.1.5	Kultivierung von adhärennten Zelllinien.....	28
4.1.6	Zellernte von RCC-DZ und DZ.....	29
4.1.7	Gewinnung von Tumorzellkulturüberstand für die Differenzierung von Monozyten zu tumorkonditionierten DZ (RCC-DZ).....	29
4.2	Arbeiten mit Vollblut .....	29
4.2.1	Isolierung mononukleärer Zellen aus Vollblut (PBMZ).....	30
4.2.2	Positive Isolierung von Monozyten aus PBMZ.....	30
4.2.3	In-vitro Generierung von RCC-DZ, DZ und GM-CSF-Makrophagen.....	31
4.2.4	Stimulation von myeloischen Zellen .....	31
4.3	Funktionelle Versuche.....	32
4.3.1	Phagozytose .....	32
4.3.2	Antigen-Kreuzpräsentation.....	32
4.3.3	Transwell® Migration (Boyden-Kammer).....	33
4.3.4	CellTiterGlo® Lumineszenz-Zellzählung .....	34
4.3.5	Zellzahlbestimmung mittels Caltag Counting Beads® .....	35
4.3.6	Signal-3-Nachweisverfahren .....	35
4.4	Bestimmung des Zytokingehalts in Zellkulturüberständen.....	36
4.4.1	Enzymgekoppelter Immunoabsorptionstest (ELISA).....	36
4.5	Durchflusszytometrie .....	37

4.5.1	Prinzip.....	37
4.5.2	Fluoreszenzmarkierung von Oberflächenmolekülen .....	39
4.5.3	Fluoreszenzmarkierung des intrazellulären zytoskelettregulierenden Proteins Faszin .....	40
4.5.4	Mehrfarbenfluoreszenzanalyse .....	41
4.5.5	Messung der Proben und Datenauswertung.....	41
4.6	Arbeiten mit Gewebe .....	42
4.6.1	Immunfluoreszenzfärbung und konfokale Mikroskopie von histologischen Präparaten .....	43
4.6.1.1	Das Prinzip der Immunfluoreszenztechnik und der konfokalen Mikroskopie .....	43
4.6.1.2	Durchführung der indirekten Immunfluoreszenzmethode.....	43
4.6.2	Bildaufnahme und Auswertung mittels konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie...	44
4.7	Statistische Analysen.....	45
4.7.1	Mann-Whitney-U Test.....	45
4.7.2	Kruskal-Wallis-Test.....	45
4.7.3	Post-Hoc Test (ANOVA).....	45
<b>5</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>47</b>
5.1	Markerexpression auf RCC-DZ und DZ und die Veränderung bei Maturierungsstimulation .....	47
5.1.1	Vergleich von RCC-DZ mit DZ in Bezug auf die Expression myeloischer Oberflächenrezeptoren.....	48
5.1.2	Vergleich von RCC-DZ mit DZ in Bezug auf die Expression kostimulatorischer Oberflächenrezeptoren, CD83 und MHC-Molekülen .....	50
5.1.3	Vergleich von RCC-DZ mit DZ in Bezug auf die Expression regulatorischer und zielsteuernder Oberflächenrezeptoren .....	51
5.1.4	Vergleich von RCC-DZ mit DZ in Bezug auf die Expression von Chemokinrezeptoren .....	53
5.1.5	Die Zellmorphologie von RCC-DZ und DZ.....	54
5.1.6	Zusammenfassung der phänotypischen Merkmale von RCC-DZ und DZ.....	54
5.2	Induktionsfaktoren des RCC-DZ-Phänotyps .....	55
5.3	Phagozytosefähigkeit der RCC-DZ und DZ .....	57
5.4	Fähigkeit zur Antigen-Kreuzpräsentation der RCC-DZ und DZ.....	58

---

5.5	Migrationsfähigkeit der RCC-DZ und DZ .....	59
5.6	Faszin .....	61
5.7	In-situ Lokalisation der RCC-DZ, DZ und Makrophagen in Relation zum Lymphgefäßsystem im Nierenzellkarzinomgewebe .....	62
5.7.1	Prozentuale Häufigkeit der einzelnen Subpopulationen am myeloischen Gesamtinfiltrat in der Transitzone des RCCs .....	65
5.7.2	Räumliche Verteilung der einzelnen Zelltypen in Relation zu den Lymphgefäßen .....	66
5.7.3	Die integrierte myeloische podoplanin <sup>+</sup> Subpopulation .....	68
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>72</b>
6.1	Die RCC-DZ .....	72
6.2	Die Bedeutung der RCC-DZ für die antitumorale Immunantwort und Toleranz .....	75
6.3	Bedeutung der RCC-DZ in der Pathogenese des RCC .....	77
6.4	Die RCC-DZ im Therapiekontext .....	78
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>80</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>81</b>
<b>9</b>	<b>Abkürzungen.....</b>	<b>89</b>
<b>10</b>	<b>Veröffentlichung .....</b>	<b>92</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>93</b>



# 1 Einleitung

## 1.1 Das humane Immunsystem

Der menschliche Körper sieht sich in seiner Umwelt der ständigen Konfrontation mit potentiell pathogenen Mikroorganismen ausgesetzt. Um deren Angriff abzuwehren und seine Integrität zu bewahren, bedient sich der Körper verschiedener Mechanismen und Zellen, die kollektiv als das Immunsystem zusammengefasst werden. Dieses Abwehrsystems besitzt die Fähigkeit zwischen körpereigenen und körperfremd zu unterscheiden, ebenso wie körperfremd abzuwehren ohne sich selbst anzugreifen. Dies stellt das Schlüsselement zum Schutz des Organismus dar (Medzhitov und Janeway 2002, Matzinger 2002).

### 1.1.1 Angeborenes und adaptives Immunsystem

Generell wird das angeborene, unspezifische Immunsystem vom adaptiven, spezifischen Immunsystem unterschieden.

Zum angeborenen Immunsystem zählen physiologische Barrieren wie Epithelien, der pH-Wert eines Gewebes oder Immunzellen wie Makrophagen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Dendritische Zellen (DZ) und Granulozyten. Die Immunzellen besitzen keimbahnkodierte Rezeptoren, die „pattern recognition receptors“ (PRRs), womit sie pathogenassoziierte Molekularmuster (PAMPs) erkennen. Da die Abwehrmechanismen genetisch angelegt sind, bedürfen die Zellen des angeborenen Immunsystems keiner Voraktivierung und können sofort eine Reaktion gegen das Pathogen einleiten. Mittels Phagozytose und intrazellulärem Verdau werden die Pathogene unschädlich gemacht. Das angeborene Immunsystem hat keine Gedächtnisfunktion und wird bei erneutem Antigenkontakt nicht schneller wirksam oder effektiver.

Zum adaptiven Immunsystem gehören die B-Lymphozyten und die T-Lymphozyten. Jeder Lymphozyt ist mit einem einzigartigen Antigenrezeptor ausgestattet. Diese enorme Vielfalt an unterschiedlichen Rezeptoren wird durch Rekombination rezeptorkodierender Gensegmente ermöglicht. Nach Kontakt mit dem passenden Antigen auf professionellen antigen-präsentierenden Zellen (APZ) können sich B-Zellen in antikörperproduzierende Plasmazellen oder langlebige Gedächtniszellen differenzieren. Der antigenerkennende Rezeptor der T-Zellen ist der T-Zell-Rezeptor (TZR), der durch APZ präsentiertes Antigen mithilfe von Korezeptoren wie CD4 und CD8 erkennt. Die Zellen der adaptiven Immunabwehr sind per se „naiv“ und

bedürfen eines Antigen-Erstkontakts, um Effektorfunktion zu erlangen. Das adaptive Immunsystem ist antigenspezifisch und bei erneutem Antigenkontakt effektiver als bei Erstkontakt. Beide Formen der Immunabwehr interagieren miteinander. Ein gut koordiniertes Zusammenspiel ist Voraussetzung für eine effiziente Immunreaktion (Borghans, et al. 1999).

## 1.2 Die dendritische Zelle

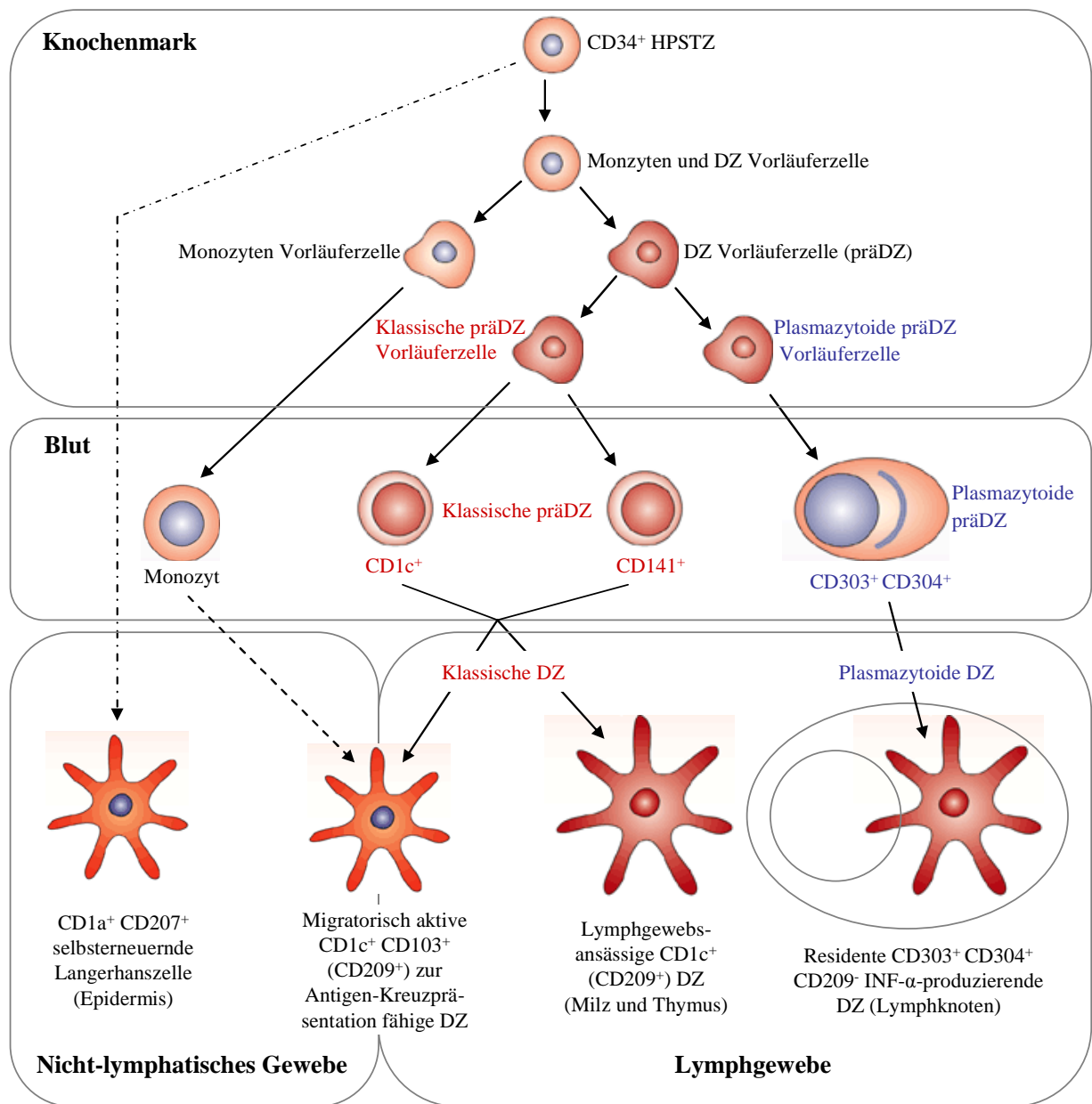
### 1.2.1 Ontogenie

DZ stammen wie alle Blutzellen von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks ab. Im Vergleich zu anderen hämatopoetischen Zelltypen, die meist aus einer spezifischen Vorläuferzelle entstehen, besteht bei der Entwicklung der DZ eine hohe Diversität. Eine gemeinsame Vorläuferzelle der DZ im Knochenmark (präDZ) kann eine Vielzahl an heterogenen Subpopulationen generieren (Liu und Nussenzweig 2010).

Aus der  $CD34^+$  hämatopoetischen Stammzelle differenziert sich eine den präDZ und Monozyten gemeinsame Vorläuferzelle (Abbildung 1.2.1). Die Hypothese, dass plasmazytoide DZ der lymphoiden und klassische DZ der myeloischen Zellreihe entstammen, scheint mittlerweile überholt zu sein. Aus myeloischen präDZ können sich sowohl plasmazytoide als auch klassische präDZ Vorläuferzellen entwickeln (Liu und Nussenzweig 2010).

Im Blut zirkulieren die klassischen und plasmazytoiden präDZ, die in Form und Funktion noch unreif sind und sich erst auf einen inflammatorischen oder mikrobiellen Stimulus hin differenzieren (Ziegler-Heitbrock, et al. 2010). Aus  $CD303^+/BDCA-2$   $CD304^+/BDCA-4$  plasmazytoiden präDZ entwickeln sich residente  $CD303^+CD304^+CD209^-/DC-SIGN^-$  plasmazytoide DZ, die im Lymphknoten auf einen viralen oder mikrobiellen Stimulus Interferon- $\alpha$  produzieren, wodurch die virale Proteinsynthese gehemmt und andere Immunzellen aktiviert werden können. Die klassischen DZ, die von  $CD1c/BDCA-1^+$  oder  $CD141/BDCA-3^+$  klassischen präDZ abstammen und in Form und Funktion gereift sind, werden in zwei Subtypen gegliedert, die migratorisch aktiven  $CD1c^+CD103^+CD209^+$  oder  $CD1c^+CD103^+CD209^-$  DZ und die im Lymphgewebe ansässigen  $CD1c^+CD209^+$  oder  $CD1c^+CD209^-$  DZ (Shortman und Naik 2007). Die migratorisch aktiven DZ patrouillieren durch Gewebe und präsentieren im Lymphknoten naiven T-Zellen phagozytiertes Antigen. Im Gegensatz dazu migrieren die im Lymphgewebe ansässigen DZ nicht. Sie sind hauptsächlich in ihrem Ursprungsgewebe für die Antigenaufnahme und Antigenpräsentation zuständig. In der Maus können spezielle Untergruppen der klassischen, im Lymphgewebe ansässigen DZ

anhand des Oberflächenrezeptors CD8 unterschieden werden (Vremec, et al. 2000; Shortman und Liu 2002).



**Abbildung 1.2.1 Die Hämatopoese der dendritischen Zelle.**

Monozyten und DZ Vorläuferzellen stammen von  $CD34^+$  hämatopoetischen Stammzellen (HPSTZ) des Knochenmarks ab. Sowohl klassische als auch plasmazytoide präDZ Vorläufer differenzieren sich aus der präDZ im Knochenmark. Im Blut zirkulieren die klassischen  $CD1c^+$  oder  $CD141^+$  präDZ und die plasmazytoiden  $CD303^+$  $CD304^+$  präDZ, die aus den jeweiligen Vorläuferzellen hervorgehen. Die plasmazytoiden präDZ entwickeln sich in die im Lymphknoten residenten  $INF-\alpha$  produzierenden  $CD303^+$  $CD304^+$  $CD209^-$  DZ. Von der klassischen präDZ stammen sowohl migratorisch aktive, also auch im Lymphgewebe ansässige  $CD1c^+$  $CD209^+$  oder  $CD1c^+$  $CD103^+$  DZ ab. Die migratorisch aktiven Antigen-kreuzpräsentierenden  $CD103^+$  DZ patrouillieren durch Gewebe und Lymphe und präsentieren im Lymphknoten naiven T-Zellen phagozytirtes Antigen. Die im Lymphgewebe ansässigen DZ sind für die Aufnahme und Präsentation von Antigen hauptsächlich vor Ort zuständig. In der Epidermis treten außerdem  $CD1a^+$  $CD207^+$  Langerhanszellen auf, die einen eigenen Entwicklungsweg haben und sich vor Ort selbsterneuern. (Angelehnt an Shortman und Liu 2002.)

Die in Geweben wie der Niere, Lunge, Plazenta oder Lymphgewebe vorkommenden  $CD103^+CD1c^+CD209^+$  oder  $CD103^+CD1c^+CD209^-$  migratorisch aktiven DZ können virales und autologes Antigen kreuzpräsentieren und tragen mitunter zur Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz bei (Sung und Bolton 2010; del Rio, et al. 2010; Collins, et al. 2009). In der Epidermis wird zudem die Subpopulation der  $CD1a^+CD207^+$  Langerhanszellen gefunden, die eine eigene Entwicklung durchlaufen. Langerhans-Vorläufer besiedeln bereits in der späten Embryonalperiode die Dermis und können sich später vor Ort selbst erneuern (Chorro, et al. 2009). DZ ändern milieuhängig ihren Erscheinungszustand, was als Plastizität bezeichnet wird, und demzufolge können bei einer Infektion oder Entzündung neuartige Subpopulationen gefunden werden (Shortman und Naik 2007).

### **1.2.2 Die Rolle von DZ bei der Induktion von peripherer Toleranz oder Immunität**

DZ sind sowohl Vermittler der Immunität als auch der immunologischen Toleranz gegenüber Selbstantigenen (Steinman und Nussenzweig 2002). Neben der Aufnahme von möglichen pathogenen Erregern werden auch körpereigene Proteine phagozytiert. Diese Quelle an Selbstantigenen ist ein wichtiger Bestandteil in der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz und der Elimination autoreaktiver T-Zellen. Ursprünglich wurde angenommen, dass immature DZ, die keine T-Zell-Stimulationsfähigkeit besitzen und weniger kostimulatorische Rezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimieren, zu immunologischer Toleranz führen, während mature DZ mit kostimulatorischen Oberflächenmolekülen und der Fähigkeit T-Zellen zu aktivieren, Immunität induzieren. Jedoch wurde im Tiermodell gezeigt, dass auch mature DZ, die kontinuierlich Selbstantigene in das Lymphgewebe transportierten, periphere Toleranz gegenüber Selbstantigenen aufrechterhalten (Shortman und Heath 2001). Demzufolge wird sowohl immunologische Toleranz als auch Immunität über mature DZ induziert. Der Reifungsprozess zur matura DZ wird durch exogene Maturierungssignale wie mikrobiologische Bestandteile, inflammatorische Zytokine oder CD40L reguliert (Sallusto und Lanzavecchia 1994; Roake, et al. 1995). DZ kontrollieren die Qualität der T-Zellantwort indem sie die Differenzierung von naiven T-Zellen zu bestimmten Effektorzellen bewirken. Um die Differenzierungsrichtung der T-Zelle zu determinieren, bedarf es neben der Aufnahme, Prozessierung und Präsentation des Pathogens weiterer Signale. Wird eine Interaktion zwischen DZ und T-Zelle ausschließlich über den T-Zell-Rezeptor mit dem auf MHC-Rezeptor präsentierten Antigen geführt (Signal 1), so resultiert eine T-Zell-Inaktivierung durch Anergie oder Apoptose, ein Mechanismus der zu peripherer Toleranz führt. Waren zusätzlich

akzessorische Signale über kostimulatorische Moleküle wie CD80/B7.1 oder CD86/B7.2 übermittelt (Signal 2), wird Immunität induziert und es folgt eine T-Zell-Expansion, Zelldifferenzierung und die Bildung eines immunologischen Gedächtnisses (Reis e Sousa 2006). Durch die zusätzliche Sekretion von Zytokinen, wie beispielsweise Interleukin-12 (IL-12), bewirkt die DZ die Differenzierung einer naiven T-Zelle zur zytotoxischen T-Zelle (Signal 3; Trinchieri 2003). Für die Ausbildung einer T-Zelle mit voller Effektorfunktion, muss die DZ von  $CD4^+$  T-Zellen „lizenzieren“ werden. Dies geschieht über die Interaktion von CD40L/CD154 mit CD40 auf der APZ.

Die DZ spielt somit eine zentrale Rolle in der Initiation und Steuerung einer Immunantwort.

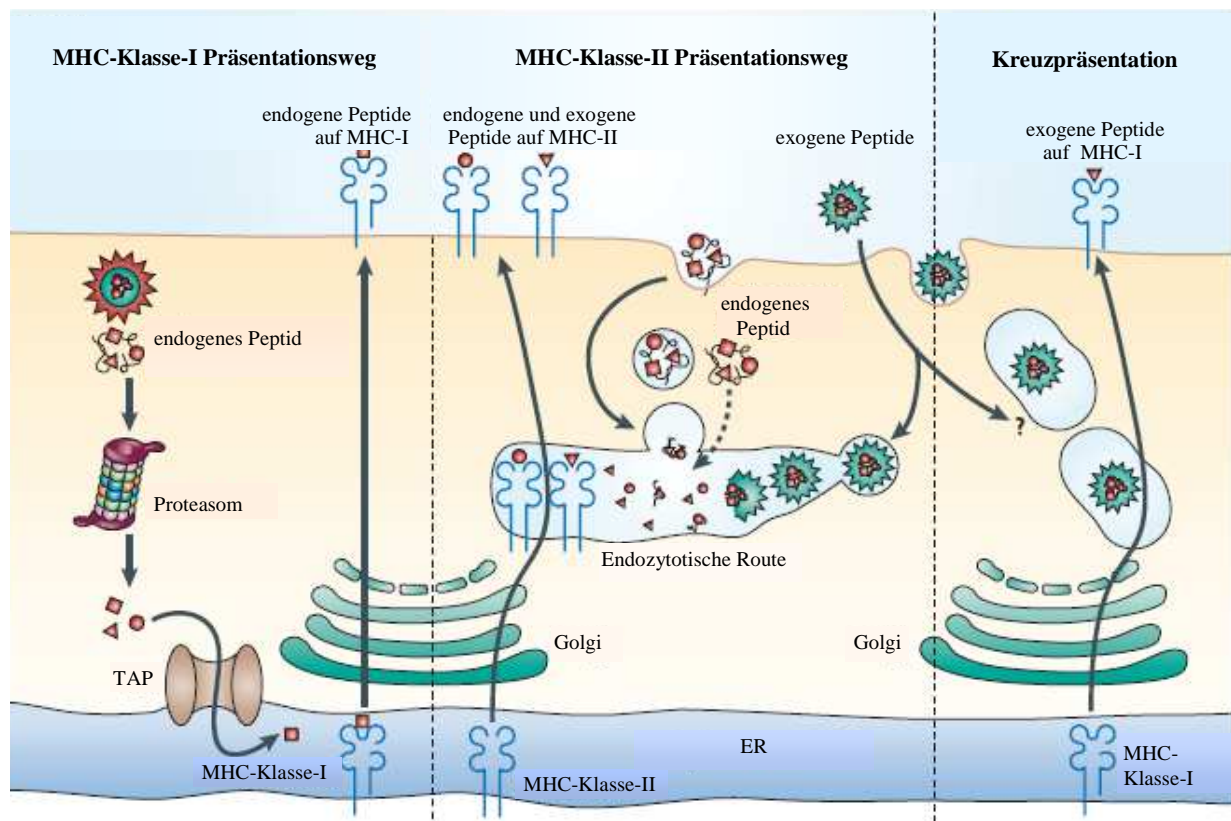
### **1.3 MHC-restringierte Antigenpräsentation der DZ zur T-Zell-Stimulation**

Um das für den T-Zell-Rezeptor spezifische Antigen erkennen zu können, muss das Antigen von besonderen Molekülen auf der Zelloberfläche von APZ präsentiert werden. Diese Moleküle sind im Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) auf Chromosom 6 kodiert. Es werden MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II Moleküle unterschieden. Das Phänomen, dass T-Zellen Antigen nur auf körpereigenen MHC-Molekülen als prozessiertes, kurzkettiges Peptid erkennen, wird MHC-Restriktion genannt (Zinkernagel und Doherty 1974).

MHC-Klasse-I Proteine befinden sich auf nahezu allen kernhaltigen Zellen des Organismus. Über diesen Weg werden zelleigene, zytosolische Proteine an zytotoxische T-Zellen ( $CD8^+$ ) präsentiert. Die T-Zelle wird allerdings nur dann aktiviert, wenn veränderte Peptide, wie sie beispielsweise bei einer Virusinfektion oder Mutation auftreten, präsentiert werden. Ist das präsenzierte zelleigene Antigen unverändert, wird die T-Zelle nicht aktiviert und die Zelle nicht angegriffen. Um die MHC-I-Moleküle mit Peptiden beladen zu können, müssen die Proteine zunächst von einem multikatalytischen Proteasekomplex, dem Proteasom, zu Peptiden zerkleinert werden. Im Anschluss werden diese Proteinfragmente über Transportersysteme in das Endoplasmatische Retikulum geschleust und auf die MHC-I-Moleküle geladen. Im Komplex mit MHC-I gelangen sie dann auf die Zelloberfläche.

Im Gegensatz zu den MHC-Klasse-I Proteinen werden MHC-Klasse-II Moleküle nur von professionellen APZ exprimiert. Proteine, die über MHC-II präsentiert werden, sind exogene Antigene, die mittels Endozytose aus dem Extrazellulärraum aufgenommen wurden. Sie werden von  $CD4^+$  T-Helferzellen erkannt und führen zu deren Aktivierung. Nach Aufnahme in die APZ wird das Protein im Endosom fragmentiert und in MHC-II-Moleküle eingelagert. Der MHC-II-Peptid-Komplex wird anschließend an die Zelloberfläche transportiert.

Neben den beiden klassischen Antigenpräsentationswegen, exogene Antigene auf MHC-II und endogene Antigene auf MHC-I Molekülen, verfügen DZ über eine weitere Fähigkeit, die Kreuzpräsentation. Hierbei werden exogene Antigene auf MHC-I Molekülen präsentiert. Durch die Präsentation von aufgenommenem Antigen auf MHC-I kann eine zytotoxische T-Zellantwort gegen Antigene, die nicht von der DZ selbst produziert wurden, wie beispielsweise Tumorantigene, induziert werden. Der genaue Mechanismus der Kreuzpräsentation ist noch umstritten. Zum einen wird postuliert, dass das Phagosom, welches das Antigen enthält, mit dem Endoplasmatischen Retikulum, in dem sich MHC-I Moleküle befinden, fusioniert (Villadangos, et al. 2007). Zum anderen wird die Version der direkten Beladung von MHC-I-Molekülen mit Antigen im Endosom diskutiert (Burgdorf, et al. 2008; Di Pucchio, et al. 2008). Abbildung 1.3 gibt einen Überblick über die drei Antigenpräsentationswege der DZ.



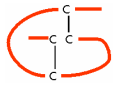

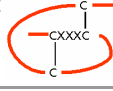
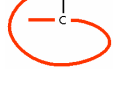
**Abbildung 1.3 Übersicht über die Antigenpräsentationswege dendritischer Zellen.**

Endogen synthetisierte Proteine werden nach ihrer Degradation im Proteasom über Transportersysteme (TAP = Transporter associated with antigen processing) in das Endoplasmatische Retikulum (ER) geschleust, wo sie auf MHC-Klasse-I Moleküle geladen und im Komplex auf die Zelloberfläche transportiert werden. Exogene, aus dem Extrazellularraum oder durch Autophagie internalisierte Antigene, werden im Endosom in Peptide zerteilt, in MHC-Klasse-II Moleküle eingelagert und mit diesen zusammen an der Zelloberfläche präsentiert. Darüber hinaus können DZ exogene Antigene über MHC-Klasse-I kreuzpräsentieren. Es bleibt noch zu klären, ob MHC-I und MHC-II um das exogene Antigen konkurrieren oder ob der Mechanismus der Endozytose bei der Internalisierung den Präsentationsweg bestimmt (Villadangos und Schnorrer 2007).

## 1.4 Chemokine und Chemokinrezeptoren

Chemokine sind kleine Signalproteine, die bei Zellen mit passenden Rezeptoren eine chemotaktische Bewegung auslösen. Hierbei wandern die Zellen entlang eines Konzentrationsgradienten zum Ort der höchsten Chemokinkonzentration. Anhand ihrer chemischen Struktur lassen sich die Chemokine in vier Familien unterteilen (siehe Tabelle 1): CC-Chemokine (CCL), in deren Aminosäuresequenz zwei Cysteine direkt aufeinander folgen, CXC-Chemokine (CXCL), bei denen zwei Cysteine durch eine Aminosäure voneinander getrennt sind, CX<sub>3</sub>C-Chemokine (CX<sub>3</sub>CL), deren Cysteine durch drei Aminosäuren voneinander getrennt liegen und XC-Chemokine (XCL). Bei den ersten drei Gruppen werden jeweils zwei Disulfidbrücken gebildet. Die XC-Familie besitzt nur ein konserviertes Cystein am Amino-Terminus und bildet somit nur eine Disulfidbrücke aus. Entsprechend der Chemokine bezeichnet man die Rezeptoren CC-Rezeptoren (CCR), CXC-Rezeptoren (CXCR), CX<sub>3</sub>C-Rezeptoren (CX<sub>3</sub>CR) oder XC-Rezeptoren (XCR) (Sozzani, et al. 1998; Zlotnik und Yoshie 2000).

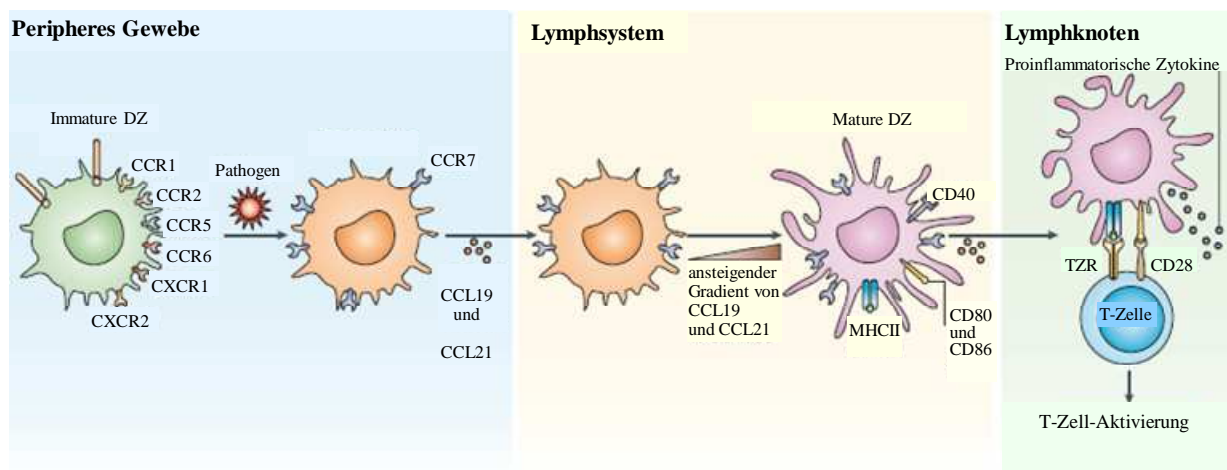
**Tabelle 1 Die Klassifikation ausgewählter Chemokine mit korrespondierendem Rezeptor und deren Expressionsmuster auf Leukozyten.**

Chemokin-Familie <sup>1</sup>	Vertreter	Chemokinrezeptor	Chemokinrezeptor-expression
CC 	CCL3, CCL5, CCL7, CCL14, CCL15, CCL16, CCL23  CCL2, CCL7, CCL12, CCL13  CCL3, CCL4, CCL5  CCL20  CCL19, CCL21	CCR1  CCR2  CCR5  CCR6  CCR7	immature DZ, Monozyten, NK-Zellen  immature DZ, Monozyten, Basophile immature DZ, Monozyten, T-Zellen, NK-Zellen immature DZ, B-Zellen immature und mature DZ, T-Zellen,
CXC 	CXCL1, CXCL6, CXCL8  CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8	CXCR1  CXCR2	immature DZ immature DZ, neutrophile Granulozyten
CX <sub>3</sub> C 	CX <sub>3</sub> CL1	CX <sub>3</sub> CR1	Monozyten, T-Zellen, NK-Zellen
XC 	XCL1	XCR1	NK-Zellen

<sup>1</sup>Die schematischen Strukturformeln der Chemokinfamilien zeigen die Peptidkette in rot und die Disulfidgruppen in schwarz (Kohidai und Csaba 1998).

Die traditionelle Sicht, dass Chemokine ausschließlich Entzündungsmediatoren seien, ist überholt. So spielen sie bei vielen anderen Prozessen wie der Entwicklung von Lymphorganen, der Angiogenese, der Zellrekrutierung und der Zellmigration eine Rolle (Zlotnik und Yoshie 2000). Die zur Aufrechterhaltung der Homöostase benötigten Chemokine, wie beispielsweise CCL19, werden konstitutiv exprimiert und von den inflammatorischen, induzierbaren Chemokinen, wie beispielsweise CX<sub>3</sub>CL1, unterschieden. Das Ligand-Rezeptor-System ist redundant. So können verschiedene Chemokine an einen Rezeptor binden, wie zum Beispiel CCL19 und CCL21 an CCR7. Zudem sind die Chemokinrezeptoren nicht zellspezifisch: CCR7 wird sowohl auf DZ als auch auf Subtypen von T-Zellen exprimiert. Darüber hinaus können Chemokine rezeptorabhängig eine agonistische oder antagonistische Wirkung evozieren (Proudfoot, et al. 2010).

#### 1.4.1 Die Rolle der Chemokine bei der Migration von klassischen DZ



**Abbildung 1.4.1 Die Rolle der Chemokine bei der Migration von klassischen dendritischen Zellen.**

Immature DZ exprimieren die Chemokinrezeptoren CCR1, CCR2, CCR5, CCR6, CXCR1 und CXCR2, welche sie ins Gewebe lotsen. Durch Antigenkontakt und inflammatorische Stimuli treten sie in den Reifungsprozess, wobei sie vermehrt CCR7, MHC-II, CD40, CD80 sowie CD86 exprimieren. Die DZ können nun auf die konstitutiv vom Lymphgewebe produzierten Chemokine CCL19 und CCL21 reagieren und werden zum drainierenden Lymphknoten gelenkt. Dort interagiert die mature DZ mit der T-Zelle, wodurch letztere aktiviert wird. (Angelehnt an Bachmann, et al. 2006).

Abhängig von ihrem Aktivitätszustand exprimieren DZ verschiedene Chemokinrezeptoren und reagieren demzufolge auf unterschiedliche Chemokine (Abbildung 1.4.1). Immature DZ exprimieren die Chemokinrezeptoren CCR1, CCR2, CCR5, CCR6, CCR7, CXCR1 und CXCR2 auf der Zelloberfläche. Auf maturen DZ ist dagegen überwiegend CCR7 zu finden. Das inflammatorische Chemokin CCL3 beispielsweise bindet an CCR1 oder CCR5 und lockt klassische immature präDZ aus dem Blut an den Ort der Entzündung. Durch Antigenkontakt



und inflammatorische Stimuli treten die präDZ in den Reifungsprozess und regulieren die Expression von MHC-II und kostimulatorischen Rezeptoren wie CD40, CD80 und CD86 hoch. Zudem sezernieren sie weitere Zytokine und Chemokine, um andere Immunzellen zum Fokus der Infektion zu rekrutieren und Effektorzellen zu aktivieren (Zlotnik und Yoshie 2000). Über die Expression von CCR7 erhalten migratorisch aktive DZ eine neue Reaktivität auf Chemokine, wie CCL19 und CCL21, die sie über den Lymphweg in das sekundäre Lymphgewebe lotsen. Als mature DZ erreichen sie den Ort der höchsten Chemokinkonzentration, die T-Zell-Region der lymphatischen Organe, in denen sie mit naiven T-Zellen interagieren und diese aktivieren.

## 1.5 Tumorimmunologie

Obwohl Tumorzellen Antigene exprimieren und diese von Immunzellen erkannt werden, gelingt es der immunologischen Abwehr nicht das maligne Wachstum zu beherrschen. Die bereits 1909 von Paul Ehrlich postulierte Hypothese, dass das Immunsystem Tumoren angreifen kann (Garcia-Sanchez, et al. 2010), wurde von Burnet und Thomas 1960 unter dem Begriff der Immunüberwachung (immunosurveillance) aufgegriffen (Burnet 1957). Diese Theorie basiert auf der Annahme, dass das Immunsystem Tumorzellen mittels Effektorimmunzellen detektieren und eliminieren kann. Doch erst mit der Entwicklung von transgenen Mausmodellen und monoklonalen Antikörpern konnte die Hypothese getestet werden. Neben der Theorie der Immunüberwachung existierte die erstmals 1863 von Rudolf Virchow formulierte Hypothese, dass chronische Entzündungsprozesse einen prädisponierenden Faktor für Krebserkrankungen darstellen. Sie besagt, dass das chronisch entzündete Mikromilieu eine entscheidende Rolle sowohl bei der Krebsentstehung als auch bei der Krebsprogression spielt. Chronische Entzündung wirkt gleichermaßen hoch proliferativ wie auch hoch gewebeschädigend und kann zu einer malignen Umwandlung des Gewebes führen. Die gegenseitige Stimulation von Tumorzellen und immunkompetenten Zellen begünstigt weiterhin die Tumorprogression.

Die Erkenntnis, dass das Immunsystem eine ambivalente Rolle in der Tumorbekämpfung und Tumorförderung spielt, veranlasste Dunn et al. (Dunn, et al. 2002) dazu, den Begriff des „Immunoediting“ einzuführen. Diesem Konzept zufolge kommt es zu einer wechselseitigen Beeinflussung von Tumor und Immunsystem, welche nach Dunn in drei Phasen eingeteilt werden kann: Elimination, Equilibrium und Entkommen (Escape). Im frühen Stadium der Tumorentstehung werden die Tumorzellen erkannt und von einwandernden Immunzellen

angegriffen. Chemokine und Zytokine rekrutieren weitere Zellen wie beispielsweise DZ, die Tumorpartikel aufnehmen und spezifische T-Zellen ausbilden, die für die Zerstörung der Tumorzellen verantwortlich sind (Elimination). Daran schließt sich die Phase des Equilibriums an, welche ein dynamisches Gleichgewicht darstellt, in welchem Tumorzellen den Angriff überleben und durch die Lymphozyten einem permanenten Selektionsdruck unterliegen. Hierbei können sich Tumorzellklone mit verminderter Immunogenität herausbilden. Dies stellt die tumorfördernde Komponente des Immunsystems dar. Im Stadium des Entkommens gelingt es der Tumorzelle mithilfe der entwickelten Mechanismen der Immunantwort zu entkommen und zu wachsen. Die Mechanismen des Tumorentkommens sind vielfältig und reichen von der Produktion immunsuppressiver Zytokinen, wie TGF- $\beta$  und IL-10, über den Verlust immunogener Tumorantigene bis hin zur Induktion von regulatorischen T-Zellen (Dunn, et al. 2004).

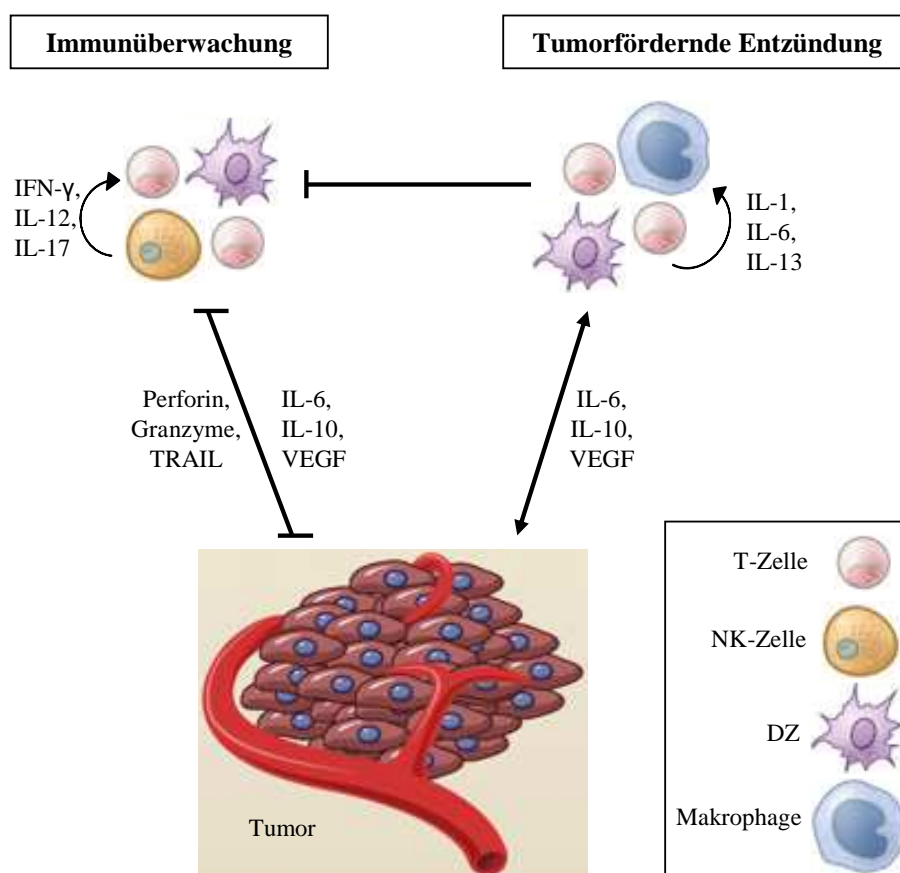
### **1.5.1 Das inflammatorische Tumormikromilieu**

Dem inflammatorischen Mikromilieu wird eine entscheidende Rolle in der Tumorentstehung zugeschrieben, wenn auch kausale Zusammenhänge zwischen einer Entzündung und der Tumorentstehung schwer zu belegen sind (Mantovani, et al. 2008).

So sind viele Risikofaktoren wie das Rauchen mit chronischer Entzündung assoziiert (Takahashi, et al. 2010). Darüber hinaus können bakterielle und virale Infektionen, die ebenfalls entzündliche Reaktionen auslösen, das Krebs-Erkrankungsrisiko erhöhen (de Martel und Franceschi 2009). Tumore besitzen oft ein Infiltrat aus verschiedenen Immun- und Entzündungszellen. Die Zellen im Tumormikromilieu entscheiden durch Kommunikation untereinander, über ihren Aktivitätsstatus, sowie ihre Zytokin- oder Chemokinproduktion darüber, ob eine tumorfördernde Entzündung oder antitumorale Immunität resultiert (Lin und Karin 2007; Smyth, et al. 2004). Tumorfördernde Entzündung und antitumorale Immunität koexistieren während der Tumorprogression in unterschiedlichem Ausmaß (Abbildung 1.5.1) (Bui und Schreiber 2007; Swann, et al. 2008).

Die innerhalb der tumorinfiltrierenden Immunzellen am häufigsten vorkommende Zellpopulation sind die tumorassoziierten Makrophagen (TAM) und die T-Zellen. TAM fördern das Tumorwachstum und sind wesentlich an Angiogenese, Invasivität und Metastasierung beteiligt (Condeelis und Pollard 2006). Ein hoher Anteil an TAM im Tumormikromilieu korreliert meist mit einer schlechten klinischen Prognose (Murdoch, et al. 2008). T-Zellen können sowohl tumorsupprimierende als auch tumorfördernde Eigenschaften haben, je nachdem welchem Subtyp sie angehören (DeNardo, et al. 2009; Langowski, et al.

2007). Eine erhöhte Anzahl an zytotoxischen T-Zellen und proinflammatorischen T-Helferzellen korreliert beim invasiven Kolonkarzinom, dem malignen Melanom, dem multiplen Myelom und dem Pankreaskarzinom mit einem besseren Überleben (Galon, et al. 2006; Laghi, et al. 2009; Swann und Smyth 2007). NK-Zellen sind die einzigen Zellen, die bislang nicht mit tumorfördernden Effekten assoziiert wurden. Für sie ist nur ein direkter zytotoxischer Effekt auf Tumorzellen beschrieben. DZ spielen während der antitumoralen Immunität einerseits eine wichtige Rolle in der Antigenpräsentation und T-Zell-Aktivierung, andererseits können sie auch zur Immunsuppression im bestehenden Tumor beitragen (Grivennikov, et al. 2010).



**Abbildung 1.5.1 Die Balance zwischen Immunüberwachung und tumorfördernder Entzündung im Tumormikromilieu.**

Tumorfördernde Zytokine wie IL-6, IL-10 und VEGF wirken auf Immun- und Tumorzellen, indem sie die Balance in Richtung Tumorpromotion lenken. Die Immunüberwachung inhibiert das Tumorwachstum durch Zytokine wie TRAIL und zytotoxische Effekte (Perforin, Granzyme) und wird durch die tumorfördernde Entzündung gedämpft. Die Immunzellen kommunizieren über IL-1, IL-6, IL-12, IL-13, IL-17 und IFN- $\gamma$  untereinander.

Ein richtungsbestimmender Faktor in der Weichenstellung zu antitumoraler Immunität oder Tumorprogressionsförderung scheint das Tumormikromilieu mit seinem spezifischen Zytokin- und Chemokinprofil zu sein. Die von Tumorzellen sezernierten Zytokine wie IL-6, IL-10 und

VEGF (Gefäßendothelialer Wachstumsfaktor, "Vascular Endothelial Growth Factor") können die Tumorentstehung und -progression fördern indem sie die tumorfördernde Entzündung unterhalten oder die Immunüberwachung inhibieren (Abbildung 1.5.1). Das inflammatorische Milieu beeinflusst die Immunüberwachung negativ, die ihrerseits über Zytokine wie beispielsweise TRAIL (Tumornekrosefaktor-verwandter-Apoptose-induzierender Ligand) oder über zytotoxische Effektormoleküle wie Perforine und Granzyme das maligne Wachstum inhibiert (Lin und Karin 2007). Die Kommunikation unter den Immunzellen geschieht über Zytokine, wie IL-12, IL-17 und IFN- $\gamma$ . Während der Inflammation werden zusätzliche Zytokine wie IL-1, IL-6 und IL-13 sezerniert, die einen immunsuppressiven Effekt bewirken und zum Tumorwachstum beitragen.

### **1.5.2 Die DZ im Tumorkontext und in der Immuntherapie**

Aufgrund ihrer zentralen Bedeutung für die Initiation einer Immunantwort stellt die DZ ein Ziel für eine therapeutische Intervention bei Tumorerkrankungen. Jedoch kann das Tumormilieu auf die DZ Einfluss nehmen, so dass die immuninduzierenden Funktionen nicht mehr ausgeübt werden. Mögliche Mechanismen der DZ-Inhibierung im Tumormilieu können sowohl die DZ direkt betreffen, wie durch Änderung des Differenzierungszustandes, als auch indirekt beispielsweise durch die Auslöschung essentieller Signale für die Migration (Vicari, et al. 2002). So sezernieren Tumoren Zytokine wie IL-6 und IL-10, welche die DZ-Maturierung durch STAT3-Signalwirkung supprimieren. Zudem kann der Tumor die DZ so konditionieren, dass sie immunsuppressive T-Zellen wie FOXP3<sup>+</sup> und IL-13-produzierende T-Helferzellen ausbildet (Steinman und Banchereau 2007). Diese durch den Tumor veränderte DZ, die wenig immunaktive oder sogar immunsupprimierende Wirkung hat, dürfte ein Grund dafür sein, dass das Immunsystem in Patienten spontan, das heißt ohne Therapie, bei der Kontrolle der Tumorentstehung und Tumorprogression versagt.

Mit dem technologischen Fortschritt, dass DZ in-vitro aus Blutmonozyten hergestellt werden können, entwickelte sich die therapeutische Branche der DZ-Anwendung (O'Doherty, et al. 1993). Gegenwärtig werden in-vitro generierte DZ als Immunvakzin gegen Krebserkrankungen in der Klinik eingesetzt (Hsu, et al. 1996; Nestle, et al. 1998; Banchereau und Palucka 2005). Mittlerweile gibt es kaum noch eine Krebserkrankung, bei der nicht eine immunstimulatorische Therapie mittels DZ versucht wurde (Ridgway 2003). Therapieversuche beim malignen Melanom sind aufgrund der Kenntnis spezifischer Tumorantigene und seiner Immunogenität am häufigsten und am weitesten entwickelt (Lens 2008). Aber auch Studien an Patienten mit Nierenzellkarzinom (Avigan, et al. 2007), Mammakarzinom (Dees, et al. 2004), Hirntumoren

(Wheeler, et al. 2008) oder Prostatakarzinom (Doehn, et al. 2008) zeigten, dass DZ eine antitumorale Immunantwort induzieren können. Leider überzeugten die klinischen Ergebnisse bisher nicht, da Remissionen selten und nicht von Dauer waren. Mögliche Gründe dafür sind, dass diese Art der Therapie erst im Endstadium der Erkrankung eingesetzt wird (Nencioni, et al. 2008) oder dass die Patienten häufig weniger funktionsfähige DZ besitzen (Gottfried, et al. 2008). Derzeit sind zwei Therapiestrategien im Einsatz: die Beladung der in-vitro generierten DZ mit Tumorantigenen und anschließende Reinjektion in den Patienten oder die Injektion von monoklonalen, gegen DZ gerichteten Antikörpern, an welche die Tumorantigene gekoppelt wurden. Aktuelle Empfehlungen zum Immunvakzin beinhalten eine Kombination aus DZ und Tumorantigenen (Carrasco, et al. 2008), Immunadjuvantien oder antigenspezifischen T-Zellen (Engell-Noerregaard, et al. 2009).

## **1.6 Das humane Nierenzellkarzinom**

Das Nierenzellkarzinom (renal cell carcinoma, RCC) entsteht aus dem proximalen Tubulusepithel der Niere. Es ist mit einer Häufigkeit von etwa 3% aller malignen Erkrankungen im Erwachsenenalter der dritthäufigste maligne urologische Tumor und steht an sechster Stelle aller krebsbedingten Todesursachen. Die Inzidenz liegt weltweit bei 102.000 Neuerkrankungen pro Jahr, wobei Männer häufiger erkranken als Frauen (3:2). Der Altersgipfel liegt zwischen dem 6. und 7. Lebensjahrzehnt.

Bekannte Risikofaktoren sind Zigarettenrauch (Hunt, et al. 2005), Übergewicht (Bjorge, et al. 2004; van Dijk, et al. 2004) und arterieller Hypertonus (McLaughlin, et al. 1995). In 2-3% der Fälle besteht eine familiäre Disposition, die mit autosomal dominant vererbten Syndromen assoziiert ist. Hervorzuheben ist hierbei das von-Hippel-Lindau (VHL)-Syndrom, bei dem verschiedene Mutationen des VHL-Tumorsuppressorgens vorliegen.

Histogenetisch handelt es sich um eine heterogene Tumorentität. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) unterteilt die epithelialen Nierenzellkarzinome entsprechend ihrer zytogenetischen und molekularen Eigenschaften in acht Untergruppen. Mit 75% ist das klarzellige RCC die häufigste Entität, gefolgt vom papillären RCC mit 10-15% Häufigkeit und dem chromophoben RCC mit 5% Häufigkeit.

Die Klassifikation und die Stadieneinteilung, sowie der histologische Grad der Tumorzellendifferenzierung des klarzelligen Nierenzellkarzinoms sind in nachfolgender Tabelle dargestellt.

**Tabelle 2 Stadieneinteilung und TNM-Klassifikation des Nierenzellkarzinoms nach den Richtlinien des Union Internationale Contre Le Cancer (UICC) (Yoon und Herts 2003).**

<b>T: Primärtumor</b>			
pTx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden		
pT0	Kein Nachweis eines Primärtumors		
pT1	Primärtumor mit einem maximalen Durchmesser von 7 cm, auf die Niere begrenzt		
pT1a	Primärtumor mit einem maximalen Durchmesser von 4 cm, auf die Niere begrenzt		
pT1b	Primärtumor größer als 4 cm, aber maximal 7 cm im größten Durchmesser, auf die Niere begrenzt		
pT2	Primärtumor mit einem Durchmesser von mehr als 7 cm, auf die Niere begrenzt		
pT3	Tumor dehnt sich in große Venen aus oder invadiert die ipsilaterale Nebenniere oder perirenales Gewebe, durchbricht aber nicht die Gerota´sche Faszie		
pT3a	Tumor invadiert die ipsilaterale Nebenniere oder perirenales Gewebe, durchbricht aber nicht die Gerota´sche Faszie		
pT3b	Tumor dehnt sich makroskopisch in die Nierenvene oder die Vena cava aus, jedoch nur infradiaphragmatisch		
pT3c	Tumor dehnt sich makroskopisch bis supradiaphragmatisch in die Vena cava aus		
pT4	Tumor durchbricht die Gerota´sche Faszie		
<b>N: Regionale Lymphknoten (hilär, abdominal paraaortal und paracaval)</b>			
Nx	Regionale Lymphknoten können nicht beurteilt werden		
N0	Kein Hinweis aus regionale Lymphknotenmetastasen		
N1	Singuläre regionale Lymphknotenmetastasen		
N2	Mehr als eine regionale Lymphknotenmetastase		
<b>M: Fernmetastasen</b>			
Mx	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden		
M0	Kein Hinweis auf Fernmetastasen		
M1	Nachweis von Fernmetastasen		
<b>Stadiengruppierung</b>			
Stadium I	pT1	N0	M0
Stadium II	pT2	N0	M0
Stadium III	pT3	N0	M0
	pT1-3	N1	M0
Stadium IV	pT4	N0/1	M0
	Jedes pT	N2	M0
	Jedes pT	Jedes N	M1
<b>Histologisches Grading</b>			
G1	gut differenziert		
G2	mäßig differenziert		
G3/G4	schlecht differenziert/undifferenziert		

Im frühen Stadium verursacht das Nierenzellkarzinom wenige Symptome. Die klassische Trias aus Hämaturie, Flankenschmerz und palpablem, abdominalem Tumor ist kennzeichnend für ein fortgeschrittenes Stadium der Erkrankung. Heutzutage fällt der Nierentumor typischerweise als sonographischer oder Computertomograph-morphologischer Zufallsbefund auf. Entscheidend für die Prognose ist das Ausmaß der Erkrankung bei Diagnosestellung. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt in Stadium I und II noch bei 75-100%, in Stadium III ohne Lymphknotenbefall bei bis zu 60% und mit Lymphknotenbefall bei bis zu 30%. In Stadium IV sinkt die 5-Jahres-Überlebensrate auf 5-30%. Bei Diagnosestellung befinden sich bereits 30% im fortgeschrittenen Stadium.

Die chirurgische Entfernung des Primärtumors und resektabler Metastasen ist aufgrund der hohen Resistenz des Nierenzellkarzinoms gegen Bestrahlung und Chemotherapie die Therapie der Wahl und einzige kurative Option. Im lokalisierten Stadium geht der Trend von der radikalen Nephrektomie (Tumorgröße größer als 4 cm) hin zur partiellen, nierenerhaltenden Tumorsektion (Tumorgröße bis 4 cm) mit regionaler Lymphadenektomie. Im metastasierten Stadium ist der Goldstandard nach wie vor eine zytoreduktive Nephrektomie in Kombination mit einer weiterführenden Therapie. Als First-Line-Therapie gilt aus aktueller Studiendatenlage die zielgerichtete Therapie mit Sunitinib (Sutent<sup>®</sup>), einem Multi-Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitor zur Hemmung der Angiogenese (Escudier und Kataja 2010). Als weitere zielgerichtete Agentien in der First-Line-Therapie gelten die Kombination aus Immuntherapie (IFN- $\alpha$ ) und Bevacizumab (Avastin<sup>®</sup>), einem anti-VEGF-Antikörper, sowie die Therapie mit Temsirolimus (Torisel<sup>®</sup>, ein mTOR-Kinase-Inhibitor) bei Patienten mit schlechten prognostischen Prädiktoren. Bei Therapieversagen gilt alternativ Sorafenib (Nexavar<sup>®</sup>), ebenfalls ein Multi-Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitor, als Goldstandard (Escudier und Kataja 2010). Obwohl die zielgerichtete Therapie die Prognose des metastasierten Nierenzellkarzinoms signifikant verbessert hat und es in eine chronische therapierbare Erkrankung überführen konnte, werden nur wenige komplette Remissionen beobachtet (Gore und Larkin 2011). Die Mehrzahl an Patienten entwickeln Medikamentenresistenzen, wonach ihre Erkrankung weiter fortschreitet (Sosman, et al. 2007). Aktuell wird durch die Kombination unterschiedlicher zielgerichteter Agentien versucht dieses Problem zu beheben (Karumanchi, et al. 2002; Sosman 2008).

Das Nierenzellkarzinom wird wie das maligne Melanom zu der seltenen Gruppe der immunogenen Tumoren gezählt. Spontane Remissionen bei Patienten, die ausgedehnte

Tumordinfiltration mit Lymphozyten (tumordinfiltrierende Lymphozyten, TIL) und das relativ gute Ansprechen auf Immuntherapien lassen auf eine reaktivierbare, antitumorale Immunantwort schließen. Paradoxe Weise korreliert aber ein ausgeprägtes Lymphozyteninfiltrat mit einer negativen Prognose (Nakano, et al. 2001). Daraus ergibt sich die Frage nach der Effektivität der infiltrierenden Immunzellen. Aus der Beobachtung, dass TIL nach Entfernung aus dem Tumor reaktiv sein können, resultiert die Annahme, dass das Tumormilieu für die Inaktivierung der Zellen vor Ort verantwortlich sein könnte. Das Immunzellinfiltrat des Nierenzellkarzinoms setzt sich aus T-Zellen und NK-Zellen (Schleypen, et al. 2006) und wenigen B-Zellen, sowie myeloischen Zellen wie Monozyten, Makrophagen und DZ zusammen (Engels, et al. 2005). Am ausführlichsten charakterisiert sind bisher die infiltrierenden T-Zellen, wobei zahlenmäßig die zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber den CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen überwiegen (Tomita, et al. 1991, Nakano, et al. 2001). Anhand funktioneller Analysen konnte gezeigt werden, dass einige infiltrierende CD8<sup>+</sup> T-Zellen tumorspezifische Antigene erkennen und antigenexprimierende Tumorzellen in-vitro lysieren können (Jantzer und Schendel 1998; Leisegang, et al. 2010). Dass infiltrierende Lymphozyten effektiv sein können, wurde von Rosenberg et al. in einem Mausmodell gezeigt, in dem durch adoptiven Transfer von TIL ein etablierter Tumor eliminiert wurde (Rosenberg, et al. 1986). Diese viel versprechenden Ergebnisse bilden die Basis für immuntherapeutische Ansätze und können bei einem besseren Verständnis der Immundefizienzen und des Tumormikromilieus optimiert werden.



## 2 Zielsetzung der Arbeit

Die Analyse des Immuzellinfiltrats und Zytokinprofils des Nierenzellkarzinoms dient der Aufklärung der lokal bestehenden insuffizienten Immunantwort und möglicher systemischer Auswirkungen. Die Tatsache, dass das Nierenzellkarzinom (RCC) trotz Akkumulation von intratumoralen Immuneffektorzellen nicht beherrscht wird, deutet auf eine immunmodulatorische Eigenschaft des Tumormilieus hin. Das Ansprechen auf Immuntherapien wiederum spricht für eine widerrufliche, rekonvertierbare Insuffizienz des Immunsystems. Die Aufklärung der Mechanismen der funktionellen Inhibierung von Immunzellen kann weitere Ansatzpunkte für neuartige Therapien liefern.

Im Fokus dieser Arbeit stand die Untersuchung der dendritischen Zellen (DZ) im RCC. Die Arbeit basierte auf dem Vorbefund, dass im RCC-Gewebe eine phänotypisch veränderte Subpopulation an DZ mit Koexpression des DZ-Markers CD209/DC-SIGN und den Makrophagenmarkern CD14 und CD163 nachgewiesen wurde. In einem in-vitro Modell gelang es, diesen Subtyp aus Monozyten des Blutes durch Inkubation mit Zellkulturüberstand verschiedener Nierenzellkarzinomlinien zu differenzieren. Funktionelle Untersuchungen zeigten, dass die im Folgenden als RCC-DZ bezeichneten DZ allogene Lymphozyten in-vitro nicht stimulieren konnten (Figel, et al. 2011). Ziel dieser Arbeit war es, die RCC-DZ phänotypisch genauer zu charakterisieren und die für die Differenzierung verantwortlichen Faktoren nachzuweisen. Funktionell sollten weitere Eigenschaften von DZ, wie Antigen-Kreuzpräsentation, Migration auf ein Chemokinsignal, sowie die Fähigkeit zur Maturierung, untersucht werden. Für die Funktionsanalysen wurden die in-vitro generierten RCC-DZ verwendet. Um einen Hinweis zu erbringen, ob die in-vitro nachgewiesenen Funktionen auch von den lokal im RCC ansässigen RCC-DZ ausgeübt werden, waren histologische Untersuchungen geplant, die beispielsweise die Migrationsfähigkeit der RCC-DZ in-situ nachweisen sollten. Hierzu wurde die Lokalisation der RCC-DZ in den Lymphgefäßen des Nierenzellkarzinoms analysiert.

### 3 Material

#### 3.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Gerät	Hersteller
Bestrahlungsanlage HWM-D-200, (Strahlungsquelle: 137 Caesium)	GammaCell 40, Ottawa (Kanada)
Brutschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Durchflusszytometer, LSR-II	Becton Dickinson, Heidelberg
Dynal-Magnet MPC-50	Invitrogen, Karlsruhe
ELISA-Lesegerät SLT SPECTRA	SLT Instruments, Altdorf, Österreich
ELISA Waschgerät	Nunc, Wiesbaden
Eppendorffzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Fluoreszenz-Plattenlesegerät Wallac Victor 2 1420	Perkin Elmer, Rodgau
Heizblock BT 130-2	HLC Biotech, Bovenden
Kryostat	Leica Jung CM 3000
Laserscanning System TCS SP2	Leica Microsystems, Heidelberg
Leica DM IRBE Mikroskop	Leica Microsystems, Heidelberg
Lichtmikroskop ( Zeiss Axioskop)	Zeiss, Jena
Lichtmikroskop (Leica DMLS)	Leica Microsystems, Heidelberg
MACS Multistand (quadro MACS)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Megafuge 2.0 R	Heraeus Instruments, München
Mehrkanalpipette	Dunn Labortechnik, Asbach
Mikroplattenlesegerät Victor™ X3	Perkin Elmer
Milli-Q®-Reinwasserherstellungssystem	Millipore, Schwalbach
Multistepper	Eppendorf, Hamburg
Neubauer-Zählkammer	GLW, Würzburg
Pipetten 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Sterilbank, Laminar Flow	BDK, Sonnenbrühl-Genkingen
Sterilfiltrationseinheiten	Milipore, Schwalbach
Stickstofftank <i>Chronos Biosafe</i>	Messer Griesheim, Krefeld
Thermocycler Taqman 7700	Applied Biosciences
Ultrazentrifuge L7	Beckmann Coulter, Krefeld
Vortexer	Neo-Lab, München
Wasserbad	Köttermann Labortechnik, Uetze
Verbrauchsmaterial	Hersteller
5 ml Spritzen (für Multistepper)	Eppendorf, Hamburg
96-Loch Flachbodenplatten für ELISA	Greiner bio-one, Frickenhausen

Deckgläschen	IDL, Nidderau
Einmalplastikpipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml und 25 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
FACS-Röhrchen (5 ml mit Deckel, Polypropylen)	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Röhrchen (1,5 ml, Polypropylen)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Kryoröhrchen (1,5 ml)	Nunc, Wiesbaden
MACS Separation Columns; 25 LS	Miltenyi, Biotec, Bergisch Glattbach
Mehrlochflachbodenplatten (6- und 48-Loch)	Nunc, Wiesbaden
Mehrlochrundbodenplatten (96-Loch)	PAA Laboratories, Cölbe
Pasteurpipetten, Glas	Peske OHG, München
Pipettenspitzen	Eppendorf/Gilson
Reagenzröhrchen (15 ml und 50 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Sudefrost® Plus Objektträger	Menzel, Braunschweig
Transwell 24-Loch-Platten, Porengröße 5 µm	Costar, Corning (USA)
Vectashield	Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching
Zellschaber (25 cm)	Greiner, München
Zellsieb Cellstrainer, Porengröße 40 oder 100 µm	BD Biosciences, Heidelberg
Zellkulturflaschen (25 / 75 / 175 cm <sup>2</sup> )	Greiner bio-one, Frickenhausen

### 3.2 Chemikalien und fertige Lösungen

Substanz	Hersteller
1 N Salzsäure	Merck, Darmstadt
4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
7-Amino-Actinomycin D (7-AAD)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Aceton	Merck, Darmstadt
Aqua ad injectabilia Braun	B.Braun AG, Melsungen
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Fixogum	Science Services, München
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
Humanserum (HS; für die Durchflusszytometrie)	Cambrex Corporation, Wiesbaden
Immersionsöl Typ F	Leica Microsystems, Wetzlar
Methanol	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt

Natriumazid	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), Pulver zum Lösen	Biochrom AG, Berlin
Orthophosphorsäure	Merck, Darmstadt
Polysorbat-20 (TWEEN 20)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Propidiumiodid (PI)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Saponin	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Trypanblau	ICN Biomedicals GmbH, Frankfurt (Main)
Vectashield	Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching

Feinchemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) bezogen.

### 3.3 Zellkultur

#### 3.3.1 Verbrauchsmedien und Zusätze

Substanz	Hersteller
AIM-V	Invitrogen, Karlsruhe
HBSS (10x) ohne CaCl <sub>2</sub> / MgCl <sub>2</sub>	Invitrogen, Karlsruhe
HBSS (1x) mit CaCl <sub>2</sub> / MgCl <sub>2</sub>	Invitrogen, Karlsruhe
Caltag Counting Beads	Invitrogen, Karlsruhe
CD14 Microbeads	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
CompBeads (anti Maus IgG,κ)	BD Biosciences, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Ficoll <sup>®</sup> (Pancoll, Dichte 1,077 g/ml)	Pan Biotech, Aidenbach
Fluoreszein-markierte <i>E.coli</i> (K-12) <i>BioParticles</i> <sup>®</sup>	Vybrant <sup>®</sup> von Molecular Probes (Invitrogen)
Fötale Kälberserum (FKS)	Invitrogen, Karlsruhe
Heparin 2500 IE	Essex Pharma GmbH, München
Humanserum (HS; verschiedener gesunder Spender)	IMI, Helmholtz Zentrum München
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Lipopolysaccharid (LPS) von <i>E.coli</i> 0111:B4 (1 mg/ml)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumpyruvat	Invitrogen, Karlsruhe
Nicht-essentielle Aminosäuren (100x)	Invitrogen, Karlsruhe
Opti-MEM	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin / Streptomycin (100x)	Invitrogen, Karlsruhe

phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Invitrogen, Karlsruhe
RPMI 1640 ohne L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin-EDTA (10x)	Invitrogen, Karlsruhe
<b>Zytokin</b>	<b>Hersteller</b>
Rekombinantes humanes Chemokin (C-C Motiv) Ligand 19 (CCL19)	Peptotech, Hamburg
Rekombinantes humanes Interleukin-2 (IL-2)	Cetus, Emeryville, USA
Rekombinantes humanes Interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )	Promokine, Heidelberg
Rekombinantes humanes Interleukin-4 (IL-4)	CellGenix
Rekombinantes humanes Interleukin-6 (IL-6)	R&D Systems
Rekombinantes humanes Interleukin-8 (CXCL-8)	R&D Systems
Rekombinantes humanes Prostaglandin E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> )	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Rekombinanter humaner Tumornekrosefaktor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )	Promokine, Heidelberg
Rekombinanter humaner „Vascular Endothelial Growth Factor“ (VEGF)	R&D Systems
Rekombinanter humaner Granulozyten/Monozyten-koloniestimulierender Faktor (GM-CSF)	Leukine, Berlex

### 3.3.2 Medien

#### RPMI-Basismedium

RPMI 1640  
 2 mM L-Glutamin  
 1 mM Natriumpyruvat  
 1 mM nicht-essentielle Aminosäuren

#### LCL-Medium (Medium für die Kultur von L929 CD40L-Zellen)

RPMI-Basismedium  
 10% FKS

#### RCC-Medium (Medium für die Kultur von RCC-Tumorzelllinien)

RPMI-Basismedium  
 12% FKS

#### T-Zellmedium

RPMI-Basismedium  
 7,5% FKS  
 7,5% HS  
 50 U/ml IL-2

**Kulturmedium für myeloische Zellen**

AIM-V (serumfrei) + 2 mM L-Glutamin

**Einfriermedium für eukaryotische Zellen**

RPMI 1640 ohne Glutamin

20% DMSO

**3.3.3 Lösungen und Puffer****Trypsin-EDTA-Lösung**

2x Stocklösung Trypsin-EDTA

**FACS-Puffer**

1% HS

2 mM EDTA (in PBS)

0,1% Natriumazid (in PBS)

**MACS-Puffer**

0,5% HS

2 mM EDTA (in PBS)

**Paraformaldehydlösung**

1% (w/v) PFA (in PBS)

**Saponinlösungen**

0,1% (w/v) bzw. 0,35% (w/v) Saponin (in PBS)

2% HS

**ELISA-Puffer**

Coating-Puffer: 0,1 M Carbonatpuffer pH 9,5 (in PBS)

Waschpuffer: 0,05% Tween20 (in PBS)

Blockierungspuffer: 1% Magermilchpulver (in PBS)

<b>Lösungen für die histologische Immunfluoreszenzfärbung</b>	
20x SSC-Puffer:	0,3 M Natriumcitrat 2x H <sub>2</sub> O (8,82 g) 3 M Natriumchlorid (17,83 g) zu Aqua ad injectabilia (100 ml) → pH-Wert 7,0 (mit 1 N Salzsäure)
DAPI-Stocklösung:	5 mg DAPI/ml in Aqua ad injectabilia
DAPI-Gebrauchslösung:	150 µg/ml DAPI (3 µl Stocklösung) 2x SSC-Puffer (10 ml) zu Aqua ad injectabilia (90 ml)

### 3.4 Zellen und Zelllinien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Charakteristika</b>	<b>Kulturmedium</b>	<b>Quelle</b>
Dendritische Zellen (klassische DZ)	aus Monozyten gesunder Spender differenziert	AIM-V-Medium (GM-CSF, IL-4)	im Labor generiert
PBMZ (periphere Blut-mononukleäre Zellen)	aus Vollblutproben gesunder Spender isoliert		gesunde Spender
RCC-26	Humane Nierenzellkarzinomzelllinie, HLA-A2 <sup>+</sup>	RCC-Medium	IMI, Helmholtz Zentrum München
Tumor-dendritische Zellen (RCC-DZ)	aus Monozyten gesunder Spender differenziert	AIM-V-Medium mit 20% Kulturüberstand von RCC-26	im Labor generiert
Zytotoxischer T-Zell-Klon JB4	Humane klonale zytotoxische T-Zell-Linie, HLA-A2 alloreaktiv	T-Zellmedium	IMI, Helmholtz Zentrum München
Zytotoxischer T-Zell-Klon A42	Humane klonale zytotoxische T-Zell-Linie, erkennt MART-1 Peptid im HLA-A2 Kontext	T-Zellmedium	M. C. Panelli, Bethesda, USA
MEL93.04A12	Humane HLA-A2 <sup>+</sup> Tyrosinase <sup>+</sup> Melanomzelllinie	LCL-Medium	P. Schrier, Leiden (NL)
L929 CD40L	Maus-Fibroblastenzelllinie, mit huCD40L stabil transfiziert	LCL-Medium	P. Garrone (1995)

### 3.5 Antikörper

#### 3.5.1 Primäre Antikörper für die Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz

<b>Spezifität</b>	<b>Markierung</b>	<b>Spezies/ Isotyp</b>	<b>Klon</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Verwendung</b>
CCR1	PE	Maus IgG2b	53504.111	R&D Systems	1:10	OF <sup>1</sup>
CCR5	PE	Maus IgG2b	45531	R&D Systems	1:10	OF
CCR7	APC-A750	Ratte IgG2a	3D12	eBioscience	1:10	OF
CD14	APC-Alexa Fluor 750	Maus IgG2a,κ	TuK4	Caltag	1:50	OF
CD14	Pacific Blue	Maus IgG2a,κ	M5E2	BD Biosciences	1:25	OF

CD40	FITC	Maus IgG1	5C3	BD Biosciences	1:10	OF
CD48	FITC	Maus IgG1	J4-57	Immunotech	1:25	OF
CD80	FITC	Maus IgM	BB1	BD Biosciences	1:2	OF
CD83	PE	Maus IgG2b	HB15A	Immunotech	1:10	OF
CD86	PE	Maus IgG1	2331/FUN-1	BD Biosciences	1:17	OF
CD103	FITC	Maus IgG1	LF 61	Biozol	1:17	OF
CD163	PerCP-Cy5.5	Maus IgG1, $\kappa$	GHI/G1	BioLegend	1:25	OF
CD163	PE	Maus IgG1, $\kappa$	GHI/G1	BD Biosciences	1:12	OF
CD209/ DC-SIGN	APC	Maus IgG2b, $\kappa$	DCN46	BD Biosciences	1:10	OF
CD209/ DC-SIGN	PE	Maus IgG2b, $\kappa$	DCN46	BD Biosciences	1:17	OF
Faszin	Unmarkiert	Maus IgG1	55K-2	Santa Cruz Biotechnology	1:500	IZ <sup>2</sup>
HLA-ABC/ MHC-I	APC	Maus IgG1 $\kappa$	G46_2.6	BD Biosciences	1:10	OF
HLA-DR/ MHC-II	FITC	Maus IgG2a	L243	BD Biosciences	1:25	OF
HLA-DR/ MHC-II	PE	Maus IgG2a	G46-6	BD Biosciences	1:25	OF
ILT4	PE	Ratte IgG2	42D1	Immunotech	1:17	OF
Isotyp	Unmarkiert	Maus IgG1 $\kappa$	MOPC21	BD Biosciences	1:500	IZ
Podoplanin	Unmarkiert	Maus IgG1 $\kappa$	D2-40	Invitrogen	1:1000	IF <sup>3</sup>
Isotyp	APC	Maus IgG1	MOPC-21	BD Biosciences	1:10	OF
Isotyp	FITC	Maus IgG1	MOPC-21	BD Biosciences	1:10	OF
Isotyp	FITC	Maus IgG2b	27-35	BD Biosciences	1:25	OF
Isotyp	PE	Maus IgG1	MOPC-21	BD Biosciences	1:10	OF
Isotyp	PE	Ratte IgG2a	R35-95	BD Biosciences	1:10	OF

<sup>1</sup> Oberflächenfärbung; <sup>2</sup> intrazelluläre Färbung (mit PFA und Saponin); <sup>3</sup> Immunfluoreszenz

### 3.5.2 Sekundäre Antikörper für die Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz

Spezifität	Markierung	Spezies	Hersteller	Einsatz	Färbung
Maus-IgG1	AlexaFluor A488	Ziege	Invitrogen	1:500	IZ <sup>1</sup>
Maus-IgG1	AlexaFluor A568	Ziege	Invitrogen	1:500	IF <sup>2</sup>
Maus-IgG2a	AlexaFluor A568	Ziege	Invitrogen	1:500	IF
Maus-IgG2a	AlexaFluor A647	Ziege	Invitrogen	1:500	IF
Maus-IgG2b	AlexaFluor A488	Ziege	Invitrogen	1:500	IF
Kaninchen	Cy5	Ziege	Dianova	1:100	IF

<sup>1</sup> intrazelluläre Färbung (mit PFA und Saponin); <sup>2</sup> Immunfluoreszenz



## 3.6 Reagenziensysteme und synthetische Peptide

### 3.6.1 Zytokinbestimmung

Bezeichnung	Hersteller
hu IL-12p70 ELISA BD OptEIA™	BD Pharmingen, New Jersey
hu IFN- $\gamma$ ELISA Set BD OptEIA™	BD Biosciences, Heidelberg

### 3.6.2 Phagozytose

Bezeichnung	Hersteller
Phagocytosis Fluorometric (Fluorescein) Assay Kit, Vybrant®	Molecular Probes (Invitrogen)

### 3.6.3 Zellzahlbestimmung

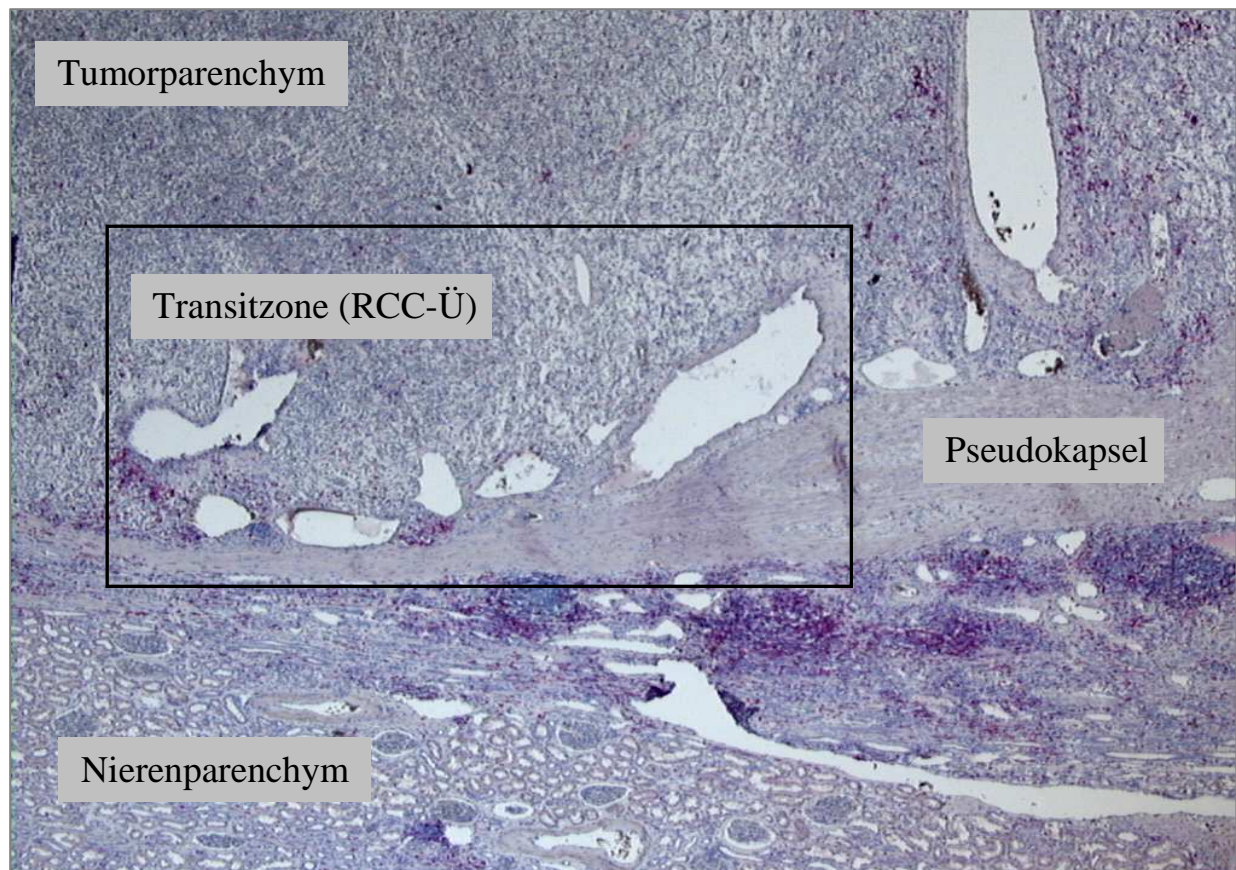
Bezeichnung	Hersteller
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	Promega Corporation (Madison)

### 3.6.4 Antigen-Kreuzpräsentation

Bezeichnung	Hersteller
Synthetisches pep70-MART-Peptid: Biotin-GSGHWDFAWPWG <u>SGLAGIGILTV</u>	Biosyntan GmbH (Berlin)

## 3.7 Patientenmaterial

Die in dieser Arbeit untersuchten Nierengewebe wurden von der Urologischen Abteilung des Klinikums Großhadern und der Urologischen Klinik Dr. Castringius in Planegg zur Verfügung gestellt. Alle Tumoren waren Nierenzellkarzinome (RCC) des klarzelligen Typs. Von jedem Patienten wurde zusätzlich tumorfreies Gewebe der tumortragenden Niere (NN) asserviert. In histologischen Präparaten wurde die Transitzone des RCCs (RCC-Ü; Ü=Übergang) untersucht, dem Bereich des Tumorgewebes, wo die Pseudokapsel das Tumorpharenchym vom tumorfreien Nierenparenchym abgrenzt (siehe Abbildung 3.7). Gewebe mit Transitzone stand von 6 Patienten zur Verfügung (RCC-5, RCC-7, RCC-8, RCC-10, RCC-11, RCC-34), wobei sowohl bei Patient RCC-5, als auch bei Patient RCC-8 zwei histologische Präparate (ÜI und ÜII) untersucht wurden.



**Abbildung 3.7 Die Transitzone des RCC (RCC-Ü).**

Dargestellt ist die lichtmikroskopische Aufnahme einer immunhistochemischen Färbung der Transitzone des RCCs (RCC-Ü). Der histologische Querschnitt zeigt das tumorfreie Nierenparenchym, die Pseudokapsel und das Tumorpharenchym in 400facher Vergrößerung. Der schwarze Rahmen kennzeichnet die untersuchte Transitzone.

Die klinisch-histopathologischen Merkmale sind in folgender Tabelle 3 zusammengestellt.

**Tabelle 3 Klinisch-histopathologische Merkmale der Präparate.**

Patient-ID Tumorgewebe	Patient-ID Tumorfreies Gewebe (tumortragende Niere)	Geschlecht <sup>1</sup>	Alter <sup>2</sup> (Jahre)	TNM – Stadium <sup>3</sup>
RCC-5 ÜI <sup>4</sup>	NN-5 <sup>5</sup>	m	52	pT1 N0 M0 G3
RCC-5 ÜII	NN-5	m	52	pT1 N0 M0 G3
RCC-7 Ü	NN-7	m	68	pT3b N0 M1 G2
RCC-8 ÜI	NN-8	m	68	pT3b N0 M0 G2
RCC-8 ÜII	NN-8	m	68	pT3b N0 M0 G2
RCC-10 Ü	NN-10	f	67	pT3b N0 M0 G2
RCC-11 Ü	NN-11	f	74	pT3a Nx M0 G3
RCC-34 Ü	NN-34	f	65	pT3b N2 M0 G3-4

<sup>1</sup> Geschlecht der Patienten (m =männlich, f =weiblich)

<sup>2</sup> Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Gewebsentnahme

<sup>3</sup> Klassifikation und Stadiengruppierung der Tumoren nach den Richtlinien der Union Internationale Contre le Cancer (Yoon und Herts 2003)

<sup>4</sup> RCC-Ü : Transitzone des jeweiligen Tumorgewebes

<sup>5</sup> NN : Tumorfreies Gewebe der tumortragenden Niere des jeweiligen Patienten

## 4 Methoden

### 4.1 Allgemeine Methoden der Zellkultur

#### 4.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Alle Arbeiten mit vitalen Zellen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Zellkultivierung erfolgte bei einer Temperatur von 37°C, einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 6,5% und einer Luftfeuchtigkeit von 95%.

#### 4.1.2 Bestimmung der Zellzahl anhand der Neubauer-Methode

Die Zellzahl wurde mithilfe der Trypanblau-Färbung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurde einer Zellsuspension ein Aliquot (10 µl) entnommen und 1:10 mit Trypanblau-Lösung (90 µl) gemischt. Da nur tote Zellen die Substanz aufnehmen, beeinträchtigt diese Vitalfärbung die lebende Zelle nicht. Bei aufgelegtem Deckglas wurden 10 µl der Farbstoff-Zell-Suspension seitlich aufpipetiert, welche durch Kapillarkraft in den Zwischenraum gesaugt wird. Unter dem Lichtmikroskop konnte nachfolgend die Anzahl der ungefärbten Zellen in vier Großquadranten, bestehend aus 16 Kleinquadranten, bestimmt werden. Nach Ermittlung der Zellzahl erfolgte die Berechnung der Gesamtzellzahl anhand folgender Formel:

Zellzahl/ml = Mittlere Zellzahl pro Großquadrant x Verdünnungsfaktor x Kammerfaktor.

Bei einem Verdünnungsfaktor von 1:10 und einem Kammerfaktor von  $1 \times 10^4$  entspricht dies einer Multiplikation der gezählten Leukozyten mit dem Faktor  $10^5$ . Die Gesamtzellzahl ergibt sich aus dem Wert pro ml multipliziert mit dem Gesamtvolumen der Zellsuspension. War die Zellkonzentration niedrig, so wurde eine geringere Verdünnung gewählt.

#### 4.1.3 Kryokonservierung von Zellen

Um die Zellen für eine Langzeitlagerung zu konservieren, wurde die Gefrierschutzsubstanz Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet. Das hypertone DMSO diffundiert durch die Zellmembran und erniedrigt den Wassergehalt in der Zelle, der durch Ausdehnung beim Einfrieren die Zelle schädigen würde. Da DMSO auf stoffwechselintakte Zellen toxisch wirkt, wurden alle Arbeitsschritte der Kryokonservierung zügig auf Eis durchgeführt. Die Zellen

wurden durch Zentrifugation von 5 Minuten bei 1500 Umdrehungen pro Minute (rpm) (Megafuge 2.0, Heraeus) sedimentiert und der Kulturüberstand abgesaugt. Anschließend wurde das Zellsediment in 500 µl gekühltem fötalem Kälberserum (FKS) aufgenommen und in ein Kryoröhrchen überführt. Schrittweise wurde das gleiche Volumen an kühlem 20%igem DMSO zur Zellsuspension gegeben. Anschließend wurden die Röhrchen in Zellstoff eingepackt, um ein zu rasches Einfrieren zu verhindern, und bei -80°C eingefroren. Nach einer bis zwei Wochen erfolgte die Überführung der Kryoröhrchen auf Trockeneis in flüssigen Stickstoff (-196°C).

#### **4.1.4 Auftauen von Zellen**

Eingefrorene Zellen wurden bei Bedarf im Wasserbad bei 37°C angetaut, durch Zugabe von 2 ml FKS vollständig aufgetaut und für 5 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert (Megafuge 2.0, Heraeus). Anschließend wurde das Zellsediment in dem jeweiligen Kulturmedium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt oder nach der Zellzählung und Zellfärbung mithilfe des Durchflusszytometers (LSR II, Becton Dickinson) direkt analysiert.

#### **4.1.5 Kultivierung von adhärennten Zelllinien**

Die Kultivierung von adhärennt wachsenden Zelllinien erfolgte in dem für die Zellen optimalen Kulturmedium. Das Volumen des Kulturmediums in mittleren Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup> Adhärenzfläche) betrug 10 ml, in den großen Zellkulturflaschen (175 cm<sup>2</sup> Adhärenzfläche) betrug das Volumen des Kulturmediums 25 ml. Da die Nährstoffe im Kulturmedium ab einer gewissen Zelldichte aufgebraucht sind, wurde das Kulturmedium der Zellen alle drei bis vier Tage gewechselt, indem das alte Kulturmedium abgesaugt und neues Kulturmedium hinzugegeben wurde. War unter dem Mikroskop bereits ein dichter Zellrasen sichtbar, das heißt eine Konfluenz von 80% bis 100% vorhanden, wurde die Zellzahl reduziert, indem bei den Nierenzellkarzinomzelllinien zwei Drittel bzw. drei Viertel der Zellen verworfen wurde. Für die Entnahme von Zellen bei einer adhärennt wachsenden Zellkultur musste zuerst eine Zellsuspension hergestellt werden. Hierzu wurde das alte Kulturmedium in der Zellkulturflasche abgesaugt und die Zellen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen, um das noch verbliebene FKS-haltige Medium und tote Zellen, die nicht mehr an den Zellkulturboden angeheftet waren, zu beseitigen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml (75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen) bzw. 2 ml (175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen) Trypsin-EDTA-Lösung ca. 2 bis 5 Minuten behandelt, damit sie sich von der Kulturgefäßoberfläche ablösen. Dabei spaltet

Trypsin proteolytisch die Bindeproteine zwischen Zelle und Substrat und EDTA komplexiert die für die Salzbrücken zwischen Zelle und Substrat notwendigen zweiwertigen Kationen, vor allem Kalzium. Sobald unter dem Mikroskop zu erkennen war, dass sich alle Zellen vollständig abgelöst hatten, wurde Zellkulturmedium hinzugegeben. Die im Kulturmedium enthaltenen Bestandteile des FKS inaktivieren das Trypsin und stoppen somit die Reaktion. Die Inkubation der Zellen mit der Trypsin-EDTA-Lösung erfolgte nicht länger als nötig, da bei längerer Exposition die Zellen geschädigt würden. Das gewünschte Volumen der Zellsuspension wurde aus der Kulturfläche entnommen und diese Zellen verworfen oder in Experimente eingesetzt. Den restliche Zellen in der Kulturflasche wurde neues Kulturmedium zugegeben und die Kultivierung fortgesetzt.

#### **4.1.6 Zellernte von RCC-DZ und DZ**

Um für die Experimente eine gute Ausbeute an RCC-DZ und DZ zu erzielen, ist es notwendig diese von der Platte möglichst schonend abzulösen. Da die in 4.1.5 beschriebene Methode keine zufrieden stellenden Resultate ergab, wurde sie durch den Einsatz des Zellschabers erweitert. Hierbei wurden die Zellen zusätzlich zu der Trypsin-EDTA-Lösung in mehreren Schritten mechanisch vom Plattenboden abgeschabt. Die Ausbeute konnte um bis zu 40% gesteigert werden.

#### **4.1.7 Gewinnung von Tumorzellkulturüberstand für die Differenzierung von Monozyten zu tumorkonditionierten DZ (RCC-DZ)**

Für die in-vitro Differenzierung von tumorkonditionierten DZ (RCC-DZ) aus Monozyten wurde der Tumorzellkulturüberstand von RCC-26 eingesetzt. Zur Gewinnung wurden  $2 \times 10^6$  Zellen der Tumorzelllinie RCC-26 in 10 ml AIM-V+L-Glutamin in einer 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche über 10 Tage kultiviert und anschließend der Überstand geerntet. Dieser wurde dann 10 Minuten bei 1500 rpm (Megafuge 2.0, Heraeus) zentrifugiert, aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

## **4.2 Arbeiten mit Vollblut**

Alle Vollblutspenden wurden von gesunden Spendern zur Verfügung gestellt. Nach Zustimmung des Spenders erfolgte die Blutentnahme durch mich persönlich. Die Zulassung der lokalen Ethikkommission lag vor.

Alle Isolierungsschritte wurden zügig durchgeführt. Es wurden Einmalpipetten aus Plastik verwendet, um eine Voraktivierung der Zellen zu vermeiden.

#### **4.2.1 Isolierung mononukleärer Zellen aus Vollblut (PBMZ)**

Die Isolierung von PBMZ (periphere Blut-mononukleäre Zellen) aus venösem Vollblut gesunder Spender erfolgte durch die Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation. Nach der Blutabnahme in 50 ml heparinisierte Spritzen (5000 U/50 ml zur Antikoagulation) wurde das Blut sofort 1:1 mit RPMI1640-Medium gemischt und in einem 50 ml-Röhrchen auf 15 ml Ficoll überschichtet. Die Bestandteile des Blutes wurden anhand einer 20-minütigen Zentrifugation bei 2000 rpm (840 g) ohne Bremse (Megafuge 2.0, Heraeus) durch die Zentrifugalkraft entsprechend ihrer Dichte voneinander getrennt. Hierbei sammeln sich die PBMZ in der Interphase unterhalb des Plasmas und oberhalb der Ficollschicht an, wohingegen Erythrozyten durch diese absinken und Granulozyten darauf verbleiben. Die Thrombozyten befinden sich im Plasma-Medium-Gemisch. Die Interphase wurde vorsichtig mit einer 10 ml Plastikpipette abgenommen, in ein neues 50 ml Röhrchen überführt und mit dem gleichen Volumen an RPMI1640-Medium gemischt. Durch einen weiteren Waschschrift (bei 1900 rpm mit Bremse) für 12 Minuten (Megafuge 2.0, Heraeus) wurde das restliche Ficoll entfernt und das Zellsediment anschließend in eiskaltem Isolationspuffer (MACS-Puffer) aufgenommen. Um Zellaggregate zu entfernen wurde die Zellsuspension über ein Zellsieb (Porengröße: 100 µM) filtriert und mit einem Aliquot des Filtrats die Zellzahl bestimmt.

Die Ausbeute lag spenderabhängig bei  $15 \times 10^7$  bis  $30 \times 10^7$  Zellen pro 100 ml Vollblut.

#### **4.2.2 Positive Isolierung von Monozyten aus PBMZ**

Die Isolierung der Monozyten aus PBMZ erfolgte über „Magnetic Cell Sorting“ (MACS, Miltenyi), einer Selektion der gewünschten Zellen mittels Antikörper, die an magnetische Beads gebunden werden. Alle folgenden Arbeitsschritte erfolgten auf Eis, alle Zentrifugationsschritte mit der Megafuge 2.0 (Heraeus).

Nach Zentrifugation der PBMZ (1900 rpm mit Bremse) für 12 Minuten wurde das Zellsediment in 80 µl MACS-Puffer pro  $10^7$  Zellen resuspendiert und jeweils 15 µl der CD14 Microbeads-Lösung pro  $10^7$  Zellen zugesetzt. Die Microbeads sind mit monoklonalen Maus anti-humanen CD14-Antikörpern konjugiert. Nach 15 Minuten Inkubation bei 4°C (auf einem Rotiergerät) wurden die Zellen mit dem Isolationspuffer gewaschen und auf die magnetische Säule (MACS 25 LS *Separation Column*, Miltenyi) geladen. Im Magnetfeld wurden die Säulen

dreimal mit 5 ml Isolationspuffer gespült. Die CD14-positive Zellfraktion wurde dabei durch die Bindung der Beads in der Magnetsäule zurückgehalten, wohingegen die nicht an die Säule gebundenen Zellen (CD14-negativ) direkt aufgefangen wurden. Nach Entfernung des Magnetfeldes wurden die CD14-positiven Zellen mit Isolationspuffer und Stempel von den Säulen eluiert, abzentrifugiert und in AIM-V Medium aufgenommen. Das gesondert aufgefangene Eluat der CD14-negativen PBMZ-Fraktion wurde portionsweise eingefroren oder direkt verwendet.

Die Ausbeute an Monozyten betrug - spenderabhängig - zwischen 5-15% der PBMZ, bei einer Zellzahl von  $20 \times 10^6$  bis  $30 \times 10^6$  Monozyten pro 100 ml Blut.

### **4.2.3 In-vitro Generierung von RCC-DZ, DZ und GM-CSF-Makrophagen**

Zur Generierung der RCC-DZ wurden  $6 \times 10^6$  CD14-positive Zellen in 3 ml AIM-V-Medium mit 1 ml RCC-26-konditioniertem Tumorüberstand (siehe 4.1.6) pro Vertiefung kultiviert.

Zudem wurden Monozyten nur mit den Zytokinen CXCL-8/IL-8 (7 ng/ml), IL-6 (1,9 ng/ml) und VEGF (23,4 ng/ml) oder einer Kombination daraus kultiviert, um RCC-DZ zu generieren. Die Konzentrationen der einzelnen Zytokine entsprachen denen, die im RCC-26-konditioniertem Tumorüberstand detektiert wurden (Figel, et al. 2011).

Zur Generierung von DZ wurden die durch Magnetseparation gewonnenen CD14-positiven Monozyten in einer Konzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen in 4 ml AIM-V-Medium pro Vertiefung in einer 6-Loch-Flachbodenplatte ausgesät und mit 400 U/ml IL-4 und 800 U/ml GM-CSF supplementiert.

Zur Generierung der GM-CSF-Makrophagen wurden  $4 \times 10^6$  CD14-positive Zellen in 4 ml AIM-V-Medium pro Vertiefung ausgesät und das Medium mit 800 U/ml GM-CSF angereichert.

Die Zytokine bzw. der RCC-26-konditionierte Tumorüberstand wurden am Tag der Aussaat, am Tag 2 und Tag 5 der Kultivierung zugegeben. Die Zellen wurden meistens am Tag 7 geerntet und für Experimente verwendet. Die Expression der Oberflächenmarker CD14, CD40, CD80/B7-1, CD83, CD86/B7-2 und CD209/DC-SIGN von jeder Zellgruppe wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert.

### **4.2.4 Stimulation von myeloischen Zellen**

Zur Generierung von murenen RCC-DZ oder klassischen DZ, wurden die Zellen am Tag 6 der Kultivierung für 24 Stunden entweder mit dem bakteriellen Endotoxin Lipopolysaccharid

(LPS; 10 µg/ml) oder dem proinflammatorischen Zytokincocktail Jonuleit (Tabelle 4; Jonuleit, et al. 1997) stimuliert.

**Tabelle 4 Maturierungcocktail nach Jonuleit:**

Zytokin	Konzentration
rhu IL-4	10 ng/ml
rhu GM-CSF	20 ng/ml
rhu TNF- $\alpha$	10 ng/ml
rhu IL-1 $\beta$	10 ng/ml
rhu IL-6	15 ng/ml
PGE <sub>2</sub>	1 µg/ml

## 4.3 Funktionelle Versuche

### 4.3.1 Phagozytose

Zur Bestimmung der Phagozytoseaktivität von RCC-DZ und DZ wurde das Vybrant<sup>®</sup> Phagozytose Versuchskit (Molecular Probes, Invitrogen) verwendet. Hierfür wurden  $5 \times 10^4$  Makrophagen, immature oder mature RCC-DZ oder DZ ( $5 \times 10^6$  Zellen/ml) in 150 µl Medium auf einer 96-Flachboden-Mikroplatte ausgesät und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert, so dass sich die Zellen am Plattenboden absetzen konnten. Von jedem Ansatz wurden 6 Replikate erstellt. Nach der vorsichtigen Entfernung von 100 µl Medium, wurden 100 µl einer fluoreszierenden *Escherichia coli* (K12)-Biopartikel-Suspension pro Vertiefung hinzugefügt und für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Im Anschluss daran wurde der Überstand (100 µl) abgenommen und für 1 Minute 100 µl Trypanblaulösung pro Vertiefung zugegeben. Dies dient der Auslöschung noch vorhandener Fluoreszein-Partikel, welche als falsches Signal detektiert werden würden. Unmittelbar nach Abnahme der Trypanblaulösung (100 µl) folgte die Fluoreszenz-Messung am Fluoreszenz-Plattenlesegerät (Wallac Victor 2 1420, Perkin Elmer) bei 480 nm Anregung und 520 nm Emission.

### 4.3.2 Antigen-Kreuzpräsentation

Die Kreuzpräsentation exogener Antigene auf MHC-I-Molekülen stellt einen besonderen Mechanismus der Antigenpräsentation durch RCC-DZ und DZ dar und wurde anhand dieses Experiments nachgewiesen. Es wurde der HLA-A2-restringierte, Melan-A/MART-1-



spezifische zytotoxische T-Zell-Klon-A42 und das pep70-MART Peptid eingesetzt. Dieses 15-mer Peptid enthält das HLA-A2 restringierte T-Zell-Epitop des Melan-A/MART-1-Antigens. Die N-terminale Verlängerung des Peptids verhindert die direkte Beladung des HLA-A2 auf der Oberfläche der RCC-DZ bzw. DZ. Eine Präsentation über HLA-A2 ist somit erst nach Aufnahme und Prozessierung des Antigens durch die RCC-DZ bzw. DZ möglich, welche in Folge die T-Zelle aktivieren können. Die T-Zell-Stimulation wird anhand der Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )-Sekretion gemessen, die umso höher ist, je mehr Peptid kreuzpräsentiert wird (Bendz, et al. 2007).

Die myeloischen Zellen ( $2 \times 10^4/100 \mu\text{l}$  AIM-V) wurden mit 82 nM bzw. 140 nM pep70-MART Peptid für 1 Stunde bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert um die Aufnahme des Peptids zu induzieren, bevor die zytotoxische T-Zellen A42 ( $4 \times 10^3/100 \mu\text{l}$  AIM-V) für 24 Stunden hinzu gegeben wurden. Die Zytokinmenge in den Überständen wurde mithilfe des Enzymgekoppelten Immunadsorptionstests (ELISA) – siehe 4.4.1 - gemessen. Kontrollproben, die alle Komponenten außer dem Peptid enthielten, wurden für die Bestimmung des ohne Stimulation sezernierten IFN- $\gamma$  (Hintergrundspiegel) benutzt. Als Qualitätskontrolle des zytotoxischen T-A42-Klons wurde die IFN- $\gamma$ -Produktion gemessen, die bei der Kokultur der T-Zelle mit einer Melanom-Zelllinie, MEL93.04A12 ( $15 \times 10^3/100 \mu\text{l}$ ), die das Melan-A/MART-1-Antigen endogen exprimiert und über HLA-A2 präsentiert, induziert wurde.

### 4.3.3 Transwell<sup>®</sup> Migration (Boyden-Kammer)

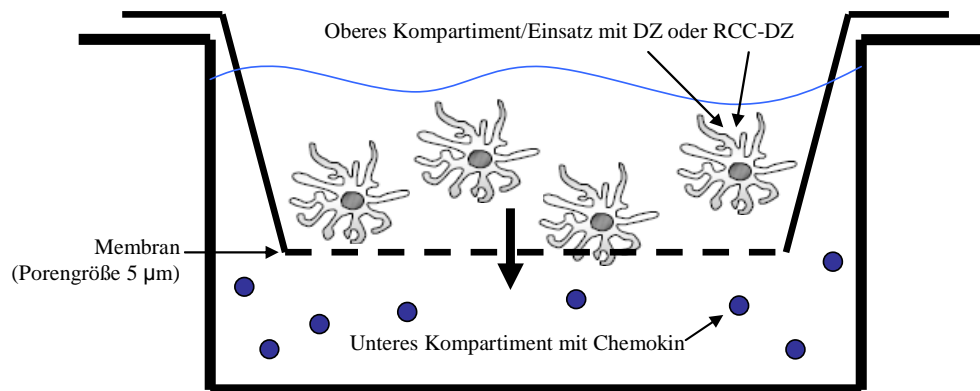
Der Transwell<sup>®</sup> (Costar) Migrationstest (Boyden 1962) dient der Untersuchung der chemotaktischen Wanderungsfähigkeit von RCC-DZ und DZ. Hierbei trennt eine Membran (Porengröße  $5 \mu\text{m}$ ) das obere Kompartiment vom unteren, wodurch sich die Zellen bei adäquatem Stimulus hindurchzwängen können (siehe Abbildung 4.3.3). Die Porengröße von  $5 \mu\text{m}$  ist dabei so gewählt, dass dieser aktive Vorgang möglich ist, die Zellen aber nicht passiv in das untere Kompartiment fallen können.

Nach Vorinkubation der Einsätze ( $100 \mu\text{l}$  AIM-V/Einsatz) und der Verteilung unterschiedlicher Konzentrationen des Chemokins CCL19 in je  $600 \mu\text{l}$  AIM-V pro Vertiefung, wurden  $2 \times 10^5$  Zellen pro  $100 \mu\text{l}$  AIM-V in den Einsatz gegeben und für 3 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Durch Diffusion bildet sich in den Poren der Membran ein Konzentrationsgefälle, dem die Zellen folgen. Am Ende der Migrationszeit wurde  $50 \mu\text{l}$  an 0,1 M EDTA pro Vertiefung hinzugefügt und die Platte für 10 Minuten bewegt, um die in der Membran sitzenden Zellen abzulösen. Anschließend wurden die Einsätze entfernt und die Zellsuspension des unteren Kompartiments anhand des CellTiterGlo<sup>®</sup> Luminescent Cell Viability Assay (Promega; siehe 4.3.4) oder der

Caltag Counting Beads<sup>®</sup> (siehe 4.3.5) gezählt. Die Spontanmigration wurde mithilfe der Inkubation von Zellen ohne Chemokinzusatz bestimmt.

Der Migrationsindex setzt die spezifisch migrierten Zellen mit den spontan migrierten Zellen in ein Verhältnis, wodurch sich eine korrigierte Vergleichsgröße ergibt.

$$\text{Migrationsindex} = \frac{\text{Anzahl spezifisch migrierter Zellen (mit Chemokin)}}{\text{Anzahl spontan migrierter Zellen (ohne Chemokin)}}$$



**Abbildung 4.3.3 Boyden-Kammer-Migrationssystem.**

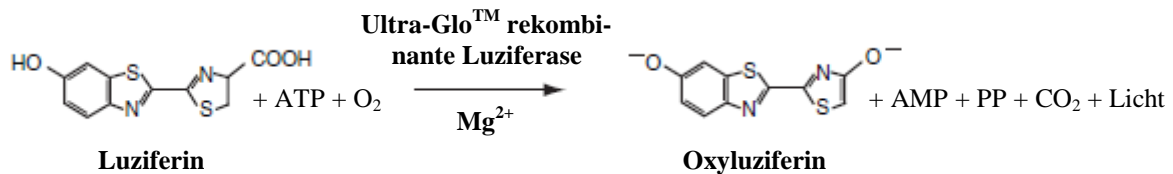
Unter serumfreien Bedingungen werden die RCC-DZ oder DZ in die obere Kammer gesetzt. In dem unteren Kompartiment befindet sich das Chemokin. Nach drei Stunden im 37°C-Inkubator werden die Zellen im unteren Kompartiment gezählt, die die kammertrennende Membran (Porengröße 5 µm) passiert haben.

#### 4.3.4 CellTiterGlo<sup>®</sup> Lumineszenz-Zellzählung

Diese Methode bestimmt die Anzahl lebendiger Zellen in Kultur, basierend auf der Quantifizierung des vorhandenen Adenosintriphosphats (ATP), welches ein Indikator für metabolisch aktive Zellen ist. Dabei wird der ATP-Gehalt in einer Luziferasereaktion (Ultra-Glo<sup>™</sup>; rekombinante, thermostabile Luziferase) in ein Lumineszenzsignal, das direkt proportional zum ATP-Gehalt ist, umgewandelt und in einem Luminometer gemessen.

Die zu zählenden Zellen wurden im Kulturmedium (100 µl) auf eine Luminometer kompatible 96-Loch-Mikroplatte (Brand) übertragen. Auf dieser wurden außerdem eine Standardkurve aus bekannten Zellzahlen desselben Zelltyps erstellt, sowie Negativkontrollen ohne Zellen zur Erfassung der Hintergrund-Lumineszenz aufgetragen. Nach 30 Minuten Inkubationszeit wurden 100 µl des CellTiterGlo<sup>®</sup> Reagenz (beinhaltet die Enzyme zur Zelllyse, die Luziferase, sowie das Substrat Luziferin, welche kurz zuvor zusammengebracht wurden) in jede Vertiefung gegeben und für 12 Minuten inkubiert, um eine vollständige Zelllyse zu erreichen und das Lumineszenzsignal zu stabilisieren. Bei der Luziferase-Reaktion (siehe Abbildung 4.3.4) wird das Luziferin mithilfe von ATP, Magnesium<sup>2+</sup> und molekularem Sauerstoff (O<sub>2</sub>)

zum energetisch höheren Oxyluziferin umgesetzt, wobei Adenosinmonophosphat (AMP), Pyrophosphat (PP) und Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) entsteht. Beim Rückfall in seinen Grundzustand gibt es ein Photon ab, welches dann detektiert werden kann. Es wurde am Mikroplattenlesegerät Victor X3 (Absorptionszeit 0,25 – 1 Sekunde /Vertiefung) gemessen und anhand der Standardkurve die Zellzahl bestimmt.



#### Abbildung 4.3.4 Die Luziferase-Reaktion.

Die Oxygenierung von Luziferin wird durch die Luziferase in Anwesenheit von Magnesium, ATP und molekularem Sauerstoff katalysiert.

### 4.3.5 Zellzahlbestimmung mittels Caltag Counting Beads®

Eine andere Methode zur Bestimmung der absoluten Zellzahl ist die Verwendung der Caltag Counting Beads®. Hierbei wurde die Zellsuspension im unteren Reaktionsraum (migrierte Zellen) mit 20 µl PE-markierten Counting Beads (963 Beads/µl) versetzt und die gesamte Lösung in ein 1,5 ml FACS-Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation (7 Minuten bei 1600 rpm) wurde der Überstand bis auf 100 µl abgenommen und die Zell-Bead-Suspension am LSR-II Durchflusszytometer gemessen. Im SSC/FSC-Punktendiagramm (siehe Erläuterung 4.5.1) wurden dabei die Counting Beads ausgewählt und 10.000 Ereignisse aufgenommen. Gleichzeitig wurden die in dem Volumen aufgezogenen Zellen gezählt und die absolute Zellzahl mittels der Bead-Konzentration und dem bekannten Probevolumen anhand folgender Formel ermittelt:

$$\text{Absolute Zellzahl [Zellen/}\mu\text{l]} = \frac{\text{Anzahl der erfassten Zellen}}{\text{Anzahl der erfassten Beads}} \times \frac{\text{angegebene Konzentration der Beads [Beads/}\mu\text{l]}}{\text{Probevolumen [}\mu\text{l]}}$$

### 4.3.6 Signal-3-Nachweisverfahren

Dieser Funktionstest (Zobywalski, et al. 2007) imitiert den T-Zell-DZ-Kontakt mithilfe der Maus-Fibroblasten L929, die mit humanem CD40L (CD40 Ligand/CD154) transfiziert wurden. CD40L interagiert mit dem CD40 Rezeptor auf DZ und bewirkt die Sekretion von IL-12p70.

Die CD40L-L929 Fibroblasten ( $5 \times 10^4$  L-Zellen in 100 µl LCL-Medium) wurden durch Cäsium-Bestrahlung (100 Gy) inaktiviert und anschließend 24 Stunden kultiviert. Die RCC-DZ

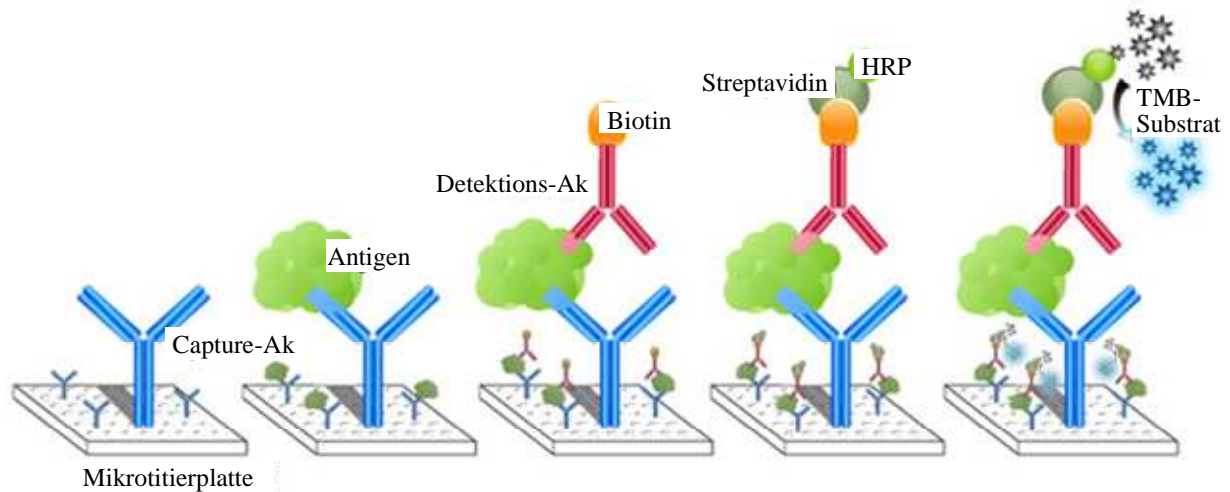
und DZ wurden nach der Ernte und Zellzählung auf  $2 \times 10^4$  Zellen pro 200  $\mu\text{l}$  eingestellt. Anschließend wurde das Medium von dem adhärennten Rasen der L929-Fibroblasten entfernt, 100  $\mu\text{l}$  der DZ-Suspension zugegeben und für 24 Stunden darauf belassen.

Als Kontrollen wurden die RCC-DZ bzw. DZ und L929-Zellen isoliert kultiviert. Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurden die Platten abzentrifugiert, der Überstand zur Bestimmung des IL-12p70 (siehe 4.4.1) abgenommen und eingefroren.

## **4.4 Bestimmung des Zytokingehalts in Zellkulturüberständen**

### **4.4.1 Enzymgekoppelter Immunoabsorptionstest (ELISA)**

Der Enzymgekoppelter Immunoabsorptionstest (EIA) bzw. „Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA)“ bezeichnet ein immunologisches Nachweisverfahren von Proteinen in Suspensionen, das auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Sandwich-ELISA (Abb. 4.4.1) verwenden zwei Antikörper (Ak), die beide spezifisch an das nachzuweisende Antigen binden. Hierbei ist es wichtig, dass beide Antikörper an unterschiedliche Epitope des Antigens binden, da sie sich ansonsten gegenseitig behindern würden. Die Bestimmung von IL-12p70 und IFN- $\gamma$  erfolgte mithilfe fertiger ELISA-Kits entsprechend der Anleitung des Herstellers. Dazu wurden die Vertiefungen von 96-Loch-Platten über Nacht mit Antikörpern (Capture-Antikörper) gegen das zu messende Zytokin beschichtet. Bevor die Proben und die Standardkurve mit bekannter Proteinmenge in die Vertiefungen pipettiert wurden, wurde die Platte am nächsten Tag mit einem Blockierungsreagenz inkubiert, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Nach der Inkubation wurde nicht gebundenes Zytokin durch Waschen entfernt. Gebundenes Zytokin wurde durch die Zugabe eines Biotin-gekoppelten Antikörpers (Detektionsantikörper) markiert. Anschließend wurden die Proben mit Streptavidin-Meerrettichperoxidase (Streptavidin-HRP) inkubiert, wobei die Streptavidin-Moleküle mit den Biotin-Molekülen eine feste Bindung eingehen. Die Meerrettichperoxidase katalysiert mit einem zugegebenen Farbstoff (TMB, eine Kombination aus Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin) eine quantifizierbare Reaktion, die proportional zu der Menge des in der Probe vorhandenen Zytokins ist. Direkt nach Abstoppen der Reaktion mit Phosphorsäure wird die durch den umgesetzten Farbstoff hervorgerufene Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm im ELISA-Plattenlesegerät gemessen. Die Auswertung erfolgte anhand des Vergleiches mit der Standardreihe.



**Abb. 4.4.1 Die Sandwich-ELISA-Methode.**

Die Mikrotiterplatte wird mit Capture-Antikörper beschichtet und inkubiert. Die zu analysierende Suspension mit dem Antigen wird in die Vertiefungen pipettiert, wobei das Antigen an den Capture-Ak bindet. Der hinzugefügte biotinylierte Detektionsantikörper bindet an ein anderes Epitop des Antigens. Über die stark affine Bindung von Biotin und Streptavidin wird das Enzym HRP angekoppelt. Nach Zugabe des TMB-Substrats katalysiert die HRP die Reaktion, wobei ein farbiges, quantifizierbares Produkt entsteht.

## 4.5 Durchflusszytometrie

### 4.5.1 Prinzip

Die fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie beruht auf der Emission von optischen Signalen seitens der markierten oder nicht markierten Zellen, wenn diese einen Laserstrahl passieren. Hierbei werden die suspendierten Einzelzellen durch eine Kapillare gesaugt und passieren im Sensormodul einzeln den Laserstrahl. Die Zellen streuen einen Teil des Lichts, welches mittels Fotodetektoren nachgewiesen wird. Das Vorwärtsstreulicht (FCS-Licht) ist ein direkt proportionales Maß für die Größe der Zelle, wohingegen das Seitwärtsstreulicht (SSC-Licht) eines für die Granularität der Zelle ist. Außerdem können Fluoreszenzfarbstoffe, die an monoklonale Antikörper gekoppelt sind und somit Zellen spezifisch markieren, detektiert werden. Jedes Fluorochrom absorbiert Licht eines bestimmten Wellenlängenbereichs (Absorptionsspektrum), welches sie auf ein höheres Energieniveau anhebt. Beim Rückfall in den Grundzustand wird die Energie vornehmlich in Form von Fluoreszenzlicht freigesetzt, dessen Wellenlänge größer ist als die des absorbierten Lichts (Stokes shift) und für jedes Fluorochrom charakteristisch ist. Durch den Einsatz von Lasern unterschiedlicher Wellenlänge (Argonlaser, Helium-Neonlaser, UV-Laser und violetter Laser) ergibt sich ein breites Spektrum an verwendbaren Fluorochromen. Die in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe mit den jeweiligen Extinktions- und Emissionsmaxima, sowie die verwendeten Laser und Filter sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Das emittierte Licht wird durch ein „Photomultiplier tube (PMT)“ detektiert und in ein verstärktes, elektronisches Signal umgewandelt. Blenden bündeln die Lichtstrahlen und Spiegel blocken bzw. lenken sie zu den der Wellenlänge entsprechenden PMTs. Somit wird eine Überlappung des Emissionslichts der verschiedenen Fluorochrome weitgehend verhindert. Da optische Filter nicht alle spektralen Überschneidungen beseitigen können, ist eine elektronische Subtraktion, die sogenannte spektrale Kompensation, notwendig, um verbleibende Streufluoreszenzen zu entfernen.

**Tabelle 5 Fluoreszenzcharakteristika der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe, die Wellenlänge der Laser für die Anregung, sowie die Filter für die Detektion am LSR II-Durchflusszytometer.**

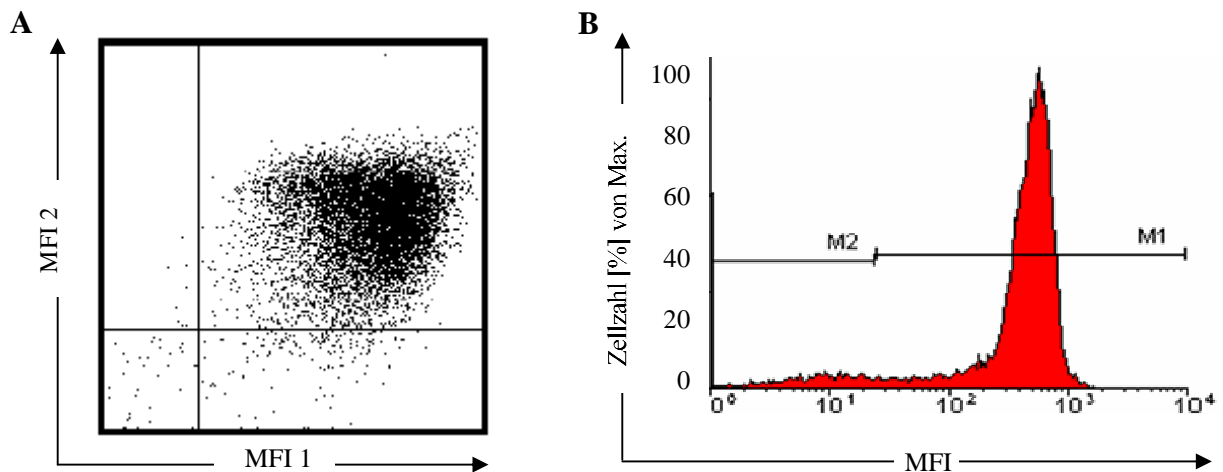
Fluoreszenzfarbstoff	Extinktionsmaximum	Emissionsmaximum	Wellenlänge ( $\lambda$ ) des Lasers	Filter (nm)
Pacific Blue (PB)	401	452	450 nm <sup>1</sup>	450 / 50
Amcyan	457	491	450 nm	525 / 50
FITC	494	519	488 nm <sup>2</sup>	530 / 30
Alexa-Fluor 488	495	519	488 nm	530 / 30
PE	564	578	488 nm	575 / 26
PI	493	619	355 nm <sup>3</sup>	630 / 22
7-AAD	543	655	488 nm	630 / 30
APC	650	660	633 nm	660 / 20
Alexa-Fluor 647	650	668	633 nm	670 / 20
PerCP-Cy5.5	482	695	488 nm	695 / 40
Alexa-Fluor 700	696	719	633 nm <sup>4</sup>	720 / 40
Pe-Cy7	564	785	488 nm	780 / 60
APC-Alexa-Fluor 750	650	785	633 nm	780 / 60

<sup>1</sup> Violetter Laser, <sup>2</sup> Argonlaser, <sup>3</sup> UV-Laser, <sup>4</sup> Helium-Neonlaser

Die Signalauswertung erfolgt mithilfe eines speziellen Programms (FlowJo<sup>®</sup>, Treestar). Die gesammelten Daten werden in Graphen dargestellt, in denen ein oder zwei Parameter zugleich betrachtet werden können. Das Histogramm (siehe Abbildung 4.5.1.B) stellt einen Parameter dar. Hierbei gibt die horizontale x-Achse die Intensität der Einzelmessung wieder, die vertikale y-Achse die Anzahl der Zellen. Anhand der relativen Fluoreszenzintensität können Populationen unterschieden werden. Um zwei Parameter gegeneinander abbilden zu können, und auf diese Weise Subpopulationen zu identifizieren und charakterisieren, wird das Punktediagramm (Dot-Plot; siehe Abbildung 4.5.1.A) angewandt. Hierbei repräsentiert jede Zelle einen Punkt in einem xy-Koordinatennetz. Die x-Achse entspricht der Fluoreszenz des

einen und die y-Achse die des zweiten Parameters. Darüber hinaus ist es möglich, nur eine Teilpopulation der Zellen zu betrachten und zu analysieren, indem man sie durch ein Analysefenster (Gate) von den restlichen Zellen separiert.

Das Durchflusszytometer, das für die hier durchgeführten Experimente eingesetzt wurde, war ein „Flow-Zytometer“ (LSR II) der Firma Becton Dickinson mit vier Lasern. Dies ermöglichte die Detektion von bis zu 18 verschiedenen Fluoreszenzen.



**Abbildung 4.5.1 Darstellung der durchflusszytometrischen Ereignisse.**

**A)** In der Punktediagrammdarstellung (Dot Plot) können zwei Fluoreszenzintensitätswerte (MFI 1, MFI 2) gegeneinander dargestellt werden. Damit kann der prozentuale Anteil von Zellen, markiert über zwei Marker, in einem Zellgemisch ermittelt werden. Im linken oberen Quadranten liegen die MFI 2-positiven, aber MFI 1-negativen Zellen, im rechten oberen Quadranten die doppelt-positiven (MFI 1<sup>+</sup>, MFI 2<sup>+</sup>), im linken unteren Quadranten die doppelt-negativen (MFI 1<sup>-</sup>, MFI 2<sup>-</sup>) und im rechten unteren Quadranten die MFI 1-positiven, aber MFI 2-negativen Zellen. **B)** In der Histogrammdarstellung wird eine Fluoreszenzintensität gegen den prozentualen Anteil der Ereignisse dargestellt. Höhere MFI entspricht dabei höherer Expressionsdichte des Markers. Durch die Einteilung in Regionen (M1 und M2) kann man die gefärbten, also Marker exprimierenden Zellen (M1) von den ungefärbten Zellen (M2) unterscheiden.

## 4.5.2 Fluoreszenzmarkierung von Oberflächenmolekülen

Mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen Oberflächenantigene kann eine Immunphänotypisierung der Zelle durchgeführt werden.

Hierzu kamen  $1 \times 10^5$  bis  $5 \times 10^5$  Zellen pro FACS-Röhrchen zum Einsatz. Zu diesen wurden 500  $\mu$ l FACS-Puffer hinzugegeben und im Anschluss bei 1500 rpm für 5 Minuten zentrifugiert (Megafuge 2.0, Heraeus). Nach Abnahme des Überstandes bis auf 50  $\mu$ l wurde der spezifische fluoreszierende monoklonale Antikörper (in adäquater Menge) hinzugegeben und nach kurzem Mischen für 30 Minuten auf Eis abgedunkelt inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschriff mit 500  $\mu$ l FACS-Puffer, um die nicht an die Zelloberfläche gebundenen Antikörper zu entfernen. Zuletzt wurde je 10  $\mu$ g/ml (1  $\mu$ l) Propidiumiodid (PI) hinzu pipettiert und für 3 Minuten abgedunkelt inkubiert. PI dient der Lebend-Tot-Untersuchung von Zellen, indem es durch die

perforierte Zellmembran toter Zellen eindringt und in die DNS interkaliert. Die Messung muss nun innerhalb der nächsten drei Stunden stattfinden. Zusätzlich wurde eine Kontrollreihe mit sogenannten Kompensations-Beads erstellt. Diese wird für die Erstellung einer Kompensationsmatrix bei der Datenauswertung im Anschluss an die Durchflusszytometrie benötigt, um die Fluoreszenzinterferenzen zu evaluieren und die Kompensation der Streufluoreszenz durchzuführen. Die positiven Beads sind mit einem Antikörper beladen, welcher die  $\kappa$ -leichte Kette der fluorochrommarkierten Antikörper erkennt. Diese Beads wurden vor der Messung mit Kompensationsbeads, die keinen Antikörper tragen (negative Beads), vermischt, so dass eine positive (mit Fluoreszenz) und eine negative (ohne Fluoreszenz) Population messbar ist.

#### **4.5.3 Fluoreszenzmarkierung des intrazellulären zytoskelettregulierenden Proteins Faszin**

Um intrazelluläre Komponenten mit markierten Antikörpern nachweisen zu können, müssen die Zellen zunächst fixiert und anschließend permeabilisiert werden. Falls ebenso eine Oberflächenfärbung gewünscht wird, ist diese - wie in 4.5.2 beschrieben - durchzuführen. Allerdings muss PI durch 10  $\mu\text{g/ml}$  7-AAD (1  $\mu\text{l}$ ) ersetzt werden, da es sich stabil in die DNS integriert und bei der Permeabilisierung nicht ausgewaschen würde. Nach zweimaligem Waschen mit 500  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer oder PBS wurden die Zellen durch Zugabe von 1%igem Paraformaldehyd (PFA, 500  $\mu\text{l}$ / Röhrcchen) fixiert und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Auf einen weiteren Waschschrift folgte der erste Permeabilisierungsschritt der Zellen mit 500  $\mu\text{l}$  100%igem Methanol pro Röhrcchen, das 10 Minuten lang auf die Zellen einwirkte. Nach einem erneuten Waschschrift erfolgte der zweistufige Permeabilisierungsschritt mit je 500  $\mu\text{l}$  0,1%iger und 0,35%iger Saponin-FACS-Puffer-Lösung, wobei nach jeder Zugabe des Detergenz die Zellsuspension zentrifugiert und der Überstand bis auf 50  $\mu\text{l}$  abgesaugt wurde. Anschließend wurde die entsprechende Menge des unmarkierten Primärantikörpers gegen Faszin zugegeben und für 30 Minuten auf Eis im Dunklen inkubiert. In Folge wurde analog mit Saponin-Puffer gewaschen, dann der AlexaFluor A488-markierte Sekundärantikörper zu den Zellen gegeben und bei 4°C für 30 Minuten inkubiert. Es folgte ein Waschschrift mit 500  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer, woraufhin die Zelle zentrifugiert und vor der anschließenden Messung mit 500  $\mu\text{l}$  1%igem PFA fixiert wurden. Gemäß dem Fall, dass die Messung erst am folgenden Tag durchgeführt wurde, wurden die Zellen mit 500  $\mu\text{l}$  0,5%igem PFA fixiert und abgedunkelt im Kühlschrank aufbewahrt.



#### 4.5.4 Mehrfarbenfluoreszenzanalyse

Die Mehrfarbenfluoreszenzanalyse ermöglicht die Korrelation mehrerer Zelleigenschaften einer Population. In Abhängigkeit vom umgebenden Milieu verändern beispielsweise DZ ihren Phänotyp und zeigen unterschiedliche Oberflächenrezeptoren (Marker)-Kombinationen.

Zur Identifikation des Zelltyps und des Reifegrads wurden die in Tabelle 6 aufgeführten Oberflächenmarker-Färbungen in variablen Kombinationen durchgeführt. Als Marker für immature DZ gelten CD209/DC-SIGN, CCR1 und CCR5, sowie eine niedrige Expression an CD14, CD40, CD80/B7-1, CD86/B7-2, HLA-ABC/MHC-I und HLA-DR/MHC-II (Erläuterung in 5.1.1-5.1.5). Umgekehrt steht eine hohe Expression an CD40, CD80/B7-1, CD86/B7-2, HLA-ABC/MHC-I und HLA-DR/MHC-II, sowie an CD83 und CCR7 für mature DZ.

**Tabelle 6 Färbekombinationen zur durchflusszytometrischen Analyse der RCC-DZ und DZ.**

Analyse	Antikörperkombinationen	
RCC-DZ/DZ Diskrimination	CD14-PB <sup>1</sup> CD209-APC <sup>1</sup> CD163-PE <sup>1</sup> MHC-II-FITC <sup>4</sup> oder CD86-FITC <sup>2</sup>	
Reifegrad der RCC-DZ oder DZ	CCR1-PE <sup>3</sup> CCR7-APC-Alexa750 <sup>3</sup> CD83-FITC <sup>5</sup>	CCR5-PECy7 <sup>3</sup> CD80-FITC <sup>2</sup>
Oberflächenrezeptorprofil der RCC-DZ oder DZ	ILT4-PE <sup>6</sup> MHC-I-APC <sup>4</sup> CD48-FITC <sup>6</sup> oder CD80-FITC <sup>2</sup>	CD103-FITC <sup>6</sup> CD40-PE <sup>2</sup> oder CD86-PE <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Myeloische Marker; <sup>2</sup>Kostimulatorische Marker; <sup>3</sup>Chemokinrezeptoren; <sup>4</sup>MHC-Moleküle; <sup>5</sup>Maturierungsmarker; <sup>6</sup>Regulatorische und zielsteuernde Marker

#### 4.5.5 Messung der Proben und Datenauswertung

Zur optimalen Positionierung der Zellpopulation im Aufnahme Fenster wurde zunächst eine ungefärbte Probe aufgenommen und so eingestellt, dass die Punktwolke möglichst in der Mitte des FSC/SSC-Dot Plots zu liegen kam. Da es sich um eine Relativmessung handelt, muss mithilfe von Kontrollen „positiv“ und „negativ“ definiert werden. Hierzu wurden die Kontrollproben aufgenommen und die PMT-Einstellungen der Laser so modifiziert, dass die negative Probe möglichst am Nullpunkt der x-Achse zu liegen kam. Kontrollproben waren entweder parallele Analysen von Kontrollzellen, die bekanntermaßen die zu untersuchenden

Moleküle nicht exprimierten oder es wurde parallel zum spezifischen Antikörper eine sogenannte Isotypenkontrolle gefärbt. Unter einer Isotypenkontrolle versteht man die Färbung mit einem Antikörper, der gegen ein Molekül gerichtet ist, das von der zu untersuchenden Zellpopulation nicht exprimiert wird. Die Isotypkontrollen dienen zudem der spektralen Kompensation. Da Fluoreszenzspektren überlappen und somit zu falschen doppelt positiven Ergebnissen führen können, muss kompensiert werden. Bei der Kompensation wird auf rechnerischem Wege von einem Fluoreszenzsignal eine relative Menge abgezogen und die Differenzlichtmenge als kompensiertes Signal bezeichnet.

Nach Definition der Fluoreszenzgrenzen konnten die zu untersuchenden Zellen aufgenommen und durch ein vorgegebenes Analysefenster (Gate) im FSC/SSC-Diagramm selektiert werden. Aus jeder Probe wurden zwischen  $1 \times 10^4$  und  $1 \times 10^5$  Ereignisse (Zellen) aufgenommen und detektiert. Diese Rohdaten wurden anschließend mithilfe der FlowJo<sup>®</sup>-Software-Matrix kompensiert, die lebenden von den toten Zellen abgegrenzt (mittels PI oder 7-AAD) und anhand ihres Streulichts (FSC und SSC), der Fluoreszenz und dem prozentualen Anteil, die Population charakterisiert.

Das Histogramm (siehe Abbildung 4.5.1.B), die Einparameterdarstellung, dient der Häufigkeitsverteilung der Messsignale. Die Fluoreszenzintensität ist direkt proportional zur Antigenexpression. Eine Zweiparameterdarstellung ist das Punktediagramm (siehe Abbildung 4.5.1.A), welches die Korrelationsverteilung dieser Parameter zeigt. Zur quantitativen Auswertung werden Grenzen anhand der Kontrollmessungen gesetzt.

## 4.6 Arbeiten mit Gewebe

Das untersuchte Nierenzellkarzinomgewebe stammt von unbehandelten Patienten und wurde histopathologisch als klarzelliges Nierenzellkarzinom beurteilt. Peritumorale Areale wurden makroskopisch ausgewählt und beinhalten die Pseudokapsel des Tumors, sowie die angrenzenden Regionen des tumorfreien und malignen Gewebes. Klinisch-pathologische Charakteristika der Patienten sind der Tabelle 3 zu entnehmen. Im Anschluss an die Nephrektomie wurden die entsprechenden Areale von einem Pathologen identifiziert und abgetrennt, von uns sofort in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei  $-86^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

## **4.6.1 Immunfluoreszenzfärbung und konfokale Mikroskopie von histologischen Präparaten**

### **4.6.1.1 Das Prinzip der Immunfluoreszenztechnik und der konfokalen Mikroskopie**

Mit der Immunfluoreszenztechnik werden Strukturen mithilfe spezifisch bindender fluoreszenzmarkierter Antikörper mikroskopisch sichtbar gemacht. Die Bildaufnahme erfolgte mit einem konfokalen Laser-Rastermikroskop (Laser-Rastermikroskop TCS SP2 von Leica). Das Mikroskop war mit zwei Helium-Neonlasern (633 nm bzw. 543 nm), einem Diodenlaser (405 nm) und einem Argonkryptonlaser (488 nm) ausgestattet. Anhand dieser Ausstattung ist es möglich bis zu vier Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig zu analysieren. Ein wesentlicher Vorteil gegenüber der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie besteht darin, dass das Fluoreszenzsignal nur aus einer optischen Ebene gemessen wird und Signale aus anderen optischen Ebenen ausgeblendet werden. Dadurch ist es möglich durch das Zusammensetzen mehrerer Schnittebenen ein räumliches Bild zu erzeugen und die Kollokalisierung von Markern zu bestimmen.

Die Immunfluoreszenz kann als direkte oder indirekte Immunfluoreszenz durchgeführt werden. Bei der direkten Immunfluoreszenz ist das Fluorochrom direkt an den Antikörper gekoppelt. Dagegen benutzt man bei der viel häufiger eingesetzten indirekten Immunfluoreszenz zwei Antikörper, einen primären Antikörper, der das gewünschte Antigen im Präparat erkennt und einen sekundären Antikörper, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist und die Fluoreszenz trägt.

### **4.6.1.2 Durchführung der indirekten Immunfluoreszenzmethode**

Die untersuchten Tumorübergangsgewebeschnitte (RCC-5 ÜI und ÜII, RCC-7 Ü, RCC-8 ÜI und ÜII, RCC-10 Ü, RCC-11 Ü, RCC-34 Ü; siehe Tabelle 3) wurden auf die Verteilung der RCC-DZ und DZ in Relation zu den Lymphgefäßen mittels einer Mehrfarben-Immunfluoreszenzanalyse untersucht. Die histologischen Präparate umfassten mikroskopisch tumorfreies Nierenparenchym, die Pseudokapsel und Tumorgewebe. Mit einem Kryostat wurden von kryokonserviertem Gewebe 5 µm dicke Gefrierschnitte erstellt, auf SuperFrost® Plus Objektträger aufgezogen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Zur Gewebefixierung wurden die Schnitte für 10 Minuten in eine Küvette mit eiskaltem 100%igem Aceton gestellt, anschließend kurz Luft-getrocknet und mit Fixogum umrandet. Mit diesem Fettstift entsteht eine Barriere um das Präparat, so dass Färbereagenzien lokal auf dem Schnitt

begrenzt bleiben und nicht ablaufen. Um unspezifische Bindungen zu verhindern, erfolgte die Blockierung mit 2%igem bovinem Serumalbumin (BSA; 80 µl/ Schnitt) für 10 Minuten. Im Anschluss wurden die spezifischen Primärantikörper (Verdünnung siehe 3.5.1) CD209/DC-SIGN (IgG2b) und CD14 (IgG1) und Podoplanin (IgG1κ) für 1 Stunde aufgebracht. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die histologischen Präparate dreimal mit PBS gewaschen und die Sekundärreagenzien (anti-IgG2b-AlexaFluorA488, anti-IgG1-AlexaFluorA568 und anti-IgG1κ-Cy5) für 30 Minuten zugegeben. Nun folgten ein erneuter Waschschrift und die Anfärbung der Zellkerne indem die Objektträger für 1 Minute in DAPI-Lösung getaucht wurden. Nach Entfernung überschüssiger DAPI-Lösung wurden die Gewebeschnitte mit dem Eindeckmedium Vectashield® eingedeckelt und mit Nagellack versiegelt. Die Schnitte wurden bis zur Analyse am konfokalen Laser-Rastermikroskop lichtgeschützt bei -20°C gelagert.

#### **4.6.2 Bildaufnahme und Auswertung mittels konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie**

Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit einer Ölimmersionsobjektivlinse (HCX PL APO 63 x 1,40NA) und einer resultierenden Gesamtvergrößerung von 630fach. Das Mikroskop war mit zwei Helium-Neonlasern (633 nm bzw. 543 nm), einem Diodenlaser (405 nm) und einem Argon-Kryptonlaser (488 nm) ausgestattet. Die Detektion der Emissionen erfolgte über getrennte PMT-Einheiten. Durch die Regelung des Wellenlängenbereiches der Aufnahme Fenster wurde das Überstrahlen einer Fluoreszenz in jeweils andere Fluoreszenzkanäle ausgeblendet. Zusätzlich wurden die vier verwendeten Fluoreszenzmoleküle im sequentiellen Modus aufgenommen. Um die räumliche Ausdehnung zu erfassen, wurden jeweils mehrere optische Schnittebenen in der z-Dimension (z-Stacks; Abstand 0,5 µm) aufgenommen.

Die Intensitäten einzelner Fluoreszenzfarbstoffe innerhalb einer Zelle wurden in der Bildbearbeitung durch beliebige Farben dargestellt. Liegen zwei Oberflächenproteine, die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert wurden, räumlich eng nebeneinander (Kokalisation), kommt es zur Überlagerung der für die Darstellung verwendeten Farbsignale. Die Überlagerung wird durch die Mischfarbe der entsprechenden Farben optisch sichtbar. Überlagert beispielsweise ein rotes Farbsignal mit einem grünen, entsteht ein gelbes Farbsignal. Die Kokalisation wurde über die Überlagerung der Histogrammprofile mittels Leica konfokal Software LCS Lite geprüft. Eine Kokalisation liegt ausschließlich dann vor, wenn zwei Marker in derselben optischen Ebene zusammen auftreten. Dies erfordert die Analyse der einzelnen optischen Schnittebenen (z-Ebenen). Die Bearbeitung der in dieser

Arbeit gezeigten Bilder erfolgte nur durch Veränderungen des Kontrast und/oder der Helligkeit des gesamten Bildes mittels Leica Software. Pro Tumortransitzone eines Gewebeschnittes wurden mindestens 10 nicht-überlappende Gesichtsfelder bewertet.

## **4.7 Statistische Analysen**

Für die statistische Auswertung der Daten wurde das Programm GraphPad Prism in der Version 5.0 für Windows der Firma GraphPad Software (San Diego California USA) verwendet. In dieser Arbeit wurden verschiedene Testverfahren angewandt. Bei allen wurde ein Signifikanzniveau von  $\alpha < 0,05$  angenommen.

### **4.7.1 Mann-Whitney-U Test**

Der Mann-Whitney-U Test (äquivalent zum Wilcoxon-Rangsummentest) ist ein nicht-parametrisches Testverfahren, welches daher für die statistische Untersuchung von geringen Probenzahlen und nicht normal-verteilten Daten geeignet ist. Der Mann-Whitney-U Test untersucht bei einer zweiseitigen Fragestellung, ob sich die Alternativhypothese signifikant von der Nullhypothese unterscheidet, also ob der Mittelwerte einer Gruppe A signifikant unterschiedlich ist zu einem Mittelwert einer Gruppe B.

### **4.7.2 Kruskal-Wallis-Test**

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

### **4.7.3 Post-Hoc Test (ANOVA)**

Sobald festgestellt wird, dass es signifikant unterschiedliche Abweichungen zwischen den Mittelwerten gibt (d.h., das Kruskal-Wallis-Testergebnis hat einen p-Wert  $< 0,05$ ) können mit Hilfe des Post-Hoc Spannweitentests und paarweisen multiplen Vergleichen untersucht werden, welche Mittelwerte sich unterscheiden. Mit paarweisen Mehrfachvergleichen wird die

Differenz zwischen zwei Mittelwerten verglichen. Die Gruppenmittelwerte, die auf Grund eines Alpha-Niveaus von 0,05 signifikant voneinander abweichen sind durch Sterne markiert. Ein Post-Hoc Spannweitentest ist der Post-Hoc Test nach Dunn, oder auch Bonferroni genannt. Dabei werden paarweise Vergleiche zwischen Gruppenmittelwerten mit T-Tests durchgeführt, wobei die Gesamtfehlerrate mit einbezogen wird, indem die Fehlerrate jedes einzelnen Tests auf den Quotienten aus der experimentellen Fehlerrate und der Gesamtzahl der Tests gesetzt wird. Dadurch wird das beobachtete Signifikanzniveau an Mehrfachvergleiche angepasst.

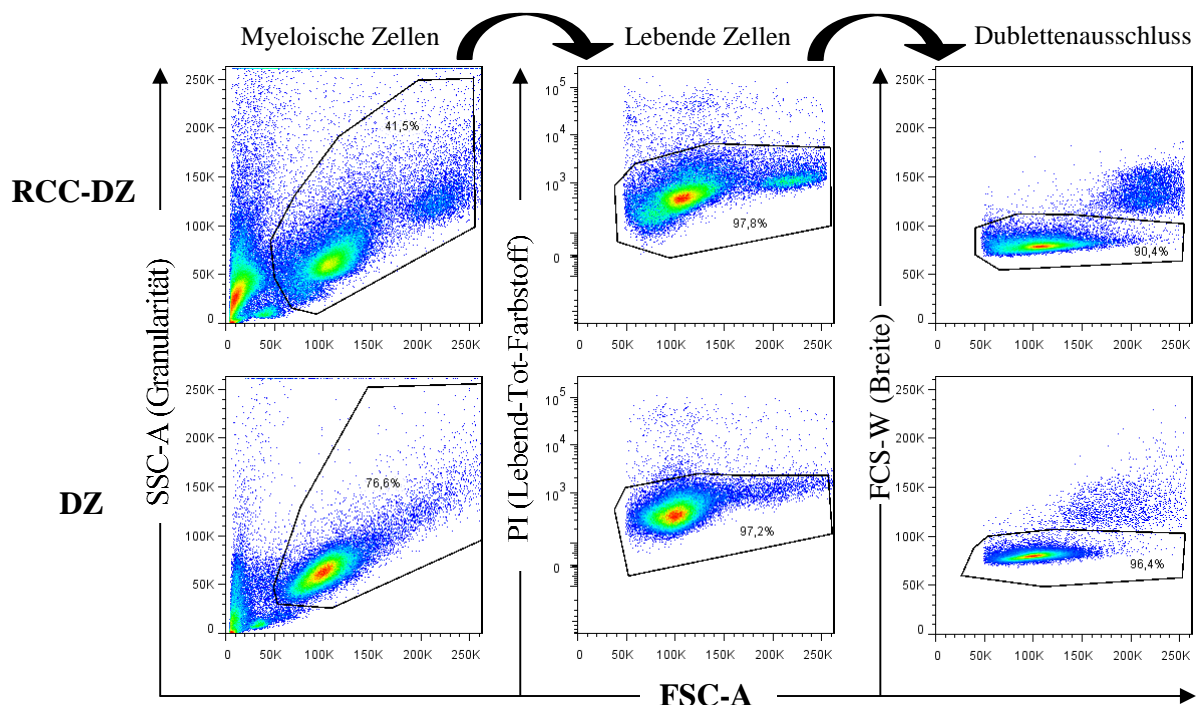
## 5 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden der Phänotyp und die Funktion der in-vitro mit RCC-26-Zellkulturüberstand konditionierten Monozyten (RCC-DZ) mit konventionellen DZ verglichen. Beide Zelltypen wurden stets parallel aus Blutmonozyten desselben Spenders differenziert. Die Monozyten wurden aus PBMZ (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) isoliert und RCC-DZ mit RCC-26-Zellkulturüberstand bzw. klassische DZ mit IL-4+GM-CSF inkubiert. Prototypische DZ-Eigenschaften, wie die Fähigkeit zur Pinozytose und Phagozytose, die Antigen-Kreuzpräsentation, die Migration auf die zum drainierenden Lymphknoten dirigierende Chemokine CCL19 und CCL21, sowie die Reaktion auf Maturierungsstimuli, wurden untersucht. Zudem wurden die für die Induktion des RCC-DZ Phänotyps verantwortlichen Faktoren nachgewiesen. Die Funktionsanalysen wurden mit in-vitro generierten RCC-DZ durchgeführt, da aus RCC-Gewebe isolierte DZ (in-vivo RCC-DZ) nicht in ausreichendem Maße verfügbar waren. Um Übereinstimmungshinweise der in-vitro erhobenen Funktionsdaten mit den RCC-DZ in-situ zu erhalten, wurde an RCC-Geweben die Lokalisation der RCC-DZ im Lymphgefäßsystem nachgewiesen. Dies sollte einen Hinweis auf die Migrationseigenschaften geben.

### 5.1 Markerexpression auf RCC-DZ und DZ und die Veränderung bei Maturierungsstimulation

Mithilfe von CD14-Mikrobeads wurden Monozyten aus PMBZ gesunder Spender isoliert und zu RCC-DZ und konventionellen DZ differenziert (4.2.1 - 4.2.3). Zur Generierung der RCC-DZ wurden die CD14-positiven Monozyten in AIM-V-Medium, das zu einem Viertel RCC-26-konditionierten Tumorüberstand enthielt, 7 Tage lang kultiviert. Zur Generierung der DZ wurden die Monozyten desselben Spenders in mit 400 U/ml IL-4 und 800 U/ml GM-CSF angereichertem AIM-V-Medium ausgesät und über 7 Tage parallel zu den RCC-DZ kultiviert. Bei Verwendung maturer RCC-DZ (mRCC-DZ) und maturer DZ (mDZ) wurde die Hälfte der Zellsuspension am Tag 6 der Kultivierung entweder mit dem bakteriellen Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS; 10 µg/ml) oder dem proinflammatorischen Zytokincocktail nach Jonuleit (siehe 4.2.4) für weitere 24 Stunden stimuliert. Sowohl die unstimulierten immaturren RCC-DZ (iRCC-DZ) und DZ (iDZ) als auch die stimulierten maturen RCC-DZ (mRCC-DZ) und DZ (mDZ) wurden am Tag 7 geerntet und mittels verschiedener Färbekombinationen durchflusszytometrisch analysiert (siehe Tabelle 6).

Mithilfe des Auswerteprogramms FlowJo® (Treestar) wurde zur Bewertung der Markerexpression auf RCC-DZ und DZ wie folgt vorgegangen (Abbildung 5.1). Zunächst wurde im Punktwolkendiagramm Größe (FSC) gegen Granularität (SSC) aufgetragen. Anhand ihrer Form konnten die RCC-DZ und DZ darin von Zelldebris abgegrenzt und durch ein Analysefenster selektiert werden. Im darauf folgenden Diagramm wurde ausschließlich die selektierte Population dargestellt, aus welcher die lebenden Zellen ausgewählt wurden. Bei einer Lebend/Tod-Färbung, beispielsweise mit 7-AAD oder PI, erscheinen diese als nicht-markiert (negativ). Die Darstellung Streulicht-Breite (FSC-W) gegen Streulicht-Größe (FSC-A) im Punktwolkendiagramm erlaubt die Abgrenzung der Zellen von Zellaggregaten und Dubletten. Die resultierende Zellpopulation wurde schließlich auf die spezifischen Oberflächenmarker analysiert.



**Abbildung 5.1** Auswertungsstrategie zur Selektion der RCC-DZ und DZ in Abgrenzung von toten Zellen und Dubletten.

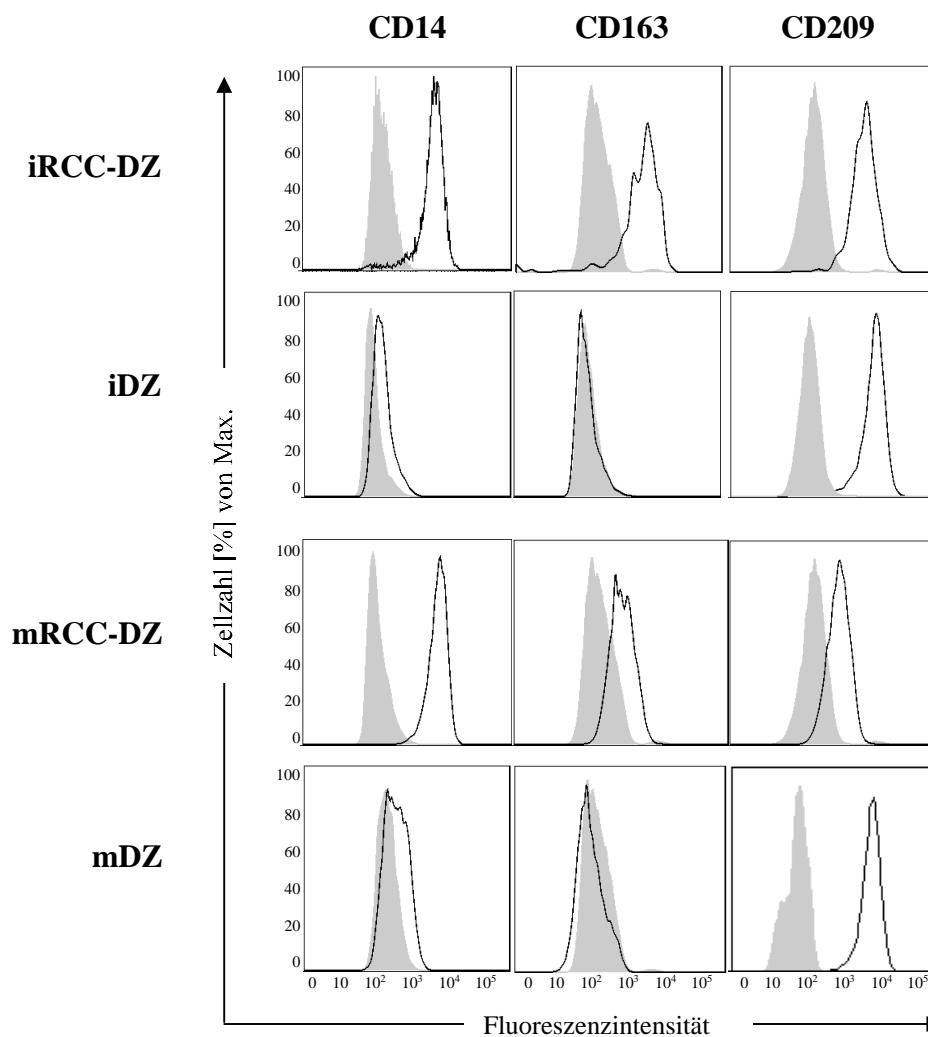
Die mit Antikörpern gefärbte und mit PI versetzte 7d lang kultivierte Zellsuspension wurde am LSR-II Durchflusszytometer aufgenommen. Die Daten wurden mit der Software FlowJo analysiert. Zunächst wurden die zu untersuchenden myeloischen Zellen anhand ihrer Größe (FSC-A) und Granularität (SSC-A) identifiziert, dann die lebenden, PI-negativen Zellen ausgewählt und zuletzt von Dubletten oder Zellaggregaten abgegrenzt. Anschließend wurden die spezifischen Oberflächenmerkmale mittels Histogrammen dargestellt (5.1.ff).

### 5.1.1 Vergleich von RCC-DZ mit DZ in Bezug auf die Expression myeloischer Oberflächenrezeptoren

Als myeloische Oberflächenmarker wurden CD14, CD163 und CD209/DC-SIGN eingesetzt. CD14 ist ein Oberflächenrezeptor, der bevorzugt von Monozyten und Makrophagen exprimiert



wird und Opsonin-Rezeptorfunktion hat. Er ist mit dem Toll-Like-Rezeptor (TLR) 4 assoziiert und bindet somit Bestandteile von gramnegativen Bakterien. CD163 ist ein Mitglied der Scavenger-Rezeptor-Superfamilie und wird auf chronisch aktivierten Makrophagen und DZ gefunden. Nach Bindung eines Pathogens kann es eine negative Signalkaskade vermitteln und antiinflammatorisch wirken. CD209/DC-SIGN (DZ-spezifisches ICAM-3-greifendes nicht-Integrin) ist ein C-Typ-Lektin, das typischerweise auf gewebständigen interstitiellen unreifen DZ gefunden wird und virale, bakterielle oder fungoide PAMPs erkennt. Außerdem hat CD209 eine hohe Affinität für ICAM-3 (Interzelluläres Adhensionsmolekül 3), das mitunter die Zelladhäsion vermittelt.



**Abbildung 5.1.1 Expression myeloischer Oberflächenrezeptoren auf RCC-DZ und DZ.**

Die Hälfte der in-vitro in 7 Tagen parallel generierten Zelltypen desselben Spenders wurde am Tag 6 mit dem Jonuleit-Zytokincocktail für 24 Stunden maturiert. Unmittelbar nach der Ernte wurden die Zellpopulationen einer Oberflächenfärbung unterzogen und anschließend am LSR-II Durchflusszytometer gemessen. Die spezifische Antikörperfärbung ist als unausgefülltes Histogramm, die korrespondierende Isotypkontrolle als graues ausgefülltes Histogramm angegeben. Dargestellt ist jeweils eines von mehreren unabhängigen Experimenten mit Zellen verschiedener Spender.

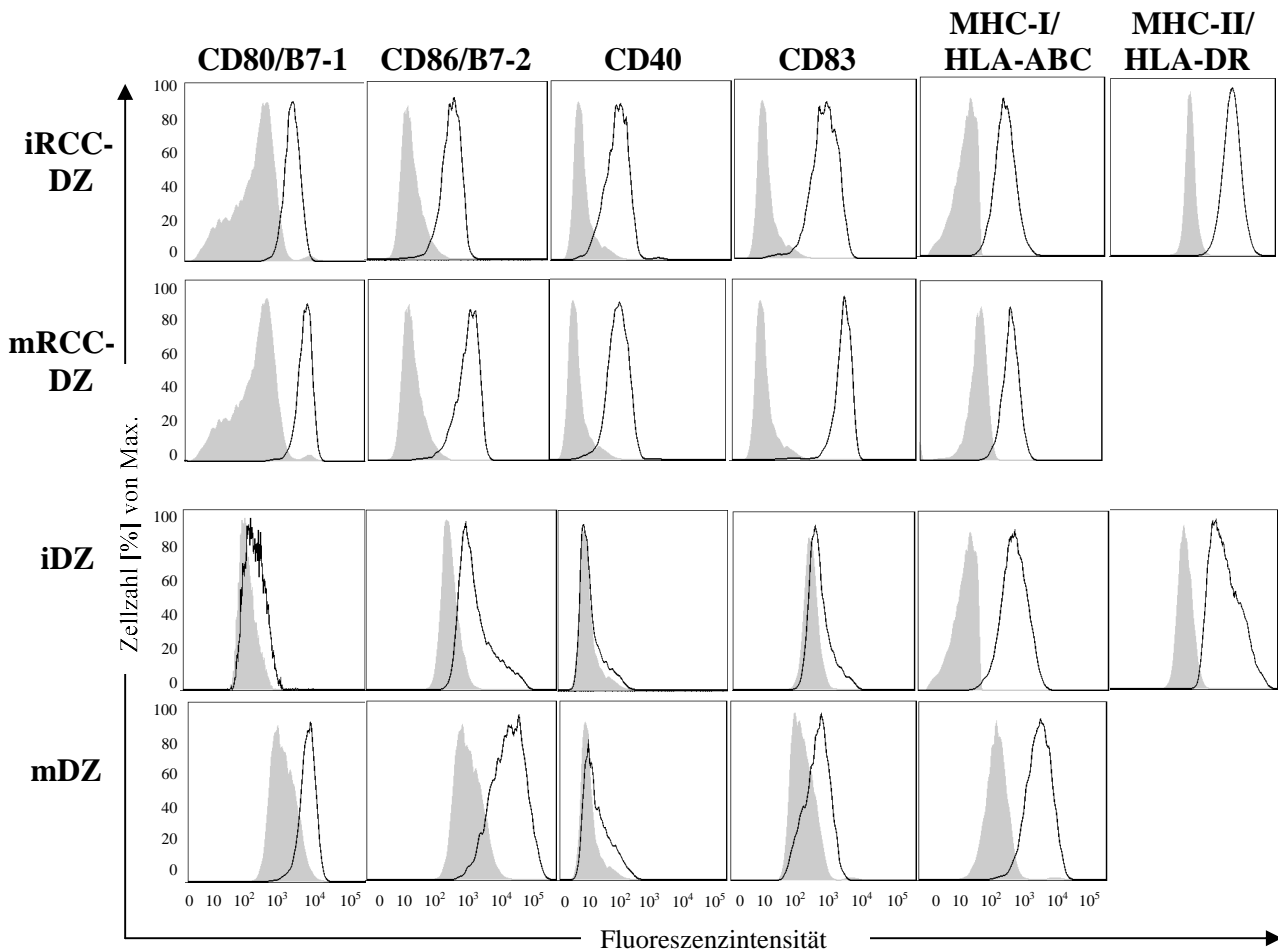
Abbildung 5.1.1 zeigt, dass iRCC-DZ im Gegensatz zu iDZ CD14 und CD163 exprimierten. Beide Zellpopulationen zeigten eine starke Expression von CD209. Auf einen Maturierungsstimulus hin veränderten mDZ die Markerexpression im Grunde nicht, wohingegen mRCC-DZ CD163 und CD209 abregulierten.

### **5.1.2 Vergleich von RCC-DZ mit DZ in Bezug auf die Expression kostimulatorischer Oberflächenrezeptoren, CD83 und MHC-Molekülen**

Die kostimulatorischen Oberflächenrezeptoren CD80/B7-1 und CD86/B7-2 auf APZ sind wichtige Mitinduktoren der T-Zell-Aktivierung, indem sie mit CD28 auf T-Zellen interagieren und das Signal 2 vermitteln (siehe 1.2.2). CD40-Rezeptor, ein Mitglied der TNF-Rezeptor Superfamilie, bindet CD154 (CD40L) auf aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen, wodurch die DZ für die Generation von zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen „lizenziiert“ wird. CD83 ist der klassische Maturierungsmarker von muren DZ. Die MHC-Moleküle sind essentiell an der Antigenpräsentation an T-Zellen beteiligt (siehe 1.3).

Der Literatur entsprechend (Banchereau, et al. 2000) wurden die kostimulatorischen Moleküle CD80/B7-1 und CD86/B7-2 nur in niedriger Menge auf immaturren DZ exprimiert. Zudem exprimierten iDZ kaum CD40 und CD83. Auf einen Maturierungsstimulus wurden diese Marker auf der Zelloberfläche verstärkt exprimiert bzw. induziert (Abbildung 5.1.2).

iRCC-DZ wiesen dagegen bereits eine hohe Rezeptordichte von CD80/B7-1, CD86/B7-2, CD40 und CD83 auf. Diese Ergebnisse deuten auf einen voraktivierten Zellstatus der immaturren RCC-DZ hin. Auf ein Maturierungssignal verstärkten auch die mRCC-DZ die Markerexpression. Beide Zelltypen, RCC-DZ und DZ, exprimierten die MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II Moleküle gut.



**Abbildung 5.1.2 Expression von CD80/B7-1, CD86/B7-2, CD40, CD83 und MHC-Molekülen auf RCC-DZ und DZ.**

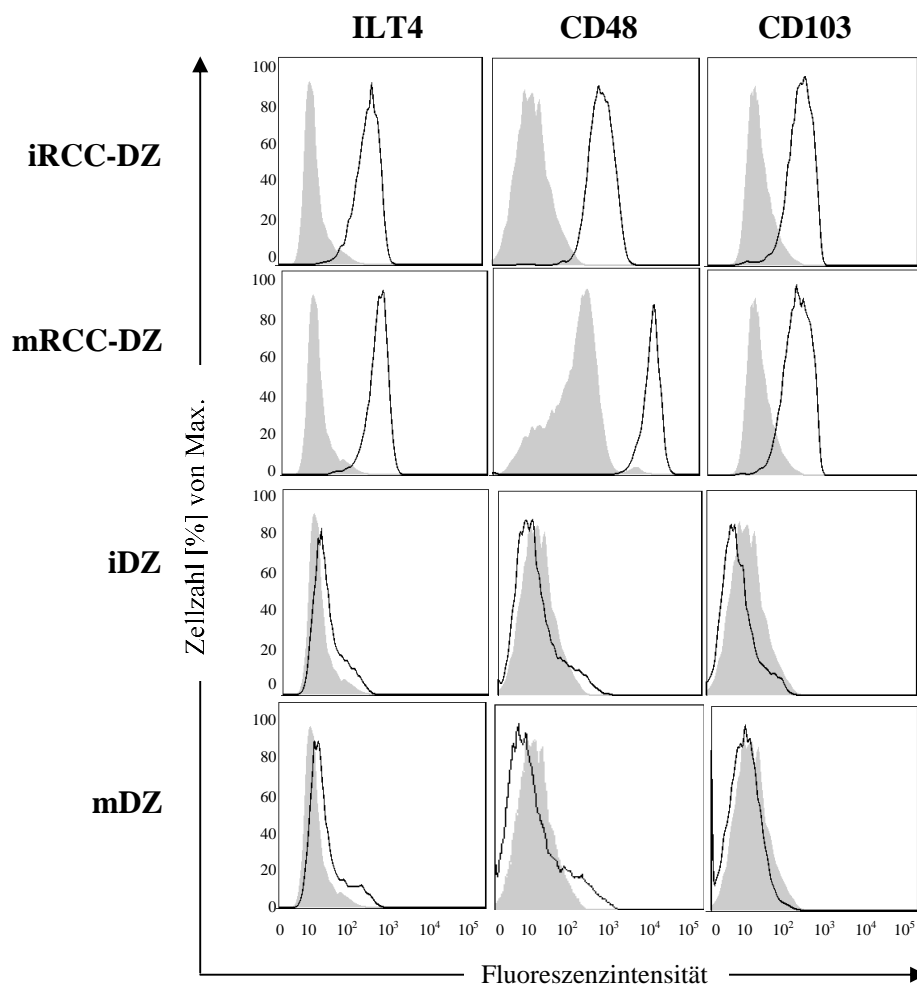
Von den in vitro in 7 Tagen parallel generierten Zelltypen desselben Spenders wurde die Hälfte am Tag 6 mit dem Jonuleit-Zytokincocktail für 24 Stunden maturiert. Unmittelbar nach der Ernte wurden die Zellpopulationen einer Oberflächenfärbung unterzogen und anschließend am LSR-II Durchflusszytometer gemessen. Die spezifische Antikörperfärbung ist als unausgefülltes Histogramm, die korrespondierende Isotypkontrolle als graues ausgefülltes Histogramm angegeben. Dargestellt ist jeweils eines von mehreren unabhängigen Experimenten mit Zellen verschiedener Spendern.

### 5.1.3 Vergleich von RCC-DZ mit DZ in Bezug auf die Expression regulatorischer und zielsteuernder Oberflächenrezeptoren

Die Untersuchung der regulatorischen Rezeptoren ILT4 und CD48 diente der Aufklärung einer möglichen immunregulatorischen Wirkung der RCC-DZ. ILT4 (Ig-ähnliches Transkript 4, CD85d) ist ein Mitglied der LIR-Familie (Leukozyten Immunglobulin ähnlicher Rezeptor) auf Immunzellen und bindet an MHC-Moleküle, vor allem HLA-G. Es induziert eine negative Signalkaskade, die eine Immunstimulation verhindert. CD48 wird auf nahezu allen Leukozyten gefunden und ist ein Ligand des Rezeptors CD244/2B4, der von NK-Zellen und aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert wird. CD244 kann als aktivierender Rezeptor fungieren, wenn das zytoplasmatische Adaptormolekül SAP (SLAM-assoziiertes Protein) rekrutiert werden kann (Nakajima und Colonna 2000). Ist SAP abwesend, so wird die NK-Zelle bei Ligation von

CD48 inhibiert (Lee, et al. 2004). Das Integrin CD103, das an E-Cadherin von beispielsweise Epithelien bindet, ist für die Zielsteuerung und die Retention von Lymphozyten im Epithelgewebe verantwortlich. Die Analyse diente einer möglichen Zuordnung der RCC-DZ zur gewebständigen CD103<sup>+</sup> DZ-Subpopulation, welche mitunter über Kreuzpräsentation viraler und autologer Antigene periphere Toleranz, sowie zelluläre Immunität induzieren kann (Sung und Bolton 2010, Manicone, et al. 2009).

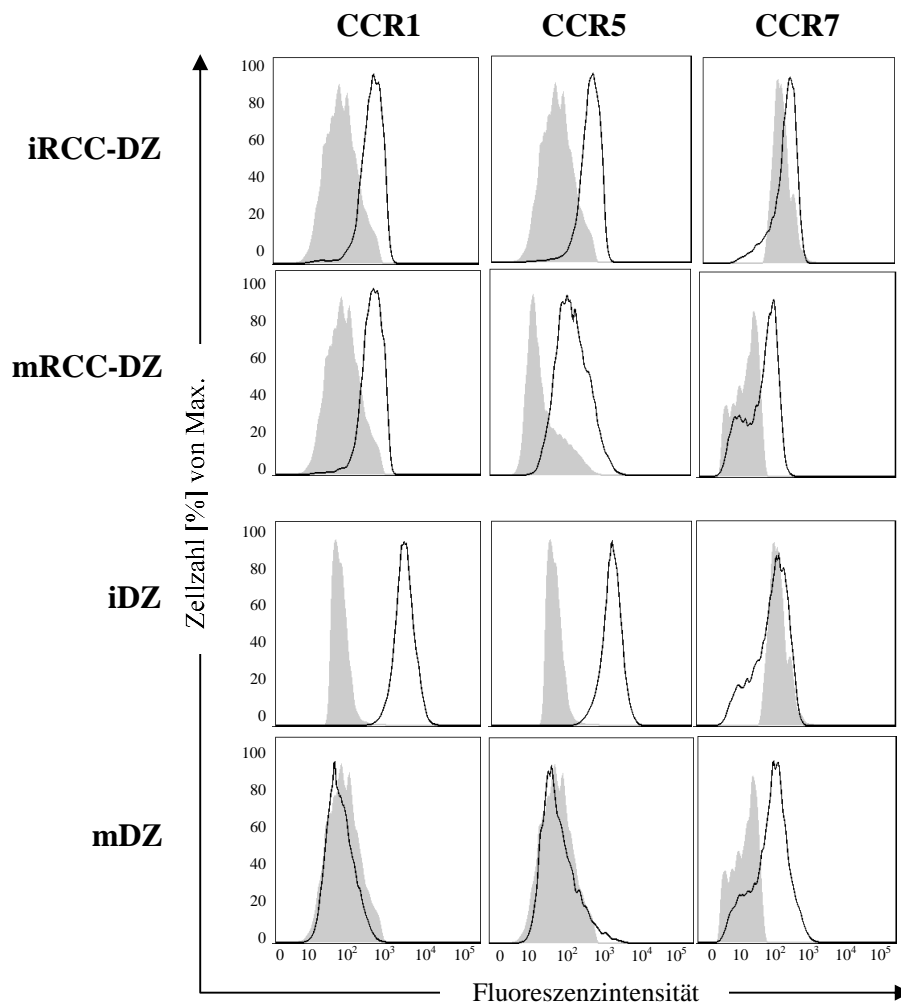
Die FACS-Analyse zeigte auf iRCC-DZ eine starke Expression von ILT4, CD48 und CD103, während iDZ diese Marker nicht exprimierten (Abbildung 5.1.3). Der Maturierungsstimulus veränderte die Expression nicht merklich.



**Abbildung 5.1.3 Expression regulatorischer und zielsteuernder Oberflächenrezeptoren auf RCC-DZ und DZ.** Die Hälfte der in vitro in 7 Tagen parallel generierten Zelltypen desselben Spenders wurden am Tag 6 mit dem Jonuleit-Zytokincocktail für 24 Stunden maturiert. Direkt nach der Ernte wurden die Zellpopulationen einer Oberflächenfärbung unterzogen und anschließend am LSR-II Durchflusszytometer gemessen. Die spezifische Antikörperfärbung ist als unausgefülltes Histogramm, die korrespondierende Isotypkontrolle als graues ausgefülltes Histogramm angegeben. Dargestellt ist jeweils eines von mehreren unabhängigen Experimenten mit Zellen verschiedener Spender.

### 5.1.4 Vergleich von RCC-DZ mit DZ in Bezug auf die Expression von Chemokinrezeptoren

Immature DZ exprimieren typischerweise CCR1 und CCR5, die auf einen Maturierungsstimulus hin abreguliert werden. Der Chemokinrezeptor CCR7 wird gegensätzlich reguliert und ist auf maturen DZ zu finden. Abbildung 5.1.4 zeigt das Expressionsniveau der Chemokinrezeptoren CCR1, CCR5 und CCR7 auf RCC-DZ und DZ in unreifer und reifer Entwicklungsstufe. iRCC-DZ zeigten ein niedrigeres Expressionslevel von CCR1 und CCR5 als iDZ, aber bereits eine geringe Expression von CCR7. Die Maturierung veränderte die Expression nicht. iDZ zeigten eine hohe Rezeptordichte an CCR1 und CCR5, exprimierten aber nur wenig CCR7. Auf einen Maturierungsstimulus hin waren CCR1 und CCR5 auf der Zelloberfläche von DZ nicht mehr, dagegen aber CCR7 detektierbar.



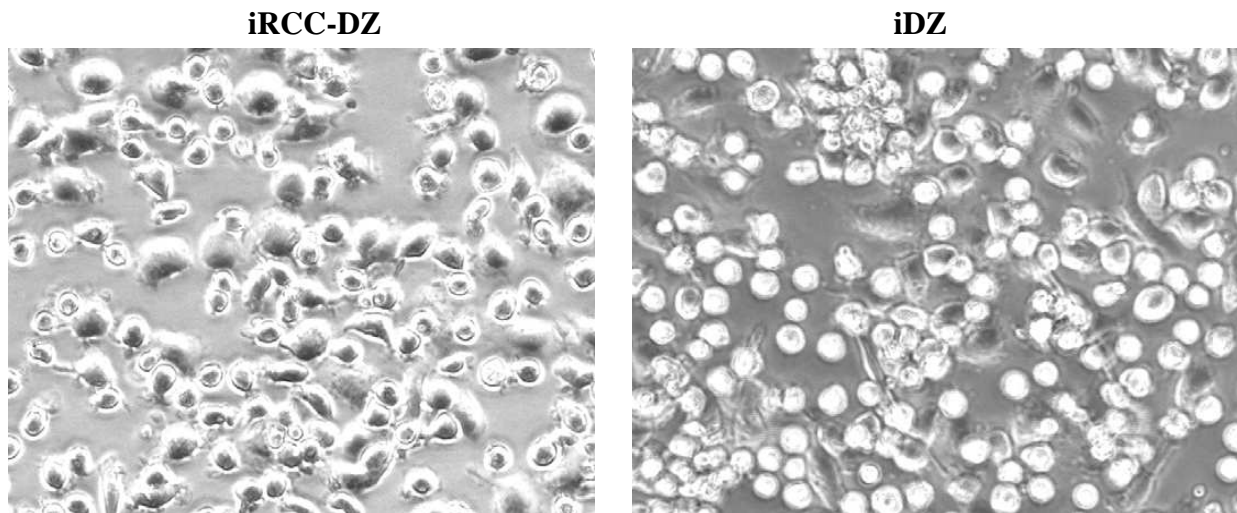
**Abbildung 5.1.4 Expression von Chemokinrezeptoren auf RCC-DZ und DZ.**

Die Hälfte der *in vitro* in 7 Tagen parallel generierten Zelltypen desselben Spenders wurde direkt nach der Ernte mit Jonuleit-Zytokincocktail für 24 Stunden maturiert. Anschließend wurden die Zellpopulationen einer Oberflächenfärbung unterzogen und am LSR-II Durchflusszytometer gemessen. Die spezifische Antikörperfärbung ist als unausgefülltes Histogramm, die korrespondierende Isotypkontrolle als graues ausgefülltes Histogramm angegeben. Dargestellt ist jeweils eines von mehreren unabhängigen Experimenten mit Zellen verschiedener Spender.

### 5.1.5 Die Zellmorphologie von RCC-DZ und DZ

Die Zellmorphologie wurde durch Lichtmikroskopie am Tag 7 der Kultivierung beurteilt.

iRCC-DZ waren klein und hatten eine polymorphe, granuläre Gestalt (Abbildung 5.1.5). iDZ waren ebenso klein, hatten dagegen eine rundliche, glatte Morphologie. mRCC-DZ und mDZ zeigten die charakteristischen Dendriten (nicht gezeigt).



**Abbildung 5.1.5 Zellmorphologie der unreifen RCC-DZ und DZ.**

Lichtmikroskopische Aufnahmen der RCC-DZ und DZ mit 100facher Vergrößerung am Tag 7 der Zellkultivierung in einer 6-Loch-Flachbodenplatte.

### 5.1.6 Zusammenfassung der phänotypischen Merkmale von RCC-DZ und DZ

Die phänotypische Betrachtung der RCC-DZ ergab bereits im unreifen Zustand eine starke Expression von CD209/DC-SIGN, CD14, CD163, den kostimulatorischen Oberflächenrezeptoren (CD40, CD80/B7-1, CD86/B7-2), von HLA-ABC/MHC-I und HLA-DR/MHC-II, sowie von ILT4, CD48, CD83, CD103 und den Chemokinrezeptoren CCR1 und CCR5. Auf Stimulation veränderten sie ihr Immunrezeptorprofil indem die myeloischen Marker abreguliert und die kostimulatorischen Rezeptoren hochreguliert wurden. Das Chemokinrezeptorprofil der mRCC-DZ änderte sich jedoch nicht. iDZ zeigten eine starke Expression von CD209/DC-SIGN, CCR1 und CCR5, sowie keine Expression von CD14, CD103, ILT4 oder CD48. Auf einen Maturierungsstimulus hin wurden die kostimulatorischen Rezeptoren (CD80/B7-1, CD86/B7-2, CD40), HLA-ABC/MHC-I, HLA-DR/MHC-II sowie CD83 verstärkt exprimiert, die Chemokinrezeptoren CCR1 und CCR5 abreguliert und CCR7 induziert. Tabelle 7 fasst die phänotypischen Charakteristika der einzelnen Subpopulationen zusammen.

**Tabelle 7 Phänotypische Merkmale immaturer und maturer RCC-DZ und DZ.**

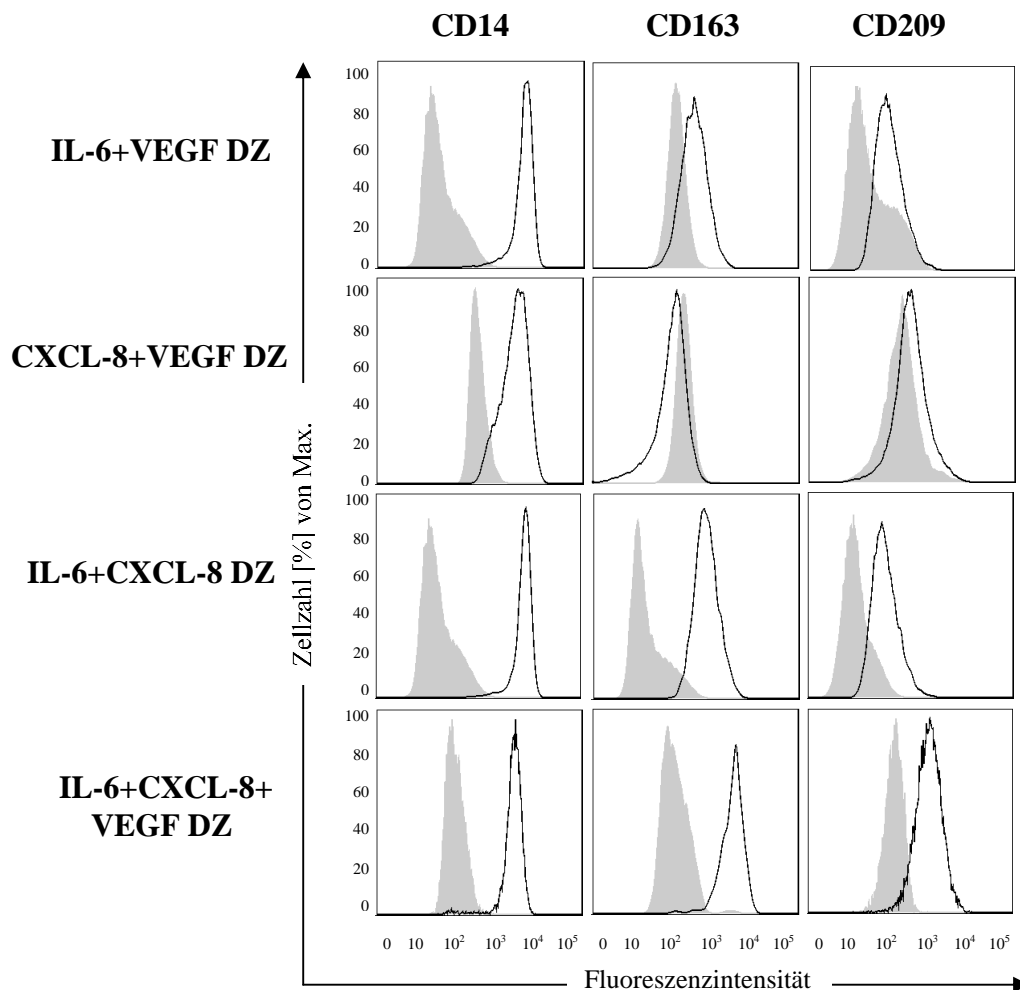
Population	Myeloische Marker	Kostimulatorische Marker	MHC-Moleküle und CD83	Regulatorische Marker	Chemokinrezeptoren	Zellmorphologie
iRCC-DZ	CD14 <sup>++</sup> CD209 <sup>++</sup> CD163 <sup>++</sup>	CD80 <sup>+</sup> CD86 <sup>+</sup> CD40 <sup>++</sup>	MHC-I <sup>+</sup> MHC-II <sup>++</sup> CD83 <sup>++</sup>	ILT4 <sup>++</sup> CD48 <sup>++</sup> CD103 <sup>++</sup>	CCR1 <sup>+</sup> CCR5 <sup>+</sup> CCR7 <sup>+</sup>	klein, polymorph, granulär
mRCC-DZ	CD14 <sup>++</sup> CD209 <sup>+</sup> CD163 <sup>+</sup>	CD80 <sup>++</sup> CD86 <sup>++</sup> CD40 <sup>++</sup>	MHC-I <sup>+</sup> MHC-II <sup>+</sup> (nicht gezeigt) CD83 <sup>++</sup>	ILT4 <sup>++</sup> CD48 <sup>++</sup> CD103 <sup>++</sup>	CCR1 <sup>+</sup> CCR5 <sup>+</sup> CCR7 <sup>+</sup>	klein, granulär, mit Dendriten
iDZ	CD14 <sup>-</sup> CD209 <sup>++</sup> CD163 <sup>-</sup>	CD80 <sup>+</sup> CD86 <sup>+</sup> CD40 <sup>-</sup>	MHC-I <sup>+</sup> MHC-II <sup>+</sup> CD83 <sup>-</sup>	ILT4 <sup>-</sup> CD48 <sup>-</sup> CD103 <sup>-</sup>	CCR1 <sup>++</sup> CCR5 <sup>++</sup> CCR7 <sup>-</sup>	klein, rundlich, glatt
mDZ	CD14 <sup>-</sup> CD209 <sup>++</sup> CD163 <sup>-</sup>	CD80 <sup>++</sup> CD86 <sup>++</sup> CD40 <sup>+</sup>	MHC-I <sup>++</sup> MHC-II <sup>++</sup> (nicht gezeigt) CD83 <sup>++</sup>	ILT4 <sup>-</sup> CD48 <sup>-</sup> CD103 <sup>-</sup>	CCR1 <sup>-</sup> CCR5 <sup>-</sup> CCR7 <sup>++</sup>	klein, glatt, mit Dendriten

++ starke Markerexpression; + schwache Markerexpression; - keine Markerexpression

## 5.2 Induktionsfaktoren des RCC-DZ-Phänotyps

Den Induktionsfaktoren des RCC-DZ-Phänotyps im Tumormilieu wurde bereits in Vorarbeiten durch A.-M. Figel nachgegangen, indem zellfreie Kulturüberstände verschiedener Tumorzelllinien in einer Bioplex-Analyse auf ihr Zytokinprofil untersucht wurden (Figel, et al. 2011). In allen Zellkulturüberständen, die den RCC-DZ Phänotyp induzierten, wurden hohe Werte an IL-6 und CXCL-8/IL-8 detektiert und demzufolge vermutet, dass diese Faktoren den RCC-DZ-Subtyp induzieren könnten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die aus Vollblut isolierten Monozyten mit CXCL-8 (7 ng/ml) oder IL-6 (1,9 ng/ml) oder beiden Faktoren zusammen und in unterschiedlichen Kombinationen mit VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor; 23,4 ng/ml) in AIM-V Medium kultiviert und am Tag 7 mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Konzentrationen der einzelnen Zytokine wurden denen nachempfunden, wie sie im RCC-26-konditionierten Tumorzellkulturüberstand detektiert wurden.

Abbildung 5.2.1 zeigt, dass IL-6+VEGF und CXCL-8+VEGF einen Zelltyp mit starker Expression von CD14, mit geringer Expression von CD209, aber keiner Expression von CD163 induzierten. Dagegen wurde bei Kombination von IL-6 und CXCL-8 mit oder ohne VEGF der RCC-DZ Phänotyp mit starker Expression aller drei Merkmale erreicht.

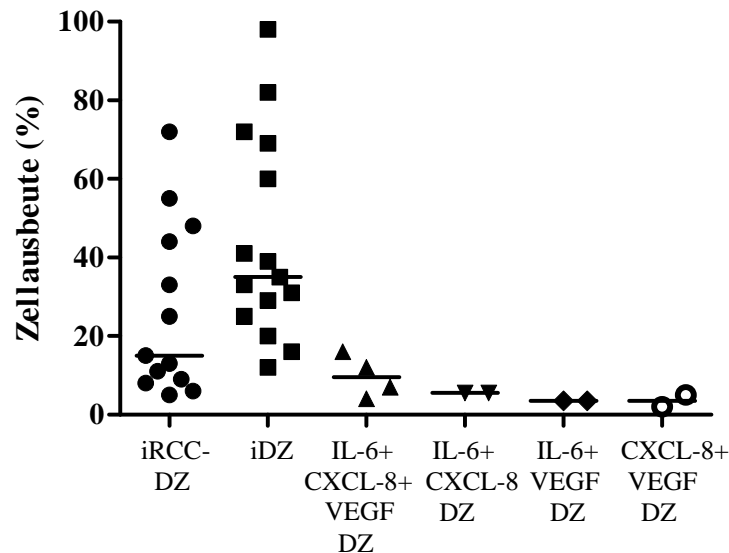


**Abbildung 5.2.1 CD14, CD163 und CD209 Expression auf zytokingenerierten DZ.**

Die Monozyten wurden in unterschiedlichen Kombinationen (IL-6+VEGF, CXCL-8+VEGF, IL-6+CXCL-8, IL-6+CXCL-8+VEGF) an den Tagen 0, 2 und 6 in AIM-V Medium mit 7 ng/ml CXCL-8, 1,9 ng/ml IL-6 und 23,4 ng/ml VEGF inkubiert. Nach der Ernte am Tag 7 wurden sie mit Antikörpern gegen CD14, CD163 und CD209 gefärbt und am LRS II-Durchflussszytometer gemessen. Die spezifische Antikörperfärbung ist als unausgefülltes Histogramm, die korrespondierende Isotypkontrolle als graues Histogramm angegeben. Dargestellt ist jeweils eines von mehreren unabhängigen Experimenten mit Zellen verschiedener Spender.

Obleich durch den Zytokincocktail aus IL-6, CXCL-8 und VEGF ein vergleichbarer Phänotyp wie mit RCC-26-Zellkulturüberstand induziert wurde, war bei Verwendung der Einzelfaktoren die Zellausbeute deutlich geringer als bei Einsatz des Zellkulturüberstandes. Abbildung 5.2.2 zeigt, dass bei klassischer DZ-Kultivierung mit IL-4+GM-CSF eine mittlere Zellausbeute von 35% (12-98%; n=15) erreicht wurde. Bei Kultivierung der Monozyten mit RCC-26-Tumorzellkulturüberstand wurde eine Ausbeute von 17% (6-72%; n=13) erreicht. Bei Verwendung von IL-6+CXCL-8+VEGF war die Ausbeute 10% (4-16%; n=4). Die Kultivierung mit IL-6+CXCL-8 oder IL-6+VEGF ergab eine Zellausbeute von 2% (n=2) und die mit CXCL-8+VEGF von 4% (2-5%; n=3). Dies weist auf einen deutlichen Überlebensnachteil der zytokingenerierten Zellen im Vergleich zu den mit IL-4+GM-CSF generierten DZ und den mit RCC-26-Tumorzellkulturüberstand erzeugten RCC-DZ hin.





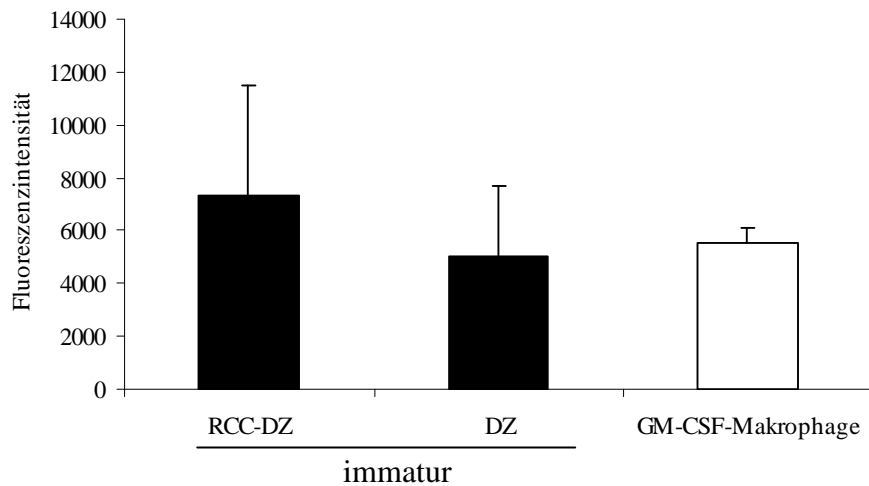
**Abbildung 5.2.2 Zellausbeute an iRCC-DZ, iDZ und zytokingenerierten DZ.**

Dargestellt sind 2 bis 13 Experimente. Es wurden 5-30 Millionen Zellen pro Ansatz ausgesät und nach 7 Tagen Kultivierung zwischen 100.000 und 16 Millionen Zellen geerntet. Zur Berechnung der Zellausbeute wurden die geernteten mit den ausgesäten Zellen in ein prozentuales Verhältnis gesetzt und die Zellausbeute anhand folgender Formel rechnerisch ermittelt:  $\text{Zellausbeute [\%]} = \frac{\text{geerntete Zellzahl}}{\text{ausgesäte Zellzahl}} \times 100$ . Der horizontale Balken zeigt den Median der Gruppe mit der jeweiligen SEM.

### 5.3 Phagozytosefähigkeit der RCC-DZ und DZ

Immature DZ zeigen ein hohes Endozytose- und Phagozytosepotential, welches sie nach Maturierungsstimulation verlieren. In Vorarbeiten (Figel, et al. 2011) wurde bereits gezeigt, dass RCC-DZ hohes Endozytosepotential haben. Hier wurde die Phagozytosekapazität mithilfe Fluoreszein (FITC)-markierter *Escherichia coli*-Partikel gemessen. Es wurden jeweils 6-8 Replikate angesetzt und der Fluoreszenzintensität-Mittelwert (MFI) der Replikate gebildet. Die gemessene Fluoreszenzintensität korreliert mit der Anzahl der aufgenommenen Partikel. Als positive Vergleichspopulation galten GM-CSF-generierte Makrophagen.

Abbildung 5.3 ist zu entnehmen, dass iRCC-DZ eine etwas höhere Phagozytoseaktivität als iDZ und GM-CSF-Makrophagen zeigten.



**Abbildung 5.3 Phagozytoseaktivität der RCC-DZ und DZ.**

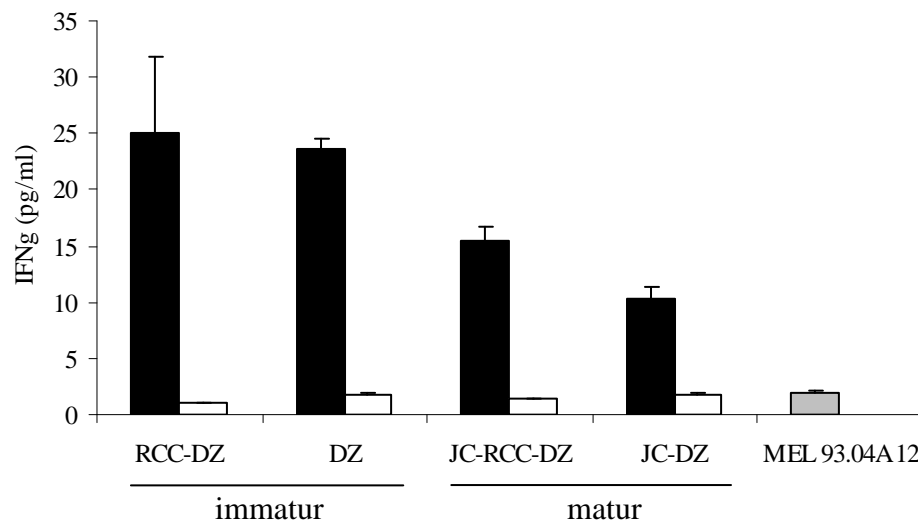
RCC-DZ und DZ (in-vitro 4 Tage generiert, n=1, bzw. 7 Tage generiert, n=2) wurden für 2 Stunden mit fluoreszierenden *E.coli*-Partikeln bei 37°C inkubiert, anschließend die Fluoreszenz der extrazellulären Partikel mit Trypanblau abgefangen und dann die Fluoreszenz der internalisierten Partikel am Fluoreszenzplattenlesegerät bei 480 nm Anregung und 520 nm Emission gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert der Fluoreszenzintensität unter Subtraktion der Hintergrundfluoreszenz (ohne Zellen) von drei Experimenten mit jeweiliger SEM.

## 5.4 Fähigkeit zur Antigen-Kreuzpräsentation der RCC-DZ und DZ

Die Antigen-Kreuzpräsentation ist eine Eigenschaft, die nur von DZ durchgeführt werden kann. Dabei präsentieren DZ exogene Antigene über MHC-I-Moleküle. Um die Fähigkeit der RCC-DZ zur Antigen-Kreuzpräsentation zu testen, wurde der HLA-A2-restringierte, Melan-A/MART-1-spezifische zytotoxische T-Zell-Klon A42 und das pep70-MART Peptid benutzt. Das Peptid ist ein 15-mer, das das HLA-A2 T-Zell-Epitop des Melan-A/MART-1-Antigens enthält. Das N-terminale Ende des Peptids ist verlängert und verhindert so die direkte Beladung des HLA-A2 auf der Oberfläche der DZ. Eine Präsentation und T-Zellstimulation ist somit nur dann möglich, wenn das Peptid aufgenommen und prozessiert wurde, d.h. Antigen-Kreuzpräsentation stattfindet. Ob Antigen-Kreuzpräsentation stattgefunden hat, wurde anhand von antigenspezifischer T-Zell-Stimulation getestet, die anhand der Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )-Produktion mittels ELISA-Test (siehe 4.4.1) messbar ist. Die IFN- $\gamma$ -Produktion ist umso höher, je mehr Peptid kreuzpräsentiert wurde (Bendz, et al. 2007).

Die myeloischen Zellen wurden mit 82 nM pep70-MART Peptid für 1 Stunde bei 37°C inkubiert, um die Aufnahme des Peptids zu induzieren. Anschließend wurden die zytotoxischen T-Zellen A42 für 24 Stunden zugegeben. Als Positivkontrolle für die Qualität der im Experiment eingesetzten T-Zellen fungierte die Kokultur der A42 T-Zelle mit der Melanomzelllinie MEL93.04A12, die das MART-Peptid endogen exprimiert und auf HLA-A2 präsentiert. Als Negativkontrolle wurden Kokulturen aus APZ und T-Zelle ohne Peptid, sowie Einzelzellansätze, die entweder die APZ oder die T-Zelle mit Peptid enthielten, verwendet.

Abbildung 5.4 zeigt die in den Kokulturen gemessenen IFN- $\gamma$ -Konzentrationen nach Inkubation der APZ mit 82 nM pep70-MART-Peptid. Vergleichbare Ergebnisse konnten mit dem Einsatz von 140 nM pep70-MART-Peptid erzielt werden (nicht gezeigt). iRCC-DZ induzierten mit iDZ vergleichbare Konzentrationen an IFN- $\gamma$  (25 pg/ml versus 23,6 pg/ml). Demzufolge zeigten sowohl die RCC-DZ als auch die DZ gute Kreuzpräsentationseigenschaft. Die IFN- $\gamma$ -Konzentrationen waren höher als bei den Melanomzellen. Die Antigen-Kreuzpräsentationskapazität der mRCC-DZ (15,5 pg/ml) und mDZ (10,3 pg/ml) war geringer und steht mit der geringeren Antigenaufnahme im murenen Zustand im Einklang.



**Abbildung 5.4 Antigen-Kreuzpräsentation bei RCC-DZ und DZ gemessen als IFN- $\gamma$ -Sekretion der MART-spezifischen zytotoxischen T-Zellen Kokultur mit pep70-MART inkubierten RCC-DZ und DZ.**

$2 \times 10^4$  APZ/100  $\mu$ l AIM-V Medium wurden mit pep70-MART-Peptid (82 nM) 1 Stunde bei 37°C inkubiert, um die Peptidaufnahme und Prozessierung zu sichern. Die APZ waren entweder unreif oder für 24 Stunden mit dem Jonuleit Zytokincocktail (JC) stimuliert worden. Anschließend wurden 4000 MART-T-Zellen für 24 Stunden zugegeben und danach der Gehalt an IFN- $\gamma$  in den Kokulturen mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Duplikate mit Peptid (schwarzer Balken) und ohne Peptid (weißer Balken) mit der jeweiligen Mittelabweichung von einem Experiment. Als Positivkontrolle wurden MEL93.04A412 Zellen verwendet, die natürlicherweise das MART-Peptid auf HLA-A2 präsentieren.

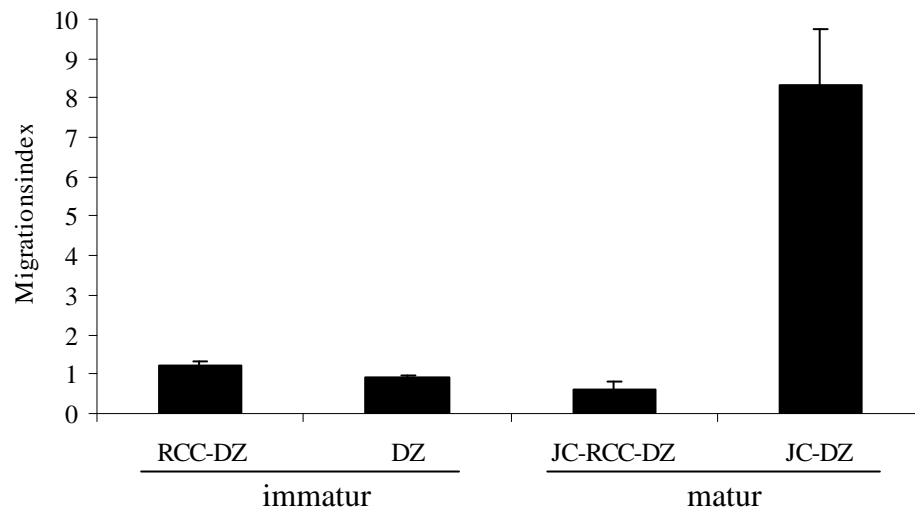
## 5.5 Migrationsfähigkeit der RCC-DZ und DZ

DZ können entlang chemotaktischer Gradienten migrieren. Die Wechselwirkung der Chemokinliganden CCL19 und CCL21 mit CCR7 auf murenen DZ ist dabei entscheidend für die Migration der murenen DZ in den Lymphknoten.

Anhand eines Transwell-Migrationssystems (siehe 4.3.3) wurden die RCC-DZ und DZ im Vergleich auf ihr CCL19-vermitteltes Migrationspotential getestet. Hierzu wurden sowohl immature als auch mit Jonuleit-Zytokincocktail (siehe 4.2.4) über 24 Stunden stimulierte RCC-DZ und DZ ( $2 \times 10^5$  Zellen/Einsatz) eingesetzt. Die Spontanmigration wurde in einem parallelen Ansatz ohne Chemokinzusatz bestimmt. Nach 3 Stunden Inkubationszeit bei 37°C

wurde mittels CellTiterGlo<sup>®</sup> (4.3.4) oder der Caltag Counting Beads (4.3.5) die Zellzahl im unteren Kompartiment bestimmt.

Abbildung 5.5.1 zeigt den Migrationsindex, also das Verhältnis aus den auf ein Chemokin spezifisch migrierten Zellen zu den spontan migrierten Zellen, bei einer Chemokinkonzentration von 100 ng/ml CCL19. iRCC-DZ und iDZ zeigten eine vergleichbar geringe Migration (1,2 versus 0,9; n=5). Stimulierte mDZ dagegen zeigten eine starke Migration, wohingegen mRCC-DZ nicht migrierten.

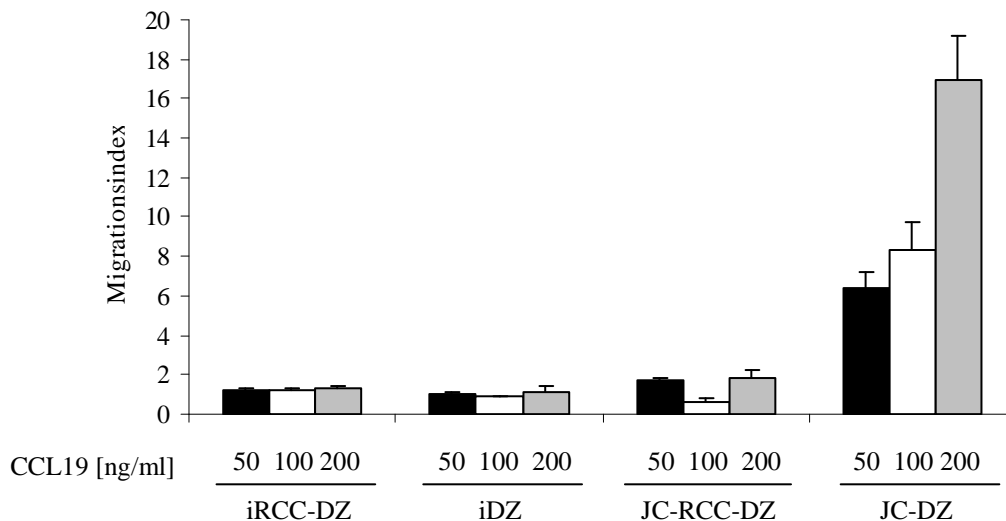


**Abbildung 5.5.1 CCL19 gerichtete Migration immaturer und maturer RCC-DZ und DZ.**

Nach 6 Tagen in-vitro Kultivierung wurde ein Teil der Zellsuspension 24 Stunden mit JC maturiert (mRCC-DZ, mDZ) und an Tag 7 zusammen mit den immaturren Zellen ( $2 \times 10^5$  in 200  $\mu$ l AIM-V) verwendet. In den unteren Kompartimenten befand sich 100 ng/ml CCL19 in 600  $\mu$ l AIM-V Medium. Es folgten 3 Stunden Inkubation bei 37°C. Als Negativkontrolle diente Medium ohne Chemokin, das zur Bestimmung der Spontanmigration von Zellen verwendet wurde. Für den Migrationsindex wurde die Anzahl der spezifisch migrierten Zellen mit den spontan migrierten Zellen in ein Verhältnis gesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert des Migrationsindex mit der jeweiligen SEM von fünf unabhängigen Experimenten.

Zudem wurde das Migrationspotential in Abhängigkeit von der CCL19-Konzentration ermittelt. Hierfür wurde CCL19 in aufsteigender Konzentration (50 ng/ml, 100 ng/ml und 200 ng/ml CCL19) in die unteren Kompartimente des Transwellsystems verteilt und  $2 \times 10^5$  myeloische Zellen in die Einsätze gegeben. Nach 3 Stunden Migrationszeit wurde die Zellzahl im unteren Kompartiment bestimmt und der Migrationsindex errechnet.

Abbildung 5.5.2 zeigt, dass immature RCC-DZ und DZ unabhängig von der Konzentration nicht migrierten. Maturierte DZ zeigten eine konzentrationsabhängige Chemotaxis, wohingegen mRCC-DZ auch bei höherer Chemokinkonzentration nicht migrierten.



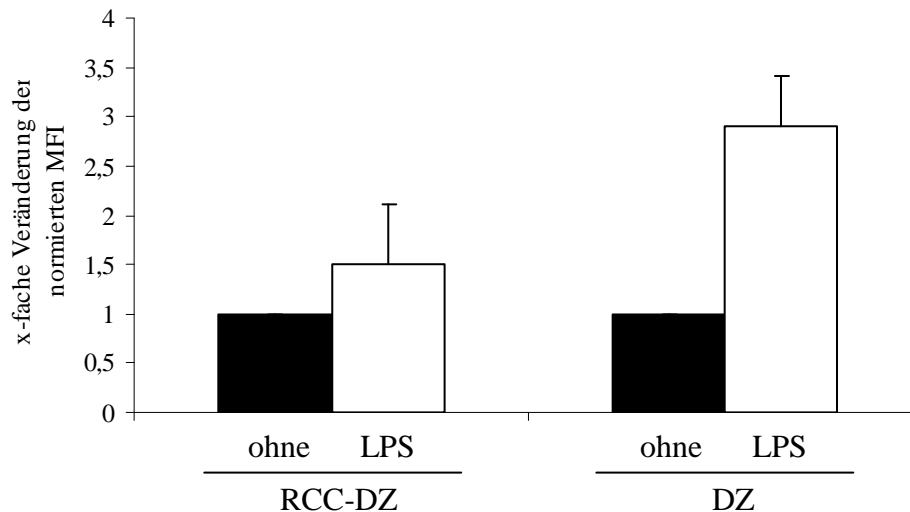
**Abbildung 5.5.2 Migration immaturer und maturer RCC-DZ und DZ gegen CCL19-Gradienten.**

Nach 6 Tagen in-vitro Kultivierung wurde ein Teil der Zelltypen 24 Stunden mit JC maturiert (JC-RCC-DZ, JC-DZ) und am Tag 7 zusammen mit den immaturren Zellen ( $2 \times 10^5$  in 200  $\mu$ l AIM-V) verwendet. In den unteren Kompartimenten befand sich je 50, 100 oder 200 ng/ml CCL19 in 600  $\mu$ l AIM-V Medium. Es folgten 3 Stunden Inkubation bei 37°C. Als Negativkontrolle diente Medium ohne Chemokin, das zur Bestimmung der Spontanmigration von Zellen verwendet wurde. Für den Migrationsindex wurde die Anzahl der spezifisch migrierten Zellen mit den spontan migrierten Zellen in ein Verhältnis gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte des Migrationsindex und die jeweilige SEM von fünf unabhängigen Experimenten.

## 5.6 Faszin

Faszin ist ein zytoskelettregulierendes, aktinbündelndes Protein, das während Zellveränderungsprozessen verstärkt exprimiert wird (Al-Alwan, et al. 2001). Sowohl für die Dendritenformation als auch die Bildung der Kontaktzone zwischen T-Zelle und DZ ist Faszin essentiell. Die Faszin-Produktion wird durch TLR-Agonisten, wie beispielsweise LPS, induziert. Die Faszin-Expression in RCC-DZ und DZ wurde anhand der Durchflusszytometrie sowohl vor als auch nach LPS- oder JC-Stimulation untersucht. Hierzu wurden die in-vitro generierten immaturren und maturen RCC-DZ und DZ für die intrazelluläre Färbung fixiert und permeabilisiert. Das Faszin wurde mittels anti-Faszin Antikörpern (Maus-IgG1) und sekundär mit Alexa-FluorA488 markierten anti-IgG1-Antikörpern (Ziege-MOPC21) detektiert. Anschließend wurde am LSR II gemessen und mithilfe der FlowJo<sup>®</sup> Software ausgewertet.

Abbildung 5.6 zeigt, dass immature RCC-DZ und DZ in etwa dieselbe Menge an Faszin (MFI iRCC-DZ=1650, MFI iDZ=1800; n=3) exprimierten. Die Stimulation mit LPS oder JC (nicht gezeigt) bewirkte bei RCC-DZ die Produktion der nur 1,5fachen Menge an Faszin, bei DZ dagegen die dreifache Menge.



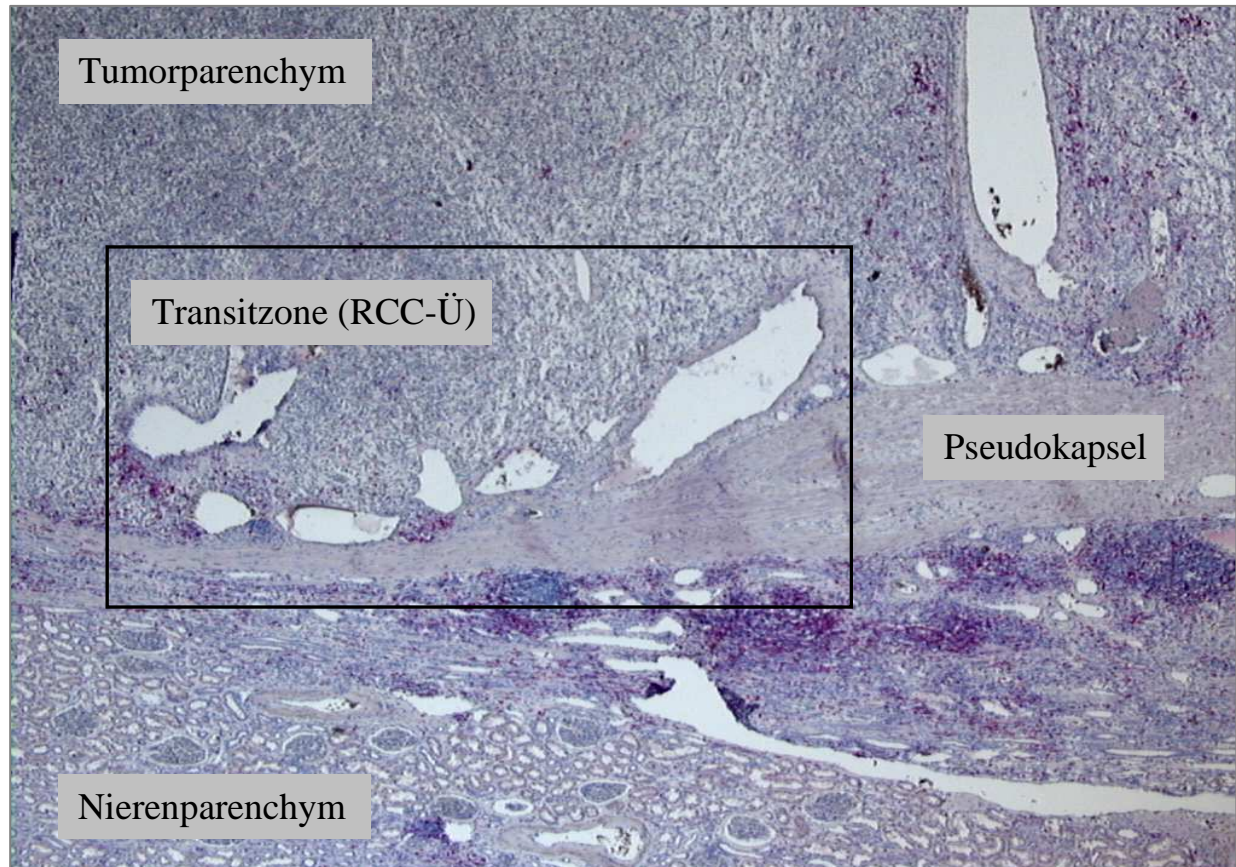
**Abbildung 5.6 Faszingehalt der RCC-DZ und DZ vor und nach Maturierungsstimulation.**

Nach 6 Tagen in-vitro Kultivierung wurde ein Teil der Zellsuspension 24 Stunden mit LPS stimuliert und am Tag 7 zusammen mit den immaturren Zellen geerntet. Für die intrazelluläre Faszin-Färbung wurden je Population  $2 \times 10^4$  Zellen mit Methanol fixiert, mit Saponin permeabilisiert und mit dem Faszin-Primärantikörper sowie dem A488-markiertem Sekundärantikörper gefärbt. Gemessen wurde am LRS II-Durchflusszytometer. Dargestellt ist der Mittelwert der x-fachen Veränderung der normierten Median Fluoreszenzintensität (MFI) von drei unabhängigen Experimenten. Die normierte MFI ist die Differenz aus der MFI des Faszin-Aks und der MFI des Isotypen MOPC21. Die Normierung erfolgte auf die unreife Zellpopulation. Der Fehlerbalken zeigt den SEM der drei Experimente. Bei Stimulation mit JC wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt.

## 5.7 In-situ Lokalisation der RCC-DZ, DZ und Makrophagen in Relation zum Lymphgefäßsystem im Nierenzellkarzinomgewebe

Um Hinweise zu erarbeiten, ob die in-vitro erhobenen Funktionsdaten der Situation in-situ entsprechen, wurde die Lokalisation der RCC-DZ, DZ und Makrophagen am RCC-Gewebe in Relation zum Lymphgefäßsystem untersucht. Das Lymphgefäßsystem lockt migratorisch aktive DZ mithilfe des Chemokins CCL19, das von Lymphgefäßendothelzellen sezerniert wird, in die Lymphgefäße, so dass die Lokalisation der myeloischen Zellen in Relation zum Lymphgefäßsystem im RCC-Gewebe ihre Migrationseigenschaften aufzeigen dürfte.

Die tumoralen, zum Lymphknoten drainierenden Lymphgefäße befinden sich beim RCC in der Transitzone (RCC-Ü; Ü=Übergang), dem Bereich des Tumorgewebes, wo die Pseudokapsel das Tumorphenchym vom tumorfreien Nierenparenchym abgrenzt (Abbildung 5.7.A). Für die Bewertung wurden ausschließlich Lymphgefäße einbezogen, die auf der Tumorseite der Pseudokapsel lagen. Gewebe mit Transitzone stand von 6 Patienten zur Verfügung (RCC-5, RCC-7, RCC-8, RCC-10, RCC-11, RCC-34), wobei sowohl von Patient RCC-5, als auch von Patient RCC-8 zwei histologische Präparate (ÜI und ÜII) untersucht wurden.



**Abbildung 5.7.A Die Transitzone des RCCs (RCC-Ü).**

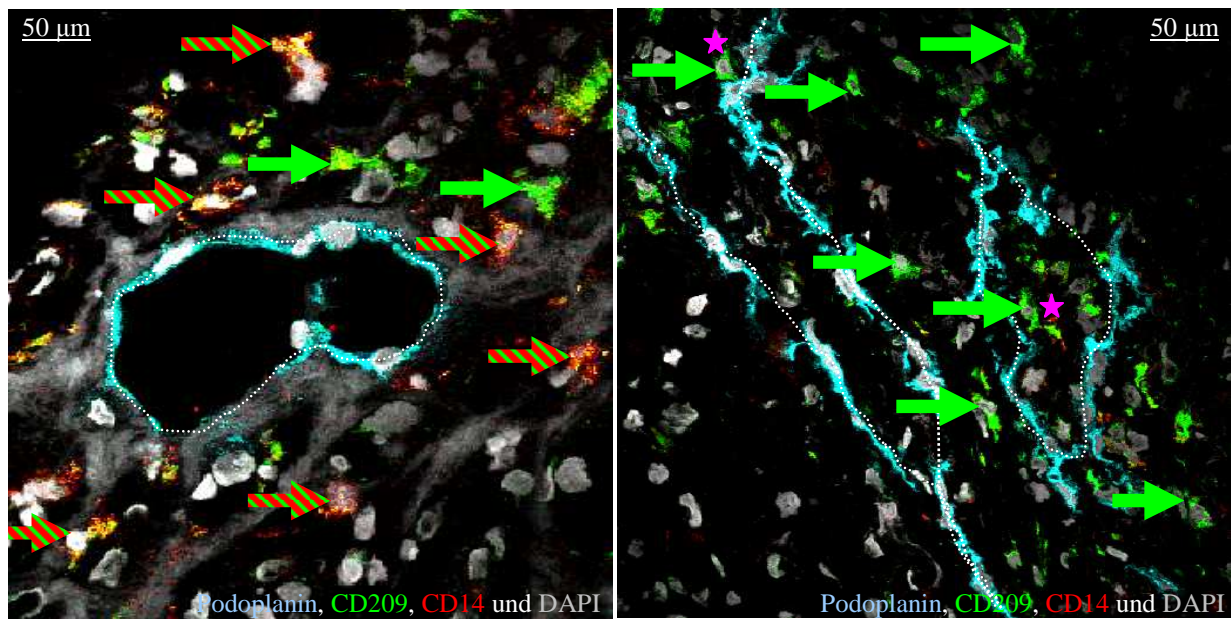
Dargestellt ist die lichtmikroskopische Aufnahme einer immunhistochemischen Färbung der Transitzone des RCCs (RCC-Ü). Der histologische Querschnitt zeigt das tumorfreie Nierenparenchym, die Pseudokapsel und das Tumorparenchym in 400facher Vergrößerung. Der schwarze Rahmen kennzeichnet die untersuchte Transitzone.

Die histologischen Präparate wurden mit Antikörpern gegen CD209/DC-SIGN und CD14, sowie gegen Podoplanin immunfluoreszent gefärbt. Die myeloischen Oberflächenmarker CD209 und CD14 dienen der Identifizierung der RCC-DZ ( $CD209^+CD14^+$ ), DZ ( $CD209^+CD14^-$ ) und Makrophagen ( $CD209^-CD14^+$ ). Podoplanin ist ein Mucoglykoprotein, das auf lymphatischen Endothelzellen exprimiert und als Marker für Lymphgefäße eingesetzt wird. Die Auswertung der dreifach immunfluoreszent-gefärbten Gewebe erfolgte mittels konfokaler Laserscanmikroskopie.

Abbildung 5.7.B zeigt zwei repräsentative Beispiele (RCC-5ÜI Gesichtsfeld (GF) 7 und RCC-11Ü GF6), wie die Lokalisation der RCC-DZ, DZ und Makrophagen vorgenommen wurde. GF7 des RCC-5ÜI zeigt zentral ein nierenförmiges Lymphgefäß mit cyanblau gefärbtem Endothel, sowie extralymphatisch zwei  $CD209^+$  DZ (grüner Pfeil) und fünf  $CD14^+CD209^+$  RCC-DZ (grün-rote Pfeile). GF6 des RCC-11Ü zeigt zwei Lymphgefäße im Längsschnitt mit cyanblauem Endothel, sowie extralymphatisch fünf  $CD209^+$  DZ und intralymphatisch zwei  $CD209^+$  DZ (★).

## RCC-5ÜI (GF7)

## RCC-11Ü (GF6)



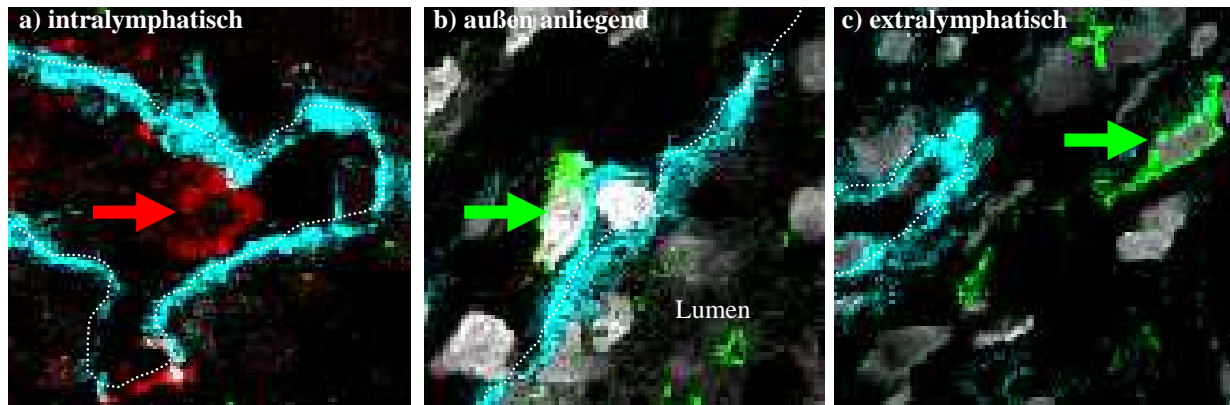
**Abbildung 5.7.B Konfokale Aufnahmen zweier histologischer RCC-Ü-Präparate gefärbt gegen CD209, CD14 und Podoplanin.**

Histologische Kryogewebeschnitte von RCC-5ÜI und RCC-11Ü wurden mit 3-Farben-Immunfluoreszenz auf CD209 (A488), CD14 (A568), Podoplanin (Cy5) gefärbt und mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. Dargestellt ist jeweils ein Gesichtsfeld (GF), um die Lokalisation der RCC-DZ ( $CD209^+CD14^+$ ), DZ ( $CD209^+CD14^-$ ) und Makrophagen ( $CD209^-CD14^+$ ) in Relation zu den Lymphgefäßen zu verbildlichen. Die podoplanin<sup>+</sup> Lymphgefäße sind in cyanblau und die  $CD209^+$  Zellen in grün (grüner Pfeil) dargestellt. Doppelt positive Zellen ( $CD209^+CD14^+$ ) leuchten gelb und sind mit einem rot-grün gestreiften Pfeil markiert. Intralymphatisch lokalisierte Zellen sind mit  $\star$  gekennzeichnet. Die Zellkerne sind anhand einer DAPI-Färbung in grau sichtbar gemacht. Die Bilder wurden mit einer 630fachen Vergrößerung in sequentiellm Modus (z-Stacks Abstand 0,5  $\mu$ m) aufgenommen.

Zur Analyse wurden zunächst pro Tumorübergang 5 bis 10 nicht-überlappende Gesichtsfelder ausgewählt, die podoplanin<sup>+</sup> Lymphgefäße enthielten, und anschließend die  $CD209^+CD14^+$  (RCC-DZ),  $CD209^+CD14^-$  (DZ), sowie die  $CD209^-CD14^+$  (Makrophagen) Zellen entsprechend ihrer Lokalisation in die Kategorien „intralymphatisch“, „am Lymphgefäßendothel außen anliegend“ und „extralymphatisch“ eingeteilt. Abbildung 5.7.C zeigt exemplarisch die drei Kategorien.

Im Kompartiment „intralymphatisch“ (5.7.C.a) befindet sich eine  $CD209^-CD14^+$  Makrophage. In den Kompartimenten „außen am Gefäßendothel anliegend“ (5.7.C.b) und „extralymphatisch“ (5.7.C.c) befindet sich jeweils eine  $CD209^+CD14^-$  DZ.

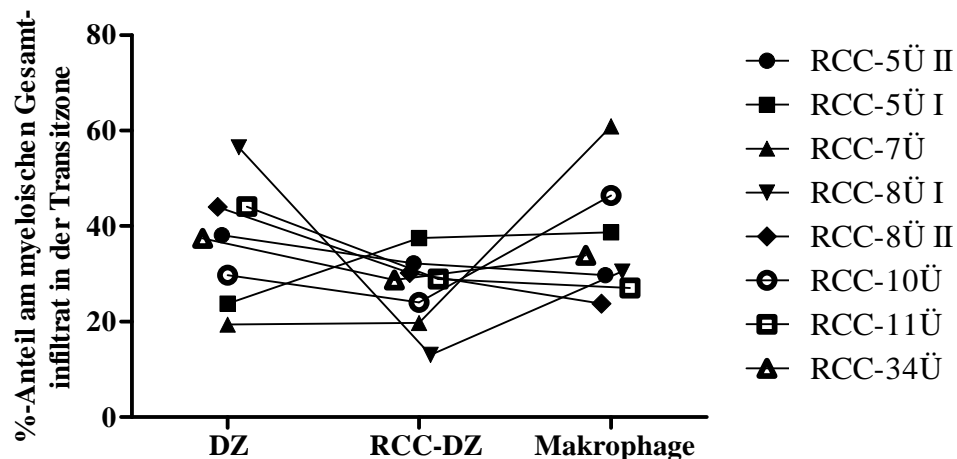




**Abbildung 5.7.C Lokalisation myeloischer Zellpopulationen in Relation zu den Lymphgefäßen.**

Histologische Kryogewebeschnitte wurden mit 3-Farben-Immunfluoreszenz gegen CD209 (A488; grün), CD14 (A568; rot) und Podoplanin (Cy5; caynblau) gefärbt und mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. Gezeigt sind Beispiele von myeloischen Zellen in Relation zu den Lymphgefäßen. a) Kompartiment „intralymphatisch“, enthält in diesem Beispiel einen Makrophagen (CD209<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>); b) Kompartiment „am Lymphgefäßendothel außen anliegend“, mit dargestellter DZ (CD209<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>) und c) Kompartiment „extralymphatisch“ mit dargestellter DZ (CD209<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>).

### 5.7.1 Prozentuale Häufigkeit der einzelnen Subpopulationen am myeloischen Gesamtinfiltrat in der Transitzone des RCCs



**Abbildung 5.7.1 Prozentualer Anteil der einzelnen Zellpopulationen am myeloischen Gesamtinfiltrat in der Transitzone des RCCs.**

8 histologische Kryogewebeschnitte (RCC-5Ü I, RCC-5Ü II, RCC-7Ü, RCC-8Ü I, RCC-8Ü II, RCC-10Ü, RCC-11Ü, RCC-34Ü) von 6 RCC-Tumoren (RCC-5, RCC-7, RCC-8, RCC-10, RCC-11, RCC-34) wurden mit 3-Farben-Immunfluoreszenz gegen CD209, CD14 und Podoplanin gefärbt und mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. Pro Tumorübergang wurden 5 bis 10 Gesichtsfelder ausgezählt und die Anzahl, sowie Lokalisation der RCC-DZ (CD209<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>), DZ (CD209<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>) und Makrophagen (CD209<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>) bestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der einzelnen Zelltypen RCC-DZ, DZ und Makrophagen am myeloischen Gesamtinfiltrat in der RCC-Transitzzone. Für die statistischen Analysen wurde der Kruskal-Wallis-Test in Kombination mit dem Dunn-Mehrfach-Parameter-Vergleichstest angewandt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Die Auszählung der drei Zellpopulationen in 8 Transitzonen ergab eine vergleichbare prozentuale Häufigkeit der drei Zelltypen am myeloischen Gesamtinfiltrat in der RCC-

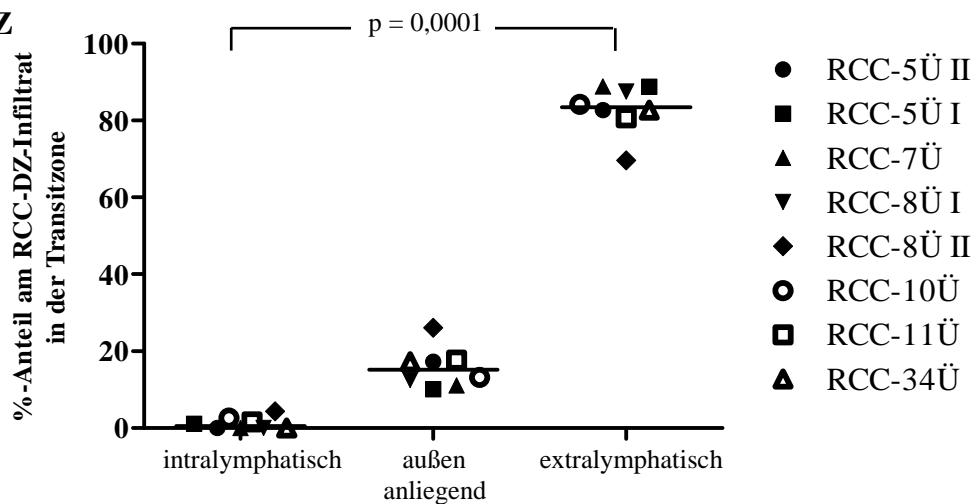
Transitzone. Die absoluten Zellzahlen sind in Tabelle 8 gezeigt. Die DZ repräsentierten unabhängig vom Kompartiment im Mittel der 8 untersuchten Transitzonen 37,8% (Streuung 19,4-56,5%; n=8) von allen bewerteten myeloischen Zellen. Die RCC-DZ waren mit einem Anteil von 28,8% (13-37,5%; n=8) nicht signifikant etwas weniger vertreten und die Makrophagen zeigten mit einem Anteil von 32,2% (24,5-60,9%; n=8) etwa die gleiche Häufigkeit wie die DZ (Abbildung 5.7.1).

### **5.7.2 Räumliche Verteilung der einzelnen Zelltypen in Relation zu den Lymphgefäßen**

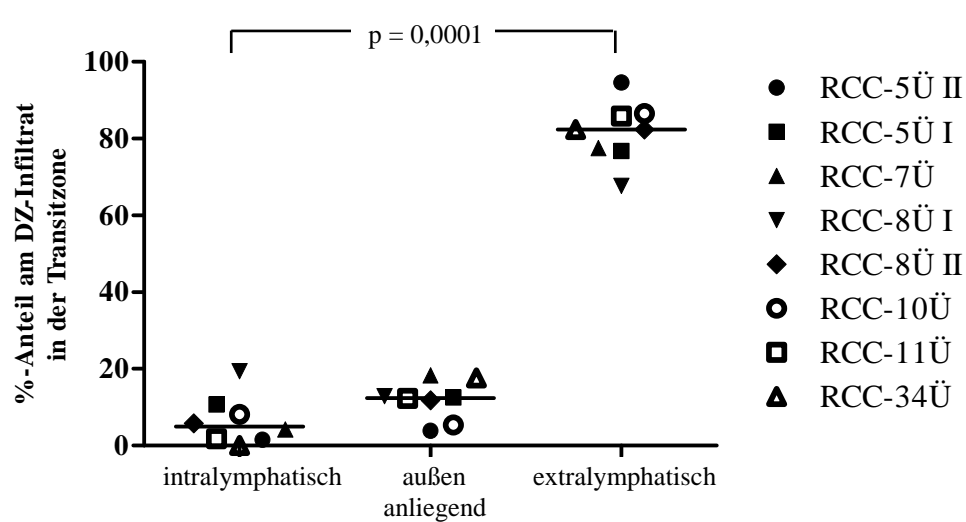
Die räumliche Verteilung in Relation zu den Lymphgefäßen zeigte für alle drei Subpopulationen ein ähnliches Muster (Abb. 5.7.2.1). Die absoluten Zellzahlen sind in Tabelle 8 dargestellt. Der größte prozentuale Anteil befand sich extralymphatisch, wobei bei den DZ der Anteil mit 82,4% (67,7-94,6%; n=8) am geringsten war. Bei den RCC-DZ befanden sich 83,5% (69,6-88,9%; n=8) extralymphatisch und bei den Makrophagen 88,9% (69-96,3%; n=8). Der geringste prozentuale Anteil war bei allen drei Subpopulationen intralymphatisch (Abbildung 5.7.2.1:  $p=0,0001$  (RCC-DZ);  $p=0,0001$  (DZ);  $p<0,0001$  (Makrophage)). Der prozentuale Zellanteil, der außen am Lymphgefäßendothel anlag, betrug bei den DZ im Mittel 12,4% (3,9-18,3%; n=8), bei den RCC-DZ 15,3% (10,1-26,1%; n=8) und bei den Makrophagen 10,7% (0-13,6%; n=8).

Vergleicht man den prozentualen Anteil der intralymphatischen Zellen zwischen den drei Zelltypen, so zeigte sich, dass dieser intralymphatische Anteil bei den RCC-DZ mit 0,6% (0-4,4%; n=8) signifikant niedriger war als bei den DZ (Median: 5%, 0-10,7%; n=8) und mit den Makrophagen vergleichbar niedrig war (Median: 1,1%, 0-6,9%; n=8) (siehe Abb. 5.7.2.2).

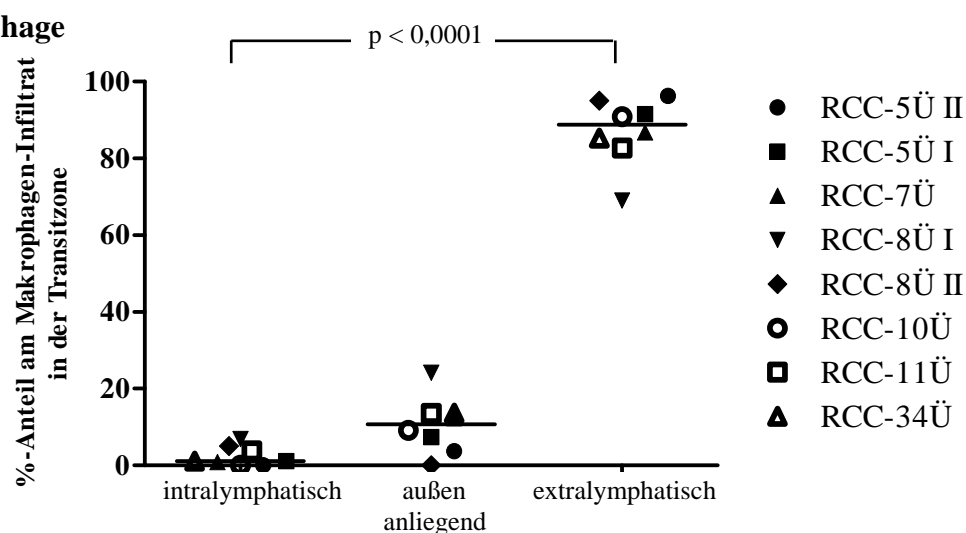
## A) RCC-DZ



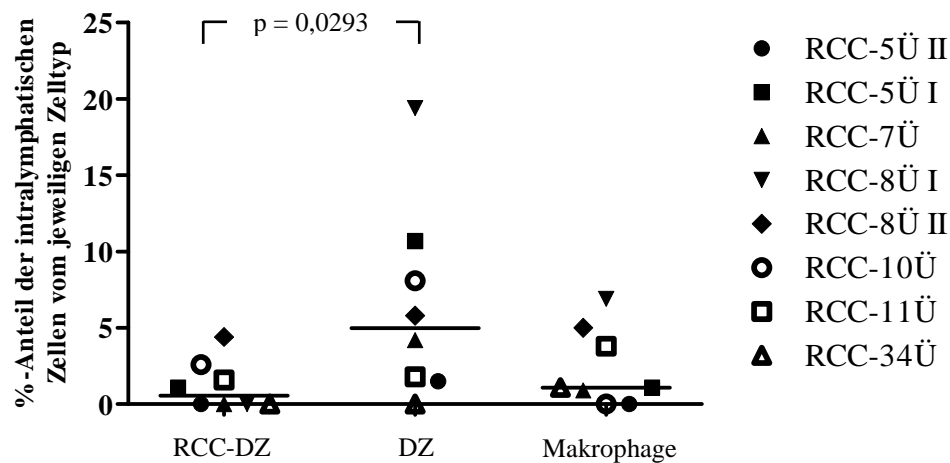
## B) DZ



## C) Makrophage



**Abbildung 5.7.2.1 Das räumliche Verteilungsmuster der RCC-DZ, DZ und Makrophage in Relation zu den Lymphgefäßen.** 8 histologische Kryogewebeschnitte (RCC-5Ü I, RCC-5Ü II, RCC-7Ü, RCC-8Ü I, RCC-8Ü II, RCC-10Ü, RCC-11Ü, RCC-34Ü) von 6 RCC-Tumoren (RCC-5, RCC-7, RCC-8, RCC-10, RCC-11, RCC-34) wurden mit 3-Farben-Immunfluoreszenz gegen CD209, CD14 und Podoplanin gefärbt und mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. **A)** Verteilungsmuster der RCC-DZ-Population. **B)** Verteilungsmuster der DZ-Population. **C)** Verteilungsmuster der Makrophagen-Population. Für die statistischen Analysen wurde der Kruskal-Wallis-Test in Kombination mit dem Dunn-Mehrfach-Parameter-Vergleichstest angewandt. Die p-Werte sind bei signifikanter Korrelation angegeben.



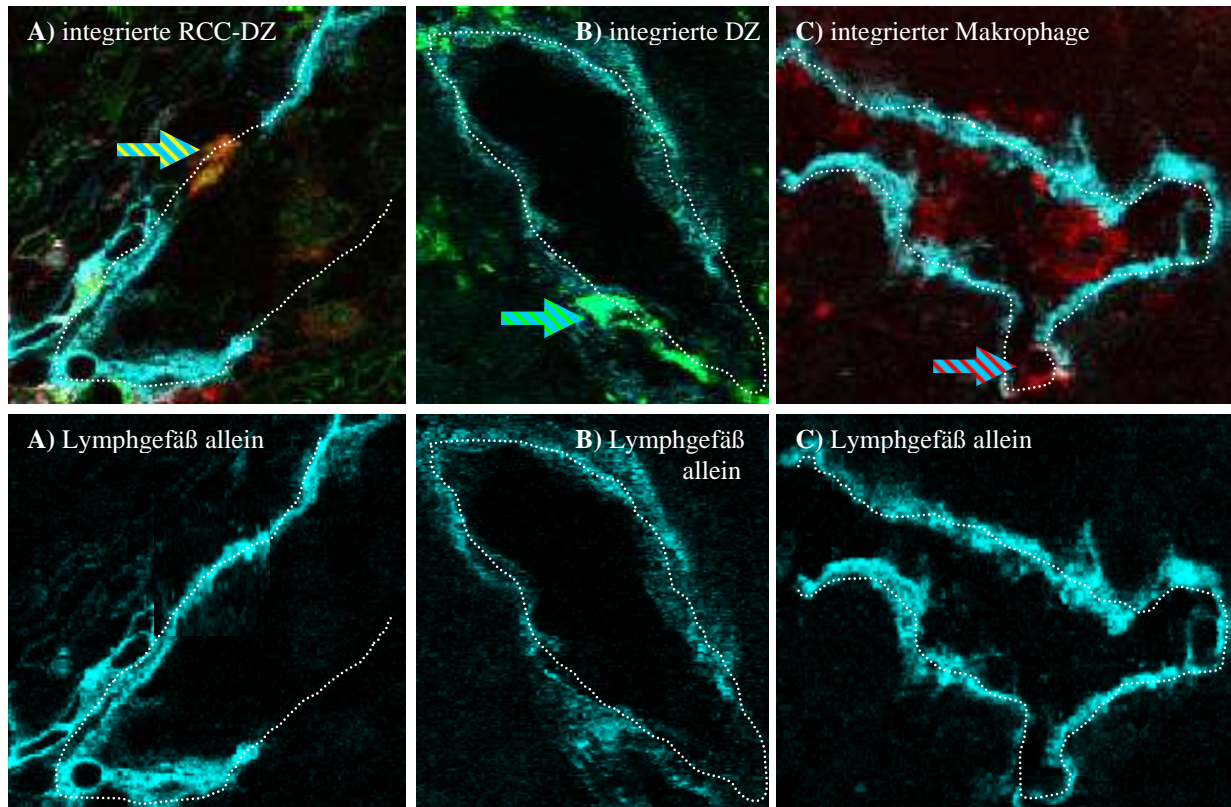
**Abbildung 5.7.2.2 Prozentualer Anteil der intralymphatischen RCC-DZ, DZ und Makrophagen.**

8 histologische Kryogewebeschnitte (RCC-5Ü I, RCC-5Ü II, RCC-7Ü, RCC-8Ü I, RCC-8Ü II, RCC-10Ü, RCC-11Ü, RCC-34Ü) von 6 RCC-Tumoren (RCC-5, RCC-7, RCC-8, RCC-10, RCC-11, RCC-34) wurden mit 3-Farben-Immunfluoreszenz gegen CD209, CD14 und Podoplanin gefärbt und mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. Die Lokalisierung wurde definiert als „intralymphatisch“, „an der Lymphgefäßwand außen anliegend“ und „extralymphatisch“. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der intralymphatischen RCC-DZ, DZ und Makrophagen bezogen auf die Gesamtzellzahl des jeweiligen Subtyps in der Transitzone. Der horizontale Balken ist der Median der Gruppe. Für die statistischen Analysen wurde der Kruskal-Wallis-Test in Kombination mit dem Dunn-Mehrfach-Parameter-Vergleichstest angewandt. Die p-Werte sind bei signifikantem Unterschied angegeben.

## 5.7.2 Die integrierte myeloische podoplanin<sup>+</sup> Subpopulation

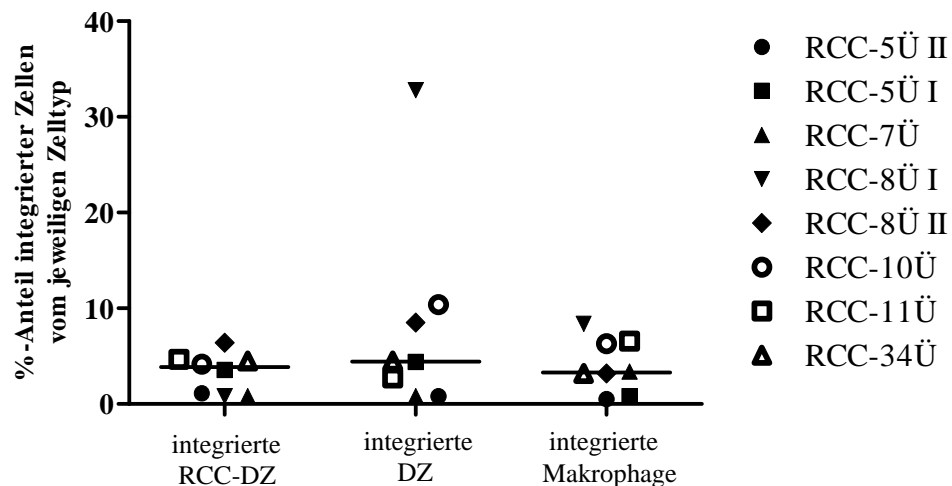
Neben den drei myeloischen Zelltypen CD209<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> (RCC-DZ), CD209<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup> (DZ) und CD209<sup>-</sup>CD14<sup>+</sup> (Makrophage) wurde eine vierte Zellpopulation identifiziert, die Podoplanin positiv und zugleich für die myeloischen Oberflächenrezeptoren CD209 und/oder CD14 positiv war. Zudem war sie stets integraler Bestandteil der Lymphgefäßwand im RCC-Gewebe. Die lymphatischen Endothelzellen besitzen typischerweise einen Eichenblatt-ähnlich geformten Zellkörper und liegen perlschnurartig aufgereiht hintereinander. Die Zellgrenzen können überlappen, wodurch Lücken auftreten, durch die Flüssigkeit und hochmolekulare Stoffe, wie abgelöste Tumorzellen, in das Lymphkapillarlumen gelangen können. Die integrierte myeloische podoplanin<sup>+</sup> Subpopulation zeigte stets dieselbe Form wie die lymphatischen Endothelzellen.

Abbildung 5.7.3.1 (A-C) zeigt jeweils exemplarisch den integrierten Zelltyp. Die integrierte Subpopulation wurde sowohl bei den RCC-DZ, den DZ und den Makrophagen gefunden. Die Quantifizierung ergab, dass der prozentuale Anteil bei allen drei myeloischen Zelltypen etwa gleich war (Abbildung 5.7.3.2), bei den RCC-DZ mit Medianwert 3,9% (0,8-10,4%; n=8) etwas häufiger als bei den DZ (Median: 4,5%, 0,8-6,4%; n=8) und Makrophagen (Median: 3,3%, 0,5-8,4%; n=8).



### Abbildung 5.7.3.1 Die integrierten podoplanin<sup>+</sup> Subpopulationen.

Histologische Kryogewebeschnitte wurden mit 3-Farben-Immunfluoreszenz gegen CD209 (A488; grün), CD14 (A568; rot) und Podoplanin (Cy5; caynblau) gefärbt und mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. Gezeigt sind in der oberen Reihe Beispiele von myeloischen Zellen, die in das Lymphgefäß entlang der Endothelzellen integriert sind, sowie die Lymphgefäße alleine in der unteren Reihe. **A)** Das Lymphgefäß zeigt ein Beispiel, in dem eine RCC-DZ (CD209<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>) Bestandteil des Lymphgefäßes zu sein scheint. **B)** Das Lymphgefäß zeigt eine DZ (CD209<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>) als Bestandteil des Lymphgefäßendothels. **C)** Das Lymphgefäß zeigt einen Makrophagen (CD209<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>) als Bestandteil des Lymphgefäßendothels.



### Abbildung 5.7.3.2 Prozentualer Anteil der integrierten Subpopulationen.

8 histologische Kryogewebeschnitte (RCC-5Ü I, RCC-5Ü II, RCC-7Ü, RCC-8Ü I, RCC-8Ü II, RCC-10Ü, RCC-11Ü, RCC-34Ü) von 6 RCC-Tumoren (RCC-5, RCC-7, RCC-8, RCC-10, RCC-11, RCC-34) wurden mit 3-Farben-Immunfluoreszenz gegen CD209, CD14 und Podoplanin gefärbt und mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. Integriert wurde definiert als podoplanin<sup>+</sup> und im Lymphendothel integriert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der integrierten RCC-DZ, DZ und Makrophagen vom jeweiligen Zelltyp. Der horizontale Balken ist der Median der Gruppe. Für die statistischen Analysen wurde der Kruskal-Wallis-Test in Kombination mit dem Dunn-Mehrfach-Parameter-Vergleichstest angewandt.

Tabelle 8 zeigt die Mittelwerte der absoluten Zellzahlen aus 5 bis 10 Gesichtsfeldern pro analysierter Transitzone eines RCC-Gewebeschnittes.

**Tabelle 8 Absolute Zellzahlen der myeloischen Subtypen in den verschiedenen Kompartimenten der Transitzone des RCCs.**

RCC-Ü <sup>1</sup>	Kompartiment <sup>2</sup>	CD209 <sup>+</sup> CD14 <sup>+</sup> (RCC-DZ)	CD209 <sup>+</sup> CD14 <sup>-</sup> (DZ)	CD209 <sup>-</sup> CD14 <sup>+</sup> (Makrophage)	Gesamt <sup>3</sup>
RCC5-Ü I	intra	1 <sup>4</sup>	6	1	8
	integriert	4	3	2	9
	außen anliegend	9	7	7	23
	extra	79	43	86	208
RCC5-Ü II	intra	0	2	0	2
	integriert	9	11	2	22
	außen anliegend	19	5	4	28
	extra	91	123	104	318
RCC7-Ü	intra	0	3	2	5
	integriert	3	3	13	19
	außen anliegend	8	13	27	48
	extra	64	55	190	309
RCC8-Ü I	intra	0	6	2	8
	integriert	1	43	11	55
	außen anliegend	2	4	7	13
	extra	14	21	20	55
RCC8-Ü II	intra	1	2	1	4
	integriert	6	8	3	17
	außen anliegend	6	4	0	10
	extra	16	28	19	63
RCC10-Ü	intra	1	3	0	4
	integriert	8	20	12	40
	außen anliegend	5	2	7	14
	extra	32	32	70	134
RCC11-Ü	intra	1	2	2	5
	integriert	12	7	17	36
	außen anliegend	11	13	7	31
	extra	50	91	43	184
RCC34-Ü	intra	0	0	1	1
	integriert	14	14	10	38
	außen anliegend	13	18	13	44
	extra	62	84	81	227

<sup>1</sup> Es wurden 8 histologischen Präparate mit RCC-Transitzonen (Ü) (RCC-5Ü I, RCC-5Ü II, RCC-7Ü, RCC-8Ü I, RCC-8Ü II, RCC-10Ü, RCC-11Ü, RCC-34Ü) aus 6 RCC-Tumoren (RCC-5, RCC-7, RCC-8, RCC-10, RCC-11, RCC-34) bewertet.

<sup>2</sup> Das Kompartiment „intra“ bedeutet im Lumen des Lymphgefäßes liegend. „integriert“ beinhaltet Podoplanin-positivität und die Anordnung entlang der Lymphendothelzellen. „außen anliegend“ bedeutet außen am Lymphgefäßendothel anliegend. „extra“ bedeutet außerhalb des Lymphgefäßes im Tumorparenchym liegend.

<sup>3</sup> Gesamtzellzahl im jeweiligen Kompartiment.

<sup>4</sup> Die Zahlen sind die Mittelwerte der absoluten Zahlen des angegebenen myeloischen Subtyps (RCC-DZ, DZ, Makrophage) von 5 bis 10 Gesichtsfeldern im jeweiligen RCC-Präparat.

Im intralymphatischen Kompartiment dominieren in jedem Tumor die DZ. Der integrierte Zelltyp ist bei allen drei myeloischen Subpopulationen in etwa gleich häufig vertreten. Ebenso

zeigt weder bei den extralymphatischen noch außen anliegenden Zellen eine der myeloischen Populationen eine Präferenz. Auffällig war zudem, dass in der Transitzone des RCC8 generell weniger myeloische Zellen gefunden wurden als bei den restlichen RCC-Ü. RCC7-Ü besaß eine große Anzahl an Makrophagen.

## 6 Diskussion

Das Scheitern des Immunsystems im Schutz des Organismus vor Neoplasien und die ambivalente Rolle der Immunreaktion in der Karzinogenese stellen ein zentrales Problem der Tumormunologie dar. Die inadäquate Immunantwort ermöglicht zum einen dem Tumor der immunologischen Abwehr zu entkommen, zum anderen ist sie ein limitierender Faktor im erfolgreichen Einsatz von Therapien. Das Verständnis der komplexen Interaktion zwischen Tumor und Immunsystem ist somit von großer Bedeutung für die Tumorentstehung, das Therapieversagen sowie zukünftige Therapieansätze.

### 6.1 Die RCC-DZ

Die DZ als Bestandteil des angeborenen Immunsystems spielen eine Schlüsselrolle bei der Regulation von Immunität und peripherer Toleranz und machen sie somit zu wesentlichen Mitakteuren im adaptiven Immunsystem. Ihre Fähigkeiten nur auf Antigenaufnahme, Prozessierung und Präsentation zu beschränken wäre bei weitem unzureichend. Die DZ erkennt nicht nur Pathogene, gegen welche sie eine spezifische Immunreaktion einleiten kann, sondern produziert selbst Zytokine wie IL-12 oder Interferone und aktiviert beispielsweise NK-Zellen und T-Zellen. Zudem können DZ die Differenzierung von naiven zu regulatorischen T-Effektorzellen bewirken, welche Autoimmunität aber auch antitumorale Immunität verhindern können. Demzufolge sind DZ nicht nur selbst an einer Immunantwort beteiligt, sondern lenken und kontrollieren ebendiese (Mellman und Steinman 2001). Darüber hinaus sind DZ auch im nicht-inflammatorischen Normalzustand aktiv und nehmen permanent Autoantigene oder harmlose Umweltantigene auf, das erlaubt, Toleranz gegenüber sich selbst und „normalen“ Umweltbestandteilen aufrecht zu erhalten. Diesen vielfältigen auch gegensätzlichen Funktionen scheint ein Zelltyp allein nicht gerecht werden zu können, so dass es eine Art Arbeitsteilung innerhalb der DZ-Populationen gibt (siehe 1.2.1). Außerdem besitzen DZ im Vergleich zu anderen APZ die Fähigkeit zur Maturierung, wobei sie sich auf andere Fähigkeiten als solche, über die sie im immaturren Zustand verfügen, wie beispielsweise die Migration, spezialisieren kann.

Aufgrund ihrer vielfältigen Funktionen und Wirkorte stellen DZ ein optimales Ziel dar, um Einfluss auf das Immungeschehen zu nehmen, sei es um eine krankheitsbedingte inhibierte Immunantwort zu aktivieren oder eine überschießende Reaktion zu limitieren.



Die in dieser Arbeit untersuchte Subpopulation der DZ im Nierenzellkarzinom (RCC-DZ) fiel durch einen ungewöhnlichen Phänotyp auf, der neben dem klassischen interstitiellen DZ-Marker CD209/DC-SIGN auch die Makrophagenmarker CD14 und CD163 aufzeigte und im RCC die dominante DZ-Population repräsentierte (Figel, et al. 2011). Zudem wurde ein Zytokincocktail aus IL-6, CXCL-8 und VEGF als der für die Induktion des Phänotyps verantwortlicher Faktor identifiziert (publiziert in Figel, et al. 2011). Quantitative Polymerasekettenreaktion-Analysen zeigten, dass diese Faktoren in RCC-Gewebe höher exprimiert wurden als in normalem Nierenparenchym (Dissertation Hosse 2010). Aufgrund der Heterogenität und der sich immer differenzierter darstellenden Ontogenese der DZ ist eine eindeutige Identifizierung der verschiedenen Subpopulationen über spezifische Marker schwierig. Anhand von Mausmodellen und in-vitro Modellen wird versucht, die Abstammung der DZ-Subtypen, deren zellspezifische Charakteristika und Funktionen zu entschlüsseln. Generell unterscheidet man im humanen wie auch im murinen System klassische und plasmazytoide DZ, die mit den Monozyten eine gemeinsame Vorläuferzelle im Knochenmark haben sollen (Liu und Nussenzweig 2010). Zudem werden in der Peripherie vorkommenden DZ oder präDZ gesondert betrachtet, da sie sich in Form und Funktion von den gewebeständigen DZ unterscheiden (Ziegler-Heitbrock, et al. 2010). Im Gewebe ist die Mannigfaltigkeit der DZ-Subpopulationen mit spezifischen Funktionen und individuellen Phänotypen noch zusätzlich erhöht, da verschiedene gewebespezifische Milieus die myeloischen Zellen verändern. In der Literatur werden CD209<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> Zellen entweder als DZ oder Makrophage bezeichnet, oftmals ohne dass eine Doppelfärbung durchgeführt wurde (Krutzik, et al. 2005; Soilleux, et al. 2002; Kammerer, et al. 2003). Eine eindeutige Zelltypzuordnung anhand der Expression von Oberflächenrezeptoren ist demnach unzureichend und über eine eher funktionsbezogenen Klassifikation wird diskutiert. Bisher wurden migratorisch aktive und T-Zell-stimulierende Zellen den DZ zugeordnet. Doch zeigen aktuelle Erkenntnisse, dass auch Makrophagen zu Lymphknoten wandern und Langerhanszellen für die T-Zell-Aktivierung unbedeutend sind (Kissenpfennig, et al. 2005). Eine Kombination aus Zellursprung, anatomischer Lokalisation, Funktion und Phänotyp wird der Beschreibung von Makrophagen und DZ vermutlich am ehesten gerecht (Geissmann, et al. 2010).

Die hier genauer durchgeführte Betrachtung der RCC-DZ ergab ein Zellprofil, das dem einer gewebsständigen, Antigen-kreuzpräsentierenden, migratorisch aktiven CD103<sup>+</sup> DZ entsprechen könnte (Sung und Bolton 2010). Diese Untergruppe zeichnet sich durch gute Kreuzpräsentation von Antigen auf MHC-I-Molekülen zur CD8<sup>+</sup> T-Zellstimulation aus,

wodurch sowohl zelluläre Immunität als auch periphere Toleranz folgen kann, je nach dem ob ein virales oder zelleigenes Peptid in inflammatorischem oder antiinflammatorischem Kontext präsentiert wird (Bedoui, et al. 2009). Die Fähigkeit zur Antigen-Kreuzpräsentation, sowie die CD103 Expression konnten bei RCC-DZ nachgewiesen werden. Allerdings ist anzumerken, dass die hier durchgeführte Untersuchung mit in-vitro generierten RCC-DZ durchgeführt wurde und die Markerexpression und Antigen-Kreuzpräsentation in-situ noch zu bestätigen sind. Die RCC-DZ wurde ausschließlich im Gewebe und nicht in der Peripherie von Patienten gefunden und entspricht damit den in der Literatur beschriebenen CD103<sup>+</sup> DZ, welche ebenfalls bevorzugt in epithelialen Geweben gefunden wurden (Sung und Bolton 2010; Manicone, et al. 2009). Im Gegensatz zu der in der Literatur beschriebenen CD103<sup>+</sup> DZ, migrierten die in-vitro generierten RCC-DZ jedoch nicht auf ein Chemokinsignal. Ein Hinweis, dass auch die in-situ befindlichen RCC-DZ migratorisch schwach sein könnten, erbrachte die Analyse der myeloischen Zellsubtypen in Relation zum Lymphgefäßsystem des Tumors. Dabei zeigte sich, dass ein höherer Prozentsatz von CD209<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup> klassischen DZ in den lymphatischen Gefäßen gefunden wurde als von den CD209<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> RCC-DZ oder den CD209<sup>-</sup>CD14<sup>+</sup> Makrophagen, während außerhalb der Lymphgefäße keine Präferenz in der Häufigkeit sichtbar war. Die intralymphatische Lokalisation war zwar bei allen untersuchten myeloischen Zelltypen gering, jedoch bei den klassischen DZ am stärksten ausgeprägt und bei RCC-DZ und Makrophagen signifikant geringer. Das Migrationsdefizit könnte auf eine verminderte Chemokinrezeptor-Expression oder eine veränderte Antwort auf ein Chemokinsignal zurückzuführen sein. Einen Hinweis für eine veränderte Chemokinrezeptor-Expression ergaben die phänotypischen Analysen (siehe 5.1.4), welche zeigten, dass die RCC-DZ bereits vor der Stimulation weniger CCR1, CCR5 dafür mehr CCR7 exprimierten als die DZ und dass anders als bei den DZ keine Regulation bei Maturierungsstimulus stattfand. Die migratorische Defizienz könnte mitunter durch das Tumormilieu ausgelöst sein. So ist beschrieben, dass der von Tumoren sezernierte Faktor CXCL-8 für die Retention von DZ im Tumor verantwortlich ist, indem er durch Abregulation von CCR7 auf der Zelloberfläche eine Emigration aus dem Tumor und somit eine antitumorale Immunantwort verhindert (Feijoo, et al. 2005). Auch für die von humanen Tumoren sezernierten Liganden des Leber-X-Rezeptors- $\alpha$  (LXR- $\alpha$ ), wie oxidierte Cholesterole, ist eine Inhibierung der CCR7-Expression bei DZ beschrieben, das zum Entkommen des Tumors vom Immunsystem beiträgt (Villablanca, et al. 2010). LXR-Liganden können zudem Modulatoren der DZ-Maturierung sein, indem sie die Faszinexpression inhibieren (Geyeregger, et al. 2007). Intrazelluläres Faszin ist ein für Zellumbauprozesse essentielles Protein, das während der Reifung in DZ vermehrt exprimiert

wird. Eine mangelnde Faszinexpression in maturen RCC-DZ konnte in dieser Arbeit gezeigt werden und gibt somit einen Hinweis auf eine Maturierungsschwäche, sowie könnte eine mögliche Erklärung für die Migrationsdefizienz der RCC-DZ sein. Für IL-6, welcher hier als Mitinduktor des RCC-DZ Phänotyps identifiziert wurde, ist gleichermaßen eine inhibierende Wirkung auf die DZ-Maturierung beschrieben, indem die Expression der kostimulatorischen Rezeptoren verhindert wird (Gabilovich 2004). Obgleich IL-6 für die Induktion des RCC-DZ Phänotyps mitverantwortlich ist, zeigten die RCC-DZ aber weder eine mangelnde Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86, noch niedrige MHC-Klasse-I, MHC-Klasse-II, und CD83 Rezeptordichte. Trotz guter Expression der kostimulatorischen Moleküle, MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II waren die RCC-DZ schlechte Stimulatoren von T-Lymphozyten (Figel, et al. 2011). Ob die fehlende T-Zellaktivierung möglicherweise auf inhibitorische Signale über Oberflächenrezeptoren auf den RCC-DZ, wie ILT4 oder CD48, zurückzuführen sein könnte, bleibt noch zu klären. Allerdings ist eine inhibitorische Aktivität der RCC-DZ unwahrscheinlich, da bei Zugabe von RCC-DZ zur Kokultur von DZ und T-Zellen die stimulatorische Aktivität der DZ nicht verändert wurde (nicht publiziert).

## **6.2 Die Bedeutung der RCC-DZ für die antitumorale Immunantwort und Toleranz**

Damit eine Antitumorantwort oder auch Toleranz entstehen kann, muss Antigen über APZ im Lymphknoten an T-Zellen präsentiert werden. Voraussetzung dazu ist die Antigenaufnahme, Prozessierung und Antigenpräsentation über MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II Moleküle, sowie die Migration der APZ vom Gewebe in den Lymphknoten. Der Phänotyp und die Funktionsanalysen der in-vitro generierten RCC-DZ mit hoher kostimulatorischer Rezeptordichte (CD80, CD86), MHC-Klasse-I, MHC-Klasse-II und CD83 Expression, sowie guter Antigen-Kreuzpräsentationseigenschaft lassen darauf schließen, dass die ersten Bedingungen erfüllt sein könnten. Jedoch wurde in-vitro ein Migrationsdefizit, mitunter auf CCL19, nachgewiesen. In-vivo ist CCL19 der Lockstoff ins Lymphgefäßsystem, welches die Migrationsbahnen der APZ zum Lymphknoten sind. Das lymphatische System ist ein sehr dynamisches Leitungssystem, das die Körperflüssigkeitshomöostase, den Transport von Antigenen und Lipiden und den Immunzelltransfer reguliert (Tammela und Alitalo 2010). Bei einer Entzündung oder Tumorerkrankung steigt die Permeabilität der Gefäße, der transmurale Fluss nimmt zu und resultiert in einem gesteigerten interstitiellen Druck. Dies in Kombination führt zu einem vermehrten Flüssigkeitsfluss im Lymphgefäßsystem in Richtung drainierenden

Lymphknoten. Der gesteigerte Fluss aktiviert die lymphatischen Endothelzellen, welche dann vermehrt die Chemokine CCL19 und CCL21 sezernieren (Drayton, et al. 2006). Das Lymphendothel exprimiert zudem Adhäsionsmoleküle für die Immunzelltransmigration (Miteva, et al. 2010) und, ebenso wie die Stromazellen des Lymphknotens, MHC-I Moleküle. Die Präsentation von Autoantigenen über MHC-Klasse-I dient der Deletion autoreaktiver zytotoxischer T-Zellen ( $CD8^+$ ) und leistet einen Beitrag zur Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz (Lund und Swartz 2010; Lee, et al. 2007; Collier, et al. 2008). Im RCC befinden sich Lymphgefäße nur in der Transitzone (Ishikawa, et al. 2006; Voss, et al. 2009). Durch die in-situ Analyse der Verteilung der RCC-DZ, DZ und Makrophagen in Relation zu den Lymphgefäßen wurde gezeigt, ob und welche myeloischen Zellen sich im Transit zum Lymphknoten befinden. Hierzu wurde zwischen den Kompartimenten extralymphatisch und intralymphatisch unterschieden, wobei die intralymphatische APZ die im Transit befindliche sein dürfte. Es zeigte sich, dass generell bei allen drei APZ-Typen ( $CD209^+CD14^+$  RCC-DZ,  $CD209^+CD14^-$  DZ,  $CD209^-CD14^+$  Makrophage) der prozentuale Anteil an Zellen mit intralymphatischer Lokalisation gering war (RCC-DZ 1,2%, DZ 6,5%, Makrophagen 2,4%). Der prozentuale intralymphatische Anteil war bei den DZ jedoch am größten und bei den RCC-DZ am geringsten, während extralymphatisch in etwa gleiche Prozentsätze gefunden wurden. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass sich RCC-DZ weniger im Transit befinden als DZ. Dies könnte auf einen migratorischen Defekt oder einer mangelnden Antwort auf Chemokinsignale beruhen. Aufgrund ihres migratorischen Defizits ist anzunehmen, dass sie sich nicht an der Induktion einer Immunantwort beteiligen, die sich im Lymphknoten ereignet, noch Toleranz gegenüber Tumorantigenen induzieren.

Weitere in-vitro Experimente (Dissertation Prinz 2010) und Ergebnisse in-situ (Figel, et al. 2011) gaben Hinweise darauf, dass RCC-DZ auch die Effektorseite der Immunantwort nicht wesentlich negativ beeinflussen. So wurden keine Hinweise gefunden, dass RCC-DZ T-Zellapoptose auslösen oder die Erkennung von Tumorzellen durch zytotoxische T-Zellen stören. Diese Befunde passen zur „Immunologie“ des Nierenzellkarzinoms, da RCC-Patienten im Vergleich zu Patienten mit anderen soliden Tumoren, wie beispielsweise dem Magenkarzinom, relativ gut auf Immuntherapien ansprechen und daher ausgeprägte antitumorale Toleranzinduktion oder T-Zellapoptosen eher unwahrscheinlich sind.

### 6.3 Bedeutung der RCC-DZ in der Pathogenese des RCC

Das migratorische Defizit und die schlechte Allostimulation von naiven T-Zellen sind Eigenschaften, die eine produktive Beteiligung von RCC-DZ an der Induktion von Immungeschehen unwahrscheinlich machen. Zudem gibt es Hinweise, dass sie Effektor-T-Zellen lokal im Tumor nicht negativ beeinflusst werden (Figel, et al. 2011). Unter dem Einfluss des RCC-Tumormilieus, mit IL-6, CXCL-8, VEGF als zentrale Faktoren, erfolgt offensichtlich eine Konditionierung der RCC-DZ, die in einer Art Paralyse resultiert. RCC-DZ scheinen weder in der Lage zu sein Effektorzellen zu inhibieren, was sich in fehlender Apoptoseinduktion oder CD3 $\epsilon$ /CD3 $\zeta$  Abregulation oder Induktion regulatorischer FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen zeigte (Figel, et al. 2011), noch scheinen sie sich produktiv an einer antitumoralen Immunantwort zu beteiligen.

Es wurde aber festgestellt, dass sie nicht inaktiv sind, sondern die Kommunikation mit T-Zellen benutzen, um das Milieu mit TNF- $\alpha$  anzureichern und Chemokine wie CXCL10 und CCL5 zu reduzieren (Figel, et al. 2011). TNF- $\alpha$  spielt sowohl in der Tumorpromotion als auch in der Angiogenese eine zentrale Rolle und kann die Tumorzellproliferation fördern (Chuang, et al. 2008). Die Chemokine CXCL10 und CCL5 sind für die Rekrutierung zytotoxischer Effektorzellen verantwortlich und hohe Spiegel werden mit einem Ansprechen auf antitumorale Immuntherapien assoziiert (Conforti, et al. 2010). Eine Korrelation zwischen Tumorstadium und Anzahl an CD209<sup>+</sup> Zellen im RCC-Gewebe zeigte, dass Tumoren mit hoher Anzahl an CD209<sup>+</sup> DZ fast immer ein fortgeschrittenes Tumorstadium mit schlechter Prognose hatten (Figel, et al. 2011). Weiterhin wurde gezeigt, dass Tumoren mit einem hohen Gehalt an CD209<sup>+</sup> Zellen proportional weniger NK und CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Gewebe hatten als Tumoren mit wenig CD209<sup>+</sup> Zellen. Ein Grund für das verschobene Verhältnis könnte die in-vitro beobachtete Reduktion der Chemokine CXCL10 und CCL5 sein, die eine Rekrutierung von NK und CD8<sup>+</sup> T-Zellen verringert. Diese Beobachtungen legen nahe, dass RCC-DZ indirekt einen Beitrag zur Tumorpromotion leisten, indem sie weniger Effektorzellen ins Gewebe rekrutieren und über beispielsweise TNF, das Tumorstadium fördern.

Bei den in-situ Untersuchungen fiel neben den RCC-DZ, DZ und Makrophagen ein APZ-Zelltyp auf, der neben den myeloischen Markern auch den Marker des Lymphgefäßendothels Podoplanin exprimiert. Diese „myeloischen“ podoplanin<sup>+</sup> Zellen waren in gleichem Ausmaß unter den RCC-DZ (CD209<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>podoplanin<sup>+</sup>), DZ (CD209<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>podoplanin<sup>+</sup>) und Makrophagen (CD209<sup>-</sup>CD14<sup>+</sup>podoplanin<sup>+</sup>) zu finden. Sie befanden sich in Reihe mit dem Lymphgefäßendothelzellen (CD209<sup>-</sup>CD14<sup>-</sup>podoplanin<sup>+</sup>) und ergaben das Bild, an der Bildung des Endothels mitbeteiligt zu sein. In der Literatur ist eine Beteiligung von Makrophagen an

der Bildung von Lymphgefäßen beschrieben. Dies wird als Transdifferenzierung bezeichnet (Maruyama, et al. 2005). Die Beobachtung hier gibt Hinweise darauf, dass nicht nur Makrophagen transdifferenzieren, sondern auch DZ und RCC-DZ diese Eigenschaft haben dürfte. Es bleibt zu klären, ob es sich um eine transiente Entwicklungsstufe oder einen enddifferenzierten Zustand handelt. Die intratumoralen Lymphgefäße fördern sowohl das Tumorwachstum als auch die lymphatische Metastasierung (Cao 2005). Zudem produzieren die Endothelzellen Metalloproteasen und Urokinase-Plasminogen-Aktivatoren, die das Eindringen des Tumors in das umgebende Gewebe erleichtern (Petrova, et al. 2002). Da RCC-DZ, DZ und Makrophagen gleichermaßen als ins Lymphgefäßendothel integrierte podoplanin<sup>+</sup> Zellen gefunden wurden (Median RCC-DZ 3,9%, DZ 4,5%, Makrophage 3,3%), scheinen die RCC-DZ sich nicht ausschlaggebend an der tumoralen Lymphangiogenese zu beteiligen und die lymphatische Metastasierung zu fördern. Eine im Vergleich zu DZ vermehrte Produktion von Metalloproteasen der RCC-DZ spricht jedoch für eine das Tumorwachstum fördernde Eigenschaft (Diplomarbeit Brech 2009).

#### **6.4 Die RCC-DZ im Therapiekontext**

Auch wenn sich RCC-DZ im unbehandelten Tumorgeschehen nicht an einer Immunstimulation beteiligen, haben sie Eigenschaften, die wichtige Voraussetzungen für eine Immunstimulation sind. Dazu gehören eine gute Antigen-Kreuzpräsentationsfähigkeit, eine hohe kostimulatorische Rezeptordichte, sowie gute Expression von MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II. Diese Merkmale zeigten auch die RCC-DZ in-situ. Eigenschaften, die eine Beteiligung der RCC-DZ an der Immunstimulation unwahrscheinlich machen, sind die schlechte Allostimulation von naiven T-Lymphozyten und das Migrationsdefizit auf ein Chemokinsignal. Würde man die Ursache für die schlechte Allostimulation und Migration ergründen, könnten Gegenmaßnahmen entwickelt werden. Es wäre dann anzunehmen, dass rekonvertierte RCC-DZ produktiv an der Induktion antitumorale Immunantworten mitwirken könnten. Neuartige Immuntherapieansätze, welche die RCC-DZ zur immunkompetenten DZ rekonvertieren würden, könnten beispielsweise an der Neutralisierung des lokalen Tumormilieus mit anti-IL-6, anti-CXCL-8 oder anti-VEGF Antikörper ansetzen, die hier als zentrale Konditionierungsfaktoren der RCC-DZ identifiziert wurden. Einen weiteren Ansatzpunkt könnte der CD40-CD40L-Signalweg darstellen, der normalerweise an der Induktion der T-Zell-vermittelte Immunität mitwirkt. Es wurde gezeigt, dass CD40-Agonisten in Tumorpatienten eine effektive Immunantwort gegen tumorassoziierte Tumorantigene

triggern können (Khalil und Vonderheide 2007). Zudem wurde erst kürzlich in einem Mausmodell gezeigt, dass im duktalem Pankreasadenokarzinom über die Aktivierung von CD40 auf Makrophagen eine tumorinduzierte Immunsuppression überwunden werden kann (Beatty, et al. 2011). Die RCC-DZ zeigen in-vitro und in-situ eine gute CD40 Expression, so dass eine Aktivierung der RCC-DZ über CD40 denkbar wäre.

Derzeit werden beim RCC zielgerichtete Therapien mit Rezeptortyrosinkinaseinhibitoren mit guten Erfolgen eingesetzt. Allerdings kommt es oftmals zu Medikamentenresistenzen. Daher werden Kombinationen mit unterschiedlichen Agentien empfohlen.

Die hier durch die detaillierte Analyse der RCC-DZ gewonnenen Daten, weisen auf neue Aspekte und Einsatzmöglichkeiten von Immunmodulation hin. Eine zukünftige Herausforderung ist es, die in-vitro Daten im RCC für die residente dendritische Zellpopulation zu verifizieren und ex-vivo Kultursysteme zu etablieren, die ein Prüfen von Immunmodulationen ermöglichen.

## 7 Zusammenfassung

Das Nierenzellkarzinom (RCC) wird trotz einer starken Infiltration von Immuneffektorzellen in seinem Wachstum nicht beherrscht. Dies lässt vermuten, dass das Tumormilieu die potentiell antitumorale Funktion der Immunzellen nicht zulässt. Ein Ansprechen auf Immuntherapien bei Patienten mit RCC deutet wiederum auf eine reversible Inhibition der Immunzellen hin. Die Aufklärung und Rekonversion dieser funktionsinhibierenden Mechanismen zielen daraufhin ab, eine kompetente Immunantwort wiederherzustellen und Tumorpromotion zu verhindern.

Die phänotypische und funktionelle Charakterisierung der aus Monozyten des Blutes durch Inkubation mit Zellkulturüberstand verschiedener Nierenzellkarzinomlinien differenzierten RCC-DZ zeigte, dass RCC-DZ im Vergleich zu konventionellen, mit GM-CSF und IL-4 generierten DZ, Eigenschaften besitzen, die für die insuffiziente Immunantwort bei Patienten mit RCC mitverantwortlich sein könnten.

Phänotypisch zeigten die RCC-DZ bereits im immaturren Zustand neben der Koexpression des DZ-Markers CD209/DC-SIGN und der Makrophagenmarker CD14 und CD163, eine starke Expression von kostimulatorischen Oberflächenrezeptoren (CD80, CD86, CD40), von MHC-Molekülen, von regulatorischen und zielsteuernden Markern wie CD48, CD103 oder ILT4, sowie von den Chemokinrezeptoren CCR1 und CCR5. Auf einen Maturierungsstimulus hin wurde das Immunrezeptorprofil im Vergleich zu den konventionellen DZ nur wenig verändert. Als die für den Phänotyp verantwortlichen Induktionsfaktoren konnten IL-6, CXCL-8 und VEGF identifiziert werden.

Die funktionelle Analyse ergab eine etwas höhere Phagozytoseaktivität der unreifen RCC-DZ im Vergleich zu konventionellen unreifen DZ und GM-CSF-Makrophagen. Zudem zeigten sowohl immature als auch mature RCC-DZ eine mit DZ vergleichbare Antigen-Kreuzpräsentationsfähigkeit.

Im Gegensatz zu den konventionellen DZ zeigten RCC-DZ in-vitro keine Migration auf das Chemokinsignal CCL19. Ebenso wurde das für Zellumbauprozesse essentielle Faszin von den RCC-DZ bei Maturierungsstimulation nicht hochreguliert.

Möglicherweise sind auch die im RCC-Gewebe ansässigen RCC-DZ wenig migratorisch aktiv. So zeigten die Untersuchungen der in-situ Lokalisation der RCC-DZ in Relation zum Lymphgefäßsystem in RCC-Geweben, dass RCC-DZ weniger häufig im Lymphgefäß vorhanden waren als DZ.



## 8 Literaturverzeichnis

- Al-Alwan MM, Rowden G, Lee TD and West KA. "Fascin is involved in the antigen presentation activity of mature dendritic cells". J Immunol **166**: 338-345 (2001).
- Avigan DE, et al. "Phase I/II study of vaccination with electrofused allogeneic dendritic cells/autologous tumor-derived cells in patients with stage IV renal cell carcinoma". J Immunother **30**: 749-761 (2007).
- Bachmann MF, Kopf M and Marsland BJ. "Chemokines: more than just road signs". Nat Rev Immunol **6**: 159-164 (2006).
- Banchereau J, et al. "Immunobiology of dendritic cells". Annu Rev Immunol **18**: 767-811 (2000).
- Banchereau J and Palucka AK. "Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer". Nat Rev Immunol **5**: 296-306 (2005).
- Beatty PL, Cascio S and Lutz E. "Tumor Immunology: Basic and Clinical Advances". Cancer Res (2011).
- Bedoui S, et al. "Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells". Nat Immunol **10**: 488-495 (2009).
- Bendz H, et al. "Human heat shock protein 70 enhances tumor antigen presentation through complex formation and intracellular antigen delivery without innate immune signaling". J Biol Chem **282**: 31688-31702 (2007).
- Bjorge T, Tretli S and Engeland A. "Relation of height and body mass index to renal cell carcinoma in two million Norwegian men and women". Am J Epidemiol **160**: 1168-1176 (2004).
- Borghans JA, Noest AJ and De Boer RJ. "How specific should immunological memory be?" J Immunol **163**: 569-575 (1999).
- Boyden S. "The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes". J Exp Med **115**: 453-466 (1962).
- Bui JD and Schreiber RD. "Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes?" Curr Opin Immunol **19**: 203-208 (2007).
- Burgdorf S, Scholz C, Kautz A, Tampe R and Kurts C. "Spatial and mechanistic separation of cross-presentation and endogenous antigen presentation". Nat Immunol **9**: 558-566 (2008).
- Burnet M. "Cancer; a biological approach. I. The processes of control". Br Med J **1**: 779-786 (1957).
- Cao Y. "Opinion: emerging mechanisms of tumour lymphangiogenesis and lymphatic metastasis". Nat Rev Cancer **5**: 735-743 (2005).

- Carrasco J, et al. "Vaccination of a melanoma patient with mature dendritic cells pulsed with MAGE-3 peptides triggers the activity of nonvaccine anti-tumor cells". J Immunol **180**: 3585-3593 (2008).
- Chorro L, et al. "Langerhans cell (LC) proliferation mediates neonatal development, homeostasis, and inflammation-associated expansion of the epidermal LC network". J Exp Med **206**: 3089-3100 (2009).
- Chuang MJ, et al. "Tumor-derived tumor necrosis factor-alpha promotes progression and epithelial-mesenchymal transition in renal cell carcinoma cells". Cancer Sci **99**: 905-913 (2008).
- Collier AY, Lee JW and Turley SJ. "Self-encounters of the third kind: lymph node stroma promotes tolerance to peripheral tissue antigens". Mucosal Immunol **1**: 248-251 (2008).
- Collins MK, Tay CS and Erlebacher A. "Dendritic cell entrapment within the pregnant uterus inhibits immune surveillance of the maternal/fetal interface in mice". J Clin Invest **119**: 2062-2073 (2009).
- Condeelis J and Pollard JW. "Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis". Cell **124**: 263-266 (2006).
- Conforti R, et al. "Opposing effects of toll-like receptor (TLR3) signaling in tumors can be therapeutically uncoupled to optimize the anticancer efficacy of TLR3 ligands". Cancer Res **70**: 490-500 (2010).
- de Martel C and Franceschi S. "Infections and cancer: established associations and new hypotheses". Crit Rev Oncol Hematol **70**: 183-194 (2009).
- Dees EC, et al. "Dendritic cells can be rapidly expanded ex vivo and safely administered in patients with metastatic breast cancer". Cancer Immunol Immunother **53**: 777-785 (2004).
- del Rio ML, Bernhardt G, Rodriguez-Barbosa JI and Forster R. "Development and functional specialization of CD103+ dendritic cells". Immunol Rev **234**: 268-281 (2010).
- DeNardo DG, et al. "CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages". Cancer Cell **16**: 91-102 (2009).
- Di Pucchio T, et al. "Direct proteasome-independent cross-presentation of viral antigen by plasmacytoid dendritic cells on major histocompatibility complex class I". Nat Immunol **9**: 551-557 (2008).
- Doehn C, Bohmer T, Kausch I, Sommerauer M and Jocham D. "Prostate cancer vaccines: current status and future potential". BioDrugs **22**: 71-84 (2008).
- Drayton DL, Liao S, Mounzer RH and Ruddle NH. "Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis". Nat Immunol **7**: 344-353 (2006).
- Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ and Schreiber RD. "Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape". Nat Immunol **3**: 991-998 (2002).

- Dunn GP, Old LJ and Schreiber RD. "The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting". Immunity **21**: 137-148 (2004).
- Engell-Noerregaard L, Hansen TH, Andersen MH, Thor Straten P and Svane IM. "Review of clinical studies on dendritic cell-based vaccination of patients with malignant melanoma: assessment of correlation between clinical response and vaccine parameters". Cancer Immunol Immunother **58**: 1-14 (2009).
- Engels B, et al. "Redirecting human T lymphocytes toward renal cell carcinoma specificity by retroviral transfer of T cell receptor genes". Hum Gene Ther **16**: 799-810 (2005).
- Escudier B and Kataja V. "Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up". Ann Oncol **21 Suppl 5**: v137-139 (2010).
- Feijoo E, et al. "Dendritic cells delivered inside human carcinomas are sequestered by interleukin-8". Int J Cancer **116**: 275-281 (2005).
- Figel AM, et al. "Human renal cell carcinoma induces a dendritic cell subset that uses T-cell crosstalk for tumor-permissive milieu alterations". Am J Pathol **179**: 436-451 (2011).
- Gabrilovich D. "Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects". Nat Rev Immunol **4**: 941-952 (2004).
- Galon J, et al. "Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome". Science **313**: 1960-1964 (2006).
- Garcia-Sanchez JE, Garcia E and Merino ML. "[100 years of Dr. Ehrlich's magic bullet (1909-2009)]". Enferm Infecc Microbiol Clin **28**: 521-533 (2010).
- Geissmann F, Gordon S, Hume DA, Mowat AM and Randolph GJ. "Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity". Nat Rev Immunol **10**: 453-460 (2010).
- Geyeregger R, et al. "Liver X receptors regulate dendritic cell phenotype and function through blocked induction of the actin-bundling protein fascin". Blood **109**: 4288-4295 (2007).
- Gore ME and Larkin JM. "Challenges and opportunities for converting renal cell carcinoma into a chronic disease with targeted therapies". Br J Cancer **104**: 399-406 (2011).
- Gottfried E, Kreutz M and Mackensen A. "Tumor-induced modulation of dendritic cell function". Cytokine Growth Factor Rev **19**: 65-77 (2008).
- Grivennikov SI, Greten FR and Karin M. "Immunity, inflammation, and cancer". Cell **140**: 883-899 (2010).
- Hsu FJ, et al. "Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells". Nat Med **2**: 52-58 (1996).
- Hunt JD, van der Hel OL, McMillan GP, Boffetta P and Brennan P. "Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies". Int J Cancer **114**: 101-108 (2005).

- Ishikawa Y, et al. "The human renal lymphatics under normal and pathological conditions". Histopathology **49**: 265-273 (2006).
- Jantzer P and Schendel DJ. "Human renal cell carcinoma antigen-specific CTLs: antigen-driven selection and long-term persistence in vivo". Cancer Res **58**: 3078-3086 (1998).
- Jonuleit H, et al. "Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions". Eur J Immunol **27**: 3135-3142 (1997).
- Kammerer U, et al. "Unique appearance of proliferating antigen-presenting cells expressing DC-SIGN (CD209) in the decidua of early human pregnancy". Am J Pathol **162**: 887-896 (2003).
- Karumanchi SA, Merchan J and Sukhatme VP. "Renal cancer: molecular mechanisms and newer therapeutic options". Curr Opin Nephrol Hypertens **11**: 37-42 (2002).
- Khalil M and Vonderheide RH. "Anti-CD40 agonist antibodies: preclinical and clinical experience". Update Cancer Ther **2**: 61-65 (2007).
- Kissenpfennig A, et al. "Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells". Immunity **22**: 643-654 (2005).
- Kohidai L and Csaba G. "Chemotaxis and chemotactic selection induced with cytokines (IL-8, RANTES and TNF-alpha) in the unicellular *Tetrahymena pyriformis*". Cytokine **10**: 481-486 (1998).
- Krutzik SR, et al. "TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells". Nat Med **11**: 653-660 (2005).
- Laghi L, et al. "CD3+ cells at the invasive margin of deeply invading (pT3-T4) colorectal cancer and risk of post-surgical metastasis: a longitudinal study". Lancet Oncol **10**: 877-884 (2009).
- Langowski JL, Kastelein RA and Oft M. "Swords into plowshares: IL-23 repurposes tumor immune surveillance". Trends Immunol **28**: 207-212 (2007).
- Lee JW, et al. "Peripheral antigen display by lymph node stroma promotes T cell tolerance to intestinal self". Nat Immunol **8**: 181-190 (2007).
- Lee KM, et al. "2B4 acts as a non-major histocompatibility complex binding inhibitory receptor on mouse natural killer cells". J Exp Med **199**: 1245-1254 (2004).
- Leisegang M, et al. "T-cell receptor gene-modified T cells with shared renal cell carcinoma specificity for adoptive T-cell therapy". Clin Cancer Res **16**: 2333-2343 (2010).
- Lens M. "The role of vaccine therapy in the treatment of melanoma". Expert Opin Biol Ther **8**: 315-323 (2008).

- Lin WW and Karin M. "A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer". J Clin Invest **117**: 1175-1183 (2007).
- Liu K and Nussenzweig MC. "Origin and development of dendritic cells". Immunol Rev **234**: 45-54 (2010).
- Lund AW and Swartz MA. "Role of lymphatic vessels in tumor immunity: passive conduits or active participants?" J Mammary Gland Biol Neoplasia **15**: 341-352 (2010).
- Manicone AM, Huizar I and McGuire JK. "Matrilysin (Matrix Metalloproteinase-7) regulates anti-inflammatory and antifibrotic pulmonary dendritic cells that express CD103 (alpha(E)beta(7)-integrin)". Am J Pathol **175**: 2319-2331 (2009).
- Mantovani A, Allavena P, Sica A and Balkwill F. "Cancer-related inflammation". Nature **454**: 436-444 (2008).
- Maruyama K, et al. "Inflammation-induced lymphangiogenesis in the cornea arises from CD11b-positive macrophages". J Clin Invest **115**: 2363-2372 (2005).
- Matzinger P. "The danger model: a renewed sense of self". Science **296**: 301-305 (2002).
- McLaughlin JK, et al. "International renal-cell cancer study. VIII. Role of diuretics, other anti-hypertensive medications and hypertension". Int J Cancer **63**: 216-221 (1995).
- Medzhitov R and Janeway CA, Jr. "Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system". Science **296**: 298-300 (2002).
- Mellman I and Steinman RM. "Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines". Cell **106**: 255-258 (2001).
- Miteva DO, et al. "Transmural flow modulates cell and fluid transport functions of lymphatic endothelium". Circ Res **106**: 920-931 (2010).
- Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB and Lewis CE. "The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis". Nat Rev Cancer **8**: 618-631 (2008).
- Nakajima H and Colonna M. "2B4: an NK cell activating receptor with unique specificity and signal transduction mechanism". Hum Immunol **61**: 39-43 (2000).
- Nakano O, et al. "Proliferative activity of intratumoral CD8(+) T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity". Cancer Res **61**: 5132-5136 (2001).
- Nencioni A, et al. "The use of dendritic cells in cancer immunotherapy". Crit Rev Oncol Hematol **65**: 191-199 (2008).
- Nestle FO, et al. "Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells". Nat Med **4**: 328-332 (1998).

- O'Doherty U, et al. "Dendritic cells freshly isolated from human blood express CD4 and mature into typical immunostimulatory dendritic cells after culture in monocyte-conditioned medium". J Exp Med **178**: 1067-1076 (1993).
- Petrova TV, et al. "Lymphatic endothelial reprogramming of vascular endothelial cells by the Prox-1 homeobox transcription factor". EMBO J **21**: 4593-4599 (2002).
- Proudfoot AE, Power CA and Schwarz MK. "Anti-chemokine small molecule drugs: a promising future?" Expert Opin Investig Drugs **19**: 345-355 (2010).
- Reis e Sousa C. "Dendritic cells in a mature age". Nat Rev Immunol **6**: 476-483 (2006).
- Ridgway D. "The first 1000 dendritic cell vaccinees". Cancer Invest **21**: 873-886 (2003).
- Roake JA, et al. "Dendritic cell loss from nonlymphoid tissues after systemic administration of lipopolysaccharide, tumor necrosis factor, and interleukin 1". J Exp Med **181**: 2237-2247 (1995).
- Rosenberg SA, Spiess P and Lafreniere R. "A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes". Science **233**: 1318-1321 (1986).
- Sallusto F and Lanzavecchia A. "Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha". J Exp Med **179**: 1109-1118 (1994).
- Schleypen JS, et al. "Cytotoxic markers and frequency predict functional capacity of natural killer cells infiltrating renal cell carcinoma". Clin Cancer Res **12**: 718-725 (2006).
- Shortman K and Heath WR. "Immunity or tolerance? That is the question for dendritic cells". Nat Immunol **2**: 988-989 (2001).
- Shortman K and Liu YJ. "Mouse and human dendritic cell subtypes". Nat Rev Immunol **2**: 151-161 (2002).
- Shortman K and Naik SH. "Steady-state and inflammatory dendritic-cell development". Nat Rev Immunol **7**: 19-30 (2007).
- Smyth MJ, Cretney E, Kershaw MH and Hayakawa Y. "Cytokines in cancer immunity and immunotherapy". Immunol Rev **202**: 275-293 (2004).
- Soilleux EJ, et al. "Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations in situ and in vitro". J Leukoc Biol **71**: 445-457 (2002).
- Sosman JA. "Improving outcomes in patients with advanced renal cell carcinoma". Expert Rev Anticancer Ther **8**: 481-490 (2008).
- Sosman JA, Puzanov I and Atkins MB. "Opportunities and obstacles to combination targeted therapy in renal cell cancer". Clin Cancer Res **13**: 764s-769s (2007).

- Sozzani S, et al. "Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties". J Immunol **161**: 1083-1086 (1998).
- Steinman RM and Banchereau J. "Taking dendritic cells into medicine". Nature **449**: 419-426 (2007).
- Steinman RM and Nussenzweig MC. "Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance". Proc Natl Acad Sci U S A **99**: 351-358 (2002).
- Sung SS and Bolton WK. "T cells and dendritic cells in glomerular disease: the new glomerulotubular feedback loop". Kidney Int **77**: 393-399 (2010).
- Swann JB and Smyth MJ. "Immune surveillance of tumors". J Clin Invest **117**: 1137-1146 (2007).
- Swann JB, et al. "Demonstration of inflammation-induced cancer and cancer immunoeediting during primary tumorigenesis". Proc Natl Acad Sci U S A **105**: 652-656 (2008).
- Takahashi H, Ogata H, Nishigaki R, Broide DH and Karin M. "Tobacco smoke promotes lung tumorigenesis by triggering IKKbeta- and JNK1-dependent inflammation". Cancer Cell **17**: 89-97 (2010).
- Tammela T and Alitalo K. "Lymphangiogenesis: Molecular mechanisms and future promise". Cell **140**: 460-476 (2010).
- Tomita Y, Nishiyama T, Fujiwara M and Sato S. "Characterization of tumor-infiltrating mononuclear cells in renal cell cancer: quantitative analysis by immunoperoxidase staining". Urol Int **47**: 1-6 (1991).
- Trinchieri G. "Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity". Nat Rev Immunol **3**: 133-146 (2003).
- van Dijk BA, Schouten LJ, Kiemeny LA, Goldbohm RA and van den Brandt PA. "Relation of height, body mass, energy intake, and physical activity to risk of renal cell carcinoma: results from the Netherlands Cohort Study". Am J Epidemiol **160**: 1159-1167 (2004).
- Vicari AP, Caux C and Trinchieri G. "Tumour escape from immune surveillance through dendritic cell inactivation". Semin Cancer Biol **12**: 33-42 (2002).
- Villablanca EJ, et al. "Tumor-mediated liver X receptor-alpha activation inhibits CC chemokine receptor-7 expression on dendritic cells and dampens antitumor responses". Nat Med **16**: 98-105 (2010).
- Villadangos JA, Heath WR and Carbone FR. "Outside looking in: the inner workings of the cross-presentation pathway within dendritic cells". Trends Immunol **28**: 45-47 (2007).
- Villadangos JA and Schnorrer P. "Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo". Nat Rev Immunol **7**: 543-555 (2007).

- Voss M, et al. "The lymphatic system and its specific growth factor vascular endothelial growth factor C in kidney tissue and in renal cell carcinoma". BJU Int **104**: 94-99 (2009).
- Vremec D, Pooley J, Hochrein H, Wu L and Shortman K. "CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen". J Immunol **164**: 2978-2986 (2000).
- Wheeler CJ, et al. "Vaccination elicits correlated immune and clinical responses in glioblastoma multiforme patients". Cancer Res **68**: 5955-5964 (2008).
- Yoon J and Herts BR. "Staging renal cell carcinoma with helical CT: the revised 1997 AJCC and UICC TNM criteria". Crit Rev Comput Tomogr **44**: 229-249 (2003).
- Ziegler-Heitbrock L, et al. "Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood". Blood **116**: e74-80 (2010).
- Zinkernagel RM and Doherty PC. "Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis". Nature **251**: 547-548 (1974).
- Zlotnik A and Yoshie O. "Chemokines: a new classification system and their role in immunity". Immunity **12**: 121-127 (2000).
- Zobywalski A, et al. "Generation of clinical grade dendritic cells with capacity to produce biologically active IL-12p70". J Transl Med **5**: 18 (2007).



## 9 Abkürzungen

7-AAD	7-Amino-Actinomycin D
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
BDCA	Blut-DZ-Antigen ( <i>blood dendritic cell antigen</i> )
BSA	Bovines Serumalbumin
CCL	Chemokinrezeptor-Ligand (CC-Motiv)
CCR	Chemokinrezeptor (CC-Motiv)
CXCL	Chemokinrezeptor-Ligand (CXC-Motiv)
CD	Differenzierungscluster ( <i>cluster of differentiation</i> )
Cy5	Cyanin 5
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DC-SIGN	DZ-spezifisches ICAM-3-greifendes nicht-Integrin ( <i>DC-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin</i> )
DMSO	Dimethylsulfoxid
DZ	Dendritische Zelle
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> (Bakterium)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzymgekoppelter Immunoabsorptionstest
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Durchflusszytometrie ( <i>Fluorescence activated cell sorting</i> )
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fötale Kälberserum
FOXP3	<i>Forkhead box P3</i>
FSC	Vorwärtsstreuung ( <i>forward scatter</i> )
GF	Gesichtsfeld
GM-CSF	Granulozyten Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
HPSTZ	Hämatopoetische Stammzelle
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
HS	Humanserum
ICAM-3	Interzelluläres Adhensionsmolekül 3 ( <i>intercellular adhesion molecule 3</i> )
IFN- $\alpha$	Interferon-alpha
IFN- $\beta$	Interferon-beta
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma

Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ILT4	Ig-ähnliches Transkript 4 ( <i>Ig-like transcript 4</i> )
JC	Jonuleit Cocktail
LIR	Leukozyten Ig-ähnlicher Rezeptor ( <i>leukocyte Ig-like receptor</i> )
LPS	Lipopolysaccharid
LXR- $\alpha$	Leber-X-Rezeptor-alpha ( <i>liverX receptor alpha</i> )
MACS	Magnet-aktivierte Zellsortierung ( <i>magnet activated cell sorting</i> )
MART-1	Melanomantigen, das von T-Zellen erkannt wird ( <i>melanom antigen recognized by T cells-1</i> )
MFI	Mittlere / mediane Fluoreszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitäts-Komplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
Min.	Minute
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
OD	Optische Dichte
PAMP	Pathogen-assoziierte Molekularmuster ( <i>pathogen associated molecular patterns</i> )
PB	Pacific Blue
PBL	Lymphozyten des peripheren Blutes ( <i>peripheral blood lymphocytes</i> )
PBMZ	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes ( <i>peripheral blood mononuclear cells</i> )
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin-E2
PI	Propidiumiodid
präDZ	DZ Vorläuferzelle
PRR	Struktur-Erkennungs-Rezeptor ( <i>pattern-recognition receptor</i> )
RCC	Nierenzellkarzinom ( <i>renal cell carcinoma</i> )
RCC-DZ	in-vitro aus Monozyten durch Zugabe von RCC26-Zellkulturüberstand generierte dendritische Zelle
RCC-Ü	Transitzone des RCC-Gewebes
Rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RPMI 1640	<i>Roesewell Park Memorial Institute Medium 1640</i>
SAP	SLAM-assoziiertes Protein
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SSC	Seitwärtsstreuung ( <i>side scatter</i> )
STAT3	Signaltransduktor und Aktivator der Transkription 3 ( <i>signal transducer and activator of transcription 3</i> )
Std.	Stunde

TAM	Tumorassoziierte Makrophagen
TAP	Transporterprotein ( <i>transporter associated with antigen processing</i> )
TGF- $\beta$	Transformierender Wachstumsfaktor- $\beta$ ( <i>transforming growth factor-<math>\beta</math></i> )
TIL	Tumordinfiltrierende Lymphozyten
TLR	<i>Toll-like-receptor</i>
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
TRAIL	Tumornekrosefaktor verwandter Apoptose induzierender Ligand ( <i>tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand</i> )
TZR	T-Zell-Rezeptor
U	Einheit ( <i>unit</i> )
UV	Ultraviolett
VEGF	Gefäßendothelialer Wachstumsfaktor ( <i>vascular endothelial growth factor</i> )

## 10 Veröffentlichung

Figel AM, Brech D, Prinz PU, **Lettenmeyer UK**, Eckl J, Turqueti-Neves A, Mysliwietz J, Anz D, Rieth N, Muenchmeier N, Buchner A, Porubsky S, Siegert SI, Segerer S, Nelson PJ, Noessner E. "Human renal cell carcinoma induces a dendritic cell subset that uses T-cell crosstalk for tumor-permissive milieu alterations". Am J Pathol **179**: 436-451 (2011).

## 11 Danksagung

*Dankbarkeit ist das Gedächtnis des Herzens!*

*(Jean Baptiste Massillon)*

Auf diesem Wege möchte ich einer Vielzahl von Leuten danken, die mich in einer Zeit begleitet haben, an die ich immer gern zurückdenken werde.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Elfriede Nößner, die sowohl die Erstellung meiner Doktorarbeit als auch meiner Facharbeit ermöglichte. Sie stand jederzeit als Ansprechpartnerin zur Verfügung und ihre Faszination an wissenschaftlichen Details, sowie ihr umfassendes Fachwissen haben mich sehr beeindruckt.

Mein Dank richtet sich ebenso an Frau Prof. Dolores Schendel, die mir die Durchführung der Doktorarbeit am Institut für Molekulare Immunologie ermöglicht hat.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meiner Arbeitsgruppe bedanken. Dass ich die Zeit zusammen mit euch verleben durfte, war ein besonderes Geschenk.

Ainhoa danke ich für eine optimale Einarbeitung und Betreuung zu Beginn. Anna Brandl danke ich für ihre Unterstützung, wo immer ich auch Hilfe benötigte. Den Mädels (Adriana, Anna, Doro, Judith, Petra) danke ich für eine wunderschöne gemeinsame Zeit!

Herzlichen Dank auch an Stefanie Tippmer, die zusammen mit mir die Migrationsversuche maß und auswertete.

Meinen Lieben, denen diese Arbeit gewidmet ist, danke ich für ihre bedingungslose Unterstützung und Begleitung auf meinem Weg.