

Aus dem Institut für Medizinische Immunologie der Medizinischen Fakultät der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktorin: Prof. Dr. Barbara Seliger)

Durchflusszytometrische Charakterisierung von Immunzellen im venösen Blut von Patienten mit Nierenzellkarzinom

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

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

von Sabine Hase
geboren am 01.09.1982 in Erfurt
Betreuer: PD Dr. med. D. Riemann

Gutachter: 1. Univ.-Prof. Dr. med. P. Fornara
2. Prof. Dr. med. D. Reinhold (Magdeburg)
3. PD Dr. med. D. Riemann

Tag der Eröffnung: 17.07.2012
Tag der Verteidigung: 12.12.2012

Referat

Das Nierenzellkarzinom ist das dritthäufigste urologische Karzinom, an dem in Deutschland jährlich mehr als 14000 Menschen neu erkranken. Da das Nierenzellkarzinom kaum strahlen- und chemotherapeutisch behandelbar ist, stellt die Resektion des Tumors gegenwärtig den einzigen kurativen Behandlungsansatz dar. Tyrosinkinaseinhibitoren werden zur Behandlung des metastasierten Nierenzellkarzinom eingesetzt und führen zu einer Verbesserung der Lebenserwartung. Das Nierenzellkarzinom gehört zur Gruppe der immunogenen Tumore, weil *in vitro* eine Immunantwort gegen den Tumor induzierbar ist und Spontanremissionen in etwa 0,5% der Erkrankungsfälle auftreten können. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der durchflusszytometrischen Analyse der phänotypischen Eigenschaften von Leukozyten im venösen Blut von Nierenzellkarzinompatienten im Vergleich zu gesunden Freiwilligen. Zudem wurde nach immunologischen Markern gesucht, die die immunzellulären Unterschiede bezüglich Tumorstadium bzw. Progression des Nierenzellkarzinoms herausstellen. Ferner wurde die immunsuppressive Wirkung der chirurgischen Intervention in Bezug auf das gewählte Operationsverfahren (laparoskopisch vs. konventionell-offen) untersucht. Hierzu wurden bei 44 Nierenzellkarzinompatienten venöse Blutentnahmen präoperativ sowie am ersten, dritten und siebten postoperativen Tag durchgeführt und 20 Freiwillige als Kontrollpersonen rekrutiert. Unter der Verwendung fluoreszenzmarkierter monoklonaler Antikörper wurden die gewonnenen Proben durchflusszytometrisch analysiert. Die Messergebnisse bei Nierenzellkarzinompatienten zeigten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen einen Anstieg der Leukozyten- und Granulozytenanzahl auf. Des Weiteren wurde eine verminderte Anzahl an dendritischen Zellen und CD28+CD8+T-Zellen im Patientenblut nachgewiesen sowie eine gesteigerte Anzahl CTLA-4+CD8+T-Zellen. Charakteristisch für ein fortgeschrittenes Tumorstadium waren eine verminderte monozytäre HLA-DR-Expression und eine vermehrte monozytäre CD13-Expression. Des Weiteren war eine vermehrte Anzahl CD57+NK-Zellen sowie eine verminderte Anzahl an dendritischen Zellen auffällig. Minimal-invasiv operierte Patienten zeigten eine geringere postoperative Immunsuppression, repräsentiert durch einen postoperativ moderateren Abfall der monozytären HLA-DR-Expression sowie durch eine schnellere postoperative Normalisierung der analysierten leukozytären Marker. Diese Resultate zeigen, dass die Analyse der Leukozytensubpopulationen mittels Durchflusszytometrie Informationen zur zellulären Tumorabwehr ermöglicht und die Messergebnisse des perioperativen Immunmonitorings den Funktionszustand des zellulären Immunsystems reflektiert.

Hase, Sabine: Durchflusszytometrische Charakterisierung von Immunzellen im venösen Blut von Patienten mit Nierenzellkarzinom.
Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2012

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Epidemiologie, Klassifizierung und Prognosefaktoren des Nierenzellkarzinoms.....	1
1.2 Therapie	3
1.2.1 Chirurgische Verfahren	3
1.2.2 Medikamentöse Therapie des Nierenzellkarzinoms	4
1.3 Immunsystem und Tumorerkrankung.....	6
1.4 Immunsupprimierende Effekte des Nierenzellkarzinoms	7
1.5 Durchflusszytometrische Bestimmung als Messverfahren zur Immunzellcharakterisierung	9
1.5.1 Fluoreszenzmessung mittels Durchflusszytometrie	9
1.5.2 Oberflächenmoleküle zur Charakterisierung von Immunzellen	11
1.5.3 Dendritische Zellen.....	18
1.6 Zielstellung der Arbeit.....	18
2 Material und Methoden	20
2.1 Blutproben	20
2.2 Monoklonale Antikörper für durchflusszytometrische Analysen.....	22
2.3 Chemikalien, Puffer und Lösungen	23
2.4 Verbrauchsmaterialien	23
2.5 Geräte.....	24
2.6 Software	24
2.7 Immunfärbungen	24
2.7.1 Durchführung der direkten Immunfärbung	24
2.7.2 Durchführung der intrazellulären Färbungen	27
2.8 Statistik	28
3 Ergebnisse	29
3.1 Vergleich von Immunzellen im venösen Blut von Patienten und Kontrollpersonen.....	29
3.1.1 Gruppencharakteristika	29
3.1.2 Vergleich der Immunzellen von Patienten und Kontrollpersonen	29
3.2 Untersuchung von Immunzellen unter Berücksichtigung des Tumorstadiums	33
3.2.1 Gruppencharakteristika (pT1a vs. pT1b).....	33
3.2.2 Vergleich der Immunzellen von Patienten im Tumorstadium pT1a und pT1b	34
3.2.3 Gruppencharakteristika (< pT3 vs. ≥ pT3).....	35
3.2.4 Vergleich der Immunzellen von Patienten im Tumorstadium < pT3 und ≥ pT3	35
3.3 Vergleich von Immunzellen laparoskopisch und konventionell operierter Patienten	39
3.3.1 Gruppencharakteristika	39
3.3.2 Postoperativer Vergleich von Immunzellen laparoskopisch und konventionell-offen operierter Patienten	40

4	Diskussion	47
4.1	Vergleich von Immunzellen im venösen Blut von Patienten und Kontrollpersonen.....	47
4.2	Evaluierung immunologischer Marker unter Berücksichtigung des TNM-Stadiums	50
4.3	Postoperatives Immunmonitoring von Nierenzellkarzinompatienten nach laparoskopischer und konventionell-offener Resektion.....	52
4.4	Monozytäre HLA-DR- und CD13-Expression.....	57
4.5	Ausblick	59
5	Zusammenfassung.....	61
	Literaturverzeichnis	62
	Thesen	79
	Selbstständigkeitserklärung	83
	Erklärung über frühere Promotionsversuche.....	84
	Danksagung.....	85

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	Antibodies bound per cell
Ak	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APN	Aminopeptidase N
CCR5	CC-Chemokin-Rezeptor 5
CD	Cluster of Differentiation
CRP	C-reaktives Protein
CTLA-4	Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4
CXCR3	CXC-Chemokin-Rezeptor 3
DC	Dendritische Zellen
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Foxp3	Forkhead box P3
FSC	Vorwärtsstreulicht
Gr	Granulozyten
HLA	Human Leukocyte Antigen
ICOS	Inducible T-cell costimulator
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
KIR	Killer inhibitory receptor
Leu	Leukozyten
Ly	Lymphozyten
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1
MDC1	Myeloide dendritische Zellen 1
MDC2	Myeloide dendritische Zellen 2
MDSC	Myeloide Suppressorzellen
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minuten
MIP	Monocyte inflammatory protein
Mo	Monozyten
mTOR	Mammalian target of rapamycin complex

MW	Mittelwert
NCAM	Neural cell adhesion molecule
PBMCs	Periphere mononukleäre Blutzellen
PD-1	Programmed Death 1
PDC	Plasmozytoide dendritische Zellen
PDGF	Platelet derived growth factor
PE	Phycoerythrin
PE-Cy5	Phycoerythrin-Cyanin-5 Peridinin-Chorophyll-Protein
PerCP	Peridinin-Chorophyll-Protein
PerCP-Cy5.5	Peridinin-Chorophyll-Protein-Komplex-Cyanin-5.5
RANTES	Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted
RCC	Renal Cell Carcinoma
RKI	Robert-Koch-Institut
SE	Standardfehler
SSC	Seitwärtsstreulicht
Tab.	Tabelle
TGF- β	Transforming growth factor- β
TIL	Tumorinfiltrierende Lymphozyten
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
TNM	Tumor – Nodes (Lymphknoten) – Metastasen
TZR	T-Zell-Rezeptor
UICC	International Union Against Cancer
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VHL	Von Hippel Lindau

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie, Klassifizierung und Prognosefaktoren des Nierenzellkarzinoms

Das Nierenzellkarzinom ist eine bösartige Neubildung der Niere. Nach dem Prostatakarzinom und dem Harnblasenkarzinom ist das Nierenzellkarzinom das dritthäufigste urologische Karzinom (Zantl et al., 2008). An allen Krebserkrankungen hat das Nierenzellkarzinom, zusammen mit den Karzinomen des Nierenbeckens und des Harnleiters, einen Anteil von 3,3% bei der Frau und 4,4% bei dem Mann (RKI, Robert Koch-Institut, 2006). Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei der Frau bei 71, beim Mann bei 67 Jahren (Wirth und Fröhner, 2010). Der Mann erkrankt im Verhältnis von 3:2 häufiger als die Frau am Nierenzellkarzinom (Zantl et al., 2008). Als wichtigster Risikofaktor gilt das Rauchen. Zudem stellt die Erkrankung an einer chronischen Niereninsuffizienz als auch eine antihypertensive Therapie ein erhöhtes Erkrankungsrisiko dar (Wirth und Fröhner, 2010; Zantl et al., 2008). Ein Zusammenhang zwischen Übergewicht und dem Auftreten eines Nierenzellkarzinoms wird ebenfalls beschrieben (Osório-Costa et al., 2009). Die häufigste genetische Ursache der Tumorerkrankung stellt das von-Hippel-Lindau (VHL)-Syndrom dar (Heine et al., Rev. 2009). Bei der Erkrankung liegt ein Fragmentverlust im Bereich des Chromosoms 3 vor, was zu einer Inaktivität des VHL-Tumorsuppressorgens führt. Die Mutation, die sich in ca. 60% der klarzelligen Nierenzellkarzinome nachweisen lässt (Longo et al., 2007), verursacht eine Heraufregulierung angiogeneseassoziiierter Wachstumsfaktoren, die das Tumorwachstum unterstützen. Bezüglich der Inzidenz des Nierenzellkarzinoms bestehen geografische Unterschiede. In Europa wird die höchste Anzahl an Neuerkrankungen registriert. Asien und Nordamerika haben niedrigere Erkrankungsraten. Zum Zeitpunkt dieser Studie (2005/06) wurden in Deutschland pro Jahr 16327 bzw. 16491 Fälle einer neu aufgetretenen Krebserkrankung der Niere dem deutschen Krebsregister gemeldet. Die Inzidenz stieg im beobachteten Zeitraum um 1% an (RKI, 2006).

Das Nierenzellkarzinom wird mittels TNM-Klassifikation der UICC (International Union Against Cancer) klassifiziert. Die Kriterien zur Graduierung des Nierenzellkarzinoms nach der UICC von 2002 werden in Tabelle 1 und 2 dargestellt (Wittekind et al., 2002). Die Prognose der Nierenzellkarzinompatienten wird durch mehrere Faktoren beeinflusst. Erstens spielt die anatomische Ausbreitung, wie z.B. Größe des Tumors, Lymphknotenstatus und Vorhandensein von Fernmetastasen, eine wichtige Rolle. Zweitens sind histologische Faktoren zu berücksichtigen. In Tabelle 3 werden die drei häufigsten histologischen Subtypen benannt und die Häufigkeit ihres Auftretens angegeben. Ebenfalls ist der Differenzierungsgrad (Tab. 2) des Nierentumors ausschlagge-

bend. Drittens sind klinische Symptome, wie Kachexie, reduzierter Allgemeinzustand (ECOG 2-3 – Index zur Lebensqualität der Eastern Cooperative Oncology Group) und Anämie sowie Hyperkalzämie, erhöhte CRP- (C-reaktives Protein) und erhöhte alkalische Phosphatase-Werte belegte und klinisch eingesetzte Prognosemarker (Kath et al.: In: Kompendium Internistische Onkologie, 2005). Viertens sind genetische und immunhistochemische Faktoren anzuführen, die aber bisher in der klinischen Routine nicht berücksichtigt werden (Young et al., 2006; Zantl et al., 2008).

Tab. 1: TNM-Klassifikation des Nierenzellkarzinoms nach UICC (Wittekind et al., 2002)

T – Primärtumor	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
T1	Tumor 7,0 cm oder weniger in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere
T1a	Tumor 4,0 cm oder weniger in größter Ausdehnung
T1b	Tumor mehr als 4,0 cm, aber nicht mehr als 7,0 cm in größter Ausdehnung
T2	Tumor mehr als 7,0 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere
T3	Tumor breitet sich in größeren Venen aus oder infiltriert direkt die Nebenniere oder perirenales Gewebe, jedoch nicht über die Gerota-Faszie hinaus
T3a	Tumor infiltriert Nebenniere oder perirenales Gewebe, aber nicht über die Gerota-Faszie hinaus
T3b	Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in Nierenvene(n) oder V.cava (einschließlich Wandbefall) unterhalb des Zwerchfells
T3c	Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in V.cava (einschließlich Wandbefall) oberhalb des Zwerchfells
T4	Tumor infiltriert über die Gerota-Faszie hinaus
N – Regionäre Lymphknoten	
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase(n) in einem regionären Lymphknoten
N2	Metastase(n) in mehr als einem regionären Lymphknoten
M – Fernmetastasen	
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tab. 2: Grading des Nierenzellkarzinoms nach UICC (Wittekind et al., 2002)

G - Histopathologisches Grading	
GX	Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden
G1	Gut differenziert
G2	Mäßig differenziert
G3-4	Schlecht differenziert/undifferenziert

Tab. 3: Die häufigsten histologischen Subtypen des Nierenzellkarzinoms (Wirth und Fröhner, 2010)

Histologische Subtypen des Nierenzellkarzinoms	Relative Häufigkeit
Klarzellig	80-90%
Papillär	10-15%
Chromophob	4-5%

1.2 Therapie

1.2.1 Chirurgische Verfahren

Mit der typischen Symptomtrias Hämaturie, Flankenschmerz und palpabler Tumor werden nur noch selten Patienten vorstellig. Viel häufiger wird das Nierenzellkarzinom bei sonographischen oder radiologischen Untersuchungen zufällig gefunden. Die frühzeitige Diagnose ermöglicht eine lokal therapeutische Intervention mit kurativem Ansatz und führt so zu einer Verbesserung der Überlebensraten. Erscheint aufgrund der diagnostischen Bildgebung eine komplette Resektion eines lokal fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms fraglich, ist zunächst eine primäre (neoadjuvante) Systemtherapie mit dem Patienten zu diskutieren.

In einem frühen Stadium des Nierenzellkarzinoms, d.h. bei einem Durchmesser bis 4 cm des Tumors (pT1a), ist die offene Nierenteilresektion das Standardverfahren (Wirth und Fröhner, 2010). Abhängig von der anatomischen Lage sind auch größere Befunde teilresezierbar. Neben der offenen Nierenteilresektion ist auch die laparoskopische Nierenteilresektion möglich. Besteht die Indikation zur kompletten Entfernung der Niere, wird im Stadium pT1b - 2 üblicherweise eine laparoskopische Tumornephrektomie durchgeführt. Wird aufgrund präoperativer Befunde ein Tumorstadium \geq pT3 vermutet, ist die offene Nephrektomie das OP-Verfahren der Wahl.

Bei dem offenen Operationsverfahren wird die Niere mittels eines größeren Hautschnittes freigelegt. Dieser Schnitt kann im Flankenbereich – retroperitonealer Zugang oder im Bauchbereich – transperitonealer Zugang erfolgen.

Beim laparoskopischen Operationsverfahren („Schlüsselloch-Operation“) werden durch mehrere kleine Hautschnitte Trokare, chirurgische Instrumente und ein Endoskop (Laparoskop) in die Bauchhöhle eingeführt. Zuvor wurde der Bauchraum mit Gas (CO₂) gefüllt, ein sogenanntes Pneumoperitoneum angelegt, um einen Arbeitsraum für den Operateur zu schaffen.

Das minimal-invasive OP-Verfahren zeichnet sich besonders durch eine geringere Morbidität der Patienten aus. Begründet wird dies durch einen geringeren intraoperativen Blutverlust, niedrigere postoperative Entzündungsparameter (CRP, IL-6), geringere intra- und postoperative kardiopulmonale Komplikationen, eine verminderte Rate an

postoperativen Wundinfektionen und eine schnellere postoperative Mobilisation der Patienten aufgrund eines reduzierten operativem Zugangstraumas (Türk et al., 1999). Hervorzuheben ist zusätzlich der geringere Schmerzmittelbedarf laparoskopisch operierter Patienten, die kürzere Krankenhausverweildauer (Fornara et al., 2003) sowie das kosmetisch bessere Resultat.

Entscheidend für die Wahl des Operationsverfahrens sind eventuelle Kontraindikationen zur Durchführung einer Laparoskopie, wie z.B. kardiorespiratorische Insuffizienz, schwerwiegende Gerinnungsstörungen, portale Hypertension und Verwachsungen (Carus, 2007). Aber auch der Wunsch des Patienten sowie die Präferenz des Operateurs sind zu berücksichtigen.

Bei chirurgischen Eingriffen kommt es unumgänglich zu einer Traumatisierung von Weichteilgeweben. Trotz der Sterilität, unter der Operationen durchgeführt werden, induziert das verletzte Gewebe eine Entzündungsreaktion. Der postoperative Anstieg proinflammatorischer Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$, IL-6 und IL-8 dokumentieren diese Inflammation (Frering et al., 1994; Cremer et al., 1996). Zudem konnten eine postoperative Erhöhung von IL-10 sowie eine verminderte monozytäre HLA-DR-Expression (Huschak et al., 2003; Strohmeyer et al., 2003) gezeigt werden, die für eine Depression des Immunsystems sprechen. Es ist nicht außer Acht zu lassen, dass die Allgemeinanästhesie und die dabei verwendeten Medikamente, wie z.B. Propofol und Fentanyl, zu einer Beeinflussung des Immunsystems beitragen. So berichtet Brand et al. (2001) über die Zunahme von Interferon- γ im Blut der Patienten schon während der Narkoseeinleitung. Des Weiteren ist anzuführen, dass das Operationsverfahren zu messbaren Veränderungen des immunologischen Funktionszustandes führt.

1.2.2 Medikamentöse Therapie des Nierenzellkarzinoms

Das Nierenzellkarzinom zählt zur Gruppe der immunogenen Tumore und gilt als relativ strahlen- und chemotherapeutisch resistent (Jost et al., 2003; Heine et al., Rev. 2009). In der Literatur werden Fälle von Spontanremissionen beschrieben (Heine et al., Rev. 2009) und zudem konnte schon *in vitro* eine immunologische Antwort gegen den Tumor erzielt werden (Banchereau und Palucka, Rev. 2005). Auch *in vivo* liegen Studienergebnisse vor, die Hoffnung geben, dass das Tumorstadium u.a. durch die Anwendung tumorspezifischer Antigene immuntherapeutisch beeinflussbar ist (Siebels et al., 2011).

In den letzten 20 Jahren stellte die immuntherapeutische Standardbehandlung mit Interleukin-2 und IFN- α (Interferon alpha) beim metastasierten Nierenzellkarzinom eine Möglichkeit dar, bei einem Teil der Patienten eine dauerhafte Remission des Tumorlei-

dens zu induzieren. Unter Kombinationstherapie mit IL-2 und IFN- α konnten Remissionsraten von 25% erzielt werden (Atzpodien et al., 1995) sowie eine günstigere 1-Jahres-Überlebensrate. Den größten Nutzen von einer Zytokintherapie zeigten Patienten mit einer geringen Tumormasse und gutem Allgemeinzustand (Neidhart et al. 1991; Minasian et al., 1993).

In den vergangenen Jahren wurden zur Behandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms neue interessante Therapiestrategien etabliert, u.a. Multikinase-Inhibitoren (Sunitinib, Sorafenib und Pazopanib), mTOR (Mammalian target of rapamycin complex)-Inhibitoren (Temsirolimus) und VEGF (vascular endothelial growth factor)-Inhibitoren (Bevacizumab), mit dem Ziel, die fortgeschrittene Krankheit zu stabilisieren (Schmidinger und Bellmunt, 2010). Nach der neuen Leitlinie der DGHO (Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie, 2011) beinhaltet die Erstlinientherapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms eine Behandlung mit Bevacizumab + IFN- α oder Pazopanib oder Sunitinib.

VEGF spielt eine wesentliche Rolle bei der Tumorangiogenese. Takahashi et al. wiesen 1994 die erhöhte VEGF-Expression im Nierenzellkarzinom nach. Unter Anwendung des monoklonalen Antikörpers gegen VEGF, Bevacizumab, konnten Yang et al. (2003) eine signifikante Verlängerung der Zeit bis zur Tumorprogression beobachten. Zudem fördert die VEGF-Inhibierung die Reifung der DC (dendritischer Zellen) (Sosman et al., Rev. 2007), die als antigenpräsentierende Zellen die Fähigkeit haben, Tumorantigene den T-Zellen zu präsentieren.

Sunitinib, ein oraler Kinaseinhibitor, hemmt mehrere Rezeptoren, u.a. VEGF und PDGF (platelet derived growth factor), die für das Wachstum von Blut- und Lymphgefäßen verantwortlich sind. Da das Nierenzellkarzinom typischerweise ein stark vaskularisierter Tumor ist, stellt die Hemmung der Angiogenese einen Angriffspunkt zur medikamentösen Therapie dar.

Das Protein mTOR (mammalian target of rapamycin complex) ist entscheidend an der Signaltransduktion des Zellwachstums und der Zellproliferation beteiligt. Temsirolimus führt zu einer Blockade des mTOR-Enzymkomplexes, das einen Stopp der Proteinsynthese und somit auch der Zellproliferation zur Folge hat.

Wegweisend für neue immuntherapeutische Ansätze ist auch die starke Infiltration des Tumorgewebes durch Lymphozyten und DC. Durch gezielte Manipulation der DC lässt sich die Expressionsdichte tumorassoziierter Antigene erhöhen und die Aktivierung tumorspezifischer T-Zellen sicherstellen. Wierecky et al. zeigten 2006, dass die Applikation tumorantigenbeladener DC eine antigenspezifische T-Zellantwort nach sich zieht und dadurch eine Reduktion der Tumorlast möglich ist.

Abschließend ist festzuhalten, dass sich auch im Jahre 2012 die immuntherapeutische Behandlung des Nierenzellkarzinoms noch im experimentellen Stadium befindet und für die Anwendung von Immuntherapeutika im klinischen Alltag kein allgemeingültiger Konsens existiert.

1.3 Immunsystem und Tumorerkrankung

Bösartige Neoplasien können aufgrund der Proliferation einer einzigen entarteten Zelle entstehen. Aber auch eine gestörte Zellapoptose kann ursächlich für eine maligne Erkrankung sein. Basierend auf ihrem charakteristischerweiser infiltrierenden und destrukierenden Wachstum können Tumorzellen die Nachbarzellen zerstören. Die lokale Wirkung des Tumorwachstums führt über „Stress-Signale“ zur Alarmierung des angeborenen Immunsystems. Die angeborene Immunabwehr beinhaltet die physiologische Barrierefunktion der Epithelien, die phagozytäre Aktivität von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen sowie die antigenpräsentierende Wirkung der DC und die zytotoxischen Eigenschaften natürlicher Killerzellen (NK-Zellen). Unabhängig von einer Antigenpräsentation zeigen NK-Zellen ihre Zytotoxizität. Sie lysieren Zellen, die eine pathologische Expression von MHC-Molekülen zeigen. Die zytotoxische Wirkung vermitteln die NK-Zellen über Perforine, die eine Lyse der Zielzelle herbeiführen sowie über Zytokine (z.B. TNF) und induzierte Apoptose der Zielzelle mit Hilfe der Aktivierung intrazellulärer Caspasen (Janeway, 2009).

Ein Teil der Krebszellen exprimiert auf der Zelloberfläche, im Vergleich zu gesunden Zellen, deutlich abweichende Proteinstrukturen. Diese veränderten Oberflächenmoleküle, auch als tumorassoziierte Antigene bezeichnet, führen zur Alarmierung des spezifischen Immunsystems. Die erworbene Immunität reagiert, sobald antigenpräsentierende Zellen (APC) antigene Peptide den T-Zellen darbieten. Unter der Einwirkung von Zytokinen und kostimulierender Signale kommt es zur Aktivierung von B- und T-Zellen sowie zu einer starken Vermehrung der Lymphozyten. Die Differenzierung der T-Zellen zu Effektorzellen kommt nach einem Antigenkontakt zustande. Mit Hilfe ihres T-Zell-Rezeptors (TZR) identifizieren CD8+T-Zellen prozessierte Antigenfragmente, u. a. auch tumorassoziierte Antigene (TAA), die über MHC-Klasse-I-Moleküle präsentiert werden. Ihre zytotoxische Aktivität vermitteln die CD8+T-Zellen über zytotoxische Proteine, wie Granzyme und Perforin. CD4+T-Helfer-Zellen produzieren IFN- γ , nachdem ein Antigenkontakt durch antigenpräsentierende Zellen stattgefunden hat. Dabei muss die Antigenpräsentation über MHC-Klasse-II-Moleküle erfolgen. CD4+T-Helfer-Zellen tragen nach Aktivierung zur Stimulation der B-Zellen sowie zur Induktion zytotoxischer Aktivitäten der Makrophagen bei. Dies zeigt, dass sich der menschliche Körper dem unkontrollierten Wachstum entarteter Zellen zur Wehr setzen kann. Die Generierung

einer tumorzellspezifischen Immunantwort wird auch als Immunüberwachung („immune surveillance“) (Burnet, Rev. 1970) bezeichnet. Das Auftreten einer spontanen Remission der Tumorerkrankung demonstriert die erfolgreiche Abwehr durch das Immunsystem. Beim Nierenzellkarzinom wird die Spontanremissionsrate auf 0,5% beziffert (Kath et al.: In: Kompendium Internistische Onkologie, 2005). Entwickelt sich jedoch der Tumor aufgrund des Selektionsdruckes des Immunsystems weiter, auch als „Immunoediting“ beschrieben und die neoplastischen Zellen bilden neue genetische Varianten, kann eine Unfähigkeit zur Eliminierung der Tumorzellen durch das Immunsystem die Folge sein. Einzelne veränderte Tumorzellen würden schließlich den Überwachungsmechanismen des Immunsystems entgehen („Escape“) (Dunn et al., Rev. 2004).

Ein Mechanismus, den die Tumorzellen anwenden, um dem Immunsystem zu entgehen, ist der Verlust bzw. die Herabregulierung des MHC-Klasse-I-Moleküls auf ihrer Zelloberfläche (Romero et al., 2006). MHC-Klasse-I-Moleküle, die von fast allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden, präsentieren CD8+T-Zellen Antigenpeptide und damit auch Tumorantigene. Die Tumorzellen schaffen sich somit eine Möglichkeit, der zytotoxischen Immunantwort zu entgehen (Garrido und Algarra, 2001) und die Progression des Tumorwachstums voranzutreiben (Brasanac et al., 1999). Auf der anderen Seite führt der Verlust des MHC-Klasse-I-Moleküls zu einer Aktivierung der NK-Zellen. Bereits eine verminderte MHC-Klasse-I-Expression führt zu einer Lyse der betroffenen Zellen durch NK-Zellen (Glas et al., 2000). Ein weiteres Prinzip, dem Immunsystem zu entkommen, ist die Produktion inhibitorischer Zytokine durch Tumorzellen. Diese produzieren TGF- β und IL-10, die sich hemmend auf die Ausreifung der DC auswirken (Menetrier-Caux et al., 1999; Gabilovich, Rev. 2004; Zou, Rev. 2006) und die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen durch DC (Nakagomi et al., 1995; Cabillic et al., 2006) stören. TGF- β supprimiert die Aktivierung von DC und CD8+T-Zellen. In Anwesenheit von TGF- β kommt es zur Generierung von CD4+CD25+T-regulatorischen Zellen aus naiven CD4+CD25-T-Zellen (Kretschmer et al., Rev. 2006). Die regulatorischen T-Zellen lassen sich im peripheren Blut und im Tumor von Nierenzellkarzinompatienten nachweisen (Griffiths et al., 2007). Funktionell wird den regulatorischen T-Zellen eine supprimierende Wirkung auf die Proliferation von Effektor-T-Zellen zugeschrieben (Sakaguchi, Rev. 2000).

1.4 Immunsupprimierende Effekte des Nierenzellkarzinoms

Das Nierenzellkarzinom ist ein immunsensitiver Tumor, der in Abhängigkeit von seiner lokalen Ausdehnung zu einer verminderten Immunkompetenz des Patienten führen kann (Frankenberger et al., 2007; Griffiths et al., 2007; Porta et al., 2007; Thompson et al., 2007). Anhand der Analyse immunbiologischer Oberflächenmoleküle kann die im-

munsupprimierende Wirkung des Nierenzellkarzinoms auf angeborenes und erworbenes Immunsystem näher untersucht werden.

MDSC, die sowohl im peripheren Blut als auch im Tumorstroma vorkommen (Zea et al., 2005; Ochoa et al., 2007; Finke et al., 2011), wird eine tumorinduzierte, immun-suppressive Wirkung zugesprochen. Die tumorvermittelte Sekretion von VEGF, TGF- β , GM-CSF und Prostaglandin E2 führt zu einer Akkumulation der MDSC (Kusmartsev et al., 2008), die charakteristischerweise Arginase produzieren (Ochoa et al., 2007). Diese Arginase-Produktion führt zu einer Verminderung des Arginin-Vorkommens im Tumormilieu. Der dadurch bedingte Aminosäuremangel bewirkt einen Verlust der ζ -Kette des T-Zell-Rezeptors auf T-Zellen von Nierenzellkarzinompatienten (Zea et al., 2005) und eine Abnahme der T-Zell-Signaltransduktion und –Funktion (T-Zell-Anergie).

Kusmartsev et al. (2008) fanden im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen eine signifikant höhere MDSC-Anzahl im peripheren Blut von Patienten mit metastasierten Nierenzellkarzinom.

Die MDSC zählen zum therapeutischen Ansatzpunkt des Tyrosinkinase-Inhibitor-Rezeptors Sunitinib, der signifikant die Akkumulation der MDSC im peripheren Blut reduziert und die T-Zell-Suppression mildert (Finke et al., 2011). Zudem dient Sunitinib zur Reduzierung der Produktion proangiogenetischer Proteine durch MDSC.

Die Synthese immunsuppressiver Membranproteine von Tumorzellen, wie z.B. PD-L1, stellt ein weiteres immunsupprimierendes Instrument des Nierenzellkarzinoms dar (Thompson et al., 2007). Die Bindung von PD-1 auf T-Zellen führt zu einer Inhibierung der Zellproliferation, zu einer reduzierten Zytokinproduktion und zu einer Apoptoseinduktion aktivierter tumorantigen-spezifischer T-Zellen (Dong et al., 1999; 2002). Die tumorspezifische Expression von PD-L1 ist mit einer schlechten Prognose der an einem Nierenzellkarzinom erkrankten Patienten assoziiert (Thompson et al., 2007).

T-Regulatorzellen, die charakteristischerweise Foxp3 exprimieren und TGF- β und IL-10 sezernieren (Zou et al., 2006), inhibieren die Aktivität aller Effektor-T-Zellen und führen zur Supprimierung von antigen-präsentierenden Zellen (Peng et al., 2004; Chen et al., 2005; Ghiringhelli et al., 2005). Folglich beeinflussen T-Regulatorzellen essentiell die antitumorale Immunität (Zou et al., 2006). Eine erhöhte Anzahl an T-Regulatorzellen konnte im peripheren Blut und im Tumorgewebe von Nierenzellkarzinompatienten gemessen werden (Griffiths et al., 2007). Nierenzellkarzinompatienten, die eine Immuntherapie mit IL-2 erhielten und klinisch auf die Behandlung ansprachen, zeigten anschließend einen signifikanten Abfall an T-Regulatorzellen (Frankenberger et al., 2007). Siddiqui et al. (2007) berichteten in ihrer Studie über die Analyse von tumorinfiltrierenden Lymphozyten von insgesamt 170 Nierenzellkarzinompatienten. Bei ca. 25% der Studienpatienten konnte ein Vorkommen CD4+CD25+Foxp3+T-Zellen im Tumor

nachgewiesen werden. Einen Zusammenhang zwischen Überleben und Foxp3-Expression konnte nicht hergestellt werden. Für eine effektive Immunabwehr sind eine intakte Proliferation von T-Zellen und NK-Zellen genauso unabdingbar wie die Anwesenheit des Wachstumsfaktors IL-2. Das Nierenzellkarzinom sezerniert in sein umgebendes Milieu Ganglioside und Zytokin TGF- β , welche sich beide störend auf die IL-2-Rezeptoren von zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen auswirken (Lahn et al., 1999; Frankenberger et al., 2007). Eine supprimierte Proliferation CD8⁺T-Zellen und NK-Zellen sowie eine reduzierte Zytotoxizität der CD8⁺T-Zellen ist die Folge.

Diegmann et al. wiesen 2006 die vorwiegende Expression von CD70, einem Ligand von CD27, durch klarzellige Nierenzellkarzinome nach. *In vitro* führte die Expression von CD70 zu einer erhöhten Apoptoserate der zytotoxischen T-Zellen.

1.5 Durchflusszytometrische Bestimmung als Messverfahren zur Immunzellcharakterisierung

1.5.1 Fluoreszenzmessung mittels Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur Charakterisierung von Zellen bezüglich ihrer Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Das Streulicht entsteht, wenn die Zelle den Laserstrahl passiert. Die Streuung des Lichts erfolgt dann in unterschiedliche Richtungen. Abhängig davon, in welchem Winkel man das Streulicht bestimmt, erhält man Informationen über die Größe (FSC, Vorwärtsstreulicht) und die Granularität der Zelle (SSC, Seitwärtsstreulicht). Durch Auswertung dieser Informationen können die wichtigsten Subpopulationen der Leukozyten unterschieden werden. Abbildung 1 zeigt ein Dot-Plot, das die gemessenen Streulichteigenschaften der Zellen (Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten) darstellt.

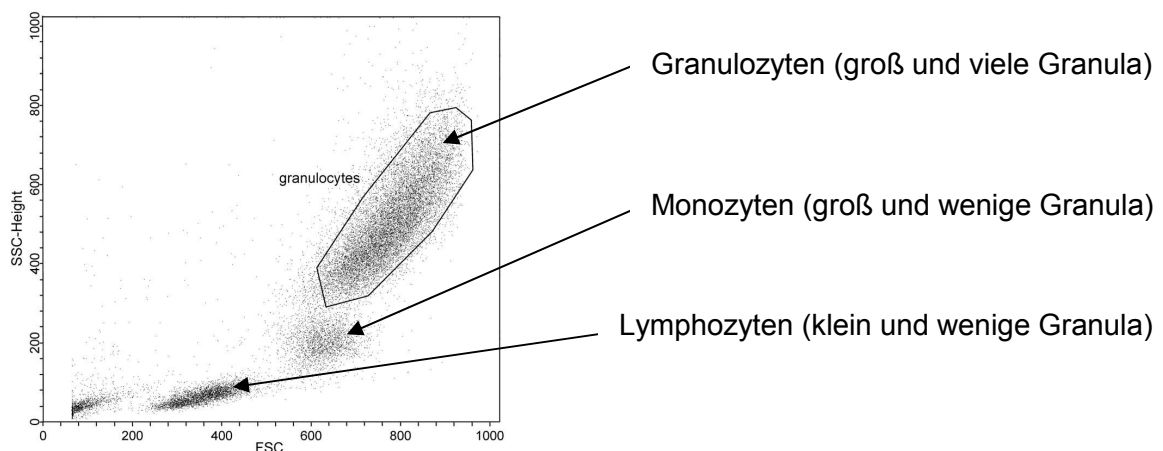


Abb. 1: Streulicht-Dot-Plot (FSC gegen SSC) mit Darstellung der Leukozytensubpopulationen (Institut für Medizinische Immunologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)

Mittels moderner Fluoreszenzfarbstoffe und einer Vielzahl monoklonaler Antikörper lassen sich Blutzellen aufgrund ihrer Oberflächenmoleküle analysieren. Der FACSCalibur von BD Biosciences arbeitet mit zwei Lasern, einem Argonlaser und einem roten Diodenlaser, die Licht einer Wellenlänge von 488 nm bzw. 635 nm generieren. Die fluoreszierenden Farbstoffe absorbieren die Lichtenergie in einem charakteristischen Wellenlängenbereich. Mit Hilfe dieser Energie werden Elektronen auf ein höheres Energieniveau gehoben und die Emittierung eines Photons angeregt. Dies wird als Fluoreszenz bezeichnet. Es erfolgt eine quantitative Erfassung und Umwandlung des Lichts in ein elektrisches Signal über Detektoren im Gerät. Anschließend werden die Messdaten an einen Computer übertragen.

Für diese Arbeit wurden Antikörper in den Farben Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Phycoerythrin-Cyanin-5 (PE-Cy5), Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP), Peridinin-Chlorophyll-Protein-Komplex-Cyanin-5.5 (PerCP-Cy5.5) und Allophycocyanin (APC) verwendet. In Tabelle 4 werden die spektralen Eigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe dargestellt.

Tab. 4: Spektrale Eigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe (BD Bioscience Fluorochrome Reference Chart)

Lasers (nm)	Fluorochrome	Exzitationsmaximum (nm)	Emmissionsmaximum (nm)
Argonlaser 488	FITC	494	519
	PE	496, 546	578
	PE-Cy5	496, 546	667
	PerCP	482	678
	PerCP-Cy5.5	482	695
Diodenlaser 635	APC	650	660

Eine wichtige Methode zur Datenauswertung in der Durchflusszytometrie ist das Gaten. Hierbei handelt es sich um eine automatische Eingrenzung von Zellen, aufgrund deren Zellgröße und Granularität im Streulicht-Dot-Plot (Abb. 2a). Die ausgewählte Zellpopulation, die innerhalb einer Region liegt („Region of interest“) wird in das Fluoreszenz-Dot-Plot (Abb. 2b) „geschleust“ und genauer untersucht. In Abbildung 2b sind auf der X-Achse FL3 (PerCP), auf der Y-Achse FL-1 (FITC) aufgetragen. Im rechten oberen und unteren Quadranten leuchten CD3+ Zellen, die T-Zellen auf. Im rechten oberen Quadranten erscheinen CD3+CD8+ Zellen, die zytotoxischen T-Zellen.

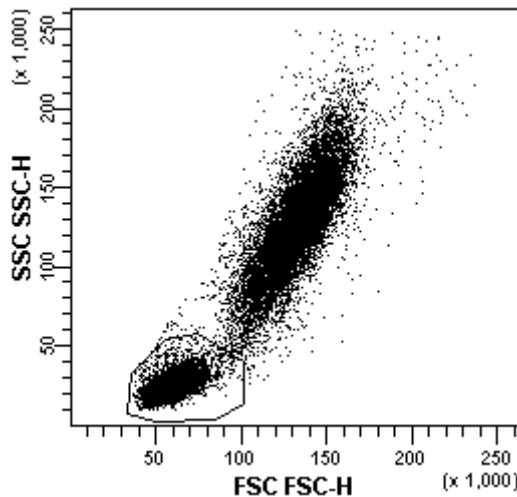


Abb. 2a: Streulicht-Dot-Plot mit Darstellung der Lymphozyten in Region 1 (R1)

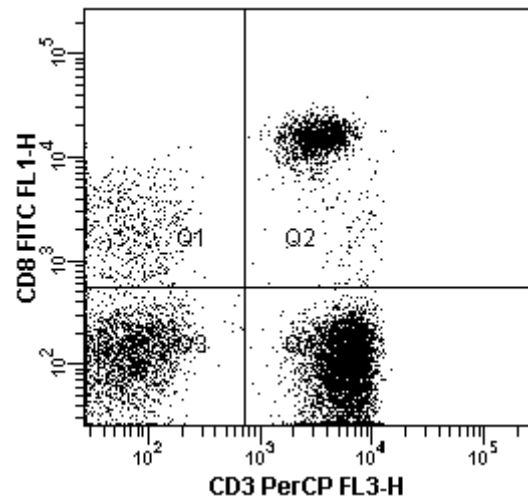


Abb. 2b: Fluoreszenz-Dot-Plot Darstellung der CD3+CD8+Zellen

1.5.2 Oberflächenmoleküle zur Charakterisierung von Immunzellen

Zur Charakterisierung der Lymphozytensubpopulationen verwendeten wir monoklonale Antikörper gegen CD3+ (T-Lymphozyten), CD4+ (T-Helfer-Zellen), CD8+ (zytotoxische T-Zellen), CD19+ (B-Zellen) und CD56+ (NK-Zellen). Zur Identifizierung der Leukozyten verwendeten wir CD45 sowie CD14 für Monozyten.

Die funktionsassoziierten Oberflächenmarker werden nun kurz beschrieben.

CD3 ζ

Die CD3 zeta (ζ)-Kette ist ein Teil des T-Zell-Rezeptor-Komplexes. Die ζ -Kette ist ein wichtiges Molekül der intrazellulären Signalweiterleitung der T-Zelle (Whiteside, Rev. 2004). Zur Anfärbung der ζ -Kette müssen die Zellen permeabilisiert werden.

CD10

CD10, auch als Nephilysin, neutrale Endopeptidase 24.11 und Enkephalinase bekannt, ist ein zinkabhängiges Enzym, welches relativ ubiquitär vorkommt (Tran-Paterson et al., 1990). CD10 wird von B- und T-Vorläuferzellen sowie von Zellen des Knochenmarkstromas exprimiert (Janeway, 2009) und wird als Marker für die akute B-Zell-Leukämie eingesetzt. Im Gehirn ist das Enzym für den Abbau des β -Amyloids verantwortlich (Takaki et al., 2000). Eine vermehrte Expression von CD10 wurde bei der Untersuchung von Tumorzelllinien und -gewebe von Patienten mit fortgeschrittenem Melanom (Oba et al., 2011) und kolorektalem Karzinom (Del Rio et al., 2011) beschrieben. Zudem wurde über eine, immunhistochemisch gesicherte, geringere CD10-Expression im Tumorgewebe von Lungenkrebs- (Cohen et al., 1996) und Nierenkrebs- (Varona et al., 2010) berichtet.

Vorarbeiten am Institut für Medizinische Immunologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zeigten, dass die Intensitätsabnahme der Expression von CD10 auf Granulozyten als Marker für die postoperative Immunsuppression der Patienten fungiert, ähnlich der Abnahme der HLA-DR-Expression auf Monozyten. Daher wurde die granulozytäre CD10-Expression in das Panel dieser Arbeit aufgenommen.

CD13

Aminopeptidase N (APN) ist ein ubiquitär vorkommendes membrangebundenes Enzym. Die Funktion der Peptidase ist der Abbau biologisch aktiver Peptide (z.B. Enkephaline und Endorphine) (Riemann et al., Rev. 1999) sowie die Beteiligung an endothelialen Signaltransduktionsvorgängen (Santos et al., 2000). Zudem wird CD13/Aminopeptidase N eine Rolle bei der Regulierung der Angiogenese zugeschrieben (Bhagwat et al., 2001). Riemann et al. zeigten bereits 1994 eine erhöhte Expression von CD13 auf tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) des Nierenzellkarzinoms. Außerdem wurde eine verminderte Expression von CD13 auf Granulozyten mit einer postoperativen Immundefizienz (Schroeter et al., 2007) in Zusammenhang gebracht. Die Regulierung der Membranpeptidase APN erfolgt über Zytokine, wie IL-4, Interferone und TGF- β (Riemann et al., Rev. 1999).

CD16

CD16 ist Baustein des Fc-Rezeptors für IgG vom Typ III und wird von neutrophilen Zellen, NK-Zellen und wenigen Monozyten und Makrophagen exprimiert. Die Funktion betreffend, dient das Molekül der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität und der Vermittlung der Phagozytose nach Antikörperopsonisierung (Janeway, 2009). CD16+ Monozyten sind eine monozytäre Subpopulation, die ca. 10% aller Monozyten im peripheren Blut darstellen (Sanchez-Torres et al., 2001) und charakteristischerweise eine höhere Expression des MHC-Klasse-II-Moleküls und eine höhere TNF-Produktion zeigen (Ziegler-Heitbrock et al., 2010). Eine Zunahme der CD16+Monozyten im peripheren Blut (bis zu 40% aller Monozyten) konnte bei Tumorpatienten mit gastrointestinalen Neoplasien beobachtet werden (Saleh et al., 1995).

CD25

Die Expression von CD25 erfolgt auf aktivierten T-Zellen, B-Zellen und Monozyten. CD25 hat die Funktion der α -Kette des IL-2-Rezeptors inne. Bei Aktivierung der T-Zellen erfolgt die Synthese der α -Kette, die zusammen mit der β - und γ -Kette den hochaffinen IL-2-Rezeptor bildet (Janeway, 2009). CD25 fungiert als Aktivierungsmarker für T-Lymphozyten und signalisiert die IL-2-induzierte Hochregulation des Rezeptors.

CD28

Aktivierte B-Zellen und T-Zellen exprimieren CD28, welches zur Immunglobulinsuperfamilie zählt und die T-Zell-Aktivierung induziert (Janeway, 2009). CD28 dient als Rezeptor für die kostimulierenden B7-Moleküle und fungiert als kostimulatorisches Signal der Interleukin-Herstellung (Mondino und Jenkins, 1994). Die Immunseneszenz wird von einer verminderten CD28-Expression auf T-Lymphozyten im zunehmenden Lebensalter begleitet und beinhaltet eine Ermüdung der zytotoxischen T-Zell-Antwort (Effros et al., 1996).

CD57

CD57, ein Oligosaccharid auf vielen Zelloberflächenglykoproteinen, wird von NK-Zellen und Subpopulationen der T-Zellen exprimiert und fungiert als Marker für hoch zytotoxische Zellen (Chattopadhyay, 2009). Donskov et al. zeigte 2002, dass Nierenzellkarzinompatienten, die sich einer Immuntherapie mit IL-2 unterzogen und anschließend eine höhere Anzahl CD57+NK-Zellen im peripheren Blut aufwiesen, besser auf die Immuntherapie ansprachen als Patienten mit geringeren CD57+NK-Zellen. Zudem deutet eine intratumoral nachgewiesene niedrige Anzahl CD57+NK-Zellen auf eine schlechtere Überlebensprognose des Patienten hin (Donskov et al., 2006). CD57 gilt als „Immunseneszenzmarker“, da es sich nach mehrfachen Zellteilungen auf der Oberfläche von T-Zellen nachweisen lässt (Tarazona et al., 2000).

CD103

Intraepitheliale Lymphozyten und ca. 2-6% der Lymphozyten des peripheren Blutes exprimieren CD103, auch bekannt als $\alpha_E\beta_7$ -Integrin (Janeway, 2009). CD103 exprimierende CD8+T-Zellen wurden im Darmgewebe (Sarnacki et al., 1992), in der Epidermis (Pauls et al., 2001) sowie in Bronchiallavage-Flüssigkeit (Rihs et al., 1996) lokalisiert. Das Oberflächenmolekül scheint entscheidend für das Weiterleiten der Lymphozyten zu ihrem Liganden E-Cadherin zu sein, der von Epithelzellen exprimiert wird und zur Stabilisierung von Zell-Zell-Kontakten beiträgt (Cepek et al., 1994). Integrine spielen eine wichtige Rolle bei der Interaktion von T-Zellen und Endothelzellen (Strauch et al., 2001) sowie beim Homing der T-Zellen (Agace et al. 2000). Uss et al. beschrieben 2006, dass CD103+CD8+T-Zellen IL-10 und IFN- γ sezernieren.

2002 beschrieben Lehmann et al. CD103 als Marker für eine potente Subpopulation der regulatorischen T-Zellen. Die CD103+CD25+T-Zellen exprimierten CTLA-4 und supprimierten die T-Zellproliferation *in vitro*.

CD107a

Das ubiquitär vorkommende Glykoprotein CD107a, auch als LAMP-1 (lysosomal associated protein) bekannt, ist Bestandteil lysosomaler Membranen. Nach Vesikelausstoß wird das Protein an die Zelloberfläche umgelagert. CD107a wird als sensitiver Marker für zytotoxische T-Zellen (Betts et al., 2003) und NK-Zellen nach Granulafreisetzung beschrieben (Alter et al., 2004). Charakteristisch für die Expression von CD107a in kolorektalen Tumorzellen ist ein ausgeprägter Unterschied in der Oligosaccharidstruktur sowie eine Zunahme der Expressionsintensität im Epithel kolorektaler Neoplasien im Vergleich zu gesunden Gewebeproben (Furuta et al., 2001). Ein Zusammenhang zwischen Tumorprogression bzw. invasivem Wachstum und Expressionsintensität des Degranulationsmarkers CD107a wird vermutet (Furuta et al., 2001).

CTLA-4/CD152

Ein Teil der zytotoxischen T-Zellen, aber auch regulatorische T-Zellen exprimieren CTLA-4, welches zur Immunglobulinsuperfamilie gehört. Es dient als Rezeptor für die kostimulierenden B7-Moleküle CD80 und CD86. Zudem wirkt es inhibierend auf die T-Zellantwort und trägt somit zur Proliferationsbegrenzung der T-Zellen bei (Maszyzna et al., 2003). Bezüglich der T-Zell-vermittelten Tumorabwehr wird CTLA-4 als negativer Regulator beschrieben (Tarhini und Iqbal, 2010) und ist somit potentieller Angriffspunkt für neue Therapieansätze.

CD158b

NK-Zellen sowie einige T-Zell-Populationen exprimieren diesen inhibitorisch wirkenden Rezeptor (KIR, killer inhibitory receptor). Die Bindung an HLA-Cw1, -3, -7, -8 führt zur Hemmung der Zytotoxizität der NK-Zellen (Janeway, 2009). Ein Einfluss auf die lytische Aktivität tumorspezifischer T-Lymphozyten wird angenommen, da aus Tumorgeewebe gewonnene T-Zellen den inhibitorisch wirkenden Marker CD158b häufiger exprimierten als im peripheren Blut (Guerra et al., 2000). Eine medikamentöse Inhibierung von CD158b wird als immuntherapeutischer Ansatz diskutiert, da die Blockierung von CD158b die Effektorfunktion der T-Zellen wiederherstellen könnte (Chiou et al., 2005).

CXCR3/CD183

CXCR3 ist ein angiostatischer Chemokinrezeptor, der auf Granulozyten eine chemotaktische, aktivierende Wirkung hat (Baggiolini et al., Rev. 1997). CXCR3 wird u.a. auf CD4+ und CD8+T-Zellen sowie NK-Zellen exprimiert und trägt zur Vermittlung der T-Zell-Proliferation, –Differenzierung und Migration ins Tumorgewebe (Smit et al., 2003; Na et al., 2006) bei. Zudem stimuliert CXCR3 die Th1-Effektorzellen, die u.a. IL-2 und IFN- γ sezernieren und eine zellvermittelte Immunantwort unterstützen (Kim und Broxmeyer, 1999). Liganden des Chemokinrezeptors sind Mig (monokine induced by IFN- γ), IP-10 (interferon-inductible protein 10) und I-TAC (interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant) (Janeway, 2009). Eine im Vergleich zum gesunden Nierengewebe erhöhte Anzahl CXCR3+T-Zellen konnten im Tumorgewebe von Nierenzellkarzinompatienten nachgewiesen werden (Suyama et al., 2005). Klätte et al. (2008) beschrieben CXCR3 aufgrund immunhistochemischer Ergebnisse als unabhängigen Prognosefaktor für Patienten mit lokalisiertem, klarzelligem Nierenzellkarzinom und zeigten, dass eine hohe CXCR3-Expression auf T-Zellen im Tumorgewebe mit einer besseren 5-Jahresüberlebensprognose in Zusammenhang steht.

CCR5/CD195

CCR5 trägt wie alle Chemokinrezeptoren zur Regulierung der Lymphozytenmigration bei und fungiert als Initiator der T-Zell-Antwort vom Th1-Typ, die wesentlich für die Tumorabwehr ist (McNicholl et al., 1997). Hierbei wird die Sezernierung von IFN- γ durch T- und NK-Zellen stimuliert, die Proliferation der NK-Zellen unterstützt sowie die Reifung zytotoxischer T-Zellen angeregt (Trinchieri, 1995). Zur Aktivierung des Rezeptors kommt es durch Bindung an seine Liganden MIP-1 α , MIP-1 β (monocyte inflammatory protein-1 α und -1 β) und RANTES (regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted). Cózar et al. (2005) beschrieben eine verminderte Oberflächenexpression des Chemokinrezeptors CCR5 auf CD4+Zellen im peripheren Blut von Nierenzellkarzinompatienten mit fortgeschrittenem Tumorleiden und Metastasen.

ICOS/CD278

Das induzierbare kostimulierende Protein (ICOS, Inducible T-Cell Costimulator) gehört der CD28/CTLA4/B7 Immunglobulinsuperfamilie an und wird von aktivierten T-Zellen erzeugt und kann zur T-Zell-Differenzierung und –Proliferation sowie zur Verstärkung der T-Zell-Antworten durch eine Steigerung der IFN- γ -, IL-4- und IL-10-Produktion (Rudd und Schneider, Rev. 2003; Janeway, 2009) beitragen. ICOS+T-Zellen werden als zytokinproduzierende Th1-Subpopulation beschrieben und als tumorantigenspezifische Effektorzellen bezeichnet (Fu et al., 2011). Die Abwesenheit von ICOS bewirkt eine abgeschwächte antitumorale T-Zell-Antwort (Fu et al., 2011).

PD-1/CD279

Programmierter Zelltod 1 (PD-1) ist ein inhibitorischer Rezeptor, der hauptsächlich auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird und als negativer Kostimulator fungiert. Die Bindung des Rezeptors PD-1 mit seinem Liganden PD-L1 bzw. -L2 führt zur Apoptose der Rezeptor-exprimierenden Zellen (Dong et al., 2002). Daraus resultiert eine Schwächung der tumorspezifischen T-Zellantwort des Körpers (Blank et al., 2006). Die Expression von PD-L1 im Tumorgewebe von Nierenzellkarzinompatienten korreliert mit einer ungünstigeren Prognose (Thompson et al., 2006).

HLA-DR auf T-Zellen und Monozyten

HLA-DP, -DQ, -DR sind MHC-Klasse-II-Moleküle, die als transmembranöse Glykoproteine auf B-Zellen, Makrophagen, Monozyten und DC nachgewiesen werden können (Male: Immunologie auf einen Blick, 2005). HLA-DR auf T-Zellen ist Ausdruck der IFN- γ -Freisetzung und ist als Zeichen der Th1-Zellaktivierung zu verstehen. Porta et al. beschrieben 2007 eine signifikant höhere Anzahl der HLA-DR+T-Zellen im peripheren Blut von Nierenzellkarzinompatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen.

Zur Identifizierung von Patienten, die sich postoperativ in einer immunsuppressiven Phase befinden, eignet sich die quantitative Bestimmung der HLA-DR-Expression auf Monozyten (Hershman et al., 1990). Die Expressionsdichte der HLA-DR-Moleküle auf Monozyten korreliert mit der Schwere der Immunsuppression (Volk, 2002; Huschak et al., 2003; Döcke et al., 2005). Charakteristisch für eine Immunparalyse, z.B. bei Sepsis, ist eine monozytäre Expression von weniger als 5000 HLA-DR-Moleküle (Ak/Zelle) (Strohmeier et al., 2003). Zur Quantifizierung der monozytären HLA-DR-Expression wurden von uns Beads verwendet, die mit einer bekannten Menge an PE-Molekülen markiert sind. Außerdem wurde ein speziell PE-markierter monoklonaler Antikörper benutzt, dessen PE-Markierung im Verhältnis 1:1 (Protein: Farbstoff) eine standardisierte Analyse über verschiedene Zeiträume bzw. Labore hinweg ermöglicht.

NKp44

Der Rezeptor NKp44 ist auf der Zellmembran aktivierter NK-Zellen (Moretta et al., 2002) zu finden und gehört neben NKp30 und NKp46 der Familie natürlicher zytotoxischer Rezeptoren (NCR) an. Währenddessen NKp30 und NKp46 von allen NK-Zellen exprimiert werden, ist NKp44 nur auf aktivierten NK-Zellen zu finden (Moretta et al., 2000). Die Expressionsdichte der NCR korreliert mit der zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen (Moretta et al., 2000).

Perforin

Bei Perforin handelt es sich um ein zytolytisches Protein, welches in intrazellulär gespeicherter Form in zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen vorliegt. Durch Polymerisierung bildet Perforin Membranporen, die sich nach Kontakt mit der Zielzelle öffnen und entleeren. Dieser Vorgang und die zytolytische Aktivität führen die Apoptose der Zielzelle herbei (Pipkin und Lieberman, 2007; Janeway, 2009). Zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen sind in der Lage, Tumorzellen zu zerstören. Nakanishi et al. (1991) untersuchten die Anzahl Perforin+Zellen im peripheren Blut und auf tumorinfiltrierenden Lymphozyten von Patienten mit kolorektalem Karzinom. Mit zunehmender Tumorprogression nahm die Anzahl Perforin+Zellen im peripheren Blut und im Tumorgewebe ab. Schleyen et al. (2006) untersuchten tumorinfiltrierende Lymphozyten von Nierenzellkarzinompatienten auf die Anwesenheit von Perforin. Die Autoren stellten fest, dass zwischen Perforin-Expression und NK-Zell-Infiltration des Tumors ein Zusammenhang besteht.

T-Zell-Rezeptor (TZR) Valpha24

NKT-Zellen repräsentieren eine Zellpopulation, die Eigenschaften von T-Zellen und NK-Zellen in sich vereinigen (Ohteki et al., 1992). Neben der Expression des NK-Zell-Rezeptors CD161 (Godfrey und Berzins, 2007) exprimieren die NKT-Zellen einen invariante TZR-CD3-Komplex (Van Kaer und Joyce, 2005). Der TZR der größten humanen NKT-Zell-Population (Typ I NKT-Zellen) besitzt die Kette Valpha24 in seiner heterodimeren Struktur (Mercer et al., 2005). Zudem werden Typ I NKT-Zellen protektive Fähigkeiten zugeschrieben, indem sie IFN- γ zur Aktivierung von NK-Zellen und CD8+T-Zellen herstellen sowie DC aktivieren und zur IL-12-Produktion stimulieren (Terabe und Berzofsky, 2008). NKT-Zellen zeigen zytotoxische Eigenschaften in der Tumorabwehr (Tahir et al., 2001; Dhodapkar et al., 2003; Song et al., 2009). Eine Tumordinfiltration durch Valpha24+invariante NKT-Zellen wird mit einer guten Prognose in Verbindung gebracht (Yanagisawa et al., 2002).

Transkriptionsfaktor Foxp3

Regulatorische Zellen, auch als Suppressor-Zellen bezeichnet, wirken inhibierend auf Effektorzellen und führen zu einer Beendigung der antitumoralen Immunantwort (Woo et al., 2002; Liotta et al., 2011). Sie werden durch die spezifische Expression des Transkriptionsfaktor Foxp3 charakterisiert. Die immunsuppressive Wirkung wird durch Zellkontakt sowie durch die Zytokine IL-10 und TGF vermittelt. Ein erhöhtes Vorkommen von CD4⁺T-regulatorischen-Zellen im peripheren Blut von Patienten unterschiedlicher Tumorentitäten konnte gezeigt werden (Liyanage et al., 2002; Wolf et al., 2003). Ein Anstieg der T-regulatorischen Zellen im peripheren Blut sowie intratumoral, korreliert mit dem Tumorstadium und ist mit einer schlechten Prognose des Nierenzellkarzinompatienten assoziiert (Liotta et al., 2011).

1.5.3 Dendritische Zellen

DC sind wichtige Schnittstellen zwischen der angeborenen und adaptiven Immunantwort. Aufgrund ihrer Oberflächenmoleküle werden die DC in plasmazytoide (CD11c⁻, CD123⁺, CD45RA⁺, BDCA-2⁺, BDCA-4⁺) und myeloide DC (CD11c⁺, CD33⁺, CD45RA⁻, CD123⁻) unterschieden (Colonna et al., Rev. 2004; Fricke und Gabrilovich, Rev. 2006). Plasmazytoide DC sind dazu befähigt, nach Virenkontakt große Mengen an Typ I-Interferonen zu produzieren (Cella et al., 1999), die die Aktivierung von Makrophagen herbeiführen (Janeway, 2009). Myeloide DC sind in der Lage, IL-12 herzustellen, das die Verwandlung naiver CD4⁺T-Zellen in Th1-Zellen unterstützt und deren Aktivität sowie Interferon- γ -Produktion verstärkt (Guermontprez et al., Rev. 2001). Porta et al. (2007) beschrieben die immunologische Dysfunktion von Nierenzellkarzinompatienten anhand der verminderten Anzahl DC im peripheren Blut im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen. Da DC hervorragende Fähigkeiten zur Antigenpräsentation und Kostimulation haben, werden sie zur Entwicklung von Vakzinierungsstrategien herangezogen, um eine potente Immuntherapie gegen das Nierenzellkarzinom zu entwickeln (Ringhoffer und Gschwend, 2002).

1.6 Zielstellung der Arbeit

Das Nierenzellkarzinom ist der häufigste bösartige Nierentumor und weist immunsensitive Eigenschaften auf. Bisher existieren nur wenige Studien, die Immunzellen im peripheren Blut von Nierenzellkarzinompatienten analysieren. Daher war Ziel dieser Studie, die phänotypischen Eigenschaften von Immunzellen im peripheren Blut von Nierenzellkarzinompatienten zu charakterisieren und erstens die Messergebnisse mit gesunden Kontrollpersonen zu vergleichen. Im Vordergrund stand dabei, Informationen über die Zusammensetzung der Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut mit-

tels T-, B-, NK- und NKT-Zellmarker zu sammeln, die Anzahl der Monozyten, Granulozyten und DC zu bestimmen sowie leukozytäre funktionsassoziierte Marker, Chemokinrezeptoren und Immunseneszenzmarker zu analysieren.

Zweitens war ein Ziel dieser Studie, immunologische Marker im peripheren Blut von Nierenzellkarzinompatienten zu identifizieren, die mit dem Tumorstadium korrelieren, wobei eine Gegenüberstellung der Tumorstadien pT1a vs. pT1b sowie <pT3 vs. ≥pT3 angestrebt wurde.

Drittens war es Ziel dieser Studie, die immunsuppressive Wirkung chirurgischer Intervention bei Nierenzellkarzinompatienten zu analysieren unter Berücksichtigung des Operationsverfahrens (Laparoskopie vs. Laparotomie). Nach heutigem Therapieregime bietet die onkologisch-chirurgische Intervention den einzigen kurativen Ansatz in der Behandlung des Nierenzellkarzinoms. Als etablierte OP-Verfahren sind die Laparotomie, charakterisiert durch ein konventionell-offenes Vorgehen sowie die Laparoskopie als minimal-invasive OP-Methode anzuführen.

Die erarbeiteten Ergebnisse sollen als Ausgangspunkte für zukünftige Studien fungieren, in denen die in dieser Arbeit gewonnenen Daten klinische und therapeutische Anwendung finden.

2 Material und Methoden

2.1 Blutproben

In die Studie wurden 44 Patienten eingeschlossen, die in der Universitätsklinik und Poliklinik für Urologie der Martin-Luther-Universität Halle–Wittenberg im Zeitraum von Oktober 2005 bis Dezember 2006 an einem Nierenzellkarzinom operiert wurden. Das mediane Alter der 24 männlichen und 20 weiblichen Patienten lag bei 66,85 Jahren (Spannweite: 43-86 Jahre). In der Gruppe mit minimal-invasiven Operationsverfahren befanden sich 17 Patienten und die Gruppe der konventionell-offen Operierten zählte 27 Patienten. Alle Operationsresektate wurden vom Pathologischen Institut der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg befundet. Von den in Tabelle 5 aufgeführten Patienten wurden jeweils 9 ml EDTA-Blut präoperativ sowie am ersten, dritten und siebten Tag postoperativ abgenommen. Die Blutproben wurden durch perkutane Venenpunktion oder über einen zentralen Venenkatheter entnommen.

Sechs Patienten wurden nachträglich aus der Studie genommen. Ein Patient im fortgeschrittenen Tumorstadium wurde schon zum zweiten Mal wegen eines Nierenzellkarzinoms operiert. Bei den fünf weiteren Patienten konnte in der histologischen Untersuchung das vermutete Nierenzellkarzinom nicht nachgewiesen werden.

Als Kontrollen fungieren 20 Freiwillige im Alter von 20-78 Jahren (medianes Alter 59,05). Zum Zeitpunkt der Blutentnahme waren alle Kontrollpersonen gesund. Es gab keinen Hinweis auf ein Tumorleiden oder eine Suppression des Immunsystems.

Tab. 5: Patientencharakteristik

Pat. Nr.	Alter	Geschlecht	TNM Klassifikation	Grading	Resektionsverfahren (N = Nephrektomie, T = Teilresektion)
1	72	M	pT1a, R0	G1	N
2	57	M	pT2, L0,V0, R0	G2	N
3	68	W	pT2, pNx, pMx	G3	N
4	66	W	pT1b, pNx, pMx, R0	G2	N
5	77	M	pT3b, V0, L0, R2	G2	N
6	66	W	pT1b, V0, L0, R0	G2	N
7	64	W	pT1a, V0, L0, R0	G2	N
8	73	M	pT1a, pNx, pMx, R0	G2	T
9	75	W	pT1a, pN0, R0	G1	N
10	59	W	pT3b, pNx, pMx, R0	G3	N
11	47	M	pT1a, L0, V0, R0	G2	T
12	69	M	pT1b, pNx, pMx	G2	N
13	63	M	pT1a, pNx, pMx, L0, V0, R0	G2	T
14	72	M	pT3a, pNx, pM0, L0, V0, R0	G1	T
15	69	M	pT2, V0, L0, R0	G1	N
16	74	M	pT3b, V2, L0, R2	G3	N
17	75	M	pT1b, pNx, pMx, V0, R0	G2	N
18	66	M	pT1a, V0, L0	G2	T
19	57	M	pT1b, pN0, pMx, R0	G1	N
20	61	W	pT3b, pN0, pMx, R0	G2	N
21	55	M	pT1a	G2	T
22	67	M	pT3a, pNx, pMx	G2	N
23	70	W	pT3b, pNx, pMx	G2	N
24	65	M	pT3a, pNx, pMx	G3	N
25	68	M	pT3a, pNx, pMx, L0, V0, R2	G3	N
27	58	M	pT2, V0, L0, R0	G2	N
28	67	M	pT1a, pNx, pMx, L0, V0, R0	G2	T
29	71	W	pT3b, pN0, L0, V1, R0	G2	N
30	67	W	pT3b, pMx, L0, V1, R0	G2	N
31	43	M	pT1b, pNx, pMx, L0, V0, R0	G1	T
32	57	W	pT1a, L0, V0, R0	G2	N
34	45	M	pT1a, V0, L0, R0	G1	N
35	63	M	pT1b, pNx, pMx, R0	G2	N
36	70	W	pT1b, pNx, pMx, R0	G1	T
38	66	W	pT1b, pNX, pMX, L0, V0, R0	G3	N
39	72	W	pT1b, pNx, pMx, R0	G2	N
41	80	W	pT1b, pNx, V0, L0	G2	N
42	67	M	pT1b, pNx, pMx, V0, R0	G2	N
43	75	W	pT2, pNx, pMx, L0, R0	G3	N
44	74	W	pT1b, V0, L0, R0	G1	N
45	86	W	pT1a, pNx, R0	G2	T
47	59	W	pT1a, pN0, pMx, V0, L0, R1	G2	T
48	65	W	pT2	G2	N
49	66	M	pT3a, pNx, L0, V0, R0	G2	N

2.2 Monoklonale Antikörper für durchflusszytometrische Analysen

Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tab. 6: Antikörper

Antikörper	Klon	Konjugation	Firma/Herkunft	Bestellnr.
Isotypenkontrolle mouse IgG ₁	679.1Mc7	FITC	Beckmann Coulter/Immunotech	A07795
Isotypenkontrolle mouse IgG ₁	MOPC-21	PE	BD Biosciences	559320
Isotypenkontrolle mouse g ₁	X40	PerCP	BD Biosciences	345817
Isotypenkontrolle mouse g ₁	X40	APC	BD Biosciences	345818
Isotypenkontrolle IgG2a	X39	FITC	BD Biosciences	349051
Isotypenkontrolle IgG2b	27-35	PE	BD Biosciences	556437
CD3	SK7	PerCP	BD Biosciences	345766
CD3ζ	G3	FITC	Serotec	556437
CD4	13B8.2	PE	Beckmann Coulter/Immunotech	A07751
CD8	SK1	FITC	BD Biosciences	345772
CD8	BW135/80	APC	Miltenyi Biotech	130-091-076
CD10	HI10a	PE	BD Biosciences	custom conjugate 1:1
CD13	L138	PE	BD Biosciences	custom conjugate 1:1
CD14	RMO52	FITC	Beckmann Coulter/Immunotech	IM0645
CD14	MφP9	PerCP	BD Biosciences	345786
CD14	TÜK4	APC	Miltenyi Biotech	130-091-243
CD16	3G8	PE	Beckmann Coulter/Immunotech	A07766
CD19	LT19	APC	Miltenyi Biotech	130-091-248
CD25	2A3	APC	BD Biosciences	340907
CD28	CD28.2	PE	Beckmann Coulter/Immunotech	IM2071
CD45	2D1	PerCP	BD Biosciences	345809
CD56	NCAM16.2	APC	BD Biosciences	341027
CD57	NC1	FITC	Beckmann Coulter/Immunotech	IM0466
CD103	Ber-ACT8	FITC	DAKO	F7138
CD107a	H4A3	FITC	BD Biosciences	555800
CD158a	EB6B	PE	Beckmann Coulter/Immunotech	A09778
CD158b	GL183	PE	Beckmann Coulter/Immunotech	IM2278
CCR5 (CD195)	2D7	PE	BD Biosciences	555993
CTLA-4 (CD152)	BNI3	APC	BD Biosciences	555855
CXCR3	49801	FITC	R&D	FAB160F
HLA-DR	L243 (G46-6)	PE	BD Biosciences	347401
HLA-DR/Monocyte	L243/MφP9	PE/PerCP-Cy5.5	BD Biosciences	340827 (1:1 PE:mAb)
ICOS (CD278)	DX29	PE	BD Biosciences	557802
NKp44	Z231	PE	Beckmann Coulter/Immunotech	IM3710
PD1 (CD279)	MIH4	FITC	BD Biosciences	557860
Perforin	δG9	PE	BD Biosciences	556437
Valpha24	C15	FITC	Beckmann Coulter/Immunotech	IM1589

Human Regulatory T cell Staining Kit, eBioscience, 88-8999

CD4		FITC
CD25		APC
Foxp3	(Klon: PCH101)	PE

Tab. 7: Komponenten des Anti-BDCA Cocktails; Blood Dendritic Cell Enumeration Kit, Miltenyi Biotech, 130-091-086

Antikörper	Klon	Isotyp	Konjugation	Spezifität
CD303 (BDCA-2)	AC144	mouse IgG1	FITC	PDC
CD1c (BDCA-1)	AD5-8E7	mouse IgG2a	PE	MDC1
CD14		mouse IgG2a	PE-Cy5	Monozyten
CD19		mouse IgG1	PE-Cy5	B-Zellen
CD141 (BDCA-3)	AD5-14H12	mouse IgG1	APC	MDC2

2.3 Chemikalien, Puffer und Lösungen

Essigsäure 100%	Merck, Darmstadt
PBS (Phosphat-gepufferte Saline) pH 7.2	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
FACS-Lysing Solution	BD Biosciences, Heidelberg
FACS-Flow	BD Biosciences, Heidelberg
FACS-Rinse	BD Biosciences, Heidelberg
FACS-Clean	BD Biosciences, Heidelberg
Dead Cell Discriminator	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Red Blood Cell Lysis Solution	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Fix Solution	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Discriminator Stop Reagent	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Flow Cytometry Staining Buffer	eBioscience, Frankfurt am Main
Fix/Perm Concentrate	eBioscience, Frankfurt am Main
Fix/Perm Diluent	eBioscience, Frankfurt am Main
Permeabilization Buffer	eBioscience, Frankfurt am Main
Leucoperm	Serotec, Düsseldorf

2.4 Verbrauchsmaterialien

FACS-Röhrchen 5 ml	BD Falcon, Heidelberg
Pipettenspitzen (20, 200, 1000 µl)	Ilona Schubert Laborfachhandel, Leipzig
BD QuantiBRITE™ PE Beads	BD Biosciences, Heidelberg

2.5 Geräte

Durchflusszytometer, FACScalibur	BD Biosciences, Heidelberg
Mikropipetten	Eppendorf, Hamburg
Multipipette	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop CH30 (10x10)	Olympus, Hamburg
Neubauerzählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Vortexer	
MS2 Minishaker	IKA Labortechnik, Staufen
Paramix 3	Julabo Labortechnik, Seelbach
Zentrifugen	
Rotina 38	Hettich, Tuttlingen
Universal 320	Hettich, Tuttlingen

2.6 Software

CellQuest (Version 3.3)	BD Biosciences, Heidelberg
QuantiQuest	BD Biosciences, Heidelberg
SPSS Statistics 17.0	SPSS Inc., Chicago, U.S.A.
Sigma Plot 11.0	Systat Software, Chicago, U.S.A.
Microsoft Word 2002	Microsoft Corporation, Redmond, U.S.A.
Microsoft PowerPoint 2002	Microsoft Corporation, Redmond, U.S.A.
Paint (Version 5.1)	Microsoft Corporation, Redmond, U.S.A.

2.7 Immunfärbungen

2.7.1 Durchführung der direkten Immunfärbung

In Vorbereitung auf die direkte Immunfärbung wurde jede Blutprobe auf die Anzahl der Leukozyten im venösen Blut untersucht. Die Bestimmung der Leukozytenzahl erfolgte mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer. Ab einer Leukozytenzahl von 10.000 Zellen/ μ l erfolgte eine Verdünnung der Blutprobe mittels PBS, um eine ausreichende zelluläre Antikörperbindung zu sichern.

Pro Ansatz wurden 100 μ l Blut und je 2,5 μ l bzw. 5 μ l Antikörper für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Danach wurden zu jedem Ansatz 2 ml gebrauchsfertige FACS-Lysing Solution hinzugefügt und erneut für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 5 Minuten bei 250 g zentrifugiert und der Überstand entfernt. Im Anschluss wurden die Zellen zweimal für 5 Minuten bei 250 g mit PBS gewaschen. Bis zur Messung wurden die Ansätze kühl und im Dunkeln gelagert.

Bestimmung der DC

Mittels eines kommerziellen Kits der Firma Miltenyi erfolgte die Bestimmung der DC und deren Subpopulationen aus dem Vollblut. Zur Identifikation der myeloiden DC (MDC1 und MDC2) und plasmazytoiden DC wurde ein Antikörpercocktail der Firma Miltenyi Biotech verwendet (Tab. 7). Pro Ansatz wurden 300 µl Spenderblut, 20 µl des Antikörpers und 10 µl Dead Cell Discriminator für 10 Minuten auf Eis unter einer brennenden 60 Watt Glühbirne inkubiert. Danach wurden 4 ml Red Blood Cell Lysis Solution hinzu gegeben und die Probe für 10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach einmaliger Zentrifugation und Entfernung des Überstandes wurde der Ansatz zweimal mit PBS gewaschen. Zum Schluss wurden dem Ansatz 200 µl Fix-Solution, 5 µl Discriminator Stop Reagent und 600 µl PBS hinzugefügt. Bis zur Messung wurde die Probe dunkel und kühl aufbewahrt.

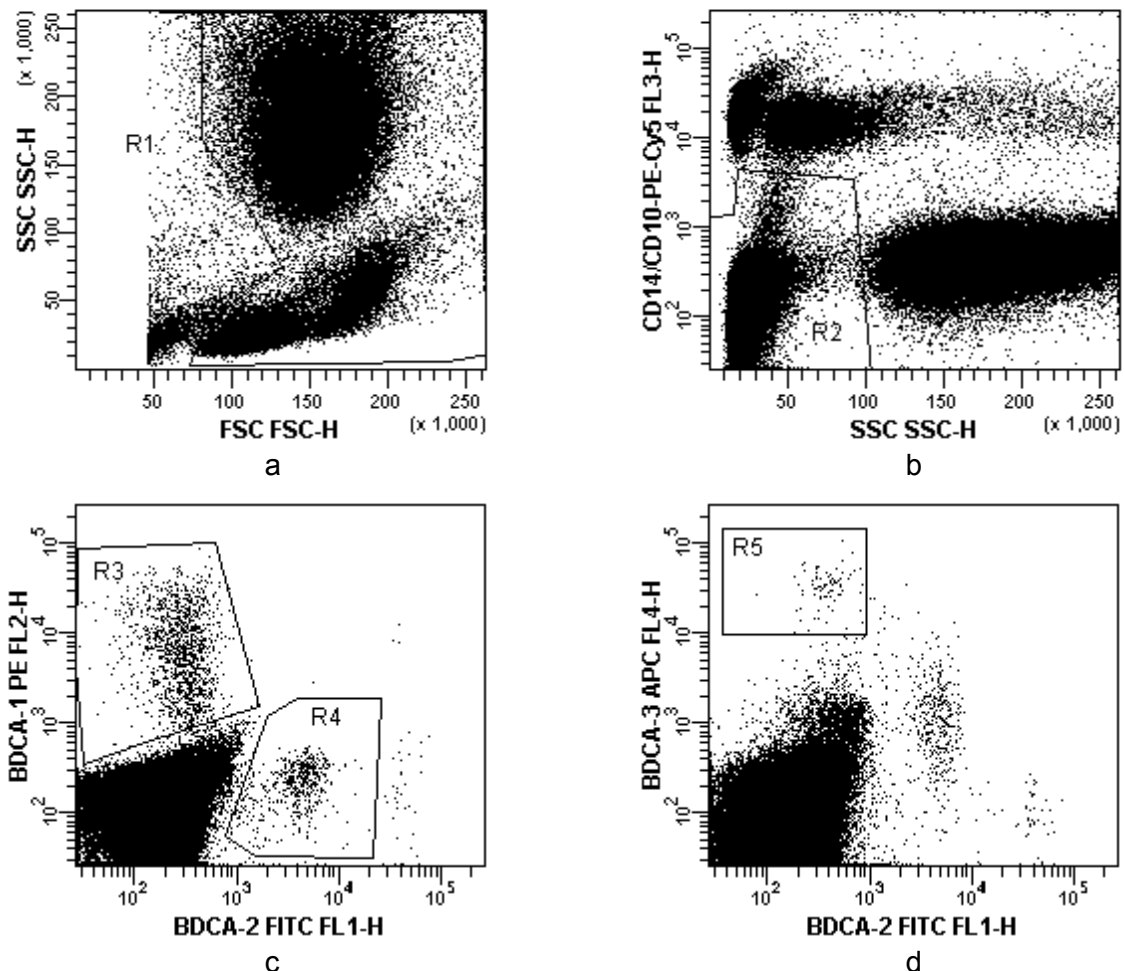


Abb. 3a-d: a.: Streulicht-Dot-Plot zur Diskriminierung von toten Zellen und Zellresten
b.: Dot-Plot zur Exklusion von B-Zellen, Monozyten sowie neutrophile und eosinophile Granulozyten
c.: Dot-Plot zur Identifizierung von PDC und MDC1
d.: Dot-Plot zur Identifizierung der MDC2

Zur Abgrenzung der DC von anderen Zellpopulationen wurde bei der Auswertung der Messung eine komplexe Gatingstrategie benutzt, bei der irrelevante Zellpopulationen ausgegrenzt wurden. Zunächst wurden im Streulicht-Dot-Plot (FSC/SSC) Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten dargestellt und tote Zellen und Zellreste ausgegrenzt (Abb. 3a). Im nächsten Dot-Plot (SSC/FL-3) wurden B-Zellen, Monozyten sowie neutrophile und eosinophile Granulozyten ausgeschlossen (Abb. 3b). Zur Quantifizierung der Subpopulationen der DC wurden anschließend zwei Dot-Plots gezeichnet und FL-1 gegen FL-2 bzw. FL-1 gegen FL-4 aufgetragen (Abb. 3c und d). Mit Hilfe der Isotypenkontrolle konnten die Grenzen der Gates ermittelt werden.

Quantitative Bestimmung der HLA-DR-, CD10/Nepriylisin- und CD13/Aminopeptidase N-Expression

Zur Ermittlung der HLA-DR-, CD10- und CD13-Expression auf Monozyten bzw. Granulozyten wurden spezielle PE- markierte monoklonale Antikörper verwendet. Die PE-Markierung im Verhältnis 1:1 (Protein: Farbstoff) ermöglicht, unter Verwendung von QuantiBRITE-PE-Beads, eine standardisierte Messung der absoluten Anzahl der gebundenen Antikörper auf den Monozyten bzw. Granulozyten.

Für den Ansatz zur Bestimmung der HLA-DR-Expression, der innerhalb von sechs Stunden nach Blutentnahme durchgeführt werden muss, wurden 50 µl Blut und 20 µl des PE-markierten monoklonalen Antikörpers HLA-DR/CD14 für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Für den Ansatz zur Bestimmung der CD10- und CD13-Expression wurden zu je 50 µl Blut 10 µl der Antikörperkonjugate CD10 bzw. CD13 hinzugefügt. Zusätzlich wurde zu dem CD13-Probenansatz 5 µl des Antikörpers CD14 zur Monozyten-Identifizierung hinzugegeben. Die Ansätze wurden für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 2 ml FACS-Lysing Solution zu den Ansätzen hinzugegeben und erneut erfolgte eine Inkubation für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln. Die Probenansätze wurden danach bei 250 g zentrifugiert und die entstandenen Überstände verworfen. Abschließend wurden die Ansätze, mit Ausnahme des HLA-DR-Probenansatzes, zweimalig gewaschen. Danach wurden die Zellen zur Messung in 500 µl PBS resuspendiert.

Die QuantiBRITE-PE-Beads werden in 500 µl FACS-Lysing Solution suspendiert und durchflusszytometrisch analysiert. Aus den gemessenen Fluoreszenzintensitäten der Beads, in Abbildung 4a als geometrische Mittelwerte im Histogramm gezeigt, wird eine lineare Regression (Abb. 4b) ermittelt. Anschließend wurden die HLA-DR-, CD10- bzw. CD13-Messungen durchgeführt und die durchschnittliche Anzahl der gebundenen Antikörper pro Zelle konnte mit Hilfe der QuantiQuest Software berechnet werden.

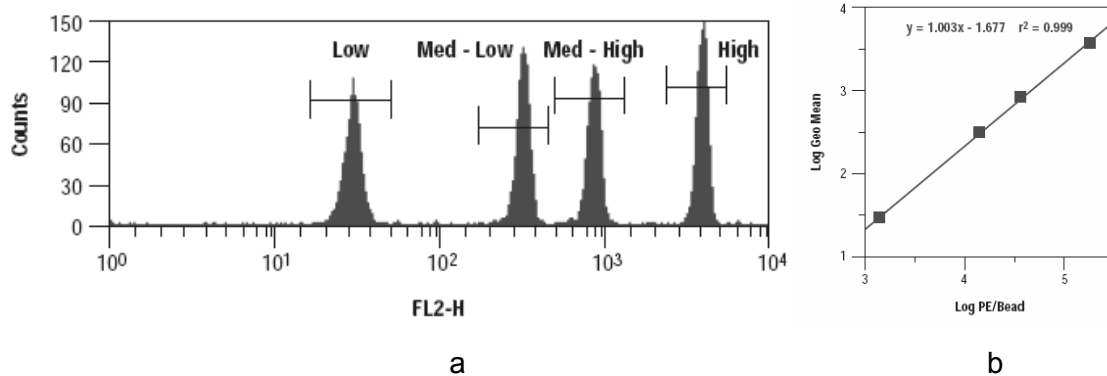


Abb. 4a und b: Histogramm der Anti-HLA-DR-PE-Fluoreszenz. Gezeigt werden die vier Bead-Populationen. Aufgrund der Mittelwerte wird mittels der bekannten PE-Beladung der Beads (chargenabhängig) eine Regressionsgerade erstellt.

2.7.2 Durchführung der intrazellulären Färbungen

Perforin-Färbung

Für die intrazelluläre Färbung von Perforin wurde ein Reagenzien-Set von Serotec genutzt. Zunächst wurde eine direkte Oberflächenfärbung durchgeführt. Danach wurde der Ansatz mit 100 μ l des Fixationsmediums vermengt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz zweimal mit PBS gewaschen. Dann erfolgte eine Zugabe von 100 μ l des Permeabilisierungsmediums sowie je 10 μ l des Antiköpers bzw. Antigens. Nach 30 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde der Ansatz erneut zweimal mit PBS bei 250 g zentrifugiert. Der Ansatz wurde bis zur Messung dunkel und kühl aufbewahrt.

Foxp3-Färbung

Zur Bestimmung des Transkriptionsfaktors Foxp3 und dem Nachweis von regulatorischen T-Zellen wurde ein Kit der Firma eBioscience verwendet. Zuerst wurde eine direkte Oberflächenfärbung CD4/CD25 Antikörpercocktail durchgeführt. Dazu wurden 100 μ l Blut mit 20 μ l Antikörper für 25 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert, anschließend einmalig mit PBS gewaschen und schließlich 1 ml Fixations- und Permeabilisierungslösung hinzugefügt. Daraufhin erfolgte eine Inkubation für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln. Anschließend wurde der Ansatz zweimal mit PBS und einmal mit Permeabilisierungspuffer gewaschen. Danach wurde der Ansatz für 15 Minuten nach Zugabe von 2 μ l Rattenserum inkubiert. Darauf folgend wurden 20 μ l des Antiköpers gegen Foxp3 hinzu gegeben und erneut erfolgte eine Inkubation für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln. Nach zweimaligem Waschen des Ansatzes konnte die durchflusszytometrische Messung erfolgen.

Mit Hilfe des Streulicht-Dot-Plot wurden zunächst die Lymphozyten diskriminiert (Abb. 2a). Anschließend wurde zur Identifikation der Regulatorischen T-Zellen auf CD4+T-Zellen „gegatet“ (Abb. 5a und b).

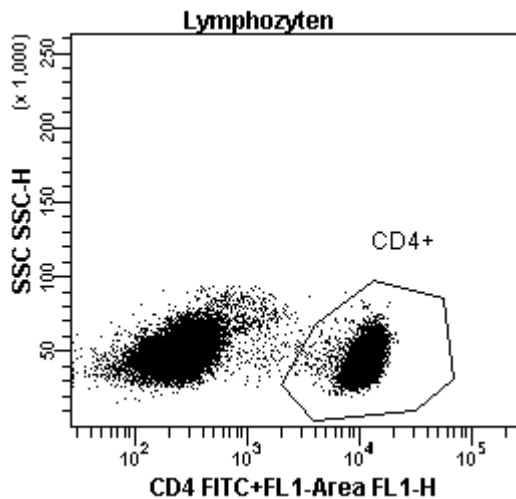


Abb. 5a: Dot-Plot mit Darstellung der CD4+Lymphozyten

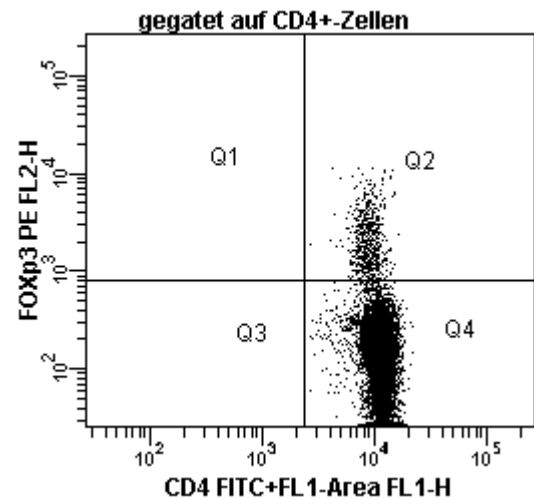


Abb. 5b: Fluoreszenz-Dot-Plot mit Darstellung der Foxp3+ Zellen

2.8 Statistik

Zur Durchführung der statistischen Tests und Erstellung der graphischen Darstellungen wurden die Programme SPSS (Version 17.0) und Sigma Plot 11.0 benutzt. Die Auswertung der Daten begleitete Frau Dr. Susanne Unverzagt, wissenschaftliche Mitarbeiterin des Instituts für Medizinische Epidemiologie, Biometrie und Informatik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Zum Vergleich von normalverteilten Daten wurde der t-Test angewendet, war eine Normalverteilung nicht gegeben, führten wir den U-Test nach Mann und Whitney durch. Zum Vergleich von kategorialen Daten wurde der Chi-Quadrat-Test angewendet. Signifikante Ergebnisse werden in Tabellen und Grafiken mit einem Sternchen (*) hervorgehoben und sind als rein explorativ zu werten. Als zweiseitiges Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Vergleich von Immunzellen im venösen Blut von Patienten und Kontrollpersonen

3.1.1 Gruppencharakteristika

Um Patienten und Kontrollgruppe statistisch vergleichen zu können, haben wir uns bemüht, ein altersäquivalentes Kontrollpersonenkollektiv für die Studie zu gewinnen. Da das Nierenzellkarzinom eine Erkrankung des höheren Lebensalters ist, gestaltete es sich schwierig, eine altersentsprechende Vergleichsgruppe zu rekrutieren. Freiwillige, die das Vorhaben mit einer venösen Blutprobe unterstützten, fanden sich im Laborpersonal, in der Verwandtschaft und in der Mitarbeiterschaft nahe gelegener Institute und waren, das mittlere Alter betreffend, acht Jahre jünger als die Patientengruppe. In Bezug auf die Gruppencharakteristika unterscheiden sich Patienten und Kontrollpersonen signifikant hinsichtlich des Alters ($p = 0,015$) (Tab. 8). Der Anteil an Frauen und Männern ist in beiden Gruppen gleich.

Tab. 8: Gruppencharakteristika von Patienten und Kontrollpersonen

Basischarakteristika	Patienten n = 44	Kontrollen n = 20	p
Alter in Jahren (Median), (Spannweite)	67 (43 – 86)	59 (40-78)	0,015*
Geschlecht, n (%)			
weiblich	20 (45%)	9 (45%)	0,973
männlich	24 (55%)	11 (55%)	

3.1.2 Vergleich der Immunzellen von Patienten und Kontrollpersonen

Zur Charakterisierung von immunologischen Unterschieden zwischen Patienten und Kontrollpersonen, im Hinblick auf die Anzahl und die Oberflächenstruktur immunologischer Zellen und Subpopulationen, wurde eine Vielzahl von Antikörpern verwendet. Die Analyse des venösen Blutes der Kontrollpersonen ergab einen Normalbefund der leukozytären Zellmarker-Expression.

Wie in Tabelle 9 dargestellt, hatten die Patienten höhere Absolutwerte an Leukozyten (7000 Zellen/mm^3) als die gesunden Kontrollpersonen (6260 Zellen/mm^3), vorwiegend aufgrund einer höheren Granulozytenanzahl bei den Patienten. Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant. Die absolute Anzahl an Monozyten war bei den Nierenzellkarzinompatienten höher und die Lymphozytenanzahl geringer als bei der Vergleichsgruppe. Die Zahl der CD16+CD14dim-Monozyten war geringfügig höher im Patientenblut nachweisbar. Die Absolutwerte an DC im Blut der Patienten waren im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen reduziert.

Tab. 9: Absolutwerte der Leukozyten und -subpopulationen: Alle Angaben in Zellen/mm³

Parameter	Patienten	Kontrollgruppe	p
Leukozyten	7000 ± 350	6260 ± 311	0,118
Granulozyten	5103 ± 292	4227 ± 310	0,072
Monozyten	375 ± 21	351 ± 39	0,560
CD16+ Monozyten	34 ± 3,3	25 ± 3,2	0,124
Lymphozyten	1566 ± 103	1671 ± 111	0,538
DC	16 ± 0,9	19 ± 1,7	0,053

Abbildung 6a zeigt die MW ± SE (Standardfehler) der prozentualen Verteilung der Granulo-, Mono- und Lymphozyten im Vergleich von Patienten und Kontrollgruppe. Nierenzellkarzinompatienten wiesen signifikant höhere prozentuale Granulozyten- sowie signifikant geringere prozentuale Lymphozytenanteile auf. Bezüglich der prozentualen Monozytenanteile konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden.

In Abbildung 6b werden die MW ± SE der prozentualen Verteilung der DC und derer Subpopulationen dargestellt. Im Blut der Patienten war im Vergleich zur Kontrollgruppe der Anteil der DC signifikant geringer. Zudem fiel besonders ein signifikant geringerer Anteil der CD1c+ myeloiden DC (MDC1) im Patientenblut auf. In Bezug auf die weiteren Subpopulationen (Anti-BDCA-3+ myeloiden und plasmazytoiden DC) konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

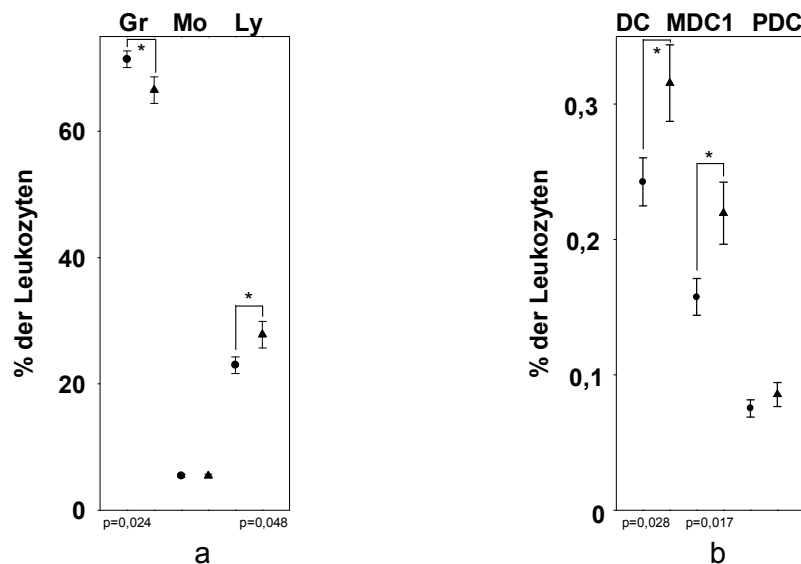


Abb. 6a und b: MW ± SE der prozentualen Verteilung der Granulozyten (Gr), Monozyten (Mo) und Lymphozyten (Ly) bzw. der DC, myeloiden (MDC1) und plasmazytoiden (PDC) DC im Vergleich von Patienten (●) und Kontrollgruppe (▲).

In Bezug auf die Lymphozytensubpopulationen, B-, T- und NK-Zellen, konnten kaum signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen aufgezeigt werden. Dennoch ist, wie in Tabelle 10 aufgeführt, eine tendenziell verringerte Absolutzahl an B-, T- sowie CD4+

und CD8+ T-Zellen in der Patientengruppe nachweisbar. Zusätzlich fiel eine höhere Anzahl an CD57+ T-Zellen und CD57+ NK-Zellen im Blut der Patienten auf. Hervorzuheben ist die höhere absolute Anzahl an CTLA-4+ zytotoxischen T-Zellen und die geringere absolute Anzahl an CD28+ zytotoxischen T-Zellen in der Patientengruppe (Abb. 7a und b). Vergleicht man gleichaltrige Patienten und Kontrollpersonen in Bezug auf ihre Anzahl CD28+ zytotoxischer T-Zellen, so lässt sich der Unterschied nicht nachweisen ($p = 0,712$).

Tab. 10: Absolutwerte der Lymphozytensubpopulationen: Alle Angaben in Zellen/mm³
Mittelwert \pm SE

Parameter	Patienten	Kontrollgruppe	p
B-Zellen	152 \pm 15	197 \pm 21	0,086
T-Zellen	1145 \pm 83	1251 \pm 90	0,442
CD8+ T-Zellen	373 \pm 32	434 \pm 50	0,292
CD4+ T-Zellen	756 \pm 59	817 \pm 68	0,541
NK-Zellen	254 \pm 25	223 \pm 27	0,450
V α 24 (NKT)	9,2 \pm 1,5	8,2 \pm 1,6	0,667
CD28+ T- Zellen	897 \pm 61	1035 \pm 72	0,181
CD8+CD28+ T-Zellen	210 \pm 17	273 \pm 26	0,043*
ICOS+ T-Zellen	24 \pm 4,8	25 \pm 4,2	0,892
CD25+ T-Zellen	374 \pm 33	389 \pm 42	0,778
CD4+CD25+ T-Zellen	264 \pm 29	233 \pm 35	0,559
CD4+Foxp3+ T-Zellen	44 \pm 5,6	45 \pm 7	0,923
CD57+ T-Zellen	262 \pm 34	215 \pm 41	0,416
PD1+ T-Zellen	192 \pm 24	180 \pm 24	0,757
CTLA-4+ T-Zellen	19 \pm 3,7	16 \pm 7,1	0,731
CD8+CTLA-4+ T-Zellen	6,1 \pm 0,9	2,8 \pm 0,9	0,016*
CXCR3+ T-Zellen	555 \pm 56	538 \pm 48	0,850
CD57+ NK-Zellen	165 \pm 21	115 \pm 15	0,057

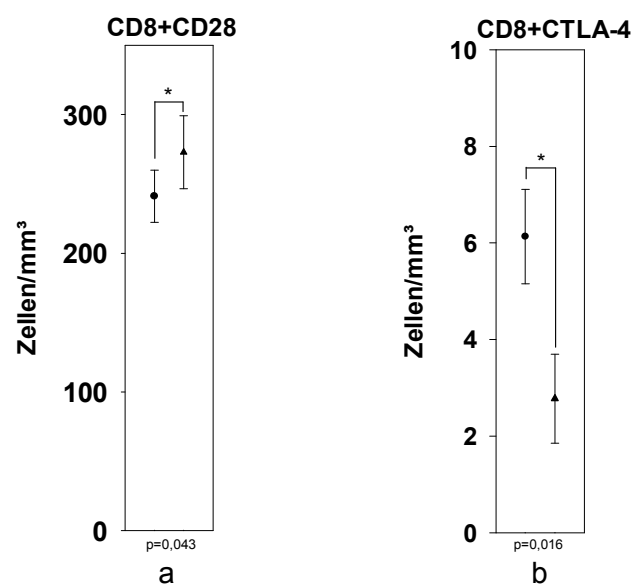


Abb. 7a und b: MW \pm SE der CD28+ zytotoxischen T-Zellen bzw. CTLA-4+ zytotoxischen T-Zellen im Vergleich von Patienten (●) und Kontrollgruppe (▲).

Die Granulozyten/Lymphozyten-Ratio der Patienten betrug $3,9 \pm 0,4$ (Spannweite 1,25 – 14,44) und die der Normalpersonen $2,9 \pm 0,4$ (Spannweite 0,96 – 7,85) ($p = 0,101$) (Abb. 8a). 19% der Patienten und 10% der Normalpersonen zeigten eine hohe Granulozyten/Lymphozyten-Ratio (≥ 5).

Bezüglich der Granulozyten/DC-Ratio unterschieden sich Patienten und Kontrollpersonen signifikant ($p = 0,002$) (Abb. 8b). Die Granulozyten/DC-Ratio der Nierenzellkarzinompatienten betrug 379 ± 31 (Spannweite 105 – 942) und die der gesunden Freiwilligen 250 ± 25 (Spannweite 109 – 501).

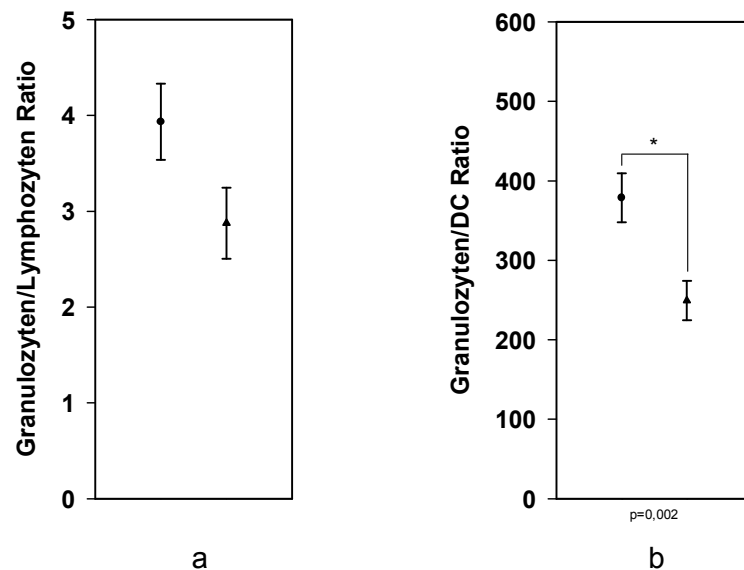


Abb. 8a und b: MW \pm SE der Granulozyten/Lymphozyten-Ratio bzw. Granulozyten/DC-Ratio* im Vergleich von Patienten (●) und Kontrollgruppe (▲).

Die regulatorischen T-Zellen, denen eine immunsuppressive Wirkung auf tumorreaktive T-Lymphozyten zugeschrieben wird (Griffiths et al., 2007) und die mittels intrazellulärer Foxp3-Färbung bestimmt werden, waren nicht unterschiedlich. Das heißt, wir konnten bei der Quantifizierung der regulatorischen T-Zellen, unter Zuhilfenahme des intrazellulären Moleküls Foxp3, keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollpersonen feststellen.

Die Intensität der HLA-DR-Expression auf Monozyten war bei den Patienten niedriger als bei der Kontrollgruppe. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

Hinsichtlich der CD10 Expression auf Granulozyten und der CD13 Expression auf Monozyten bzw. Granulozyten konnte zwischen den beiden Gruppen kein deutlicher Unterschied gemessen werden (Tab. 11).

Tab. 11: Mittlere HLA-DR-, CD10-, und CD13-Expression in ABC (Antibodies bound per cell)

Parameter	Patienten	Kontrollgruppe	p
HLA-DR auf Monozyten	28 586 ± 1876	34 192 ± 2464	0,089
CD10 auf Granulozyten	4566 ± 423	4252 ± 452	0,654
CD13 auf Monozyten	24 677 ± 2135	25 896 ± 2711	0,740
CD13 auf Granulozyten	14 554 ± 856	15 374 ± 1310	0,598

3.2 Untersuchung von Immunzellen unter Berücksichtigung des Tumorstadiums

3.2.1 Gruppencharakteristika (pT1a vs. pT1b)

Um herauszufinden, ob das Tumorstadium einen messbaren Einfluss auf die Anzahl der Immunzellen der Patienten hat, wurden die präoperativ erhobenen Messwerte der Nierenzellkarzinompatienten im Tumorstadium pT1a und pT1b verglichen, wobei im Tumorstadium pT1b der Tumor bis zu 3 cm größer ist als im Tumorstadium pT1a. In den Gruppencharakteristika (Tab. 12) unterscheiden sich die beiden Patientengruppen signifikant bezüglich des Gradings. Patienten im Tumorstadium pT1b unterzogen sich signifikant häufiger einer radikalen Nephrektomie, währenddessen Patienten im Tumorstadium pT1a eher mittels minimal-invasiver Chirurgie operiert wurden.

Tab. 12: Gruppencharakteristika der Patienten unter Berücksichtigung des Tumorstadiums (pT1a vs. pT1b)

Basischarakteristika	pT1a n = 13	pT1b n = 13	p
Alter in Jahren (Median), (Spannweite)	64 (45 – 86)	67 (43 - 80)	0,810
Geschlecht, n (%)			
weiblich	5 (38,5%)	7 (54%)	0,595
männlich	8 (61,5%)	6 (46%)	
Grading, n (%)			
G1	3 (23%)	4 (31%)	0,009*
G2	10 (77%)	8 (61%)	
G3	0 (0%)	1 (8%)	
Histologie, n (%)			
klarzellig	10 (77%)	12 (92%)	0,270
papillär	2 (15%)	1 (8%)	
chromophob	1 (8%)	0 (0%)	
Operationsausmaß, n (%)			
Nephrektomie	5 (69%)	11 (85%)	0,018*
Teilresektion	8 (31%)	2 (15%)	
Operationstechnik, n (%)			
Laparoskopisch	6 (46%)	7 (54%)	0,148
Offen	7 (54%)	6 (46%)	

3.2.2 Vergleich der Immunzellen von Patienten im Tumorstadium pT1a und pT1b

Die in Tabelle 13 aufgeführten Messdaten zeigen, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen eruiert ist. Schlussfolgernd besteht kein Zusammenhang in Bezug auf das Tumorstadium und die phänotypische Charakterisierung immunologischer Zellen im peripheren Blut der Patienten im Tumorstadium pT1a und pT1b.

Tab. 13: Absolutwerte der Lymphozytensubpopulationen: Alle Angaben in Zellen/mm³
MW ± SE

Parameter	pT1a	pT1b	p
Leukozyten	6210 ± 553	6085 ± 622	0,884
Granulozyten	4380 ± 487	4636 ± 586	0,740
Monozyten	330 ± 38	306 ± 21	0,596
CD16+ Monozyten	38 ± 7,3	26 ± 3,7	0,163
DC	16,3 ± 2,0	16,5 ± 1,4	0,942
Lymphozyten	1494 ± 193	1407 ± 98	0,693
B-Zellen	125 ± 20	155 ± 19	0,283
T-Zellen	1088 ± 176	1038 ± 93	0,807
CD8+ T-Zellen	351 ± 66	401 ± 54	0,561
CD4+ T-Zellen	682 ± 113	637 ± 63	0,735
NK-Zellen	229 ± 49	214 ± 24	0,795
Vα24 (NKT)	7,8 ± 2,3	9,3 ± 3,0	0,700
CD28+ T- Zellen	873 ± 135	813 ± 72	0,708
CD8+CD28+ T-Zellen	207 ± 31	240 ± 37	0,494
ICOS+ T-Zellen	30 ± 10	24 ± 11	0,707
CD25+ T-Zellen	324 ± 60	310 ± 49	0,862
CD4+CD25+ T-Zellen	292 ± 64	261 ± 43	0,691
CD4+Foxp3+ T-Zellen	47 ± 13	37 ± 8,1	0,524
CD57+ T-Zellen	250 ± 63	230 ± 54	0,807
PD1+ T-Zellen	187 ± 43	198 ± 42	0,863
CTLA-4+ T-Zellen	21 ± 7,1	14 ± 5,1	0,402
CD8+CTLA-4+ T-Zellen	7,3 ± 2,1	6,7 ± 2,0	0,858
CXCR3+ T-Zellen	557 ± 111	467 ± 60	0,494
CD57+ NK-Zellen	142 ± 41	135 ± 20	0,874

Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tumorsubstadien pT1a und pT1b konnten bei der Bestimmung der HLA-DR-, CD10- und CD13-Expression auf Mono- bzw. Granulozyten festgestellt werden (Tab. 14).

Tab. 14: Mittlere HLA-DR-, CD10-, und CD13-Expression in ABC

Parameter	pT1a	pT1b	p
HLA-DR auf Monozyten	31 853 ± 2797	32 333 ± 4034	0,923
CD10 auf Granulozyten	5599 ± 839	4115 ± 752	0,200
CD13 auf Monozyten	21 519 ± 3417	17 411 ± 2148	0,321
CD13 auf Granulozyten	15 489 ± 1745	12 224 ± 1293	0,146

3.2.3 Gruppencharakteristika (< pT3 vs. ≥ pT3)

Von den insgesamt 44 operierten Patienten bestand bei 32 Patienten eine noch auf die Niere begrenzte bösartige Neubildung. Bei 12 Patienten wurde die Diagnose eines fortgeschrittenen Tumorleidens gestellt. Die Patientenkollektive unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Gruppencharakteristika (Tab. 15) nicht signifikant.

Tab. 15: Gruppencharakteristika der Patienten unter Berücksichtigung des Tumorstadiums (< pT3 vs. ≥ pT3)

Basischarakteristika	< pT3 n = 32	≥ pT3 n = 12	p
Alter in Jahren (Median), (Spannweite)	66 (45 – 86)	67 (59 - 77)	0,346
Geschlecht, n (%)			
weiblich	15 (47%)	5 (42%)	0,757
männlich	17 (53%)	7 (58%)	
Tumorstadium, n (%)			
pT1a	14 (44%)	-	-
pT1b	12 (37%)	-	
pT2	6 (19%)	-	
pT3a	-	5 (42%)	
pT3b	-	7 (58%)	
Grading, n (%)			
G1	8 (25%)	1 (8%)	0,120
G2	21 (66%)	17 (58%)	
G3	3 (9%)	4 (33%)	
Histologie, n (%)			
klarzellig	26 (81%)	12 (100%)	0,384
papillär	3 (10%)		
klarzellig/papillär	1 (3%)		
chromophob	1 (3%)		
unklassifiziert	1 (3%)		
Operationsausmaß, n (%)			
Nephrektomie	22 (69%)	11 (92%)	0,240
Teilresektion	10 (31%)	1 (8%)	
Operationstechnik, n (%)			
Laparoskopisch	15 (47%)	2 (17%)	0,090
Offen	17 (53%)	10 (83%)	

3.2.4 Vergleich der Immunzellen von Patienten im Tumorstadium < pT3 und ≥ pT3

Patienten im fortgeschrittenen Tumorstadium wiesen eine signifikant höhere Absolutzahl an Leukozyten auf (Tab. 16). Diese Erhöhung resultiert am wahrscheinlichsten aus der ebenfalls signifikant gesteigerten Granulozytenanzahl (Abb. 9a). Die Anzahl der Monozyten im peripheren Blut der Patienten im Tumorstadium ≥ pT3 war ebenfalls signifikant höher, hingegen die Anzahl der DC erniedrigt (Abb. 9b). Aufgrund der Messdaten ist ein Zusammenhang zwischen fortgeschrittenem Tumorstadium und Leukozytenanzahl anzunehmen.

Tab. 16: Absolutwerte der Lymphozytensubpopulationen: Alle Angaben in Zellen/mm³
MW ± SE

Parameter	< pT3	≥ pT3	p
Leukozyten	6503 ± 402	8342 ± 563	0,017*
Granulozyten	4702 ± 354	6139 ± 385	0,025*
Monozyten	349 ± 23	440 ± 42	0,046*
CD16+ Monozyten	34 ± 3,9	33 ± 6,0	0,912
DC	16,6 ± 1,1	13,0 ± 1,7	0,087
Lymphozyten	1490 ± 110	1760 ± 237	0,247
B-Zellen	144 ± 13	169 ± 41	0,574
T-Zellen	1088 ± 92	1292 ± 181	0,279
CD8+ T-Zellen	376 ± 39	364 ± 59	0,858
CD4+ T-Zellen	689 ± 60	928 ± 139	0,070
NK-Zellen	237 ± 29	299 ± 51	0,277
Vα24 (NKT)	8,8 ± 1,6	10,5 ± 3,7	0,608
CD28+ T- Zellen	872 ± 72	962 ± 115	0,513
CD8+CD28+ T-Zellen	216 ± 21	196 ± 24	0,526
ICOS+ T-Zellen	26 ± 6,0	17 ± 4,0	0,395
CD25+ T-Zellen	348 ± 37	439 ± 68	0,218
CD4+CD25+ T-Zellen	314 ± 40	343 ± 62	0,698
CD4+Foxp3+ T-Zellen	45 ± 7,0	42 ± 9,0	0,802
CD57+ T-Zellen	239 ± 35	320 ± 83	0,294
PD1+ T-Zellen	186 ± 25	207 ± 58	0,709
CTLA-4+ T-Zellen	18 ± 4,0	20 ± 9,0	0,793
CD8+CTLA-4+ T-Zellen	6,6 ± 1,2	5,0 ± 1,6	0,481
CXCR3+ T-Zellen	530 ± 58	620 ± 138	0,480
CD57+ NK-Zellen	146 ± 24	209 ± 39	0,175

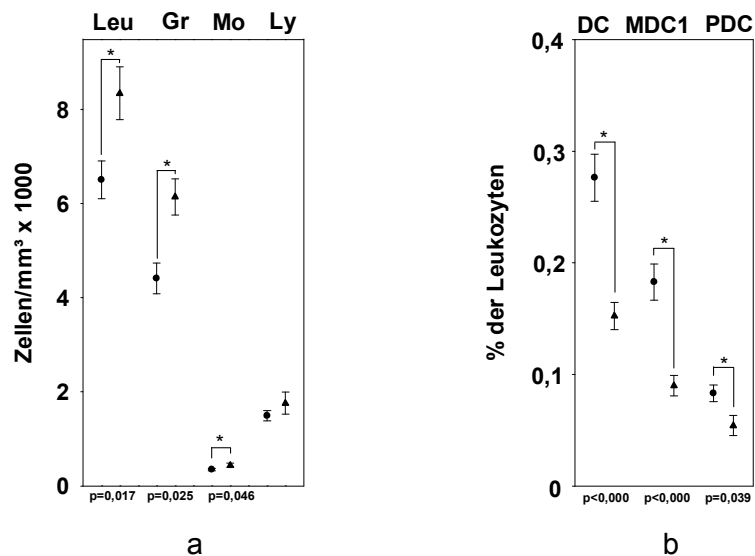


Abb. 9a und b: MW ± SE der Leukozyten-, Granulozyten-, Monozyten- und Lymphozytenanzahl bzw. DC, myeloide und plasmazytoide DC in Abhängigkeit vom Tumorstadium (< pT3 (●) vs. ≥ pT3 (▲))

Kein nennenswerter Unterschied wurde bei der Bestimmung der T-, B- sowie NK-Zellzahl in Abhängigkeit vom Tumorstadium ermittelt. Zu bemerken ist, dass tendenziell eine höhere absolute Anzahl an CD4+T-Zellen sowie CD4+CD25+T-Zellen bei Patienten mit ausgedehntem Tumorbefund gemessen wurden. Hinsichtlich der Expression von CTLA-4+, PD1+ und CXCR3+ auf T-Zellen ist zu sagen, dass diese Oberflächenmarker im Tumorstadium \geq pT3 höhere Messwerte erreichten, jedoch diese Unterschiede nicht signifikant waren.

Die Anzahl der V α 24+ NKT-Zellen war geringfügig höher im Blut von Patienten mit fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom. Zudem ist erwähnenswert, die höhere Anzahl an CD57+ T-Zellen und CD57+ NK-Zellen im peripheren Blut von Patienten mit höherem (\geq pT3) Tumorstadium (Abb. 10).

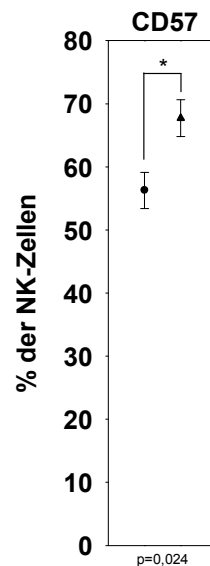


Abb. 10: MW \pm SE der CD57+ NK-Zellen in Abhängigkeit vom Tumorstadium (< pT3 (●) vs. \geq pT3 (▲)).

Die präoperative Granulozyten/Lymphozyten-Ratio der Patienten im Tumorstadium < pT3 war $3,8 \pm 0,5$ (Spannweite 1,25 – 14,44) und im Tumorstadium \geq pT3 $4,3 \pm 0,6$ (Spannweite 1,9 – 8,59) ($p = 0,607$) (Abb. 11a). Die postoperative Granulozyten/Lymphozyten-Ratio der Patienten im Tumorstadium < pT3 war $7,9 \pm 0,8$ (Spannweite 3,4 – 22,62) und im Tumorstadium \geq pT3 $6,9 \pm 1,0$ (Spannweite 3,24 – 17,47) ($p = 0,394$).

Die Granulozyten/DC-Ratio der Patienten im Tumorstadium < pT3 betrug 318 ± 30 (Spannweite 105 – 733) und im Tumorstadium \geq pT3 535 ± 60 (Spannweite 315 – 942) ($p = 0,001$) (Abb. 11b).

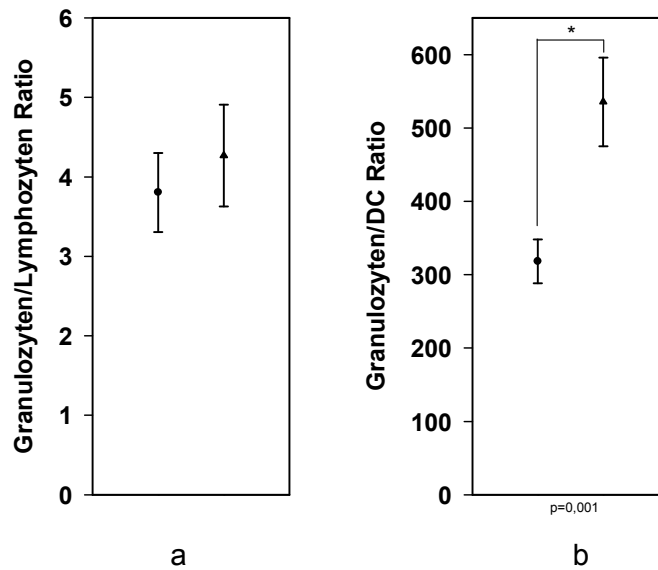


Abb. 11a und b: MW ± SE der Granulozyten/Lymphozyten-Ratio bzw. Granulozyten/DC-Ratio* im Vergleich von Patienten im Tumorstadium < pT3 (•) und im Tumorstadium ≥ pT3 (▲).

Die Intensität der CD13-Expression auf Monozyten (Tab. 17) war bei Patienten mit fortgeschrittenem Tumorstadium signifikant ($p = 0,000$) erhöht. Dagegen war die HLA-DR-Expression bei Patienten mit einem Tumorstadium ≥ pT3 signifikant ($p = 0,020$) vermindert (Abb. 12). Eine Korrelation von Tumorstadium und HLA-DR- und CD13-Expression auf Monozyten ist somit nachweisbar.

Die CD10-Expression auf Granulozyten war bei Patienten mit Tumorstadium ≥ pT3 moderat geringer, die CD13-Expression auf Granulozyten hingegen geringfügig höher im Vergleich zu Patienten mit Tumorstadium < pT3.

Tab. 17: Mittlere HLA-DR-, CD10-, und CD13-Expression in ABC

Parameter	<pT3	≥pT3	p
HLA-DR auf Monozyten	31 215 ± 2214	21 576 ± 2728	0,020*
CD10 auf Granulozyten	4708 ± 494	4188 ± 841	0,589
CD13 auf Monozyten	19 926 ± 1897	37 345 ± 4272	0,000*
CD13 auf Granulozyten	13 992 ± 984	16 054 ± 1716	0,289

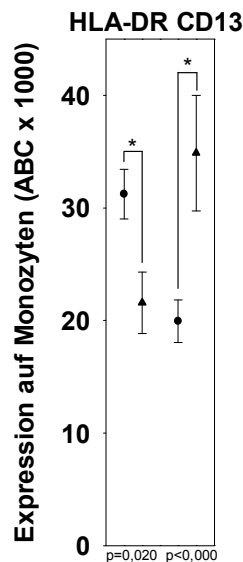


Abb. 12: MW \pm SE der HLA-DR- und CD13 Expression auf Monozyten in Abhängigkeit vom Tumorstadium (< pT3 (●) vs. \geq pT3 (▲)).

3.3 Vergleich von Immunzellen laparoskopisch und konventionell operierter Patienten

3.3.1 Gruppencharakteristika

Die Zuordnung der Patienten zum jeweiligen Operationsverfahren erfolgte nicht randomisiert. Der Operateur entschied anhand präoperativer Gesichtspunkte über die Art der durchzuführenden Operationsmethode bei den als resektabel eingeschätzten Tumoren. Entscheidende Faktoren für die Verfahrenswahl sind die größenmäßige Ausdehnung des Tumors sowie Vorerkrankungen der Patienten. Zur Zeit der Studie wurden Nierentumore mit einer Größe von bis zu 6 cm als onkologisch sicher laparoskopisch resektabel eingestuft.

Auffällig ist, dass in der Gruppe der minimal-invasiv Operierten sich signifikant mehr weibliche Patienten befinden. Um herauszufinden, wie das Immunsystem auf die zwei unterschiedlichen operativen Verfahren reagiert und welche Zeit bis zur Normalisierung der immunologischen Parameter vergeht, wurde präoperativ sowie am ersten, dritten und siebten postoperativen Tag venöses Blut den Patienten entnommen.

Die präoperativ erhobenen immunologischen Parameter zeigen, bis auf eine höhere Anzahl an CD57+ T-Zellen in der Laparotomiegruppe im Vergleich zur Laparoskopiegruppe, keine signifikanten Unterschiede.

In Tabelle 18 sind die Basischarakteristika der Gruppen aufgeführt.

Tab. 18: Gruppencharakteristika der laparoskopisch und konventionell operierten Patienten.

Basischarakteristika	Laparoskopisch n = 17	Offen n = 27	p
Alter in Jahren (Median), (Spannweite)	66 (45 – 86)	67 (43-77)	0,966
Geschlecht, n (%)			
weiblich	11 (65%)	9 (33%)	0,042*
männlich	6 (35%)	18 (67%)	
Tumorstadium, n (%)			
pT1a	6 (35%)	7 (26%)	0,351
pT1b	7 (41%)	6 (22%)	
pT2	2 (12%)	4 (15%)	
pT3a	1 (6%)	4 (15%)	
pT3b	1 (6%)	6 (22%)	
Grading, n (%)			
G1	3 (18%)	5 (18%)	0,730
G2	12 (70%)	16 (59%)	
G3	2 (12%)	6 (22%)	
Histologie, n (%)			
klarzellig	13 (76%)	25 (93%)	0,195
papillär	1 (6%)	2 (7%)	
klarzellig/papillär	1 (6%)		
chromophob	1 (6%)		
unklassifiziert	1 (6%)		
Operationsausmaß, n (%)			
Nephrektomie	15 (88%)	18 (67%)	0,158
Teilresektion	2 (12%)	9 (33%)	

3.3.2 Postoperativer Vergleich von Immunzellen laparoskopisch und konventionell-offen operierter Patienten

Die mittlere stationäre Behandlungsdauer war in der Laparotomiegruppe ($12,3 \pm 0,6$ Tage) signifikant länger als in der Laparoskopiegruppe ($10,0 \pm 0,6$ Tage) ($p = 0,016$). Damit dieser Unterschied nicht nur durch eine höhere Anzahl an Patienten im bereits fortgeschrittenen Tumorstadium in der Laparotomiegruppe entsteht, haben wir auch die Krankenhausverweildauer der Patienten im Tumorstadium pT1-2 betrachtet. Die gleiche Aussage lässt sich tendenziell statistisch auch für diese Subpatientengruppe sichern. Patienten, die minimal-invasiv operiert wurden, profitieren von einem kürzeren stationären Aufenthalt ($9,9 \pm 0,6$ Tage) im Gegensatz zu den konventionell operierten Patienten ($11,5 \pm 0,6$ Tage) ($p = 0,076$).

Die deutlichsten quantitativen Veränderungen der immunologischen Marker im Blut der Nierenzellkarzinompatienten ließen sich am ersten postoperativen Tag messen. Im weiteren postoperativen Verlauf stellte sich bald eine Normalisierung der immunologi-

schen Werte ein, wobei dies rascher in der Patientengruppe mit minimal-invasivem Operationsverfahren geschah. Viele Patienten (65%) reagierten postoperativ mit einem Anstieg der Leukozytenanzahl (Abb. 13a und b), hauptsächlich verursacht durch eine kurzzeitige Erhöhung der Granulozytenanzahl. Dieser Anstieg war signifikant ($p = 0,017$) höher in der Laparotomiegruppe (Abb. 14a und b). Die absolute Granulozytenanzahl stieg am ersten postoperativen Tag auf 142% (Tab. 19) des präoperativen Niveaus im Falle der konventionell und auf 113% (Tab. 19) der laparoskopisch Operierten. Des Weiteren fiel die Lymphozytenanzahl in beiden Patientengruppen ähnlich stark am ersten postoperativen Tag ab (Abb. 15a und b). Die Anzahl der Monozyten stieg in beiden Patientengruppen nach der Operation an. In der offen operierten Gruppe normalisierte sich die absolute Anzahl im postoperativen Verlauf. Die Patienten, die dem laparoskopischen Operationsverfahren zugeführt wurden, zeigten einen moderaten, konstanten Anstieg der absoluten Anzahl an Monozyten, so dass sich die beiden Patientengruppen diesbezüglich am dritten postoperativen Tag signifikant ($p = 0,041$) unterschieden (Abb. 16a und b).

Die Anzahl der DC fiel nach dem operativen Eingriff in beiden Patientengruppen ab. In der Laparotomiegruppe ist sogar noch am siebten postoperativen Tag ($p = 0,001$) ein Rückgang der DC zu beobachten, währenddessen sich die Zellzahl der DC in der Laparoskopiegruppe tendenziell dem Ausgangsniveau wieder annähert (Abb. 17a und b).

Tab. 19: Absolutwerte der Lymphozytensubpopulationen in Abhängigkeit vom Operationsverfahren. Die Parameter wurden präoperativ (d0), am ersten (d1), dritten (d3) und siebten (d7) postoperativen Tag erhoben. Alle Angaben in Zellen/mm³ MW \pm SE bzw. in % von d0 ausgehend.

Parameter	OP-Technik	d0	d1	d3	d7
			(% von d0)	(% von d0)	(% von d0)
Leukozyten	offen	7244 \pm 426	124	116	114
	laparoskopisch	6620 \pm 610	108	103	111
Granulozyten	offen	5134 \pm 330	142	122	121
	laparoskopisch	5050 \pm 570	113	100	98
Monozyten	offen	370 \pm 29	124	108	111
	laparoskopisch	382 \pm 28	126	134	142
CD16+ Monozyten	offen	34 \pm 4	79	88	85
	laparoskopisch	33 \pm 6	97	124	136
DC	offen	16 \pm 1	94	87,5	81
	laparoskopisch	15 \pm 2	73	113	133
Lymphozyten	offen	1650 \pm 136	62	89	102
	laparoskopisch	1423 \pm 154	70	80	107

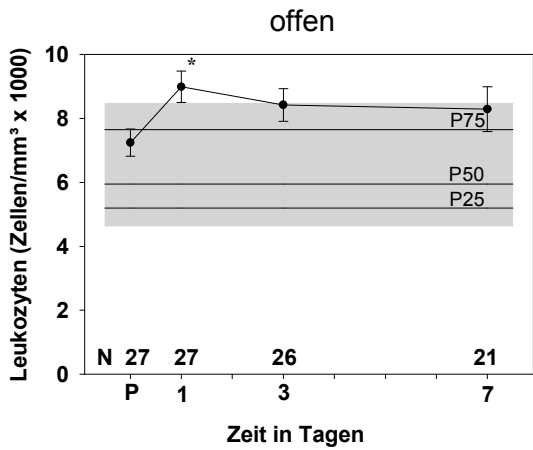


Abb. 13a

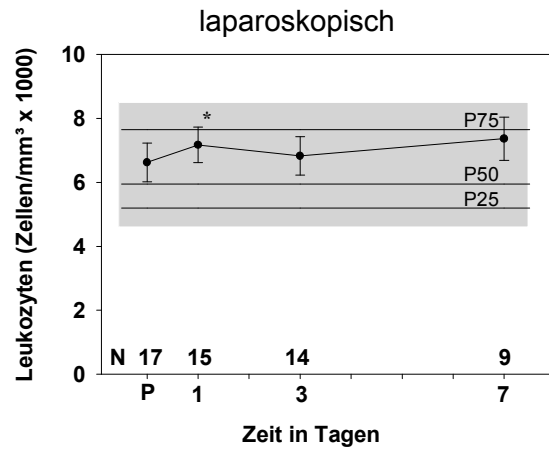


Abb. 13b

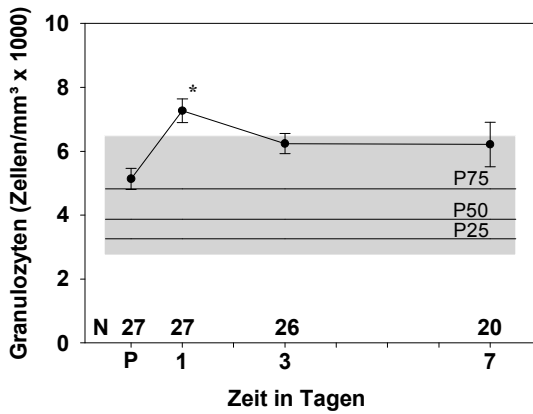


Abb. 14a

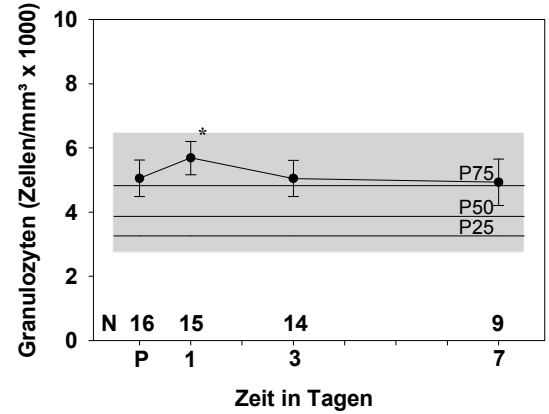


Abb. 14b

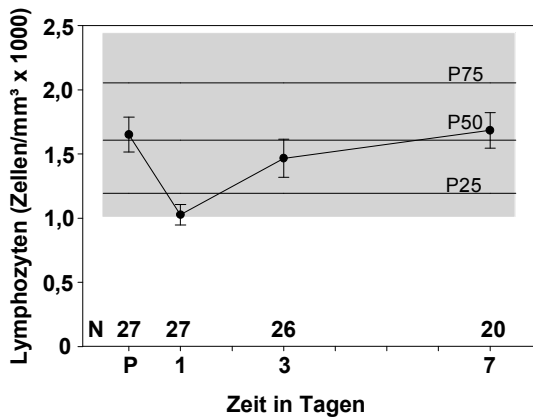


Abb. 15a

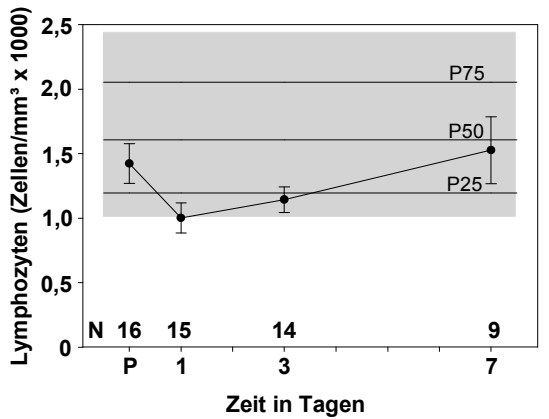


Abb. 15b

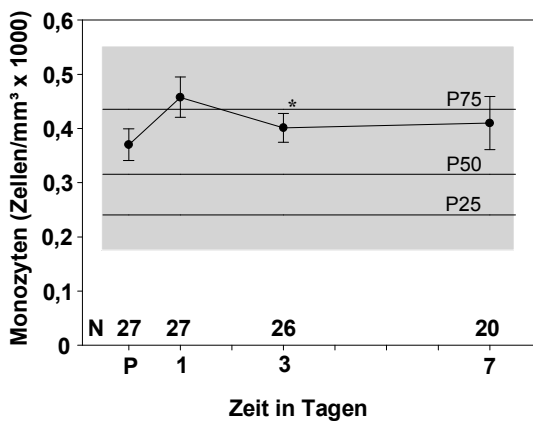


Abb. 16a

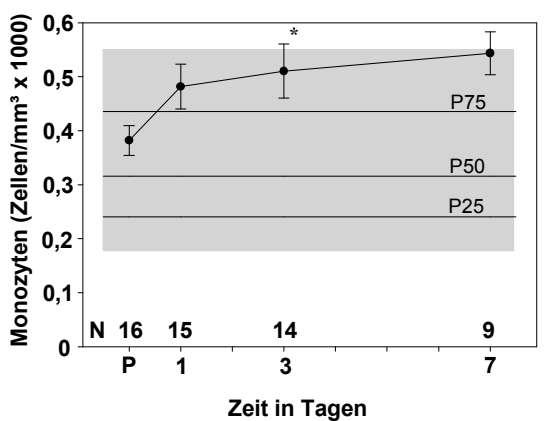


Abb. 16b

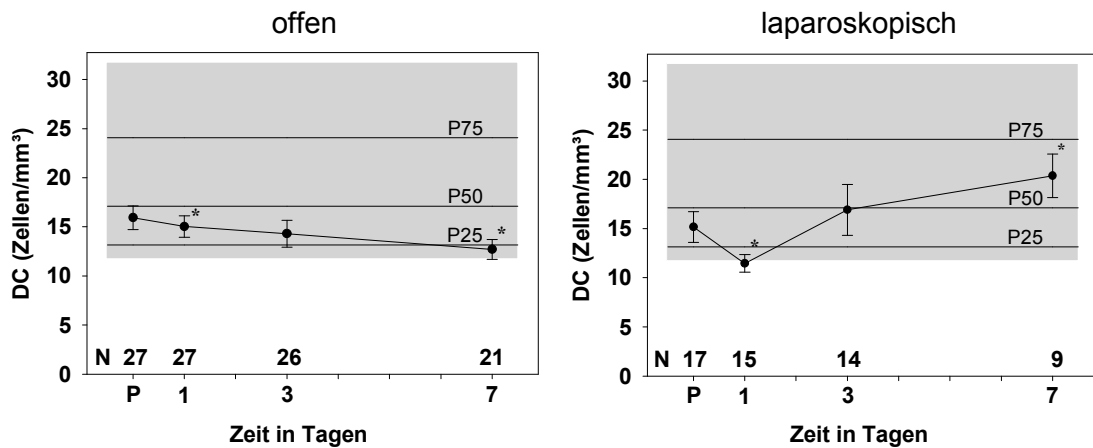


Abb. 17a

Abb. 17b

Abb. 13-17a und b: Vergleich konventionell-offen und laparoskopisch operierter RCC-Patienten (N = Anzahl der Patienten). Die Werte der gesunden Vergleichsgruppe (grau hinterlegt) werden als Perzentile mit P10, P25, P50, P75 und P90 angegeben. Die absolute Zellzahl wird als MW ± SE dargestellt. Das Sternchen kennzeichnet signifikante Messwerte zwischen beiden Gruppen.

Hinsichtlich der Anzahl der B-, T- und NK-Zellen ist zu erwähnen, dass die Zellzahl dieser Lymphozytensubpopulationen postoperativ auf ca. 50-80% des Ausgangsniveaus sinkt. Während des weiteren stationären Aufenthaltes der Patienten ist eine Normalisierung der Werte zu beobachten. Die funktionellen Subpopulationen der T-Zellen zeigten ebenfalls einen quantitativen Abfall am ersten postoperativen Tag (Tab. 20).

Die postoperative Granulozyten/Lymphozyten-Ratio der Patienten mit konventionell-offenem OP-Verfahren war $8,1 \pm 0,7$ (Spannweite 3,62 – 17,47) und die der Patienten mit minimal-invasivem OP-Verfahren $6,9 \pm 1,2$ (Spannweite 2,51 – 22,62) ($p = 0,348$). Postoperativ stieg die Granulozyten/Lymphozyten-Ratio auf 212% bei Patienten mit konventionell-offenem OP-Verfahren und bei Patienten mit minimal-invasivem OP-Verfahren auf 166% an. Somit wurde in beiden Gruppen eine hohe Granulozyten/Lymphozyten-Ratio postoperativ beobachtet (Abb. 18a und b).

Die postoperative Granulozyten/DC-Ratio der Patienten mit konventionell-offenem OP-Verfahren war 534 ± 40 (Spannweite 228 – 1143) und stieg auf 150% des präoperativen Niveaus an. Die Patienten mit minimal-invasivem OP-Verfahren zeigten eine postoperative Granulozyten/DC-Ratio von 516 ± 38 (Spannweite 311 – 748) ($p = 0,657$), das einen Anstieg auf 130% bedeutet. Im weiteren postoperativen Verlauf erreichten die laparoskopisch operierten Patienten rasch eine Normalisierung der Granulozyten/DC-Ratio. Im Gegensatz dazu zeigten die Patienten mit Laparotomie selbst noch am dritten ($p = 0,07$) und siebten ($p = 0,030$) postoperativen Tag eine hohe Granulozyten/DC-Ratio (Abb. 19a und b).

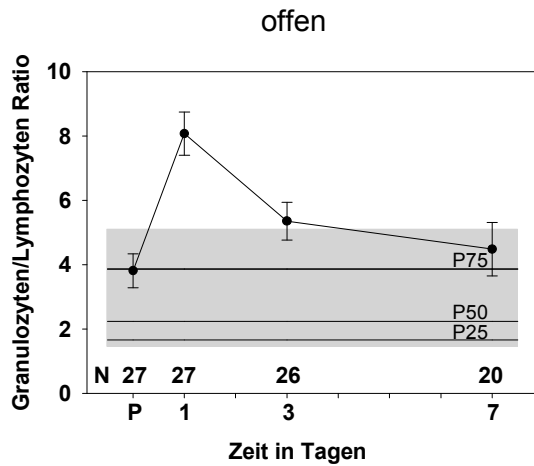


Abb. 18a

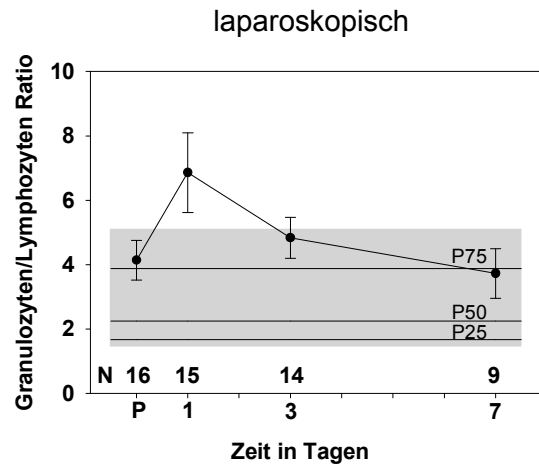


Abb. 18b

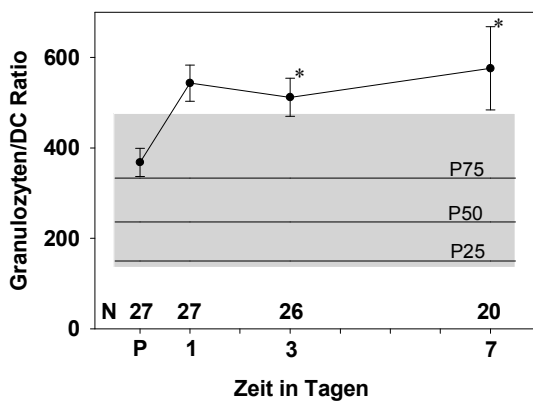


Abb. 19a

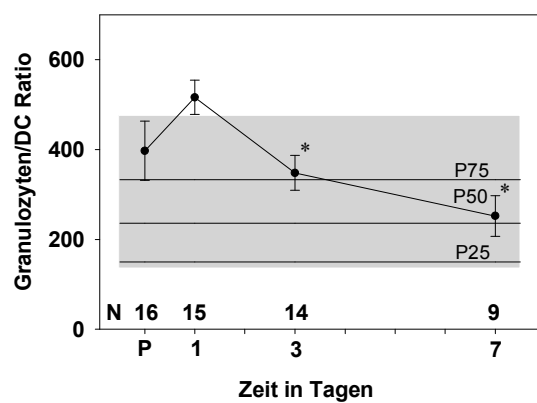


Abb. 19b

Abb. 18 -19a und b: Vergleich konventionell-offen und laparoskopisch operierter RCC-Patienten (N = Anzahl der Patienten). Die Werte der gesunden Vergleichsgruppe (grau hinterlegt) werden als Perzentile mit P10, P25, P50, P75 und P90 angegeben. Die Granulozyten/Lymphozyten-Ratio bzw. Granulozyten/DC-Ratio wird als Mittelwert \pm SE dargestellt. Das Sternchen kennzeichnet signifikante Messwerte zwischen beiden Gruppen.

Tab. 20: Absolutwerte der Lymphozytensubpopulationen in Abhängigkeit vom Operationsverfahren. Die Parameter wurden präoperativ (d0), am ersten (d1), dritten (d3) und siebten (d7) postoperativen Tag erhoben. Alle Angaben in Zellen/mm³ MW ± SE bzw. in % von d0 ausgehend.

Parameter	OP-Technik	d0	d1	d3	d7
			(% von d0)	(% von d0)	(% von d0)
B-Zellen	offen	155 ± 20	78	92	139
	laparoskopisch	146 ± 22	82	94	120
T-Zellen	offen	1211 ± 110	61,5	86	101
	laparoskopisch	1034 ± 126	71	80	103
CD8+ T-Zellen	offen	387 ± 44	66	91	89
	laparoskopisch	350 ± 46	75	83	97
CD4+ T-Zellen	offen	799 ± 77	61	87	105
	laparoskopisch	683 ± 93	69	79	107
NK-Zellen	offen	261 ± 35	52	77	79
	laparoskopisch	243 ± 35	61	72	92
Vα24 (NKT)	offen	10 ± 2	50	70	90
	laparoskopisch	7 ± 2	71	86	100
CD28+ T- Zellen	offen	931 ± 73	63	90	109
	laparoskopisch	839 ± 109	76	81	99
CD8+CD28+ T-Zellen	offen	210 ± 19	69	99,5	102
	laparoskopisch	210 ± 32	78	85	74
ICOS+ T-Zellen	offen	25 ± 6	64	80	92
	laparoskopisch	23 ± 8	52	52	61
CD25+ T-Zellen	offen	384 ± 40	63	94,5	117
	laparoskopisch	355 ± 59	61	73,5	100
CD4+CD25+ T-Zellen	offen	324 ± 39	61	92	118
	laparoskopisch	318 ± 63	58	69,5	85,5
CD57+ T-Zellen	offen	306 ± 50	55	75,5	79
	laparoskopisch	187 ± 30	69,5	78	104
PD1+ T-Zellen	offen	217 ± 32	60	90	85
	laparoskopisch	150 ± 35	65	77	76
CTLA-4+ T-Zellen	offen	21 ± 5	52	109,5	119
	laparoskopisch	15 ± 6	140	93	120
CD8+CTLA-4+ T-Zellen	offen	6 ± 1	67	150	117
	laparoskopisch	6 ± 2	117	83	67
CXCR3+ T-Zellen	offen	613 ± 74	62	88	95
	laparoskopisch	458 ± 81	72	75	109
CD57+ NK-Zellen	offen	168 ± 27	51	79	79
	laparoskopisch	159 ± 33	58	62	61

Im zeitlichen Verlauf zeigte sich bei allen Nierenzellkarzinompatienten ein Abfall der HLA-DR-Expression auf Monozyten. Das weist somit auf eine Suppression des Immunsystems bei allen Nierenzellkarzinompatienten hin. Herauszustellen ist die schnellere Normalisierung der Werte bzw. das Erreichen des präoperativen Niveaus am siebten postoperativen Tag in der Patientengruppe mit minimal-invasivem Operationsver-

fahren (Abb. 20a und b). Postoperativ kam es zudem zu einer Erhöhung der CD13-Expression auf Monozyten in beiden Patientengruppen. Der höchste Wert wurde am dritten postoperativen Tag dokumentiert (Abb. 21a und b).

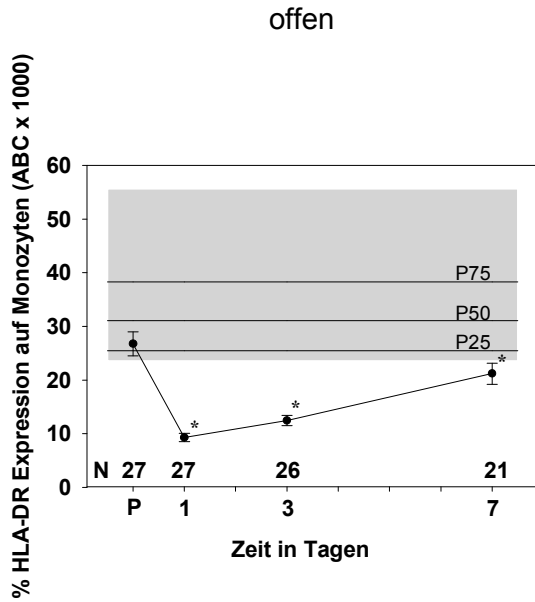


Abb. 20a

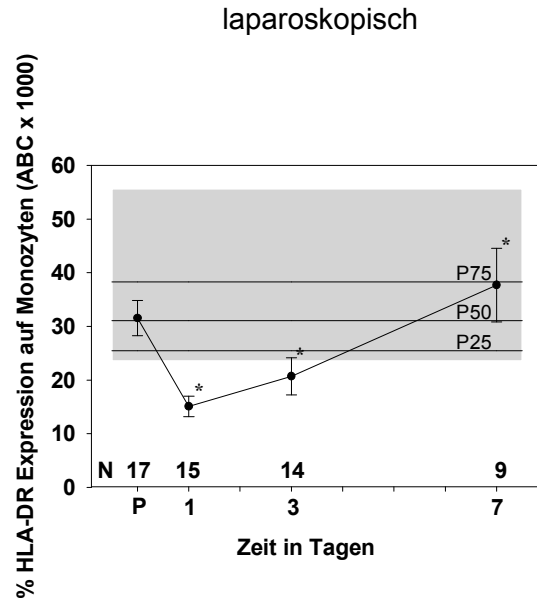


Abb. 20b

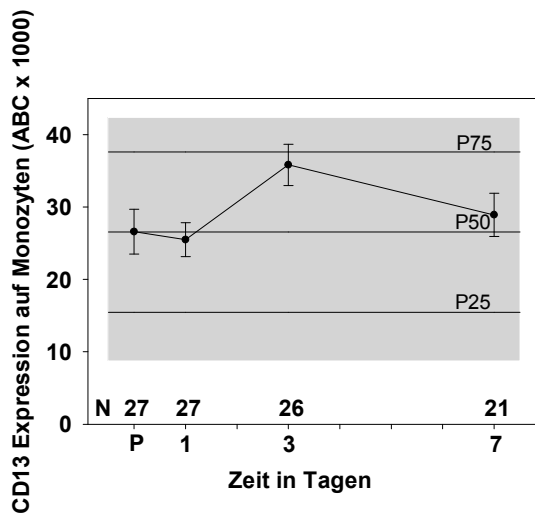


Abb. 21a

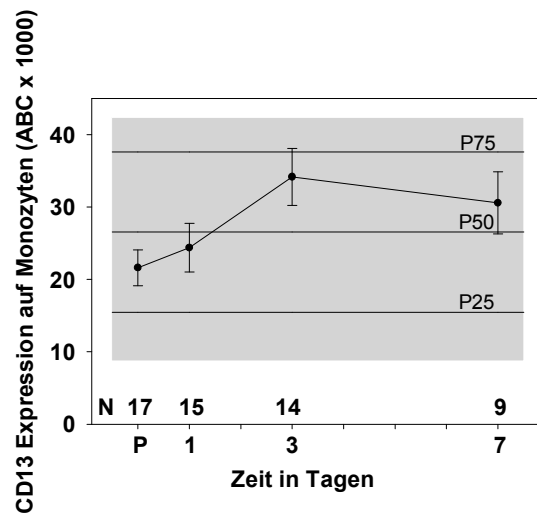


Abb. 21b

Abb. 20-21a und b: Vergleich konventionell-offen und laparoskopisch operierter RCC-Patienten (N = Anzahl der Patienten). Die Werte der gesunden Vergleichsgruppe (grau hinterlegt) werden als Perzentile mit P10, P25, P50, P75 und P90 angegeben. Die monozytäre HLA-DR- bzw. CD13- Intensität wird als Mittelwert ± SE dargestellt. Das Sternchen kennzeichnet signifikante Messwerte zwischen beiden Gruppen.

4 Diskussion

4.1 Vergleich von Immunzellen im venösen Blut von Patienten und Kontrollpersonen

Ziel der Studie war es, mit Hilfe der experimentell ermittelten Untersuchungsergebnisse die zelluläre Immunabwehr und die tumorbedingte Immunsuppression näher zu charakterisieren. Auf Grundlage der durchflusszytometrischen Immunphänotypisierung erfolgte die Analyse der Blutproben. Zur Charakterisierung immunologischer Zellen im venösen Blut von Nierenzellkarzinompatienten untersuchten wir insgesamt 44 Erkrankte und 20 gesunde Kontrollpersonen. Das mittlere Patientenalter lag bei 67 Jahren, das der Vergleichsgruppe bei 59 Jahren. Zelluläre Unterschiede, die zwischen Patienten und Kontrollpersonen festgestellt wurden, betrafen vorwiegend das angeborene Immunsystem, repräsentiert u.a. durch die Zahl der Granulozyten, die Zahl der Monozyten und die Zahl der DC. Nierenzellkarzinompatienten zeigten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen im peripheren Blut eine höhere Granulozyten- und Monozytenanzahl. 23% der Nierenzellkarzinompatienten in unserer Studie zeigten initial eine Granulozytose. Van Rossum et al. (2009) berichten von einer nachweisbaren Granulozytose bei ca. 20% der Nierenzellkarzinompatienten. Ursächlich dafür scheint eine erhöhte Freisetzung an G-CSF zu sein, die die Autoren als Immunantwort des Körpers auf die tumorassoziierte Zytokinproduktion interpretieren.

Als Marker für eine systemische Entzündungsaktivität im Körper kann die Granulozyten/Lymphozyten-Ratio herangezogen werden (Halazun et al., 2008). In Veröffentlichungen wird als Maß für eine erhöhte Granulozyten/Lymphozyten-Ratio u. a. ein Wert von > 3 für Tumorpatienten angegeben (Keizman et al., 2012), wobei dieser Wert in der Literatur variiert. Die Patienten in unserer Studie hatten im Vergleich zu den Normalpersonen eine höhere Granulozyten/Lymphozyten-Ratio ($3,9 \pm 0,4$ vs. $2,9 \pm 0,4$). Der Unterschied war jedoch nicht signifikant. In der Annahme der Nachweisbarkeit einer systemischen inflammatorischen Immunantwort bei Tumorpatienten erfolgte zudem die Bestimmung der Granulozyten/DC-Ratio. Deutlich höhere Werte der Granulozyten/DC-Ratio wurden bei Tumorpatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen dokumentiert ($p = 0,002$). Eine Überprüfung dieser Ergebnisse in weiteren Studien ist sinnvoll. Zu klären wäre, inwieweit die Granulozyten/DC-Ratio eine Aussage über den Funktionszustand des Immunsystems zulässt.

Eine geringe Anzahl an DC wurde im Patientenblut unserer Studienpatienten nachgewiesen. Bereits Porta et al. (2007) thematisierten das reduzierte Vorkommen an DC, die essentiell für die Antigenpräsentation und die Aktivierung von T-Zellen sind. Eine Erklärung für die gemessene geringe Anzahl an DC geben die vom Tumor produzier-

ten Zytokine, wie VEGF und IL-10, die die Ausreifung der DC hemmen (Menetrier-Caux et al., 1999; Gabrilovich, Rev. 2004). Die in unserer Studie nachgewiesene reduzierte Anzahl an DC im venösen Blut der Patienten könnte für eine reduzierte Stimulation der T-Zellantwort sprechen und somit auf eine unzureichende Immunabwehr der Nierenzellkarzinompatienten hinweisen. Im Vergleich zu den Ergebnissen von Porta et al. (2007), welche 0,6% der Leukozyten als zirkulierende DC identifizierten, war der in unserer Analyse ermittelte Anteil zirkulierender DC mit durchschnittlich 0,24% der Leukozyten deutlich geringer. Zur Bestimmung der DC verwendete ich in dieser Arbeit eine Vollblutprobe und einen kommerziellen Kit der Firma Miltenyi. Vor der direkten Immunfärbung fand keine weitere Separation der Zellen statt. Porta et al. (2007) hingegen verwendeten Ficoll-Paque als Zellseparationsmedium. Die isolierten PBMC (periphere mononukleäre Blutzellen) wurden anschließend mit Antikörpern beladen. In unserer Studie erfolgte die Zugabe der Antikörper in das Vollblut. Mutmaßlich ist die durchgeführte Methode zur Quantifizierung der DC ursächlich für die differierende Anzahl.

Die Zahl der CD16+CD14dim-Monozyten, einer Monozytensubpopulation, die proinflammatorische Funktionen erfüllt, TNF produziert und charakteristisch für akute Entzündungen und Infektionen ist (Ziegler-Heitbrock, Rev. 2007), war geringfügig höher im Patientenblut nachweisbar. CD16+CD14dim-Monozyten bewirken, laut Literatur, eine Erhöhung der Kapazität zur Antigenpräsentation (Ziegler-Heitbrock, 2007). Die moderat höhere Anzahl der CD16+CD14dim-Monozyten bei Nierenzellkarzinompatienten könnte das Ergebnis einer tumorbedingten, unspezifischen Inflammation sein.

Die Auswertung der in meiner Arbeit analysierten Lymphozytensubpopulationen zeigte eine verminderte Anzahl an B- und T- und NK-Zellen im Patientenblut. Auch Porta et al. (2007) beobachteten eine verringerte Anzahl zirkulierender T-Zellen im peripheren Blut von Nierenzellkarzinompatienten. Die nicht signifikant reduzierte Anzahl von B-, T- und NK-Zellen im peripheren Blut von Nierenzellkarzinompatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen deutet eine geringgradige Suppression des Immunsystems der Patienten an. Auch ein erhöhter Verbrauch an lymphozytären Subpopulationen, im Sinne einer konsumierenden Erkrankung, könnte die verringerte Anzahl zirkulierender B-, T- und NK-Zellen im Patientenblut bedingen.

Die absolute Anzahl an CTLA-4+ zytotoxischen T-Zellen war im peripheren Blut der Patienten deutlich höher. CTLA-4, ein Oberflächenprotein der T-Zellen, welches an B7.1 und B7.2 bindet, dient als negativer Regulator der T-Zellfunktion (Rudd und Schneider, Rev. 2003). Somit spricht eine erhöhte CTLA-4-Expression im venösen Blut der Tumorpatienten für eine Herabregulierung der T-Zell-Aktivierung. Eine ineffektive, antitumorale Immunantwort könnte die Folge sein. Neue Medikamente, wie die monoklonalen Antikörper Ipilimumab und Tremelimumab, die eine Blockade des Oberflä-

chemoküls CTLA-4 herbeiführen, stärken die Aktivität der zytotoxischen T-Zellen. CD28 bindet auch an B7.1 sowie B7.2 und kann als positiv kostimulatorisches Signal zur Zytokinproduktion und Zellproliferation beitragen und die tumorspezifische T-Zellantwort verbessern. Die CD28⁺T-Zellen waren im Patientenblut deutlich geringer nachweisbar als im venösen Blut der Kontrollpersonen. Im höheren Lebensalter nimmt die Expression des kostimulatorischen Moleküls CD28 auf T-Zellen im Rahmen der Immunseneszenz ab (Dorshkind und Swain, 2009). Die geringere CD28-Expression auf T-Zellen könnte als Zeichen einer verminderten Produktion naiver T-Zellen sowie als alterbedingte Funktionseinschränkung zu werten sein.

Eine höhere Expression von CD57 auf T- und NK-Zellen ließ sich im venösen Blut von Nierenzellkarzinompatienten im Vergleich zum Kontrollkollektiv nachweisen. CD57 auf T- und NK-Zellen fungiert als Immunseneszenzmarker (Focosi et al., 2010; Gayoso et al., 2011). Die Persistenz des Antigens CD57 auf T-Lymphozyten ist mit einer Verkürzung der Telomere sowie einer ineffektiven IL-2-Produktion vergesellschaftet (Tarazona et al., 2000). Nicht nur alternde Menschen zeigen diese charakteristischen Veränderungen. Auch Menschen, deren Immunsystem sich in einem permanenten Aktivierungszustand befindet, z.B. bei viralen Infektionen, autoimmunen oder bösartigen Erkrankungen, weisen eine gesteigerte Repräsentation CD57⁺T-Zellen auf (Tarazona et al., 2000). Daher ist die höhere CD57-Expression auf T- und NK-Zellen der Nierenzellkarzinompatienten auch durch das Vorliegen der Tumorerkrankung zu erklären.

In unserer Studie konnten bezüglich der Expression von Foxp3 durch regulatorische T-Zellen zwischen Patienten und Kontrollpersonen (43,9 Zellen/mm³ vs. 44,9 Zellen/mm³) keine Unterschiede gezeigt werden. Liotta et al. (2011) analysierten T-Regulatorzellen im peripheren Blut und in tumorinfiltrierenden Lymphozyten. Bezüglich der Frequenz von T-Regulatorzellen im peripheren Blut von Nierenzellkarzinompatienten und gesunden Freiwilligen konnten durch Liotta und Mitarbeiter keine relevanten Unterschiede gezeigt werden. Jedoch war die Anzahl an T-Regulatorzellen intratumoral signifikant höher als im peripheren Blut der Nierenzellkarzinompatienten und mit einer schlechten Prognose assoziiert. Griffiths et al. (2007) berichteten, dass ein erhöhtes Vorkommen von CD4⁺T-Regulatorzellen mit einer schlechteren Prognose des Patienten korreliert. Dies wird gestützt durch die Erkenntnisse, dass regulatorische T-Zellen die Aktivierung von T-Zellen behindern und die Proliferation sowie Zytokinsekretion supprimieren können (Baecher-Allan et al., Rev. 2004).

4.2 Evaluierung immunologischer Marker unter Berücksichtigung des TNM-Stadiums

Das durchschnittliche Patientenalter der in unserer Studie eingeschlossenen Frauen betrug 69 Jahre und liegt etwas unter dem mittleren Erkrankungsalter der Frau von 71 Jahren. Das Erkrankungsalter der Männer betrug 64 Jahre und liegt ebenfalls etwas unter dem Durchschnittsalter männlicher Nierenzellkarzinompatienten von 67 Jahren (Wirth und Fröhner, 2010). Unsere Studie zeigte ein Geschlechterverhältnis von 1,2 erkrankten Männern zu einer erkrankten Frau auf, womit wir annähernd das Geschlechterverhältnis, welches in der Literatur mit 1,5 erkrankten Männern zu einer erkrankten Frau angegeben wird (Husmann et al., 2010), widerspiegeln. Zum Zeitpunkt der Operation wurde bei 32 Patienten eine lokalisierte Tumorerkrankung pathologisch diagnostiziert, bei 12 Patienten ein lokal fortgeschrittenes Nierenzellkarzinom gesichert. Dies entspricht in etwa der Beschreibung der Stadienverteilung nach Silverberg (Review, 1987) nach der 45% der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose eine lokalisierte und 25% eine lokal fortgeschrittene Erkrankung aufweisen. 86% der Patienten erkrankten an einem klarzelligen Nierenzellkarzinom, dem häufigsten histologischen Subtyp.

In unserer Studie zeigten Patienten mit lokal fortgeschrittener Tumorerkrankung (\geq pT3) eine höhere absolute Leukozyten-, Granulozyten- und Monozytenanzahl im Blut. Donskov et al. (2006) beschrieben im Blut von Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom eine erhöhte Anzahl (> 6000 Zellen/ μ l) an Granulozyten, die mit einer schlechten Prognose assoziiert ist. Wilcox (Review, 2010) berichtet, dass Karzinome zu einer Leukozytose und zu einer Inhibierung der Differenzierung von Zellen der myeloischen Reihe führen können. Eine veränderte Myelopoese kann resultieren. MDSC stellen eine Population verschiedener myeloischer Zellen (Monozyten, Granulozyten, DC) dar, die im peripheren Blut als auch im Tumorgewebe von Nierenzellkarzinompatienten akkumulieren (Zea et al., 2005; Ochoa et al., 2007; Finke et al., 2011). Aufgrund des Arginase-Stoffwechsels der MDSC (Ochoa et al., 2007) kann eine T-Zell-Anergie, gekennzeichnet durch Beeinflussung der T-Zell-abhängigen Zytokinproduktion und Proliferation, herbeigeführt werden. Die Unterdrückung der MDSC-bedingten Immunsuppression stellt einen neuen Therapieansatz dar (Wilcox, Rev. 2010).

Halazun et al. (2008) analysierten die Granulozyten/Lymphozyten-Ratio bei Patienten mit kolorektalem Karzinom. Eine hohe (≥ 5) Granulozyten/Lymphozyten-Ratio war signifikant mit einem kürzeren, progressionsfreien Überleben der Patienten assoziiert. In der vorliegenden Arbeit zeigten präoperativ 16% der Patienten im Tumorstadium $< pT3$ und 25% der Patienten im Tumorstadium $\geq pT3$ eine hohe Granulozyten/Lymphozyten-

Ratio. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Postoperativ wiesen 77% der Patienten im Tumorstadium $< pT3$ und 83% der Patienten im Tumorstadium $\geq pT3$ eine hohe Granulozyten/Lymphozyten-Ratio auf. Sejima et al. (2011) beschreiben in ihrer Studie einen Zusammenhang zwischen Prognose nephrektomierter Patienten mit fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom und der Granulozyten/Lymphozyten-Ratio. Eine geringe Granulozyten/Lymphozyten-Ratio im peripheren Blut korreliert mit dem späten Auftreten von Tumorrezidiven und ist somit ein günstiger Prognosefaktor.

In unserer Studie wiesen Patienten mit einem Tumorstadium $\geq pT3$ eine geringere Anzahl an DC im peripheren Blut auf als Patienten im Tumorstadium $< pT3$. Dieses Messergebnis deutet die Defizienz des Immunsystems der Patienten im fortgeschrittenen Tumorstadium an. Bezüglich der Granulozyten/DC-Ratio der Patienten im Tumorstadium $< pT3$ und $\geq pT3$ konnte ein signifikanter Unterschied ($p = 0,001$) gezeigt werden. Somit könnte die Berechnung der Granulozyten/DC-Ratio zur Beurteilung des Funktionszustandes des Immunsystems, auch in kleinen Patientengruppen, dienen. Zukünftige Studien müssten dieses Ergebnis überprüfen.

Eine höhere Anzahl von CD57+ NK-Zellen ließ sich im Blut von Nierenzellkarzinompatienten mit Tumorstadium $\geq pT3$ im Vergleich zu $< pT3$ in unserer Studie nachweisen. CD57 ist ein sensitiver Marker für die replikative Seneszenz (Gayoso et al., 2011), deren Expression im höheren Lebensalter zunimmt. Eine hohe Frequenz von CD57+T-Zellen im Blut steht für einen permanenten Aktivierungszustand des Immunsystems (Tarazona et al., 2000). In unserer Studie war eine höhere Anzahl CD57+T-Zellen im Blut von Patienten mit höhergradigem Tumorstadium ($\geq pT3$) nachweisbar. Ein höherer Anteil CD57+zytotoxischer T-Zellen im venösen Blut von Nierenzellkarzinompatienten mit fortgeschrittenem Tumorstadium wurde in einer Studie von Characiejus et al. (2002) bereits beschrieben. Die Anzahl CD57+zytotoxischer T-Zellen dient laut Characiejus et al. als prädiktiver Wert für das Überleben von Nierenzellkarzinompatienten.

Eine höhere Expression der Oberflächenmoleküle CTLA-4 und PD-1 konnten wir in unserer Arbeit bei Patienten mit fortgeschrittenem Tumor messen. Eine Tumorinduzierte Hochregulierung der kostimulatorischen Signalmoleküle CTLA-4 und PD-1 kann zur Inhibierung der T-Zell-Aktivierung sowie zu einer reduzierten IL-2-Produktion führen. Ein höherer Anteil CTLA-4+T-Zellen scheint mit einer ineffektiven antitumoralen Immunantwort vergesellschaftet zu sein. Aufgrund des Messergebnisses ist ein Zusammenhang zwischen einer höheren Anzahl an CTLA-4- und PD1+T-Zellen und Progress der Tumorerkrankung denkbar. Immuntherapeutisch ist eine Blockade von CTLA-4 unter Anwendung des Antikörpers Ipilimumab bereits in klinischen Studien in Erprobung. Yang et al. (2007) beschrieben, dass bei einigen Patienten mit metastasier-

ten klarzelligem Nierenzellkarzinom eine Regression unter Ipilimumab beobachtet werden konnte.

Das Oberflächenmolekül CXCR3, welches zur Immunantwort der Th1-Zellen beiträgt (Loetscher et al., 1998), war in unserer Untersuchung im Blut von Patienten mit einem Tumorstadium \geq pT3 in höherer Anzahl nachweisbar als bei Patienten mit einem Tumorstadium $<$ pT3. Th1-Zellen sind zur IL-2- und IFN- γ -Produktion sowie zur Aktivierung von Makrophagen und zytotoxischen T-Zellen befähigt und werden als Effektorzellen mit potentieller antitumoröser Aktivität beschrieben (Knutson und Disis, 2005). Cózar et al. (2005) wies eine geringere Oberflächenexpression des Chemokinrezeptors CXCR3 im peripheren Blut von Nierenzellkarzinompatienten mit fortgeschrittenem Tumorleiden und Metastasen nach. Unsere Studienergebnisse dokumentieren eine gegensätzliche Beobachtung. Ursächlich dafür könnte die geringe Metastasierungsrate unserer Patienten im Tumorstadium \geq pT3 sein. Nur zwei der zwölf Patienten im Tumorstadium \geq pT3 wiesen anamnestisch Metastasen auf. Aufgrund der Zusammensetzung unseres Patientenkollektives ist vermutlich die von Cózar et al. (2005) beschriebene reduzierte CXCR3-Expression und die damit assoziierte supprimierte Th1-Antwort nicht nachweisbar.

ICOS, das induzierbare kostimulierende Protein, welches von aktivierten T-Zellen induziert wird und zur Verstärkung der T-Zell-Antwort beiträgt (Dong et al., 2001), war bei Patienten im Tumorstadium \geq pT3 in geringerer Anzahl auf den T-Zellen nachweisbar. Strauss et al. (2008) beschrieben analog zu unseren Ergebnissen eine geringe ICOS-Expression auf T-Zellen bei Patienten mit malignem Melanom. Die Herabregulierung des kostimulatorischen Signalmoleküls ICOS scheint mit einer tumorvermittelten Immunsuppression assoziiert zu sein.

4.3 Postoperatives Immunmonitoring von Nierenzellkarzinompatienten nach laparoskopischer und konventionell-offener Resektion

Die immunsupprimierende Wirkung von Operationen ist bekannt (Hershman et al., 1990). Chirurgische Eingriffe verursachen Gewebetraumatisierungen, die eine lokale Inflammation hervorrufen können. Die postoperative Bestimmung von CRP, Leukozytenanzahl sowie TNF α , IL-6 und IL-8 zeigen die Entzündungsreaktion auf (Frering et al., 1994; Cremer et al., 1996). Eine postoperative Erhöhung von IL-10 sowie eine Herabregulierung der monozytären HLA-DR-Expression (Huschak et al., 2003; Strohmeyer et al., 2003) dokumentieren die Immunsuppression.

Die OP-induzierte Depression des Immunsystems, die bei konventionell-offen operierten Patienten deutlicher nachweisbar ist (Fornara et al., 2000), könnte eine postoperative Infektion begünstigen. Einzelne Tumorzellen, die eventuell im Körper verbleiben,

könnten die postoperativ immunsupprimierte Phase zur Proliferation nutzen und es könnte eine Streuung der Erkrankung daraus resultieren. Nachweislich führt das laparoskopische OP-Verfahren zu einer signifikanten Reduzierung postoperativer Wundinfektionen (Brümmer et al., 2007). Ein onkologischer Vorteil laparoskopisch operierter Patienten wurde bisher nicht beschrieben. Retrospektive Studien zeigten keinen Überlebensvorteil zwischen laparoskopisch und offen nephrektomierten Tumorpatienten über einen beobachteten Zeitraum von 5 Jahren auf (Tait et al., 2011).

In dieser Studie beobachteten wir den postoperativen Verlauf immunologischer Marker von 44 Nierenzellkarzinompatienten, von denen 17 Patienten dem laparoskopischen und 27 Patienten dem konventionell-offenem Operationsverfahren zugeführt wurden. Das Lebensalter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation war annähernd gleich. Hervorzuheben ist, dass sich in der Gruppe mit laparoskopischen Operationsverfahren signifikant mehr weibliche Patienten befanden. Um herauszufinden, ob dieses signifikante Ergebnis nur zustande gekommen ist, weil einfach mehr Männer ein fortgeschrittenes Tumorstadium aufwiesen (\geq pT3) und somit häufiger dem offenem Operationsverfahren zugeführt wurden, ist die Zusammensetzung der Gruppen nochmals genauer analysiert wurden. 2/3 der männlichen Patienten, die eine Laparotomie zur onkologischen Resektion erhielten, hatten ein auf die Niere begrenztes Tumorleiden ($<$ pT3). Somit wäre rein technisch eine Laparoskopie möglich gewesen. Bei einem Tumorstadium $<$ pT3 ist die onkologische Resektion mittels minimal-invasiver Operationstechnik ein etabliertes Verfahren und Goldstandard (Ljungberg et al., 2010). Trotz Leitlinie ist zusätzlich zum Tumorstadium für die Auswahl der Operationstechnik von wesentlicher Bedeutung, ob die geplante chirurgische Intervention technisch machbar, onkologisch vertretbar und medizinisch sinnvoll ist. Ob andere Kontraindikationen bestanden oder der Patientenwunsch ausschlaggebend war und somit die ungleiche Geschlechterverteilung bedingt, ist nicht bekannt. Zu diskutieren wäre auch, ob der höhere Frauenanteil in der laparoskopischen Gruppe auf ästhetischen Gründen beruht. Ein Vorteil der minimal-invasiven Operationstechnik ist das minimierte Zugangstrauma durch kleine Inzisionen. Ein kosmetisch gutes Ergebnis wird somit angestrebt.

Die laparoskopische Operationstechnik wird mit geringeren postoperativen Schmerzen, schnellerer Rekonvaleszenz und geringerer Infektionsraten in Verbindung gebracht. Das postoperative Monitoring immunologischer Marker cholezystektomierter Patienten zeigte, dass Patienten, die eine Laparotomie erhalten hatten, einen signifikant höheren Granulozytenanstieg aufwiesen und es zu einem Abfall der T- und NK-Zellen im Blut der Patienten kam (Anania et al., 1998). Geringere postoperative CRP-Werte laparoskopisch operierter Patienten (Liu et al., Rev. 2011) unterstützen die Ansicht, dass aus dem geringeren Zugangstrauma eine verminderte Beeinträchtigung des Immun-

systems resultiert. Wu et al. (2010) bestimmten IL-18, welches die IFN- γ -Produktion induziert sowie MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) im Blut von Patienten, die sich einer laparoskopischen oder offenen Cholezystektomie unterzogen. MCP-1 dient der Chemotaxis und der T-Zellaktivierung (Lotan et al., 2001). Patienten, die laparoskopisch operiert wurden, erreichten höhere IL-18- und MCP-1-Konzentrationen postoperativ als die konventionell operierten Patienten. Evrard et al. (1997) nehmen als Ursache für die stärkere inflammatorische Immunantwort laparoskopisch operierter Patienten den intraoperativ erhöhten abdominellen Druck durch die CO₂-Insufflation und einen damit verbundenen Verlust der mukosalen Barrierefunktion an.

Bezüglich der präoperativen Messung immunologischer Marker wurde festgestellt, dass die Patienten mit konventionell-offenem OP-Verfahren eine höhere Anzahl CD57+T-Zellen im peripheren Blut aufwiesen. Da die beiden Patientengruppen sich in Bezug auf Alter und Tumorstadium nicht unterscheiden, ist die präoperativ erhobene unterschiedliche Anzahl CD57+T-Zellen am ehesten als zufälliges Ergebnis zu werten. Die postoperativen Blutentnahmen zur Erhebung der immunologischen Marker erfolgten am ersten, dritten und siebten postoperativen Tag. Zu Beginn der Studie war zudem eine Blutentnahme am 14. postoperativen Tag geplant. Aufgrund einer mittleren Krankenhausaufenthaltsdauer von 11,4 Tagen (Spannweite: 6 – 20 Tage) konnte die Blutabnahme am 14. postoperativen Tag nicht sichergestellt werden. Außerdem ist anzumerken, dass am siebten postoperativen Tag von insgesamt 32 der ursprünglich 44 Studienpatienten eine venöse Blutprobe entnommen werden konnte, was einem Verlust von knapp einem Drittel der Patienten entspricht. Als Ursache ist hauptsächlich die bereits erfolgte Entlassung laparoskopisch operierter Patienten anzuführen.

Die Bestimmung der Leukozytenzahl ist etabliert im klinischen Alltag und wird routinemäßig bei jedem Patienten präoperativ bestimmt, wobei eine Leukozytenanzahl von über 10 000 Zellen/mm³ als Leukozytose bezeichnet wird. Im Vergleich der postoperativ bestimmten Leukozytenanzahl fiel auf, dass die Patienten mit offenem Operationsverfahren einen höheren Leukozytenanstieg zeigten als die minimal-invasiv operierten Patienten. Ein Granulozytenanstieg wurde in beiden Gruppen registriert, jedoch merklich ausgeprägter in der Laparotomie-Gruppe. Böhm et al. (1998) berichten über einen postoperativen Leukozyten- und Granulozytenanstieg bis zum dritten postoperativen Tag bei Patienten, die einer Operation aufgrund gut- und bösartiger Nierenerkrankungen zugeführt wurden. Der Anstieg der Leukozytenzahl im venösen Blut resultiert aus der Sekretion von IL-6, welches eine Freisetzung reifer Leukozyten aus dem Knochenmark sowie aus Blutgefäßen (Janeway, 2009) bedingt. Eine erhöhte Anzahl von Leukozyten im Blut ist ein Hinweis auf einen infektiösen Prozess oder/und ein inflammatorisches Geschehen. Festzuhalten ist, dass postoperativ fünf Patienten (19%) mit

konventionell-offenem OP-Verfahren und ein Patient (6%) mit laparoskopischen OP-Verfahren eine Leukozytose zeigten. Dieses Ergebnis zeigt, dass Patienten mit Laparotomie häufiger eine postoperative Leukozytose entwickelten als Patienten mit minimal-invasivem OP-Verfahren. Anania et al. (1998) analysierten das venöse Blut von Patienten, die einer laparoskopischen oder konventionell-offenen Cholezystektomie zugeführt wurden. In beiden Patientengruppen kam es postoperativ zu einem Anstieg der Granulozytenanzahl, wobei sich dieser deutlich ausgeprägter in der Laparotomie-Gruppe nachweisen ließ. Unsere Ergebnisse bestätigen diese Beobachtungen. Ein Anstieg der Granulozytenzahl kann Ausdruck der Gewebetraumatisierung sein (Wilcox, 2000).

Ohno et al. (2012) zeigten in ihrer Studie, dass Nierenzellkarzinompatienten mit einer präoperativen Granulozyten/Lymphozyten-Ratio von $\geq 2,7$ ein geringeres tumorfreies Überleben in den folgenden 10 Jahren hatten als Patienten mit einer präoperativen Granulozyten/Lymphozyten-Ratio von $< 2,7$. Des Weiteren beschreibt Ohno et al. (2012), dass ein postoperativer Abfall der Granulozyten/Lymphozyten-Ratio unter 2,7 als positiver prognostischer Faktor herangezogen werden kann. In meiner Studie zeigten laparoskopisch und offen operierte Patienten postoperativ einen simultanen Verlauf der Granulozyten/Lymphozyten-Ratio im peripheren Blut. Im Gegensatz dazu zeigten die Studiengruppen signifikante Unterschiede bezüglich des postoperativen Verlaufes der Granulozyten/DC-Ratio. Nach einem Anstieg in beiden Gruppen am ersten postoperativen Tag kam es in der Gruppe mit minimal-invasivem OP-Verfahren am dritten und siebten postoperativen Tag zu einem Abfall der Granulozyten/DC-Ratio unter das präoperative Niveau. Hingegen wiesen die Patienten mit Laparotomie postoperativ eine stetig hohe Granulozyten/DC-Ratio auf. Aufgrund dieser Beobachtung ist die Untersuchung der Granulozyten/DC-Ratio und deren Assoziation mit Tumorerkrankung, klinischen Symptomen und Überlebensrate des Patienten in weiterführenden Studien überlegenswert.

Postoperativ kam es sowohl in der Gruppe mit laparoskopischer OP-Technik als auch in der Gruppe mit offener OP-Methode zu einem Abfall der B- und T-Zellen. Die postoperative Reduzierung der B- und T-Zellanzahl im peripheren Blut war ausgeprägter in dem Patientenkollektiv mit konventionell-offenen OP-Verfahren. Trotzdem konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der B-, T- sowie CD4+ und CD8+T-Zellen zwischen minimal-invasiven und offenem OP-Verfahren herausgestellt werden. Demzufolge ist festzuhalten, dass die durchflusszytometrische Bestimmung der B- und T-Zellzahl sich nicht eignete, die Unterschiedlichkeit der OP-Verfahren in Bezug auf die postoperative Anzahl der Immunzellen herauszustellen.

Postoperativ zeigten beide Patientengruppen einen Abfall der NK-Zellen im peripheren Blut. Der Abfall der NK-Zellanzahl war moderater im Blut von Patienten mit laparoskopischer Operationsmethode. Wichmann et al. (2005) dokumentieren die geringere proinflammatorische Immunantwort laparoskopisch operierter Patienten mit kolorektaler Erkrankung u.a. anhand der Bestimmung der NK-Zellen im venösen Blut. Die OP-induzierte Reduzierung der NK-Zellanzahl war geringer im Blut von Patienten mit laparoskopischer Operationsmethode. Patienten mit Laparoskopie erreichten bereits am siebten postoperativen Tag das präoperative Niveau ihrer NK-Zellanzahl (Wichmann et al., 2005). In unserer Studie erlangten am siebten postoperativen Tag die Patienten mit laparoskopischen OP-Verfahren 92% ihres präoperativen Zellzahl-niveaus an NK-Zellen und die Patienten mit offenem OP-Verfahren 72%. In Bezug auf infektiöse Komplikationen und Absiedlung einzelner Tumorzellen könnte die Beobachtung einer stärkeren NK-Zell-Verminderung in der Gruppe mit Laparotomie einen wesentlichen Nachteil für die Patienten darstellen.

Posteroperativ wurde ein Anstieg der Monozytenanzahl im peripheren Blut beider Studiengruppen festgestellt, wobei der Anstieg ausgeprägter in der Laparoskopie-Gruppe war. Ursächlich dafür könnte eine höhere MCP-1-Konzentration laparoskopisch operierter Patienten sein (Wu et al., 2010), die eine Chemotaxis der Monozyten bedingt. Nach der Resektion des Tumors kam es in beiden Patientengruppen zu einem Abfall der Anzahl an DC im peripheren Blut, wobei die Patienten mit laparoskopischen Operationsverfahren postoperativ rascher das präoperative Zellzahl-niveau an DC wieder erreichten. Wahrscheinlich ist die geringere Gewebstraumatisierung laparoskopisch operierter Patienten ursächlich für diese Beobachtung. Auch Ho et al. (2001) beschreiben einen postoperativen Abfall der absoluten Anzahl DC im venösen Blut von Patienten, die sich elektiv einer Cholezystektomie oder Hysterektomie unterzogen. Die Depression der Anzahl der DC wurde bis zum 2. - 3. postoperativen Tag beobachtet. Die Autoren werteten die verminderte Anzahl der DC als Antwort des angeborenen Immunsystems auf die OP-induzierte Traumatisierung. Zwei Patienten in der Studie von Ho et al. (2001) wurden konventionell-offen operiert. Diese Patienten zeigten postoperativ eine ausgeprägtere Verminderung der DC. Das präoperative Zellniveau an DC erreichten die Patienten mit offener OP-Technik erst nach einer postoperativen Periode von 3 Wochen. In unserer Studie war eine Wiederherstellung des präoperativen Zellzahl-niveaus an DC in der Gruppe mit offenem OP-Verfahren im nachbeobachteten Zeitintervall nicht absehbar. Der beobachtete Zeitraum erwies sich als zu kurz. Selbst am siebten postoperativen Tag wurde ein Abfall der DC im Gegensatz zur Patientengruppe mit minimal-invasivem OP-Verfahren durchflusszytometrisch analysiert. Bei Patienten mit laparoskopischen OP-Verfahren war ein Steigen der Anzahl der DC im peripheren Blut

ab dem dritten postoperativen Tag ersichtlich. Die Studienergebnisse suggerieren, dass eine Messung der DC im venösen Blut als Marker fungieren kann, um das Ausmaß der Beeinflussung des Immunsystems nach einer chirurgischen Intervention bewerten zu können.

Abschließend ist zu erwähnen, dass aktuelle Studien Adipozytokine, u.a. Leptin, als zusätzliche immunologische Marker zur Evaluierung der Invasivität einer chirurgischen Intervention heranziehen. Leptin ist ein Hormon, das von Adipozyten produziert wird und dessen Serumspiegel mit der Körperfettmenge korreliert (Janeway, 2009). Adipositas und speziell eine Hochregulierung des Leptinspiegels sollen mit der Entwicklung eines Nierenzellkarzinoms vergesellschaftet sein (Drabkin und Gemmill, 2010). Greco et al. analysierten 2010 im Serum von Patienten mit laparoskopischer oder offener radikaler Prostatektomie das Adipozytokin Leptin. Postoperativ hatten laparoskopisch operierte Patienten signifikant niedrigere Adipozytokin-Werte im Vergleich zu offen operierten Patienten.

Wrann et al. (2012) berichten, dass hohe Leptinspiegel im Serum zu einer Beeinträchtigung der immunologischen Funktion der NK-Zellen führt und eine Prädisposition für maligne Erkrankungen resultiert.

4.4 Monozytäre HLA-DR- und CD13-Expression

Die Analyse der monozytären HLA-DR-Expression ist ein geeignetes Messverfahren zur Beurteilung der immunologischen Kompetenz des Patienten. Eine Anzahl von < 5000 HLA-DR-Molekülen/Monozyt (CD14+) ist charakteristisch für das Vorhandensein einer schweren Immunsuppression (Immunparalyse) (Döcke et al., 2005). HLA-DR spielt eine wichtige Rolle bei der Antigenpräsentation und ist essentiell für die T-Zell-vermittelte Einleitung einer spezifischen Immunantwort (Haupt et al., 1998; Perry et al., 2003). Die Verringerung der monozytären HLA-DR-Expression korreliert mit einer vorübergehenden immunologischen Dysfunktion, verursacht z.B. durch ein Polytrauma, Verbrennungen und schwerwiegenden Infektionen (Ditschkowski et al., 1999; Sachse et al., 1999; Huschak et al., 2003; Lekkou et al., 2004). Eine signifikant verminderte HLA-DR-Expression wiesen Lekkou et al. (2004) im venösen Blut von Sepsis-Patienten nach. Die reduzierte HLA-DR-Expression hat eine Verminderung der monozytären Fähigkeit zur Antigenpräsentation zur Folge und wird von einer verringerten Lipopolysaccharid induzierten TNF α -Sekretion begleitet (Döcke et al., 1997; Haupt et al., 1998). Die Studie von Möhrle (2011) untersucht die Immunsuppression von Patienten mit Hämophagozytischer Lymphohistiozytose, Sepsis und Tumorerkrankung anhand spezifischer Oberflächenmarker. Es konnten keine deutlichen Unterschiede bezüglich der monozytären HLA-DR-Expression insbesondere zwischen Sepsis- und

Tumorpatienten aufgezeigt werden. Kennzeichnend für die Nierenzellkarzinompatienten, die wir in unserer Studie untersuchten, war eine verminderte monozytäre HLA-DR-Expression im Vergleich zur Gruppe der gesunden Kontrollpersonen. Ordemann et al. (2002) zeigten ebenfalls eine reduzierte monozytäre HLA-DR-Expression im venösen Blut von Patienten mit kolorektalem Karzinom. Die monozytäre HLA-DR-Expression spiegelt die herabgesetzte Immunkompetenz von Krebspatienten wider. Wenige Stunden nach einer chirurgischen Intervention ist ein Abfall der monozytären HLA-DR-Expression durchflusszytometrisch nachweisbar (Kawasaki et al., 2001). Die chirurgische Gewebstraumatisierung beeinflusst negativ die Monozytenfunktion und erhöht somit das Risiko des Auftretens postoperativer septischer Komplikationen (Haupt et al., 1998). In unserer Studie zeigten postoperativ beide Patientengruppen eine ausgeprägte, reduzierte HLA-DR-Expression auf Monozyten, wobei diese deutlich länger andauernd in der Laparotomie-Gruppe nachzuweisen war. Folglich könnte ein größeres Risiko für postoperative Komplikationen für Patienten mit konventionell-offener Operationstechnik bestehen. Die Patienten mit minimal-invasivem OP-Verfahren zeigten am siebten postoperativen Tag eine dem präoperativen Niveau entsprechende HLA-DR-Expression und somit eine Restitution ihrer Monozytenfunktion.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Nierenzellkarzinompatienten, die einem konventionell-offenem OP-Verfahren zugeführt wurden, am erstem postoperativen Tag eine signifikant höhere Anzahl von Monozyten mit einer massiv reduzierten HLA-DR-Expression von < 5000 Ak / Zelle, im Vergleich zu laparoskopisch operierten Patienten, aufwiesen. Die stärkere monozytäre Unterfunktion konventionell-offen operierter Patienten ist für den weiteren postoperativen Verlauf prognostisch ungünstig. Sie birgt die Gefahr einer Infektion, verbunden mit einer unzureichenden Antwort des Immunsystems.

In unserer Studie konnte bei Patienten mit höherem TNM-Stadium (\geq pT3) eine verminderte Intensität der HLA-DR-Expression auf Monozyten sowie ein simultaner Anstieg der APN/CD13-Expression auf Monozyten festgestellt werden. In einer vorangegangenen Studie der Arbeitsgruppe mit Polytrauma-Patienten konnte ebenfalls ein Abfall der monozytären HLA-DR-Expression mit einem parallelen Anstieg der monozytären APN/CD13-Expression beobachtet werden (Huschak et al., 2003). Aminopeptidase N, ein membrangebundenes Enzym, beeinflusst die monozytäre Antigenpräsentation mit Hilfe von MHC Klasse-II-Molekülen über proteolytische Modifizierung der gebundenen Antigene (Riemann et al., Rev. 1999). Das Zytokin TGF- β führt zu einer Zunahme der monozytären APN/CD13-Expression in vitro (Kehlen et al., 2004). Eine erhöhte TGF- β -Konzentration konnte im Blutplasma von Nierenzellkarzinompatienten nachgewiesen werden sowie eine supprimierende Wirkung von TGF- β auf die HLA-

DR-Expression (Navarrete Santos et al., 1998). Die Funktion der höheren Expression von APN/CD13 auf Monozyten im venösen Blut von Patienten mit fortgeschrittenem Tumorstadium (\geq pT3) bleibt unklar. Weitere Studien müssten zur Klärung der Ergebnisse folgen.

4.5 Ausblick

Die Prognose von Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom ist schlecht. Die Rolle des Immunsystems bei Toleranz und Abwehr des Nierenzellkarzinoms ist trotz vieler Studien noch unzureichend aufgeklärt. Zur Gewinnung neuer Strategieansätze für die Entwicklung effektiver Immuntherapien ist die Charakterisierung von Immunzellen im venösen Blut von Nierenzellkarzinompatienten von großer Bedeutung. Aber auch zur Abwägung individueller Risiken und anschließender patientenadaptierter Therapieentscheidungen ist eine Analyse der funktionellen und phänotypischen Zelleigenschaften des Immunsystems von entscheidender Bedeutung.

Laparoskopisch durchgeführte onkologische Operationen gehören heutzutage zum Alltag in der Urologie. Unter Berücksichtigung des TNM-Stadiums und Patientenspezifischer Kontraindikationen stellt die laparoskopische Nephrektomie oder Teilresektion den heutigen therapeutischen Goldstandard dar. Die Laparoskopie führt zu einer Verringerung der postoperativen Morbidität und überzeugt durch kosmetisch hervorragende Ergebnisse.

Die Single-Incision Laparoscopic Surgery (SILS) ist ein OP-Verfahren, das das Zugangstrauma noch mehr minimieren soll. Der Operateur benutzt allein den Bauchnabel zum Einbringen sämtlicher Kamera- und Arbeitstrokare. Nachweisbare Vorteile der SILS gegenüber der konventionellen Laparoskopie bleiben abzuwarten.

Aufgrund des Einsatzes neuartiger Fluoreszenzfarbstoffe und der technischen Weiterentwicklung der Durchflusszytometrie ist eine präzisere Charakterisierung der Immunzellen möglich. Moderne Durchflusszytometer, die bis zu 7000 Ereignisse pro Sekunde und bis zu acht Fluoreszenzen und zusätzlich zwei Streulichtmerkmale analysieren können, sollten in experimentell ähnlich gelagerten Studien zum Einsatz kommen, um erneut eine phänotypische Charakterisierung von Immunzellen bei Nierenzellkarzinompatienten durchzuführen.

Die Identifizierung tumorassoziierter Antigene spielt eine große Rolle bei der Entwicklung neuer immuntherapeutischer Ansätze. Eine Stimulation des Immunsystems mittels genetisch veränderter Antigene (Vakzine) zur Induktion einer antitumoralen Immunantwort wird in Studien erprobt. Der Einsatz transgener T-Zellen wird ebenfalls disku-

tiert. Dabei werden tumorspezifische Rezeptoren in T-Zellen eingebracht und eine direkte Bekämpfung der Tumorzellen durch die transgenen T-Zellen angestrebt.

In Zukunft wird es wichtig sein, immunologische Marker mit Hilfe der Durchflusszytometrie zu identifizieren und zu analysieren, die das Ansprechen eines Patienten auf eine Immuntherapie dokumentieren. Die in dieser Studie erarbeiteten Ergebnisse liefern bereits in diesem Zusammenhang Hinweise dafür, dass z.B. die Analyse Granulozyten/DC-Ratio sowie die Bestimmung der Granulozytenanzahl im peripheren Blut von Nierenzellkarzinompatienten zur Evaluierung eines immuntherapeutischen Ansprechens herangezogen werden können. Zukünftige Studien sollten eine Überlebensanalyse beinhalten, um die Bedeutung der analysierten immunologischen Marker in Bezug auf die Prognose des Patienten zu evaluieren.

5 Zusammenfassung

Unter Anwendung monoklonaler Antikörper und durchflusszytometrischer Analysemethoden charakterisierten wir Immunzellen im venösen Blut von Patienten mit Nierenzellkarzinom und verglichen die Messergebnisse mit gesunden Kontrollpersonen. Das Nierenzellkarzinom ist eine Erkrankung des höheren Lebensalters und führt erst im fortgeschrittenen Stadium zu klinischer Symptomatik. Die radikale Resektion des Tumors stellt bisher den einzigen kurativen Behandlungsansatz dar. In dieser Studie bestand das Patientenkollektiv aus 44 Nierenzellkarzinompatienten, von denen 38 Patienten ein klarzelliges Nierenzellkarzinom aufwiesen. Als gesunde Kontrollpersonen konnten 20 Freiwillige gewonnen werden. Bei der Analyse der erhobenen Daten wurden die OP-Methode sowie das TNM-Stadium der Patienten berücksichtigt.

Bezüglich der Lymphozytensubpopulationen ließen sich zwischen Patienten und Kontrollpersonen kaum signifikante Messergebnisse nachweisen. Hervorzuheben ist die reduzierte Anzahl DC im Patientenblut. Da diesen Zellen als antigenpräsentierende Zellen eine wichtige Rolle bei der Tumorerkennung zukommt, spiegeln die erhobenen Messwerte sehr wahrscheinlich die ineffektive antitumorale Immunantwort der Nierenzellkarzinompatienten wider. Ebenfalls signalisiert die erhöhte Anzahl CTLA-4+zytotoxischer T-Zellen im venösen Patientenblut eine Verringerung der T-Zell-Aktivierung.

Unter Berücksichtigung des TNM-Stadiums konnte erstmals beschrieben werden, dass Patienten mit Nierenzellkarzinom im fortgeschrittenem Tumorstadium ($\geq pT3$) eine verminderte monozytäre HLA-DR-Expression, eine parallel dazu gesteigerte monozytäre CD13-Expression sowie eine höhere Granulozytenanzahl aufwiesen. Möglicherweise reflektiert das Messergebnis ein inflammatorisches Geschehen in Patienten mit großer Tumorlast.

Der Vergleich von konventionell-offenem und minimal-invasivem Operationsverfahren zeigte eindeutige Vorteile des laparoskopisch operierten Patienten auf. Als Beweise sind der geringere postoperative Leukozytenanstieg, die schnellere postoperative Normalisierung (Rekonvaleszenz) der DC, der moderatere Abfall der monozytären HLA-DR-Expression sowie die kürzere Krankenhausverweildauer anzuführen. Ein prä- und postoperatives Immunmonitoring könnte frühzeitig die Dysfunktion des Immunsystems der Patienten signalisieren. Folglich könnte zeitnah eine patientenadaptierte Therapie das Komplikations- und Infektionsrisiko minimieren und den Heilungsprozess positiv beeinflussen.

Literaturverzeichnis

- Agace WW, Higgins JM, Sadasivan B, Brenner MB, Parker CM (2000) T-lymphocyte-epithelial-cell-interactions: integrin alpha (E) (CD103) beta (7), LEEP-CAM and chemokines. *Curr Opin Cell Biol* 12:563-568
- Alter G, Malenfant JM, Altfeld, M (2004) CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods* 294:15-22
- Anania A, Marchigiano E, Pene G, Cascio G, Morino M (1998) Transient immunosuppression after abdominal surgical intervention. *Recenti Pro Med* 89:296-300
- Atzpodien J, Lopez Hänninen LE, Kirchner H, Bodenstern H, Pfreundschuh M; Rebmann U, Metzner B, Illiger HJ, Jaske G, Niesel T, et al. (1995) Multiinstitutional home-therapy trial of recombinant human interleukin-2 and interferon alfa-2 in progressive metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 13:497-501
- Baecher-Allan C, Vigliette V, Hfler DA (2004) Human CD4+CD25+regulatory T cells. *Semin Immunol* 16:89-98
- Baggiolini M, Dewald B, Moser B (1997) Human Chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 15:675-705
- Banchereau J, Palucka AK (2005) Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol* 5:296-306
- Betts MR, Brenchley JM, Price DA, De Rosa SC, Douek DC, Roederer M, Koup RA (2003) Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods* 281:65-78
- Bhagwat SV, Lahdenranta J, Giordano R, Arap W, Pasqualini R, Shapiro LH (2001) CD13/APN is activated by angiogenic signals and is essential for capillary tube formation. *Blood* 97:652-659
- Blank C, Kuball J, Voelkl S, Wiendl H, Becker B, Walter B, Majdic O, Gajewski TF, Theobald M, Andreesen R, Mackensen A (2006) Blockade of PD-L1 (B7-H1) augments human tumor-specific T cell responses in vitro. *Int J Cancer* 119:317-327
- Böhm M, Ittenson A, Philipp C, Röhl FW, Ansorge S, Allhoff EP (2001) Complex perioperative immuno-dysfunktion in patients with renal cell carcinoma. *J Urol* 166:831-836

- Brand JM, Schmucker P, Breidhardt T, Kirchner H (2001) Upregulation of INF-gamma and soluble interleukin-2 receptor release and altered serum cortisol and prolactin concentration during general anesthesia. *J Interferon Cytokine Res* 21:793-796
- Brasanac D, Muller CA, Muller GA, Hadzi-Dzokic J, Markovic-Lipkovski J (1999) HLA class I antigens expression in renal cell carcinoma: histopathological and clinical correlation. *J Exp Clin Cancer Res* 18:505-510
- Brümmer S, Sohr D, Rüden H, Gastmeier P. (2007) Surgical site infection rates using a laparoscopic approach: results of the German national nosocomial infections surveillance system. *Chirurg* 78:910-914
- Burnet FM (1970) The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 13:1-27
- Cabillic F, Bouet-Toussaint F, Toutirais O, Rioux-Leclercq N, Fergelot P, de la Pinière CT, Genetet N, Patard JJ, Catros-Quemener V (2006) Interleukin-6 and vascular endothelial growth factor release by renal cell carcinoma cells impedes lymphocyte-dendritic cell cross-talk. *Clin Exp Immunol* 146:518-523
- Carus T: *Operationsatlas Laparoskopische Chirurgie*. 1. Aufl. Springer, Heidelberg, 2007, S. 3-4
- Cella M, Jarrossy D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, Colonna M (1999) Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 5:919-923
- Ceppek KL, Shaw SK, Parker CM, Russell GJ, Morrow JS, Rimm DL, Brenner MB (1994) Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the alpha E beta 7 integrin. *Nature* 372:190-193
- Characiejus D, Pasukoniene V, Kazlauskaitė N, Valuckas KP, Petraitis T, Mauricas M, Den Otter W (2002) Predictive value of CD8^{high}CD57⁺ lymphocyte subset in interferon therapy of patients with renal cell carcinoma. *Anticancer Res* 22:3679-3683
- Chattopadhyay PK, Betts MR, Price DA, Gostic E, Horton H, Roederer M, De Rosa SC (2009) The cytolytic enzymes granzyme A, granzyme B, and perforin: expression patterns, cell distribution, and their relationship to cell maturity and bright CD57 expression. *J Leukoc Biol* 85:88-97

- Chen ML, Pittet MJ, Gorelik L, Flavell RA, Weissleder R, von Boehmer H, Khazaie K (2005) Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 419-429
- Chiou SH, Sheu BC, Chang WC, Huang SC, Hong-Nerng H (2005) Current concepts of tumor-infiltrating lymphocytes in human malignancies. *J Reprod Immunol* 67:35-50
- Cohen AJ, Bunn PA, Franklin W, Magill-Solc C, Hartmann C, Helfrich B, Gilman L, Folkvord J, Helm K, Miller YE (1995) Neutral endopeptidase; variable expression in human lung, inactivation in lung cancer, and modulation of peptide-induced calcium flux. *Cancer Res* 56:831-839
- Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ (2004) Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* 5:1219-1226
- Cózar JM, Canton J, Tallada M, Concha A, Cabrera T, Garrido F, Ruiz-Cabello Osuna F (2005) Analysis of NK cells and chemokine receptors in tumor infiltrating CD4 T lymphocytes in human renal carcinomas. *Cancer Immunol Immunother* 54:858-866
- Cremer J, Martin M, Redl H, Bahrami S, Abraham C, Graeter T, Haverich A, Schlag G, Borst HG (1996) Systemic inflammatory response syndrome after cardiac operations. *Ann Thorac Surg* 61:1740-1720
- Del Rio P, Crafa P, Papadia C, Benecchi L, Campanini N, Sianesi N, Montana CM, Sianesi M (2011) Is CD10 a reliable marker of invasive colorectal cancer? *Ann Ital Chir* 82:279-282
- Dhodapkar MV, Geller MD, Chang DH, Shimizu K, Fujii S, Dhodapkar KM, Krasovsky J (2003) A reversible defect in natural killer T cell function characterizes the progression of premalignant to malignant multiple myeloma. *J Exp Med* 197:1667-1676
- Diegmann J, Junker K, Loncarevic IF, Michel S, Schimmel B, von Eggeling F (2006) Immune escape for renal cell carcinoma: CD70 mediates apoptosis in lymphocytes. *Neoplasia* 8:933-938
- Ditschkowski M, Kreuzfelder E, Rebmann V, Ferencik S, Majetschak M, Schmid EN, Obertacke U, Hirche H, Schade UF, Grosse-Wilde H (1999) *Ann Surg* 229:246-254

- Döcke WD, Randow F, Syrbe U, Krausch D, Asadullah K, Reinke P, Volk HD, Kox W (1997) Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat Med* 3:678-681
- Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L (1999) B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* 5:1365-1369
- Dong C, Juedes AE, Temann UA, Shresta S, Allison JP, Ruddle NH, Flavell RA (2001) ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature* 409:97-101
- Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, Roche PC, Lu J, Zhu G, Tamada K, Lennon VA, Celis E, Chen L (2002) Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 8:793-800
- Donskov F, Bennedsgaard KM, Von der Maase H, Marcussen N, Fisker R, Jensen JJ, Naredi P, Hokland M (2002) Intratumoral and peripheral blood lymphocyte subsets in patients with metastatic renal cell carcinoma undergoing interleukin-2 based immunotherapy: association to objective response and survival. *Br J Cancer* 87:194-201
- Donskov F, Hokland M, Marcussen N, Torp Madsen HH, Von der Maase H (2006) Impact of immune parameters on long-term survival in metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 24:1997-2005
- Dorshkind K, Swain S (2009) Age-associated declines in immune system development and function: causes, consequences, and reversal. *Curr Opin Immunol* 21:404-407
- Drabkin HA, Gemmill RM (2010) Obesity, cholesterol, and clear-cell renal cell carcinoma (RCC). *Adv Cancer Res* 107:39-56
- Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD (2004) The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21:137-148
- Effros RB, Allsopp R, Chiu CP, Hausner MA, Hirji K, Wang L, Harley CB, Villeponteau B, West MD, Giorgi JV (1996) Shortened telomeres in the expanded CD28-CD8+ cell subset in HIV disease implicate replicative senescence in HIV pathogenesis. *AIDS* 8:F17-22

- Evrard S, Falkenrodt A, Park A, Tasseti V, Mutter D, Marescaux J (1997) Influence of CO₂ pneumoperitoneum on systemic and peritoneal cell-mediated immunity. *World J Surg* 21:353-357
- Finke J, Ko J, Rini B, Ireland J, Cohen P (2011) MDSC as a mechanism of tumor escape from sunitinib mediated anti-angiogenic therapy. *Int Immunopharmacol* 11:856-861
- Focosi D, Bestagno M, Burrone O, Petrini M (2010) CD57+ T lymphocytes and functional immune deficiency. *J Leukoc Biol* 87:107-116
- Fornara P, Doehn C, Seyfarth M, Jocham D (2000) Why is urological laparoscopy minimally invasive? *Eur Urol* 37:241-250
- Fornara P, Zacharias M, Steinacker M, Doehn C, Jocham D (2003) Laparoskopische vs. offene Nephrektomie. 10 Jahres-Ergebnisse einer nichtrandomisierten Vergleichsstudie an 549 Patienten mit benignen Nierenerkrankungen. *Urologe A* 42:197-204
- Frankenberger B, Noessner E, Schendel DJ (2007) Immune suppression in renal cell carcinoma. *Semin Cell Dev Biol* 17:330-343
- Frering B, Philip I, Dehoux M, Rolland C, Langlois JM, Desmonts JM (1994) Circulating cytokines in patients undergoing normothermic cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 108:636-641
- Fricke I, Gabrilovich DI (2006) Dendritic cells and tumor microenvironment: a dangerous liaison. *Immunol Invest* 35:459-483
- Fu T, He Q, Sharma P (2011) The ICOS/ICOSL pathway is required for optimal antitumor responses mediated by anti-CTLA-4 therapy. *Cancer Res* 71:5445-5454
- Furuta K, Ikeda M, Nakayama K, Tanaka M, Hamasaki M, Hamilton SR, August JT (2001) Expression of lysosome-associated membrane proteins in human colorectal neoplasms and inflammatory diseases. *Am J Pathol* 159:449-455
- Gabrilovich D (2004) Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat Rev Immunol* 4:941-952
- Garrido F, Algarra I (2001) MHC antigens and tumor escape from immune surveillance. *Adv Cancer Res* 83:117-158
- Gayoso I, Sanchez-Correa B, Campos C, Alonso C, Pera A, Casado JG, Morgado S, Tarazona R, Solana R (2011) Immunosenescence of human natural killer cells. *J Innate Immun* 3:337-343

- Ghiringhelli F, Menard C, Terme M, Flament C, Taieb J, Chaput N, Puig PE, Novault S, Escudier B, Vivier E, Lecesne A, Robert C, Blay JY, Bernard J, Caillat-Zucman S, Freiitas A, Tursz T, Wagner-Ballon O, Capron C, Vainchencker W, Martin F, Zitvogel L (2005) CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J Exp Med* 202:1075-1085
- Glas R, Franksson L, Une C, Eloranta ML, Ohlén C, Orn A, Kärre K (2000) Recruitment and activation of natural killer (NK) cells in vivo determined by the target cell phenotype. An adaptive component of NK cell-mediated responses. *J Exp Med* 191:129-138
- Godfrey DI, Berzins SP (2007) Control points in NT-cell development. *Nat rev Immunol*: 505-518
- Greco F, Hoda MR, Wagner S, Reichelt O, Inferrera A, Fischer K, Fornara P (2010) Adipozytokine: a new family of inflammatory and immunologic markers of invasiveness in major urologic surgery. *Eur Urol* 58:781-781
- Griffiths RW, Elkord E, Gilham DE, Ramani V, Clarke N, Stem PL, Hawlins RE (2007). Frequency of regulatory T cells in renal cell carcinoma patients and investigation of correlation with survival. *Cancer Immunol Immunother* 56:1743-1753
- Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S (2002) Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 20:621-667
- Guerra N, Guillard M, Angevin E, Echchakir H, Escudier B, Moretta A, Chouaib S, Caignard A (2000) Killer inhibitory receptor (CD158b) modulates the lytic activity of tumor-specific T lymphocytes infiltrating renal cell carcinomas. *Blood* 95:2883-2889
- Halazun KJ, Aldoori A, Malik HZ, Al-Mukhtar A, Prasad KR, Toogood GJ, Lodge JP (2008) Elevated preoperative neutrophil to lymphocyte ratio predicts survival following hepatic resection for colorectal liver metastases. *Eur J Surg Oncol* 34:55-60
- Haupt W, Riese J, Mehler C, Weber K, Zowe M, Hohenberger W (1998) Monocyte function before and after surgical trauma. *Dig Surg* 15:102-104
- Heine A, Holderried TA, Brossart P (2009) Immunotherapy in renal cell carcinoma. *Immunotherapy* 1:97-107

- Hershman MJ, Cheadle WG, Wellhausen SR, Davidson PF, Polk HC Jr. (1990) Monocyte HLA-DR antigen expression characterizes clinical outcome in the trauma patient. *Br J Surg* 77:204-207
- Ho CS, López JA, Vuckovic S, Pye CM, Hockey RL, Hart DN (2001) Surgical and physical stress increases circulating blood dendritic cell counts independently of monocyte counts. *Blood* 98:140-145
- Huschak G, Zur Nieden K, Stuttmann R, Riemann D (2003) Changes in monocyte expression of aminopeptidase N/CD13 after major trauma. *Clin Exp Immunol* 134:491-496
- Husmann G, Kaatsch P, Katalinic A, Bertz J, Haberland J, Kraywinkel K, Wolf U: Krebs in Deutschland 2005/2006 Häufigkeiten und Trends. 7. Aufl. Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., Berlin, 2010
- Janeway Immunologie. 7. Aufl. Spektrum Heidelberg, 2009
- Jost L (2003) Das Nierenzellkarzinom. CURRICULUM. Schweiz Med Forum 26:614-619
- Kath R, Schlichter A, Höffken K, Heidenreich A, De Mulder PHM: Nierenzellkarzinom. In: Schmoll HJ, Höffken K, Possinger K: Kompendium Internistische Onkologie. 4. Aufl., Springer, Berlin, 2005, S. 4920-4971
- Kawasaki T, Ogata M, Kawasaki C, Tomihisa T, Okamoto K, Shiematsu A (2001) Surgical stress induces endotoxin hyporesponsiveness and an early decrease of monocyte mCD14 and HLA-DR expression during surgery. *Anesth Analg* 92:1322-1326
- Kehlen A, Geisler M, Olsen J, Sablotzki A, Langner J, Riemann D (2004) IL-10 and TGF-beta differ in their regulation of aminopeptidase N/CD13 expression in monocytes. *Int J Mol Med* 13:877-882
- Keizman D, Ish-Shalom M, Huang P, Eisenberger MA, Pili R, Hammers H, Carducci MA (2012) The association of pre-treatment neutrophil to lymphocyte ratio with response rate, progression free survival and overall survival of patients treated with sunitinib for metastatic renal cell carcinoma. *Eur J Cancer* 48:202-208
- Kim CH, Broxmeyer HE (1999) Chemokines: signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function. *J Leukoc Biol* 65:6-15

- Klatte T, Seligson DB, Leppert JT, Riggs SB, Yu H, Zomorodian N, Kabbinavar FF, Strieter RM, Belledrun AS, Pantuck AJ (2007) The chemokine receptor CXCR3 is an independent prognostic factor in patients with localized clear cell renal carcinoma. *J Urol* 179:61-66
- Knutson KL, Disis ML (2005) Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 54:721-728
- Kretschmer K, Apostolou I, Jaeckel F, Khazale K, von Boehmer H (2006) Making regulatory T cells with defined antigen specificity: role in autoimmunity and cancer. *Immunol Rev* 212:163-169
- Kusmartsev S, Su Z, Heiser A, Dannull J, Eruslanov E, Kübler H, Yancey D, Dahm P, Vieweg J (2008) Reversal of myeloid cell-mediated immunosuppression in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 14:8270-8278
- Lahn M, Fisch P, Köhler G, Kunzmann R, Hentrich I, Jesuiter H, Behringer D, Muschal B, Veelken H, Kulmburg P, Iklé DN, Lindemann A (1999) Pro-inflammatory and T cell inhibitory cytokines are secreted at high levels in tumor cell cultures of human renal cell carcinoma. *Eur Urol* 35:70-80
- Lehmann J, Huehn J, de la Rosa M, Maszyra F, Kretschmer U, Krenn V, Brunner M, Scheffold A, Hamann (2002) Expression of the integrin alpha Ebeta 7 identifies unique subsets of CD25+ as well as CD25- regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:13031-13036
- Lekkou A, Karakantza M, Mouzaki A, Kalfarentzos F, Gogos CA (2004) Cytokine production and monocyte HLA-DR expression as predictors of outcome for patients with community-acquired severe infections. *Clin Diagn Lab Immunol* 11:161-167
- Liotta F, Gacci M, Frosali F, Querci V, Vittori G, Lapini A, Santarasci V, Serni S, Cosmi L, Maggi L, Angeli R, Mazzinghi B, Romagnani P, Maggi E, Carini M, Romagnani S, Annunziato F (2011) Frequency of regulatory T cells in peripheral blood and in tumour-infiltrating lymphocytes correlates with poor prognosis in renal cell carcinoma. *BJU Int* 107:1500-1506
- Liu C, Liu J, Zhang S (2011) Laparoscopic versus conventional open surgery for immune function in patients with colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 26:1375-1385
- Ljungberg B, Cowan NC, Hanbury DC, Hora M, Kuczyk MA, Merseburger AS, Patard JJ, Mulders PF, Sinescu IC (2010) EAU guidelines on renal cell carcinoma: the 2010 update. *Eur Urol* 58:398-406

- Loetscher M, Loetscher P, Brass N, Meese E, Moser B (1998) Lymphocyte-specific chemokine receptor CXCR3: regulation, chemokine binding and gene localization. *Eur J Immunol* 28:3696-3705
- Longo R, D'Andrea MR, Sarmiento R, Salerno F, Gasparini G (2007) Integrated therapy of kidney cancer. *Ann Oncol* 18:141-148
- Lotan D, Zilberman D, Dagan O, Keller N, Ben-Abraham R, Weinbroum AA, Harel R, Barzilay Z, Paret G (2001) Beta-chemokine secretion patterns in relation to clinical course and outcome in children after cardiopulmonary bypass: continuing the search to abrogate systemic inflammatory response. *Ann Thorac Surg* 71:233-237
- Male D: *Immunologie auf einen Blick*. 1. Aufl. Elsevier, München, 2005
- Maszyna F, Hoff H, Kunkel D, Radbruch A, Brunner-Weizierl MC (2003) Diversity of clonal T cell proliferation is mediated by differential expression of CD152 (CTLA-4) on the cell surface of activated individual T lymphocytes. *J Immunol* 171:3459-3466
- McNicholl JM, Smith DK, Qari SH, Hodge T (1997) Host genes HIV: the role of chemokine receptor gene CCR5 and its allele. *Emerg Infect Dis* 3:261-271
- Menetrier-Caux C, Bain C, Favrot MC, Due A, Blay JY (1999) Renal cell carcinoma induces interleukin 10 and prostaglandin E2 production by monocytes. *Br J Cancer* 79:119-130
- Mercer JC, Ragin MJ, August A (2005) Natural killer T cells: rapid responders controlling immunity and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 37:1337-1343
- Minasian LM, Motzer RJ, Gluck L, Mazumdar M, Vlamis V, Krown SE (1993) Interferon alfa-2a in advanced renal cell carcinoma: treatment results and survival in 159 patients with long-term follow-up. *J Clin Oncol* 11:1368-1375
- Möhrle S (2011) Immunphänotypisierung von neutrophilen Granulozyten und NK-Zellen bei Sepsis-, HLH- und Tumorpatienten.
- Mondino A, Jenkins MK (1994) Surface proteins involved in T cell costimulation. *J Leukoc Biol* 55:805-815
- Moretta A, Biassoni R, Bottino C, Mingari MC, Moretta L (2000) Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity. *Immunol Today* 5:228-34
- Moretta L, Biassoni R, Bottino C, Cantoni C, Pende D, Mingari MC, Moretta A (2002) Human NK cells and their receptors. *Microbes Infect* 15:1539-1544

- Na IK, Keilholz U, Letsch A, Bauer S, Asemissen AM, Nagorsen D, Thiel E, Scheibenbogen C (2007) Addition of GM-CSF to a peptide/KLH vaccine results in increased frequencies of CXCR3-expressing KLH-specific T cells. *Cancer Immunol Immunother* 56:391-396
- Nakagomi H, Pisa P, Pisa EK, Yamamoto Y, Halapi E, Backlin K, Juhlin C, Kiessling R (1995) Lack of interleukin-2 (IL-2) expression and selective expression of IL-10 mRNA in human renal cell carcinoma. *Int J Cancer* 63:366-371
- Nakanishi H, Monden T, Morimoto H, Kobayashi T, Shimano T, Mori T (1991) Perforin expression in lymphocytes infiltrated to human colorectal cancer. *Br J Cancer* 64:239-242
- Navarrete Santos A, Kehlen A, Schütte W, Langner J, Riemann D (1998) Regulation by transforming growth factor-beta1 of class II mRNA and protein expression in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Int Immunol* 10:601-607
- Neidhart JA, Anderson SA, Harris JE, Rinehart JJ, Laszlo J, Dexeus FH, Einhorn LH, Trump DL, Benedetto PW, Tuttle RL, et al. (1991) Vinblastine fails to improve response of renal cancer to interferon alfa-n1: high response rate in patients with pulmonary metastases. *J Clin Oncol* 9:832-836
- Oba J, Nakahara T, Hayashida S, Kido M, Xie L, Takahara M, Uchi H, Miyazaki S, Abe T, Hagihara A, Moroi Y, Furue M (2011) Expression of CD10 predicts tumor progression and unfavourable prognosis in malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol* 65:1152-1160
- Ochoa AC, Zea AH, Hernandez C, Rodriguez PC (2007) Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal carcinoma. *Clin Cancer Res* 13:721-726
- Ohno Y, Nakashima J, Ohori M, Gondo T, Hatano T, Tachibana M (2012) Followup of neutrophil-to-lymphocyte ratio and recurrence of clear cell renal cell carcinoma 187: 411-417
- Ohteki T, Okuyama R, Seki S, Abo T, Sugiurs K, Kusumi A, Ohmori T, Watanabe H, Kumagai K (1992) Age-dependent increase of extrathymic T cells in the liver and their appearance in the periphery of older mice. *J Immunol* 149:1562-1570
- Ordemann J, Jacobi CA, Braumann C, Schwenk W, Volk HD, Müller JM (2002) Immunomodulatory changes in patients with colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 17:37-41

- Osório-Costa F, Rocha GZ, Dias MM, Carvalheira JB (2009) Epidemiological and molecular mechanism aspects linking obesity and cancer. *Arg Bras Endocrinol Metabol* 53:213-226
- Pauls K, Schön M, Kubitza RC, Homey B, Wiesenborn A, Lehmann P, Ruzicka T, Parker CM, Schön MP (2001) Role of integrin alphaE(CD103)beta7 for tissue-specific epidermal localization of CD8+ T lymphocytes. *J Invest Dermatol* 117:569-575
- Peng YF, Laouar Y, Li MO, Green EA, Flavell (2004) TGF-beta regulates in vivo expansion of Foxp3-expressing CD4(+)CD25(+) regulatory T cells responsible for protection against diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:4572-4577
- Perry SE, Mostafa SM, Wenstone R, Shenkin A, McLaughlin PJ (2003) Is low monocyte HLA-DR expression helpful to predict outcome in severe sepsis? *Intensive Care Med* 29:1245-1252
- Pipkin ME, Lieberman J (2007) Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Curr Opin Immunol* 19:301-308
- Porta C, Bonomi L, Lillaz B, Paglino C, Rovati B, Imarisio I, Morbini P, Villa C, Danova M, Mensi M, Roverto B (2007) Renal cell carcinoma-induced immunosuppression: an immunophenotypic study of lymphocyte subpopulations and circulating dendritic cells. *Anticancer Res* 27:165-173
- Riemann D, Göhring B, Langer J (1994) Expression of aminopeptidase N/CD13 in tumor-infiltrating lymphocytes from human renal cell carcinoma. *Immunol Lett* 42:19-23
- Riemann D, Kehlen A, Langner J (1999) CD13-not just a marker in leukaemia typing. *Immunol Today* 20:83-88
- Rihs S, Walker C, Virchow JC, Boer C, Kroegel C, Gírl SN, Braun RK (1996) Differential expression of alpha E beta 7 integrins on bronchoalveolar lavage T lymphocyte subsets: regulation by alpha 4 beta 1-integrin crosslinking and TGF-beta. *Am J Respir* 15:600-610
- Ringhoffer M, Geschwend JE (2002) Specific cellular immunotherapy of renal cell carcinoma. Current status and prospects. *Urologe A* 41:249-257

- Robert Koch Institut. Gesundheitsberichterstattung und Epidemiologie. Datenbankabfragen. Daten zur Krebsinzidenz und – mortalität in Deutschland. URL:www.rki.de/cln_151/nn_204124/DE/Content/GBE/DachdokKrebs/ Datenbankabfragen/datenbankabfragen_node.html?_nnn=true [07.05.2011]
- Romero JM, Aptsiauri N, Vazquez F, Cozar JM, Canton J, Cabrera T, Tallada M, Garrido F, Ruiz-Cabello F (2006) Analysis of the expression of HLA class I, proinflammatory cytokines and chemokines in primary tumors of patients with localized and metastatic renal cell carcinoma. *Blood* 107:2013-2021
- Rudd CE, Schneider H (2003) Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 co-receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 3:544-556
- Sachse C, Prigge M, Cramer G, Pallua N, Henkel E (1999) Association between reduced human leukocyte antigen (HLA)-DR expression on blood monocytes and increased plasma level of interleukin-10 in patients with severe burns. *Clin Chem Lab Med* 37:193-198
- Sakaguchi S (2000) Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 101:455-458
- Saleh MN, Goldman SJ, LoBuglio AF, Beall AC, Sabio H, McCord MC, Minasian L, Alpaugh RK, Weiner LM, Munn DH (1995) CD16+ monocytes in patients with cancer: spontaneous elevation and pharmacologic induction by recombinant human macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 85:2910-2917
- Sanchez-Torres C, García-Romo GS, Cornejo-Cortés MA, Rivas-Carvalho A, Sánchez-Schmitz G (2001) CD16+ and CD16- human blood monocyte subsets differentiate in vitro to dendritic cells with different abilities to stimulate Cd4+ T cells. *Int Immunol* 12:1571-1581
- Santos AN, Langner J, Herrmann M, Riemann D (2000) Aminopeptidase N/CD13 is directly linked to signal transduction pathways in monocytes. *Cell Immunol* 201:22-32
- Sarnacki S, Bègue B, Buc H, Le Deist F, Cerf-Bensussan N (1992) Enhancement of CD3-induced activation of human intestinal intraepithelial lymphocytes by stimulation of the beta 7-containing integrin defined by HML-1 monoclonal antibody. *Eur J Immunol* 22:2887-2892

- Schleypen JS, Baur N, Kammerer R, Nelson PJ, Rohrmann K, Gröne EF, Hohenfellner A, Pohla H, Schendel DJ, Falk CS, Noessner E (2006) Cytotoxic markers and the frequency predict functional capacity of natural killer cells infiltrating renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 12:718-725
- Schmindinger M, Bellmunt J (2010) Plethora of agents, plethora of targets, plethora of side effects in metastatic renal cell carcinoma (2010) *Cancer Treat Rev* 36:416-424
- Schroeter P, Sablotzki A, Riemann D (2007) CD13 and CD10 expression of granulocytes as markers for the functioning of the Immune system: quantification of the expression of membrane molecules using 1:1 labeled monoclonal antibodies and flow cytometry. *Methods Mol Biol* 378:71-81
- Sejima T, Iwamoto H, Morizane S, Hinata N, Yao A, Isoyama T, Saito M, Takenaka A (2011) The significant immunological characteristics of peripheral blood neutrophil-to-lymphocyte ratio and Fas ligand expression incidence in nephrectomized tumor in late recurrence from renal cell carcinoma. *Urol Oncol* [Epub ahead of print]
- Siddiqui SA, Frigola X, Bonne-Annee S, Mercader M, Kuntz SM, Krambeck AE, Sengupta S, Dong H, Cheville JC, Lohse CM, Krco CJ, Webster WS, Leibovich BC, Blute ML, Knutson KL, Kwon ED (2007) Tumor-infiltrating Foxp3-CD4+CD25-T cells predict poor survival in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 13:2075-2081
- Siebels M, Rohrmann K, Oberneder R, Stahler M, Haseke N, Beck J, Hofmann R, Kindler M, Kloepfer P, Stief C (2011) A clinical phase I/II trial with monoclonal antibody cG250 (RENCAREX) and interferon-alpha-2a in metastatic renal cell carcinoma patients. *World J Urol* 29:121-126
- Silverberg E (1987) Statistical and epidemiologic data on urologic cancer. *Cancer* 1:692-717
- Smit MJ, Verdijk P, van der Raaij-Helmer EM, Navis M, Hensbergen PJ, Leurs R, Tensen CP (2003) CXCR3-mediated chemotaxis of human T cells is regulated by a Gi- and phospholipase C-dependent pathway and not via activation of MEK/p44/p42 MAPK nor Akt/PI-3 kinase. *Blood* 102:1959–1965.

- Song L, Asgharzadeh S, Salo J, Engell K, Wu HW, Sposto R, Ara T, Silverman AM, DeClerck YA, Seeger RC, Metelitsa LS (2009) Valpha24-invariant NKT cells mediate antitumor activity via killing of tumor-associated macrophages. *J Clin Invest* 119:1524-1536
- Sosman JA, Puzanov I, Atkins MB (2007) Opportunities and obstacles to combination targeted therapy in renal cell cancer. *Clin Cancer Res* 13:764-769
- Strauch UG, Mueller RC, Li XY, Cernadas M, Higgins JM, Binion DG, Parker CM (2001) Integrin alpha E(CD103)beta 7 mediates adhesion to intestinal microvascular endothelial cell lines via an E-cadherin-independent interaction. *J Immunol* 166:3506-3514
- Strauss L, Bergmann C, Szczepanski MJ, Lang S, Kirkwood JM, Whiteside TL (2008) Expression of ICOS on human melanoma-infiltrating CD4+CD25highFoxp3+T regulatory cells: implications and impact on tumor-mediated immune suppression. *J Immunol* 180:2967-2980
- Strohmeier JC, Blume C, Meisel C, Doecke WD, Hummel M, Hoefflich C, Thiele K, Unbehaun A, Hetzer R, Volk HD (2003) Standardized immune monitoring for the prediction of infections after cardiopulmonary bypass surgery in risk patients. *Cytometry B Clin Cytom* 53:54-62
- Suyama T, Furuya M, Nishiyama M, Kasuya Y, Kimura S, Ichikawa T, Ueda T, Nikaido T, Ito H, Ishikura H (2005) Up-regulation of the interferon gamma (IFN-gamma)-inducible chemokines IFN-inducible T-cell alpha chemoattractant and monokine induced by IFN-gamma and of their receptor CXCR3 in human renal cell carcinoma. *Cancer* 103:258-267
- Tahir SM, Cheng O, Shaulov A, Koezuka Y, Bublek GJ, Wilson SB, Balk SP, Exley MA (2001) Loss of IFN-gamma production by invariant NK T cells in advanced cancer. *J Immunol* 167:4046-4050
- Tait C, Tandon S, Baker L, Goodman C, Townell N, Nabi G (2011) Long-term oncologic outcomes of laparoscopic radical nephrectomy for kidney cancer resection: Dundee cohort and metaanalysis of observational studies. *Surg Endosc* 25:3154-3161
- Takahashi A, Sasaki H, Kim SJ, Tobisu K, Kakizoe T, Tsukamoto T, Kumamoto Y, Sugimura T, Terada M (1994) Markedly increased amounts of messenger RNAs for vascular endothelial growth factor and placenta growth factor in renal cell carcinoma associated with angiogenesis. *Cancer Res* 54:4233-4237

- Takaki Y, Iwata N, Tsubuki S, Taniguchi S, Toyoshima S, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Lee HJ, Shirotani K, Saido TC (2000) Biochemical identification of the neutral endopeptidase family member responsible for catabolism of amyloid beta peptide in the brain. *J Biochem* 128:897-902
- Tarazona R, DelaRosa O, Alonso C, Ostos B, Espejo J, Peña J, Solana R (2000) Increased expression of NK cell markers on T lymphocytes in aging and chronic activation of the immune system reflects the accumulation of effector/senescent T cells. *Mech Ageing Dev* 121:77-88
- Tarhini AA, Iqbal F (2010) CTLAA-4 blockade: therapeutic potential in cancer treatments. *Onco Targets Ther* 3:15-25
- Terabe M, Berzofsky JA (2008) The role of NKT cells in tumor immunity. *Adv Cancer Res* 101:277-348
- Thompson RH, Kuntz SM, Leibovich BC, Dong H, Lohse CM, Webster WS, Sengupta S, Frank I, Parker AS, Zincke H, Blute ML, Sebo TJ, Cheville JC, Kwon ED (2006) Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. *Cancer Res* 66:3381-3385
- Thompson RH, Dong H, Lohse CM, Leibovich BC, Blute ML, Cheville JC, Kwon ED (2007) PD-1 is expressed by tumor-infiltrating immune cells and is associated with poor outcome for patients with renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 13:1757-1761
- Tran-Paterson R, Boileau G, Giguère V, Letarte M (1990) Comparative levels of CALLA/neutral endopeptidase on normal granulocytes, leukemic cells, and transfected COS-1 cells. *Blood* 76:775-782
- Trinchieri G (1995) Interleukin-12 and interferon-gamma. Do they always go together? *Am J Pathol* 147:1534-1538
- Türk I, Deger S, Loening SA, Schöneberger B (1999) Laparoskopische Operationen in der Urologie. *J. Urol. Urogynäkol* 6:69-72
- Uss E, Roshani AT, Hooibrin B, Lardy NM, van Lier RA, ten Berge IJ (2006) CD103 is marker for alloantigen-induced regulatory CD8+T cells. *J Immunol* 177:2775-2783
- Van Kaer L, Joyce S (2005) Innate immunity: NKT cells in the spotlight. *Curr Biol* 15:429-431.

- Van Rossum AP, Vlasveld LT, Vlasveld IN, Jansen PM, Dik WA, Hooijkaas H, Castel A (2009) Granulocytosis and thrombocytosis in renal cell carcinoma: a pro-inflammatory cytokine response originating in the tumor. *Neth J Med* 67:191-194
- Varona A, Blanco L, Perez I, Gil J, Irazusta J, López JI, Candenias ML, Pinto FM, Larrinaga G (2010) Expression and activity profiles of DDP IV/CD26 and NEP/CD10 glycoproteins in human renal cancer are tumor-type dependent. *BMC Cancer* 10:193
- Volk HD (2002) Immunodepression in the surgical patient and increased susceptibility to infection. *Crit Care* 6:279-281
- Wichmann MW, Hüttl TP, Winter H, Spelsberg F, Angele MK, Heiss MM, Jauch KW (2005) Immunological effects of laparoscopic vs open colorectal surgery: a prospective clinical study. *Arch Surg* 140:692-697
- Wierecky J, Müller MR, Wirths S, Halder-Oehler E, Dörfel D, Schmidt SM, Häntschel M, Brugger W, Schröder S, Horger MS, Kanz L, Brossart P (2006) Immunologic and clinical responses after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells in metastatic renal cancer patients. *Cancer Res* 66:5910-5918
- Wilcox RA (2010) Cancer-associated myeloproliferation: old association, new therapeutic target. *Mayo Clin Proc* 85:656-663
- Wirth M, Fröhner M: Nierentumoren: In: Siewert JR, Rothmund M, Schumpelick V: *Onkologische Chirurgie. Praxis der Visceralchirurgie. 3. Aufl.* Springer Verlag, Heidelberg, 2010, S. 857-860
- Wittekind C, Meyer HJ, Bootz F: Niere. In: *TNM Klassifikation maligner Tumoren. 6. Aufl.*, Springer, Berlin, 2002, S. 181-183
- Whiteside TL (2004) Down-regulation of zeta-chain expression in T cells: biomarker of prognosis in cancer? *Cancer Immunology, Immunotherapy* 53:865-878
- Woo EY, Yeh H, Chu TS, , Schlienger K, Carroll RG, Riley JL, Kaiser LR, June CH (2002) Cutting edge: Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. *J Immunol* 168:4272-4276
- Wrann CD, Laue T, Hübner L, Kuhlmann S, Jacobs R, Goudeva L, Nave H (2012) Short-term and long-term leptin exposure differentially affect human natural killer cell immune functions. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302:E108-E116

- Wu HY, Li F, Tang QF (2010) Immunological effects of laparoscopic and open cholecystectomy. *J Int Med Res* 38:2077-2083
- Yanagisawa K, Seino K, Ishikawa Y, Nozue M, Todoroki T, Fukao K (2002) Impaired proliferative response of V alpha 24 NKT cells from cancer patients against alpha-galactosylceramide. *J Immunol* 168:6494-6499
- Yang JC, Hughes M, Kammula U, Royal R, Sherry RM, Topalian SL, Suri KB, Levy C, Allen T, Mavroukakis S, Lowy I, White DE, Rosenberg SA (2007) Ipilimumab (anti-CTLA4 antibody) causes regression of metastatic renal cell cancer associated with enteritis and hypophysitis. *J Immunother* 30:825-830
- Young AN, Master VA, Amin MB (2006) Current trends in the molecular classification of renal neoplasms. *ScientificWordJournal* 6:2505-2018
- Zantl N, Staehler M, Maurer T, Haseke N, Liedl B, Hofer C, Hoffmann RT, Weirich G, Zimmermann F, Siebels M: Das Nierenzellkarzinom. In: Treiber U, Zaak D: *Manual Urogenitale Tumoren*. 4. Aufl. W. Zuckerschwerdt Verlag, München, 2008, S. 154-181
- Zea AH, Rodríguez PC, Atkins MB, Hernandez C, Signoretti S, Zabaleta J, McDermott D, Quiceno D, Youmans A, O'Neill A, Mier J, Ochoa AC (2005) Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer Res* 65:3044-3048
- Ziegler-Heitbrock L (2007) The CD14+CD16+ blood monocytes: their role in infection und inflammation. *J Leukoc Biol* 81:584-592
- Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJ, Liu YJ, MacPherson G, Randolph GJ, Scherberich J, Schmitz J, Shortman K, Sozzani S, Strobl H, Zembala M, Austyn JM, Lutz MB (2010) Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116:e74-80
- Zou W (2006) Regulatory T cells, tumor immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 6:295-307

Thesen

1. Das Immunsystem ist verantwortlich für die antitumoralen Abwehrmechanismen des Körpers. Eine Bestimmung der phänotypischen Eigenschaften der Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten und dendritischen Zellen im peripheren Blut von Tumorpatienten ermöglicht eine Beurteilung der tumorbedingten Immunabwehr und Immunsuppression.
2. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie und der Verwendung monoklonaler Antikörper können Immunzellen im peripheren Blut von Nierenzellkarzinompatienten analysiert und Rückschlüsse auf den Funktionszustand des Immunsystems gewonnen werden. Zudem ermöglicht die Methode ein perioperatives Immunmonitoring von Nierenzellkarzinompatienten, die einer onkologischen Resektion zugeführt wurden.
3. Im Vergleich zu einer altersentsprechenden Kontrollgruppe weisen Nierenzellkarzinompatienten im peripheren Blut einen Anstieg der Leukozyten- und Granulozytenanzahl auf. Die Anzahl der dendritischen Zellen und Lymphozyten ist hingegen reduziert.
4. Bezüglich funktionsassoziierter T-Zellmarker weisen Nierenzellkarzinompatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen prozentual höhere Anteile CTLA-4+CD8+T-Zellen und prozentual geringere Anteile CD28+CD8+T-Zellen im peripheren Blut auf.
5. Liegt ein fortgeschrittenes Tumorstadium (\geq pT3) vor, wird dies von einem Anstieg der Leukozyten-, Granulozyten- und Monozytenanzahl im peripheren Blut der Patienten begleitet.
6. Die Anzahl CD57+NK-Zellen im venösen Blut von Nierenzellkarzinompatienten korreliert mit der lokalen Ausdehnung des Nierenzellkarzinoms.
7. Ein fortgeschrittenes Nierenzellkarzinom (\geq pT3) ist mit einer reduzierten Anzahl an dendritischen Zellen im peripheren Blut sowie einer verminderten monozytären HLA-DR-Expression und gesteigerten monozytären CD13-Expression vergesellschaftet.
8. Die Berechnung der Granulozyten/Dendritischen Zellen – Ratio kann zur Beurteilung des Funktionszustandes des Immunsystems dienen. Patienten im fortgeschrittenen Tumorstadium zeigten eine erhöhte Granulozyten/Dendritischen Zellen – Ratio. Die Bedeutung der Granulozyten/Dendritischen Zellen – Ratio in Bezug auf die Prognose der Nierenzellkarzinompatienten wäre in zukünftigen Studien mit Hilfe einer Überlebensanalyse zu klären.

9. Das laparoskopische Operationsverfahren führt im Vergleich zum konventionell-offenem Operationsverfahren zu einer geringeren Gewebetraumatisierung, immunologisch gekennzeichnet durch eine verminderte postoperative inflammatorische Immunreaktion. Laborchemisch ist dies durch einen postoperativ geringeren Leukozyten- und Granulozytenanstieg im peripheren Blut minimal-invasiv operierter Patienten zu dokumentieren.

10. Der postoperative Verlauf konventionell-offen operierter Patienten ist im Vergleich zu laparoskopisch operierten Patienten gekennzeichnet durch einen deutlicheren und länger anhaltenden Abfall der dendritischen Zellen im peripheren Blut.

11. Die postoperativ stärkere Herabregulierung der monozytären HLA-DR-Expression konventionell-offen operierter Patienten zeigt eine verminderte Immunkompetenz dieser Patienten auf. Gleichzeitig impliziert dieses Messergebnis ein erhöhtes Risiko postoperativer Komplikationen.

12. Patienten mit laparoskopischen OP-Verfahren zeigen im postoperativen Verlauf eine schnellere Wiederherstellung der präoperativ gemessenen leukozytären Zellsubpopulationen im peripheren Blut.

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Vor- und Nachname	Sabine Hase, geb. Thiele
Geburtsdatum	01.09.1982
Geburtsort	Erfurt
Familienstand	verheiratet, 1 Kind
Staatsangehörigkeit	Deutschland

Berufliche Tätigkeit

07.2010 – 09.2011	Assistenzärztin in Weiterbildung zum Facharzt für Innere und Allgemeinmedizin in der Praxis Dr. med. Ute Schnell, Bad Dürrenberg
seit 12.2011	Assistenzärztin in der Klinik für Innere Medizin I des Krankenhauses Martha-Maria, Halle-Dölau

Praktisches Jahr

08.2007 – 12.2007	Chirurgie, Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie, Krankenhaus Martha-Maria, Halle-Dölau
12.2007 – 03.2008	Innere Medizin, Klinik für Innere Medizin IV, Universitätsklinikum Halle (Saale)
03.2008 – 07.2008	Allgemeinmedizin, Praxis Dr. med. Ute Schnell, Bad Dürrenberg

Famulaturen

02.2005 – 03.2005	Dermatologie, Universitätsklinikum Halle (Saale)
02.2006	Gynäkologie/Geburtshilfe, Universitätsklinikum Halle (Saale)
03.2006	Augenheilkunde, Universitätsklinikum Halle (Saale)
07.2006 – 08.2006	Innere Medizin, Universitätsklinikum Halle (Saale)
02.2007 – 03.2007	Chirurgie, Praxis Dr. Schade/Dr. Schütte, Erfurt

Studium

10.2001	Beginn des Studiums der Angewandten Medienwissenschaften an der TU Ilmenau
10.2002	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
10.2004	Abschluss des 1. Abschnitts der Ärztlichen Prüfung
11.2008	Abschluss des 2. Abschnitts der Ärztlichen Prüfung

Schulausbildung

1989 – 1991	Polytechnische Oberschule, POS2 Erfurt
1991 – 1993	Grundschule 7, Erfurt
1993 – 2001	Albert-Schweitzer-Gymnasium, Erfurt

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht verwendet sowie aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Sabine Hase

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, dass es keine früheren Promotionsversuche gegeben hat und die vorliegende Arbeit den ersten von mir unternommenen Promotionsversuch darstellt.

Sabine Hase

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Frau PD Dr. med. Dagmar Riemann danken für die Überlassung des Themas, die große Unterstützung bei der Auswertung der erhobenen Messergebnisse und die kritische Korrektur meiner Dissertation.

Ich bedanke mich bei Frau Prof. Dr. Barbara Seliger, dass ich die Arbeit in ihrem Institut durchführen durfte sowie bei Herrn Prof. Dr. med. Paolo Fornara für die Kooperation seiner Klinik.

Für die Einarbeitung in die Methodik und die kompetente Unterstützung im Labor danke ich Frau Kießling und Frau Turzer. Zudem möchte ich mich bei Frau Dr. Kersten Fischer für ihre Hilfsbereitschaft und die Bereitstellung der Pathologie-Befunde bedanken.

Frau Dr. Susanne Unverzagt danke ich für die immer freundliche Beratung in Bezug auf die statistische Aufbereitung meiner Messdaten.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mir das Studium der Medizin ermöglicht haben und immer für mich da waren. Meiner Schwester Antje danke ich für ihre kompetente Beratung und technische Unterstützung bezüglich der grafischen Gestaltung meiner Dissertation. Besonders danke ich meinem Mann Ulf für seine Geduld, sein Verständnis und seine aufbauenden Worte.