

Aus der Abteilung Pathologie
(Prof. Dr. med. H.-J. Radzun)
im Zentrum Pathologie und Rechtsmedizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Verteilung und Funktion verschiedener Subtypen dendritischer Zellen
bei Nierenzellkarzinomen**

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Sven Brauneck
aus Leipzig

Göttingen 2013

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichterstatter: PD Dr. med. P. Middel

II. Berichterstatter/in:

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	3
1.1	Das Nierenzellkarzinom	3
1.2	Rolle antigenpräsentierender Zellen im Immunsystem	6
1.3	Klassifikation und Funktion der Chemokine	9
1.4	Therapeutische Ansätze bei Nierenzellkarzinomen	11
1.5	Ziel dieser Arbeit	13
2	MATERIAL UND METHODEN	15
2.1	Materialien	15
2.2	Gewebeproben	19
2.3	Immunhistochemie und Immunfluoreszenzuntersuchungen am Gewebe	21
2.3.1	<i>Methode der Immunhistochemie</i>	21
2.3.2	<i>Doppelimmunfluoreszenzfärbungen</i>	22
2.4	Zellkultur	24
2.4.1	<i>Passagieren der Zelllinien</i>	25
2.5	RNA-Präparation	26
2.5.1	<i>RNA-Extraktion aus Zellkultur</i>	26
2.5.2	<i>Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentrationen in wässrigen Lösungen</i>	27
2.5.3	<i>Quantitative Bestimmung der RNA-Konzentration mittels Agilent 2100 bioanalyzer</i>	28
2.6	RT-PCR	29
2.6.1	<i>Amplifikation von spezifischen DNA-Sequenzen durch die PCR</i>	29
2.6.2	<i>cDNA-Synthese</i>	29
2.6.3	<i>PCR-Bedingungen</i>	30
2.6.4	<i>Temperaturprofile der Oligonukleotide</i>	31
2.6.5	<i>Agarosegelelektrophorese</i>	32
2.6.6	<i>Real-time RT-PCR</i>	33
3	ERGEBNISSE	35
3.1	Quantifizierung dendritischer/antigenpräsentierender Zellen mittels S100-Darstellung in der Immunhistochemie	35
3.2	Quantifizierung unreifer dendritischer Zellen in Tumorgewebe, Infiltrationszone und Normalgewebe mittels CD1a-spezifischer Immunhistochemie	39
3.3	Quantifizierung reifer dendritischer Zellen in Tumorgewebe, Infiltrationszone und Normalgewebe mittels CD83-spezifischer Immunhistochemie sowie weiterer Reifungsmarker	44
3.4	Nachweis tertiärer lymphatischer Strukturen in der peritumoralen Zone als Hinweis auf eine lokale, gegen den Tumor gerichtete T-Zellimmunantwort	49
3.5	mRNA-Expression der lymphoiden Chemokine CCL19, CCL20 und CCL21 in Tumorzellkulturen sowie Tumorgewebe des Nierenzellkarzinoms	51
3.6	Nachweis der Verteilung der Chemokine CCL19, CCL20 und CCL21 sowie der Chemokinrezeptoren CCR6 und CCR7 in Tumorproben von Nierenzellkarzinomen mittels Immunhistochemie und Doppelimmunfluoreszenzfärbungen	55
4	DISKUSSION	63
5	ZUSAMMENFASSUNG	77
5.1	Schlussfolgerungen	78
6	LITERATURNACHWEIS	79

Abkürzungsverzeichnis

AEC	Amino-Ethyl-Carbazol
AP	Alkalische Phosphatase
Aqua bidest.	Bi- (zweifach) destilliertes Wasser
Bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin (Rinderalbumin)
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Komplementäre DNA
Cy2/3	(Indo-) Carbocyanin
DAB	Diaminobenzidin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DC	Dendritische Zellen
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
dT	Desoxythymidin
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (Ethyldiamintetraessigsäure)
E-Wasser	Enthärtetes Wasser
FCS	Fetal calf serum (fetales Kälberserum)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPF	High power field
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
I.E.	Internationale Einheit(en)
IFN	Interferon
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IZ	Infiltrationszone (Junktionszone)
LAK	Lymphokin-aktivierte Killerzellen
LN	Lymph node (Lymphknoten)
M	Mol
MHC	Major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
NTP	Nukleosidtriphosphat
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
p-Wert	Signifikanzwert, Überschreitungswahrscheinlichkeit
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RPMI	Zellkulturmedium (entwickelt am Roswell Park Memorial Institute)
RT	Reverse Transkriptase
Taq	Thermus aquaticus (thermophiles Bakterium)
TBS	Tris buffered saline (TRIS-gepufferte Salzlösung)
TH ₁ -Zellen	Subgruppe von T-Helferzellen
TIL	Tumorinfiltrierende Lymphozyten
T _m	Schmelztemperatur in °C
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tromethamin, Trometamol)
UV	Ultraviolett

Anmerkung:

Die Abkürzungen der Puffer RDD, RLT und RPE aus dem Extraktionskit „RNeasy“ der Firma Qiagen, Hilden, stammen vom Hersteller. Die genaue Zusammensetzung ist nicht bekannt.

1 Einleitung

1.1 Das Nierenzellkarzinom

Das Nierenzellkarzinom dominiert mit mehr als 80 % die primär malignen Tumoren des Nierenparenchyms. Es ist der dritthäufigste urologische Tumor. Männer erkranken ungefähr doppelt so häufig wie Frauen (Bennington et al. 1968). Der Tumor tritt am häufigsten in der 5. bis 6. Lebensdekade auf (Paganini-Hill et al. 1983) und manifestiert sich in der Regel nach dem 40. Lebensjahr. Im bundesdeutschen Krebsregister zeigen sowohl Inzidenz als auch Mortalität des Nierenzellkarzinoms bei beiden Geschlechtern eine steigende Tendenz (Schön et al. 1989). Schmerzen, Hämaturie und palpabler Flankentumor gelten zwar als die klassische Symptomentrias, jedoch wird sie lediglich bei bis zu 30 % aller Patienten beobachtet (Patel und Lavengood 1978). Sonographie und Computertomographie können heute in 95 % der Fälle die Dignität einer renalen Raumforderung korrekt bestimmen (Balfe et al. 1982; Vincent et al. 1987). Die offene radikale Tumornephrektomie war lange Zeit die einzige anerkannte Therapieform mit kurativer Intention und galt daher als Therapie der Wahl beim lokal begrenzten Nierenzellkarzinom (McDonald 1982). Laut den aktuellen DGHO-Leitlinien aus dem Jahr 2013 sollte jedoch die partielle Nephrektomie, wenn laut Befund und chirurgisch möglich, favorisiert werden. Sie hat das Ziel, funktionsfähiges Nierengewebe zu erhalten. Beide operative Verfahren sind ebenfalls auch laparoskopisch möglich (Jocham und Miller 2007).

Aufgrund der deutlich höheren Inzidenz in den Industrieländern im Vergleich zu den Ländern der „Dritten Welt“ (Whitmore 1989) muss angenommen werden, dass Umwelteinflüsse im Sinne eines multifaktoriellen Geschehens als kritische Faktoren zur Entstehung des Nierenzellkarzinoms beitragen. Konkret ursächliche Faktoren für die Entstehung des Nierenzellkarzinoms sind derzeit weiterhin noch ungeklärt.

In der Regel tritt das Nierenzellkarzinom sporadisch auf. Selten gibt es eine familiäre Häufung im Rahmen eines Hippel-Lindau-Syndroms (Pathak et al. 1982). Bei diesem Syndrom kommt es bereits im frühen Erwachsenenalter, ohne Bevorzugung eines Geschlechts, zur Ausbildung von klarzelligen Nierenzellkarzinomen (Störkel 1997). Diese sind oft bilateral oder multifokal gelegen, im Gegensatz zu den sporadisch auftretenden Formen, welche meist unilateral auftreten. Bei den an Morbus von Hippel-Lindau erkrankten Familienmitgliedern wurden in fast allen Fällen Aberrationen am Chromosom 3 festgestellt. Diese chromosomale Veränderung konnte im Nachhinein auch bei nicht familiären Nierenzellkarzinomen gefunden werden (Carroll et al. 1987). Weiterhin ist ein signifikant gehäuftes Auftreten des Nierenzellkarzinoms bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz festzustellen (Bretan et al. 1986).

Man unterscheidet histologisch auf Grund des Zelltyps 5 Subtypen von Nierenzellkarzinomen:

Klarzelliges Karzinom: Ca. 75-80 % der Nierenzellkarzinome sind diesem klassischen, hellzelligen Karzinomtyp zuzuordnen (Riede und Wehner 1993, Thoenes et al. 1990). Seine pflanzenzellartig aussehenden Zellen sind groß und haben aufgrund einer tumorbedingten Stoffwechselanomalie einen hohen Glykogengehalt (Thoenes et al. 1990). Die kleinen Zellkerne sind in der Regel chromatinreich, mäßig polymorph und zeigen wenige Mitosen. Immunhistochemisch sind Merkmale proximaler Tubuli sowie die Koexpression von Keratin und Vimentin nachweisbar (Störkel 1997). Das Tumorstadium ist in der Regel solide, selten zystisch oder papillär (Riede und Wehner 1993, Thoenes et al. 1990).

Chromophiles Karzinom: Diesem Tumortyp entsprechen etwa 11 % aller Nierenzellkarzinome. Er lässt sich, wie der klarzellige Typ, von proximalen Tubulusepithelien ableiten. Das Zytoplasma der Zellen ist entweder basophil oder eosinophil

(Riede und Wehner 1993). Das Wachstumsmuster chromophiler Karzinome ist stets papillär und nur selten solide (Thoenes et al. 1990). Es treten gelegentlich nekrotische Anteile auf. Häufig sind multiple kleine Satellitentumore vorhanden (Riede und Wehner 1993).

Chromophobes Karzinom: Diesem Tumortyp sind etwa 2-5 % aller Nierenzellkarzinome zuzuordnen (Thoenes et al. 1990). Die Zellen dieses Tumors weisen ein transparentes feinretikuläres Zytoplasma auf und ähneln denen der Sammelrohrschaftstücke (Riede und Wehner 1993). Das Wachstum ist meist solide. Es kommt bei diesem Tumortyp nur selten zu Blutungen und er enthält niemals nekrotische Anteile (Störkel 1997).

Spindel-/Polymorphzelliger Karzinomtyp: Dieser sarkomartige Typ ist selten und macht nur 1 % der Nierenzellkarzinome aus. Seine Zellen weisen eine spindelzellige Differenzierung auf, sind proliferationsaktiv und wachsen häufig aggressiv in ihre Umgebung vor. Die Tumorzellen exprimieren Vimentin und Keratin, jedoch keinerlei Zelladhäsionsmoleküle (Riede und Wehner 1993).

Ductus-Bellini-Karzinom: Auch hierbei handelt es sich um einen seltenen Subtyp der Nierenzellkarzinome. Seine Zellen lassen sich vom distalen Tubulusapparat ableiten und sind hauptsächlich in der Markzone gelegen (Riede und Wehner 1993). Es lassen sich sowohl eosinophil/granuläre Zellformen als auch polymorphe, sarkomatoide und spindelzellige Varianten nachweisen (Störkel 1997). Oft treten Nekrosen und Blutungen auf. Prognostisch bedeutsam ist eine häufig frühzeitige Metastasierung (Riede und Wehner 1993).

In Abhängigkeit von der Lage des Primärtumors metastasiert das Nierenzellkarzinom in etwa 35 % der Fälle lymphogen über Hilus- und regionale Lymphknoten auch in weitere Lymphknotenregionen. Bei Einbruch in die Nierenvenen erfolgt die Metastasierung auf

hämatogenem Wege bevorzugt in Lunge (50 %), Leber (30 %), Knochen (30 %), Nebenniere, Gehirn, kontralaterale Niere, Pankreas und Schilddrüse. Bei nicht metastasierenden Nierenzellkarzinomen beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate ca. 70 % (Riede und Wehner 1993) und ist abhängig von Geschlecht, Alter, Tumorgröße und Malignitätsgrad. Die 5-Jahres-Überlebensrate reduziert sich jedoch auf 10-20 % bei Befall der regionalen Lymphknoten oder bei Vorhandensein von Metastasen (Golimbu et al. 1986).

1.2 Rolle antigenpräsentierender Zellen im Immunsystem

Die Immunabwehr beruht auf einer Interaktion sowohl der Antigen-unspezifischen angeborenen Immunantwort wie auch der Antigen-spezifischen adaptiven Immunantwort. Zum angeborenen Immunsystem gehören die phagozytierenden Zellen wie Makrophagen, natürliche Killerzellen, das Komplement-System und die Interferone. Die Zellen des angeborenen Immunsystems nutzen hierbei eine verschiedene Anzahl sogenannter Erkennungsrezeptoren, welche von Pathogenen exprimiert werden, wie zum Beispiel bakterielles Lipopolysaccharid, Carbohydrate oder auch doppelsträngige virale RNA. Unter dem evolutionären Druck kam es zur Ausbildung der adaptiven Immunantwort, deren wesentliche Merkmale die Fähigkeit des Rearrangements von Genen der Immunglobuline mit Ausbildung einer großen Anzahl Antigen-spezifischer Klone sowie das immunologische Gedächtnis sind. Dieses hochspezifische System wird von antigenpräsentierenden Zellen instruiert und reguliert. Dendritische Zellen fungieren hierbei als solche und sind in der Lage, eine primäre Immunreaktion zu induzieren, welche schließlich zu einem immunologischen Gedächtnis führt (Banchereau et al. 2000; Delves und Roitt 2000 a, b). Im Jahre 1973 wurden diese Zellen erstmals von Ralph M. Steinman beschrieben. Ihre typischen bäumchenartigen Zytoplasma-Ausläufer (lat. dendriticus = „verzweigt“) verleihen ihnen ihre typische sternförmige Gestalt und ihren Namen.

Dendritische Zellen fangen und transferieren Informationen der Außenwelt zu den Zellen des adaptiven Immunsystems. Sie sind hierbei nicht nur von besonderer Bedeutung für die Induktion einer Immunantwort, sondern auch für die Induktion immunologischer Toleranz sowie für die Regulation T-Zell-vermittelter Immunantworten (Caux 1998; Caux et al. 1995).

Vorläuferzellen der dendritischen Zellen im Knochenmark zirkulieren nachfolgend im peripheren Blut und wandern in verschiedenste Gewebe ein, wo sie als unreife Zellen mit hoher phagozytischer Kapazität vorhanden sind. Im Rahmen einer immunologischen Stress-Situation nehmen unreife dendritische Zellen Antigene auf und wandern nachfolgend zu den lymphatischen Organen, wo sie Antigen-spezifische T-Zellen aktivieren. Dendritische Zellen präsentieren Antigene gegenüber CD4-positiven T-Helferzellen, welche wiederum andere Effektorzellen, wie zum Beispiel Antigen-spezifische CD8-positive zytotoxische T-Zellen und B-Zellen sowie auch Antigen-spezifische Makrophagen, eosinophile Granulozyten und natürliche Killerzellen aktivieren.

Vier Stadien der Entwicklung dendritischer Zellen sind bekannt. Diese umfassen zum einen die Knochenmarksvorläuferzellen, die Vorläufer dendritischer Zellen, welche im peripheren Blut sowie in den Lymphgefäßen patrouillieren, die unreifen dendritischen Zellen der Gewebe, welche eine hohe endozytische und phagozytische Aktivität für die Antigen-Aufnahme aufweisen, sowie die reifen dendritischen Zellen, welche in den sekundären lymphatischen Organen für die T-Zell-Stimulation verantwortlich sind. Somit stellt das System der dendritischen Zellen mit den verschiedensten Differenzierungsstufen ein Zellsystem dar, welches unterschiedliche Immunreaktionen, wie Immunität oder Toleranz, induzieren kann (Banchereau et al. 2000; Caux 1998; Caux et al. 1995).

Der Antigen-Kontakt induziert einen phänotypischen und funktionellen Wandel der unreifen dendritischen Zellen. Von besonderer Bedeutung ist hierbei, dass diese Zellen eine Transition von antigensammelnden und -prozessierenden zu antigenpräsentierenden Zellen vollziehen. Die sogenannte Ausreifung dendritischer Zellen ist eng an deren Migration aus peripheren

Gewebe in die sekundären lymphatischen Organe gebunden (Caux et al. 2002; Yoneyama et al. 2005).

Von wesentlicher Bedeutung für die verschiedensten Differenzierungsstufen dendritischer Zellen ist deren Mobilität. Vorläuferzellen dendritischer Zellen wandern aus dem Knochenmark in periphere Gewebe, wo sie sich ansiedeln und eine Umwandlung in unreife dendritische Zellen vollziehen. Nach Antigen-Kontakt wandern die antigenpräsentierenden dendritischen Zellen in die sekundären lymphatischen Organe. Dort treten die jetzt ausgereiften dendritischen Zellen in Kontakt mit Antigen-spezifischen Lymphozyten aus dem Pool rezirkulierender T-Zellen. Die selektive Migration dendritischer Zellen und insbesondere ihre Wanderung von nicht lymphatischen, peripheren Organen zu den lymphatischen Organen unterliegt der Kontrolle chemotaktischer Moleküle, den Chemokinen (Randolph 2001).

Dendritische Zellen akkumulieren sehr rasch (innerhalb von Stunden) an den Ort von Antigenablagerungen, wie am Beispiel von Bronchialepithel nach Antigen-Inhalation gezeigt werden konnte. Diese Akkumulation beruht in erster Linie auf der Rekrutierung zirkulierender Vorläuferzellen dendritischer Zellen, welche durch die lokale Produktion von Chemokinen nach lokaler inflammatorischer Reizung dorthin wandern. In vitro konnte gezeigt werden, dass unreife dendritische Zellen entlang chemotaktischer Gradienten verschiedenster Chemokine wandern, was durch die Expression spezifischer Rezeptoren auf ihrer Oberfläche ermöglicht wird. Unterschiedliche dendritische Zell-Subpopulationen zeigen hierbei differente Sensitivitäten gegenüber unterschiedlichen Chemokinen (Caux et al. 2000; Caux et al. 2002; Martin-Fontecha et al. 2003; Page et al. 2002; Vissers et al. 2001; Zou und Tam 2002).

1.3 Klassifikation und Funktion der Chemokine

Wie bereits dargestellt, ist für die Ausbildung einer zellulären Immunantwort die Interaktion antigenpräsentierender Zellen mit T-Zellen essentiell. Damit es zu einer koordinierten Interaktion dieser beiden Zellpopulationen kommen kann, müssen sie in Kontakt miteinander treten. Hierfür ist die koordinierte Expression von Chemokinen von großer Bedeutung (Zlotnik und Yoshie 2000).

Chemokine sind **chemotaktische Zytokine**, die erstmals aufgrund ihrer Fähigkeit, Leukozyten-Migration zu induzieren, beschrieben wurden. Die Superfamilie der Chemokine besteht aus mehr als 40 Zytokinen und 17 Rezeptoren. Sie werden abhängig von ihrer Primärstruktur und der Anzahl der Cysteine in C-, CC-, CXC- und CX3C-Chemokine unterteilt (Bacon et al. 2002; Zlotnik und Yoshie 2000). Die Chemokine werden von einer Vielzahl unterschiedlicher Zellen zelltyp- und organspezifisch produziert und exprimiert. Sie können hinsichtlich ihres Expressionsmusters zwei Gruppen zugeteilt werden. Zur ersten Gruppe zählen die sogenannten inflammatorischen Chemokine (CCL 1 bis 5, CCL11, CCL16, CXCL7 bis CXCL10 sowie CX3CL1 und CX3CL2), deren Expression durch proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1, TNF- α oder Interferon- γ induzierbar ist. Diese inflammatorischen Chemokine spielen bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen sowie Allergieantworten und Entzündungen wie auch Infektionen eine große Rolle. Demgegenüber stehen die sogenannten lymphatischen oder homöostatischen Chemokine (CCL17 bis CCL19, CCL21, CCL 22, CXCL12 und CXCL13). Diese werden in verschiedenen Geweben lymphatischer Organe, aber auch von spezifischen Zellen außerhalb des lymphatischen Systems, konstitutiv exprimiert. Diese homöostatischen oder lymphoiden Chemokine können auf die B- und T-Zellentwicklung sowie die Entwicklung lymphatischer Organe Einfluss nehmen (Serra et al. 2004).

Bei der Rekrutierung von Leukozyten und beim Homing-Prozess von Lymphozyten in lymphatische Organe sind Chemokine somit von entscheidender Bedeutung. Bei der Migration sind Chemokine in der Lage, Integrine (wie LFA-1, Mac-1 und VLA-4) auf zirkulierenden Leukozyten zu aktivieren, über die eine feste Bindung am Endothel ermöglicht wird. Nach transendothelialer Migration, welche molekular bislang nur unvollkommen verstanden ist, steuern Chemokine dann innerhalb des Gewebes oder Organes die weitere Wanderung der Leukozyten entlang eines Chemokingradienten. Diese Migration wird entweder chemotaktisch über lösliche Chemokine oder haptotaktisch über gebundene Chemokine gesteuert. Entscheidend für die Haptotaxis ist eine lokal hohe Konzentration von gebundenen Chemokinen, wohingegen ein Konzentrationsgradient von freien Chemokinen für die Chemotaxis wichtig ist. Die Besonderheit der Chemokine liegt darin, dass sie aufgrund der Proteoglykan-bindenden Eigenschaften an der extrazellulären Matrix binden können; das heißt, Chemokine interagieren mittels ihrer basischen Aminosäuren mit verschiedenen Glykosaminoglykanen. Somit sind Zellen in der Lage, die Migration entweder chemotaktisch oder haptotaktisch oder in Kombination von beidem zu steuern.

Die Vielzahl von Chemokinen mit überlappenden Bindungsaffinitäten für verschiedene Chemokinrezeptoren und die Tatsache, dass Zellen meist mehrere Chemokinrezeptoren mit redundanter Funktion exprimieren, hat die Frage nach der Spezifität ihrer Wirkung aufgeworfen. Hierbei wird angenommen, dass die Migration von Zellpopulationen aus einander überlappenden Konzentrationsgradienten und hierarchisch wirkenden chemotaktischen Signalen resultiert, so dass die Migration von Zellen durch verschiedenste Chemokine ferngesteuert werden kann. Zudem konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Chemokine sowohl als Agonisten als auch als Antagonisten differenter Chemokinrezeptoren agieren können (Bacon et al. 2002).

Andererseits sind Chemokine auch für die Differenzierung von T-Helferzellen und für die mitogene Stimulation oder Suppression von hämatopoetischen und nicht hämatopoetischen

Zellen verantwortlich (Bacon et al. 2002; Weninger und von Andrian 2003; Zlotnik und Yoshie 2000). Somit sind Chemokine auch für die Balance der zellulären Kommunikation im peripheren Gewebe wichtig; bei Fehlregulation können sie zu Autoimmunkrankheiten, wie rheumatoider Arthritis, Multipler Sklerose oder auch chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, wie dem Morbus Crohn, führen.

1.4 Therapeutische Ansätze bei Nierenzellkarzinomen

Das Ziel der operativen Therapie des Nierenzellkarzinoms ist die Entfernung des Primärtumors und möglichst aller Metastasen. Die radikale Tumornephrektomie mit ipsilateraler Adrenaektomie und regionaler Lymphadenektomie nach Foley (1952) galt lange Zeit als Goldstandard-Therapie des lokal begrenzten Nierentumors bei gesunder kontralateraler Niere. Soweit es der Befund und die jeweiligen chirurgischen Fertigkeiten erlauben, soll jedoch laut aktuellen DGHO-Leitlinien die partielle Nephrektomie favorisiert werden, um funktionsfähiges Nierengewebe zu erhalten. Beide operative Verfahren sind auch laparoskopisch möglich (Jocham und Miller 2007).

Die gelegentliche Beobachtung von Spontanremissionen metastasierter Nierenzellkarzinome nach Tumornephrektomie (ca. 0,4 % der Fälle) führte zu der Annahme, dass es sich hierbei möglicherweise um ein immunologisches Phänomen handeln könnte. Unter diesem Gesichtspunkt wurde in den vergangenen Jahren eine Vielzahl immuntherapeutischer Konzepte entwickelt und zum Teil in großen Studien untersucht. Hierbei konnten laut Literatur Remissionsraten von bis zu 30 % der behandelten Patienten erreicht werden (Bennington et al. 1968).

Durch die Verfügbarkeit rekombinanter Zytokine seit Mitte der 1980er Jahre wurde die Immuntherapie entscheidend beeinflusst. Nachdem erste Ergebnisse von Monotherapien mit Interferonen (IFN), Interleukin-2 (IL-2) und Tumornekrosefaktor (TNF) vorlagen, wurden

Kombinationen verschiedener Zytokine, Zytokin-Chemotherapie-Kombinationen und IL-2 mit Lymphokin-aktivierten Killerzellen (LAK) bzw. Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL) klinisch getestet, in der Hoffnung, hierdurch bessere Ansprechraten zu erzielen. LAK- und TIL-Therapien stehen für den Begriff der adoptiven Therapien und beruhen auf der ex-vivo-Expansion und Aktivierung von Lymphozyten aus peripherem Blut bzw. aus autologem Tumorgewebe mit Hilfe von IL-2 und anschließender Reinfusion der expandierten und aktivierten autologen Zellen (Bennington et al. 1968).

Die beiden am häufigsten zur Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms eingesetzten Zytokine sind Interferon- α (IFN) und Interleukin 2 (IL-2). Es handelt sich dabei um Botensubstanzen der interzellulären Kommunikation.

Die adoptive Immuntherapie, auch als Zelltransfertherapie bezeichnet, wurde erstmals 1984 von Rosenberg klinisch angewandt. Diese inzwischen in vielen Modifikationen eingesetzte Therapie beruht auf der Überlegung, dem Körper Abwehrzellen zu entnehmen, diese zu vermehren und die Fähigkeit, Krebszellen zu zerstören, zu steigern, um sie dann wieder zu reinjizieren (Wei et al. 2007). Von der aktiv-spezifischen Immunisierung spricht man, wenn versucht wird, die Immunreaktion des Patienten gegen seinen eigenen Tumor durch Vakzinierung mit biologisch oder chemisch modifizierten autologen bzw. allogenen Tumorzellen zu modulieren. Die Grundlage für die Immunisierung bilden hierbei tumorassoziierte und tumorspezifische Antigene.

Für das Nierenzellkarzinom konnte bisher nur eine beschränkte Zahl solcher Antigene identifiziert werden. Zur Tumorzellvakzinierung werden devitalisierte autologe Tumorzellen oder auch Tumorzellmembranfragmente (Tumoronkolysate) verwendet. Eine ideale Tumorzellvakzine sollte infolge einer adäquaten Antigenpräsentation im Verbund mit MHC-Klasse-I/II-Molekülen zur Differenzierung zytotoxischer CD8-positiver T-Lymphozyten führen. Dies kann durch Aktivierung im Verbund mit CD4-positiven T-Helfer-Zellen und der Freisetzung von Zytokinen oder auch durch Vermittlung von antigenpräsentierenden Zellen,

wie den dendritischen Zellen, erfolgen. Durch diese Aktivierung des spezifischen körpereigenen Immunsystems können Antigene auf Tumorzellen erkannt und eine geeignete Immunantwort ausgelöst werden, um maligne Zellen zu eliminieren.

Eine wichtige Voraussetzung für ein immunologisches Konzept wie der Vakzinierung ist eine möglichst geringe Tumorlast. Als Ursache einer eingeschränkten Effizienz der Vakzinierung wird eine eingeschränkte Immunkompetenz des Patienten bei großer Tumorlast diskutiert. Daneben wird überlegt, ob Tumorzellen über auto- oder parakrine Sekretion von Modulatoren im Milieu des soliden Tumors spezifische Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TIL) deaktivieren bzw. Resistenzmechanismen gegenüber den zytotoxischen Effekten von TIL entwickeln können. Für die von Jocham et al. 2004 im Lancet publizierte Phase-III-Studie wurde die Wirksamkeit einer adjuvanten Tumorzellvakzine nach radikaler Tumornephrektomie durch eine Reduktion des Progressionsrisikos nachgewiesen. Nach 70 Monaten lag das statistisch signifikante progressionsfreie Überleben in der Vakzinegruppe bei 72 % und in der Kontrollgruppe bei 59,3 %. Somit scheinen immuntherapeutische Ansätze in der Therapie des Nierenzellkarzinoms eine Rolle zu spielen. Insbesondere die Anwendung DC-basierter Vakzine ist hier vielversprechend.

1.5 Ziel dieser Arbeit

Die vorliegende Arbeit wurde durchgeführt, um das Verständnis über die Verteilung und Funktion dendritischer Zellen bei Nierenzellkarzinomen zu verbessern. Unser Ziel war es deshalb, die bekannten Subpopulationen dendritischer Zellen im Tumorgewebe sowie im angrenzenden normalen Gewebe bei Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom zu charakterisieren und chemotaktische Faktoren zu identifizieren, die zur Rekrutierung der verschiedenen dendritischen Zellpopulationen beitragen. Die gewonnenen Erkenntnisse sollen Aufschluss über den Mechanismus der Ausbildung einer Antitumorantwort geben, mit der

sich im Rahmen einer aktiven Vakzinierung eine gezielte Eliminierung von Nierenzellkarzinomen erreichen lässt.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Chemikalien:

Alle verwendeten Chemikalien, sofern nicht anders angegeben, wurden von den Firmen Sigma (München), Merck (Darmstadt), Boehringer (Mannheim), Biochrom (Berlin) und Sera (Heidelberg) erworben und waren vom Reinheitsgrad zur Analyse bestimmt. Alle Lösungen wurden mit Aqua bidest. oder mittels Diethylpyrocarbonat (DEPC) vorbehandeltem Aqua bidest. angesetzt und für einen großen Teil der Anwendungen autoklaviert.

Tabelle 1: Enzyme

DNase I (RNase frei)	Sigma, München
Proteinase K	DAKO, Hamburg
Ribonuklease Inhibitor (RNasin)	Promega, Mannheim
Taq-DNA-Polymerase	Pharmacia, Freiburg

Antikörper und Detektionssysteme für die immunhistochemischen Färbungen und Doppelimmunfluoreszenzfärbungen am Gewebe:

Tabelle 2: Verwendete Primärantikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
CCL19	Ziege-anti-Human	1:20	R&D Systems, Wiesbaden
CCL20	Ziege-anti-Human	1:20	R&D Systems, Wiesbaden
CCL21	Ziege-anti-Human	1:50	R&D Systems, Wiesbaden
CCR6	Maus-anti-Human	1:20	R&D Systems, Wiesbaden
CCR7	Maus-anti-Human	1:50	R&D Systems, Wiesbaden

CD1a	Maus-anti-Human	1:20	DAKO, Hamburg
CD3	Maus-anti-Human	1:100	DAKO, Hamburg
CD4	Maus-anti-Human	1:100	DAKO, Hamburg
CD11c	Maus-anti-Human	1:50	DAKO, Hamburg
CD40	Maus-anti-Human	1:20	Novocastra, Berlin
CD68	Maus-anti-Human	1:50	DAKO, Hamburg
CD79a	Maus-anti-Human	1:50	DAKO, Hamburg
CD83	Maus-anti-Human	1:50	Novocastra, Berlin
D2-40	Kaninchen-anti-Human	entfällt	DCS-Diagnostics, Hamburg
DC-LAMP	Maus-anti-Human	1:25	Immunotech, Marseille, Frankreich
Fascin	Maus-anti-Human	1:50	DAKO, Hamburg
Mib-1 (Ki-67)	Maus-anti-Human	1:50	DAKO, Hamburg
RelB	Kaninchen-anti-Human	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
S100	Kaninchen-anti-Human	1:20	DAKO, Hamburg
Vimentin	Maus-anti-Human	1:200	DAKO, Hamburg

Tabelle 3: Detektionssystem der immunhistochemischen Färbungen

Biotinylierter Antikörper (LINK)	Ziege-anti-Maus/Kaninchen	vorverdünnt	DAKO, Hamburg
Streptavidin-HRP	entfällt	1:300	DAKO, Hamburg
Streptavidin-AP	entfällt	vorverdünnt	DAKO, Hamburg

Tabelle 4: Sekundärantikörper der Immunfluoreszenzfärbungen

Unmarkiertes F(ab)-Fragment	Ziege-anti-Maus	1:50	DIANOVA, Hamburg
Carbocyanin (Cy2)-markiertes F(ab)-Fragment	Ziege-anti-Maus	1:25	DIANOVA, Hamburg
Indocarbocyanin (Cy3)-markiertes F(ab)-Fragment	Ziege-anti-Maus	1:25	DIANOVA, Hamburg
Streptavidin-FITC	Ziege-anti-Maus	1:40	DAKO, Hamburg

Tabelle 5: RNA-Extraktion

RNeasy Mini-Kit	Qiagen, Hilden
-----------------	----------------

Tabelle 6: Nukleotide

dATP, dCTP, dGTP, dTTP (100 mM)	Dupont NEN, Dreieich
Dig-RNA-Labeling-Mix	Boehringer, Mannheim

Tabelle 7: Technische Geräte

Agarose-Gel-Elektrophorese-Kammern: Agargel-Standard. 10x10 cm	Biometra, Göttingen
Biofuge fresco	Heraeus Sepatech, Hanau
Heizplatte: Präzitherm Typ PZ 28-2	Gestigkeit, Düsseldorf
Hybridisierungsöfen	Biometra, Göttingen
Kühlschränke: Gefrierkombination (+4 °C/-20 °C)	Bosch, München
Magnetrührer: Ikamag RH	Ika-Werk, Oberstaufen
Megafuge 1.OR, Rotoren 2705/1379	Heraeus Sepatech, Hanau
Mikroskop: Invertmikroskop ID 03	Zeiss, Jena
Mikrotome: Schlittenmikrotom Typ HN40	Reichert-Jung, Heidelberg
PCR-Cycler: Hybaid OmniGene	Hybaid, Middlesex, England
PCR-iCycler iQ	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
PH-Meter: Typ HI 9321	HANNA Instruments, Kehl/Rhein
Polaroid-Filme/Kamera für DESAGA UVIS	DESAGA, Heidelberg
RNA-Messung: Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer, Typ G2938A	Agilent Technologies, Böblingen
Schüttler: Heidolph polymax 1040	GFL, Burgwedel
Spannungsquellen: Modell GPS 200/400	Pharmacia LKB, Freiburg
Spektralphotometer: Ultrospec III	Pharmacia LKB, Freiburg
Sterilbank	Jouan, Unterhaching
Sterilisatoren: Bioklav 3HD-Dampfsterilisator	Schütt, Göttingen
Thermomixer: Model 5436	Eppendorf, Hamburg
Tiefkühltruhe (-70 °C)	GFL, Burgwedel

Tischzentrifuge Biofuge 13	Heraeus Sepatech, Hanau
Trockensterilisator	Memmert, Schwabach
UV-Lichtquelle: Fluo-Link	Biometra, Göttingen
Vortex Mixer: IKA, Modell MS2-S9	Agilent Technologies, Böblingen
Vortex: Genie 2 : G-560E	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Waage: Modell MCI, Typ MD BA 200	Sartorius, Göttingen

2.2 Gewebeproben

Die Untersuchungen wurden an prospektiv gesammelten Gewebeproben von 24 Patienten mit verschiedenen Subtypen des Nierenzellkarzinoms durchgeführt, die in der Klinik für Urologie der Universitätsmedizin Göttingen einer Tumornephrektomie unterzogen wurden. Um die Ischämiezeit möglichst gering zu halten, wurden die Tumoren unmittelbar von einem Mitarbeiter des Transportdienstes als sogenannte „Schnellschnittproben“ in das Institut für Pathologie gebracht oder direkt an der Leitstelle des Operationstraktes bzw. unmittelbar aus dem Operationssaal abgeholt. 17 der untersuchten Tumoren zeigten eine klarzellige Differenzierung, vier Tumoren waren papillär differenziert, zwei Tumoren waren undifferenziert mit dem Aspekt eines pleomorphzelligen/sarkomatoiden Karzinoms und ein Tumor zeigte eine als chromophobes Nierenzellkarzinom zu wertende Differenzierung. Das Durchschnittsalter des Patientenkollektivs betrug 60 Jahre mit eingeschlossenen Patienten im Alter zwischen 36 und 75 Jahren. Die größte Gruppe der untersuchten Tumoren zeigte einen mittleren Malignitätsgrad entsprechend G2 (14 eingeschlossene Tumorproben). 6 Tumorproben zeigten eine gute Tumordifferenzierung mit einem Malignitätsgrad G1 und vier Tumorproben wiesen eine geringe Differenzierung mit einem Malignitätsgrad G3 auf. Die Tumorproben sind in Tabelle 8 aufgeführt. Das in Paraffin eingebettete Gewebematerial

wurde vom Zentrum für Pathologie der Georg-August-Universität Göttingen zur Verfügung gestellt. Als Kontrollgewebe diente Lymphknotengewebe, welches wie die Tumorproben erst nach Abschluss des histopathologischen Befundes für wissenschaftliche Untersuchungen verwendet wurde. Es fiel ein besonderes Augenmerk darauf, dass ausreichend Restgewebe für eventuelle weitere histopathologische Untersuchungen im Archiv des Instituts für Pathologie verblieb.

Tabelle 8: Patientenproben

Fall	Diagnose	Alter	Malignitätsgrad
1	klarzelliges NZK	70	G2
2	klarzelliges NZK	68	G2
3	papilläres NZK	61	G2
4	klarzelliges NZK	64	G3
5	klarzelliges NZK	68	G1
6	papilläres NZK	38	G1
7	klarzelliges NZK	69	G1
8	sarkomatoides NZK	36	G3
9	klarzelliges NZK	36	G1
10	papilläres NZK	60	G2
11	klarzelliges NZK	75	G2
12	klarzelliges NZK	47	G2
13	klarzelliges NZK	64	G1
14	klarzelliges NZK	67	G2
15	klarzelliges NZK	55	G2
16	klarzelliges NZK	68	G2
17	klarzelliges NZK	72	G2
18	klarzelliges NZK	63	G2
19	klarzelliges NZK	55	G2
20	chromphobes NZK	63	G2
21	klarzelliges NZK	63	G2
22	papilläres NZK	71	G3
23	sarkomatoides NZK	59	G3
24	klarzelliges NZK	66	G1

2.3 Immunhistochemie und Immunfluoreszenzuntersuchungen am Gewebe

In der Immunhistochemie und Immunfluoreszenz nutzt man die Spezifität von Antikörpern, um die Verteilung von bestimmten Antigenen im histologischen Schnittpräparat sichtbar zu machen.

Für die morphologischen Untersuchungen wurden frische Gewebeproben in 4 % neutral gepuffertem Formaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet. 2 bis 5 µm dicke Gewebeschnitte wurden auf Objektträger aufgezogen, die mit 2 % 3-Aminopropyl-triethoxysilan in Aceton vorbehandelt waren. Zur Detektion wurde die Streptavidin-Biotin-Methode eingesetzt. Hierbei macht man sich die hohe Affinität von Streptavidin oder Avidin zu Biotin zunutze. Für die Färbungen wurde ein Brückenantikörper verwendet, welcher mit Biotin markiert ist (biotinyliert). Anschließend erfolgte die Inkubation mit Peroxidase oder Alkalische-Phosphatase-gekoppeltem Streptavidin. Als Chromogen für die Farbreaktion wurde in der Peroxidase-Reaktion Diaminobenzidin (DAB) oder Amino-Ethyl-Carbazol (AEC) als Substrat eingesetzt; für die Alkalische-Phosphatase-Reaktion diente Fast Red als Chromogen (Tabellen 10, 11 und 12).

2.3.1 Methode der Immunhistochemie

Die Gewebeschnitte wurden zur Entparaffinierung 2 mal 10 Minuten in Xylol bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend eine Minute in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Danach wurden sie kurz mit E-Wasser und anschließend mit TBS (Tabelle 9) gespült. Um unspezifische Proteinbindungen abzusättigen, wurden die Präparate in 10 % BSA-FCS in TBS bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Spülen mit TBS erfolgte die Applikation des ersten Antikörpers für eine Stunde sowie nachfolgend des zweiten biotinylierten Brückenantikörpers für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur und

anschließend mit Streptavidin-AP oder Streptavidin-Peroxidase für 30 Minuten. Die Inkubationen erfolgten in feuchten Kammern. Zwischen dem Wechsel der Antikörperlösungen und der Färbereaktion wurden die Schnitte zweimalig je 5 Minuten in TBS gewaschen. Die mit Antikörper markierten Zielstrukturen wurden durch eine Färbereaktion detektiert, die unter mikroskopischer Beobachtung nach 10-20 Minuten gestoppt wurde. Die im Gewebe vorhandene endogene alkalische Phosphatase wurde durch den Zusatz von Levamisol (Sigma, München) in Chromogen deaktiviert. Die Schnitte wurden für etwa 3 Minuten in Mayers Hämalaun gegengefärbt, 5 Minuten unter laufendem lauwarmem Wasser gebläut und anschließend mit Aquamount (BDH Laboratory, Großbritannien) eingedeckt.

2.3.2 Doppelimmunfluoreszenzfärbungen

Zunächst wurden die in Paraffin eingebetteten Schnittpräparate zweimal 10 Minuten in Xylol zur Entparaffinierung bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in einer ansteigenden Alkoholreihe eine Minute entwässert. Danach wurden die Schnitte gut mit E-Wasser sowie nachfolgend kurz mit TBS (Tabelle 9) gespült. Um unspezifische Proteinbindungen abzusättigen, wurden die entparaffinierten Gewebeschnitte 20 Minuten in TBS mit 10% BSA-FCS bei Raumtemperatur inkubiert. Nach kurzem Waschen in TBS folgte die Applikation des ersten Antikörpers für eine Stunde bei Raumtemperatur. Dann wurden die Schnitte 5 Minuten in TBS gewaschen. Als sekundärer Antikörper wurde ein biotinylierter Ziege-anti-Maus/Kaninchen-Antikörper (DAKO) verwendet. Anschließend erfolgte die erste Farbreaktion mit Streptavidin-FITC (Fluorescein-Isothiocyanat [1:40, 1 Stunde, DAKO]) bzw. mit Carbocyanin (Cy2), welche eine grüne Fluoreszenz emittieren.

Um die noch freien Bindungsstellen des Primärantikörpers der ersten Fluoreszenzfärbung vollständig abzusättigen, wurden die Gewebeschnitte mit einem unmarkierten monovalenten

F(ab)-Fragment (1:50, Ziege-anti-Maus, DIANOVA) 30 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die Applikation des zweiten Antikörpers, der nachfolgend mit einem Indocarbocyanin (Cy3)-markierten F(ab)-Fragment (Ziege-anti-Maus, DIANOVA 1:25, 1 Stunde bei Raumtemperatur), welches eine rote Fluoreszenzfärbung aufweist, detektiert wurde.

Zwischen den Schritten wurde der Waschvorgang für 5 Minuten in TBS wiederholt. Alle Inkubationen erfolgten in einer feuchten, staubgeschützten Kammer bei Raumtemperatur unter lichtgeschützten Bedingungen. Abschließend wurden die Schnittpräparate mit Fluorescent-mounting Medium (Fluoromount, DAKO) eingedeckt und bis zur Auswertung bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

Tabelle 9: Tris buffered Saline (TBS)

Tris-HCl (pH 7,4)	0,05 M
NaCl	0,15 M

Färbereaktionslösungen:

Tabelle 10: AEC–Chromogen für die Peroxidasereaktion

Aqua bidest.	400 µl
H ₂ O ₂ -Substrat	100 µl
AEC-Chromogen	4,5 µl

Tabelle 11: DAB–Chromogen für die Peroxidasereaktion

DAB–Chromogen	1 Tropfen (ca. 10 µl)
Blockierungspuffer	ad 1 ml

Tabelle 12: Fast Red–Chromogen für Alkalische Phosphatase

Bottle F	750 µl
Levamisol	5 µl
Red 1	30 µl
Red 2	30 µl
Red 3	30 µl

2.4 Zellkultur

Die Anzucht und die Arbeiten an den Zelllinien (s. Tabelle 13) erfolgten unter einer Sterilbank (Jouan) mit laminarer Strömung. Es wurden die kommerziell erhältlichen Zelllinien A-498, CAKI-1 und CAKI-2 verwendet, die über die DSMZ in Braunschweig bezogen wurden. Alle verwendeten Zelllinien wachsen als sogenannter „Mono-Layer“ in Form eines einschichtigen Zellverbandes am Boden der Kulturflasche.

Eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche und kontaminationslose Anzucht von Zelllinien ist die strikte Einhaltung eines sterilen Arbeitens mit sauberer Handhabung aller Arbeitsmaterialien und -schritte und der Sterilfiltration beim Ansetzen der Nährmedien. Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in einem Brutschrank bei 37 °C unter 5 %iger CO₂-Begasung.

Die Kultivierung von Zellen erfordert zusätzlich in-vitro-Bedingungen, die Wachstum, Proliferation und Differenzierung der Zelllinien begünstigen. Zu diesem Zweck müssen dem Medium einerseits essentielle, von den Zellen nicht selber synthetisierbare Zusätze zugegeben werden. Andererseits müssen für die Zellkulturen eventuell schädliche Stoffwechselprodukte möglichst neutralisiert werden. Für die Kultur von Nierenzellkarzinomzelllinien hat sich das Medium RPMI1640 als besonders geeignet erwiesen und wurde daher auch in dieser Arbeit benutzt. Das hier verwendete Nährmedium basiert auf der Grundlage einer HEPES-/

Bikarbonat-gepufferten RPMI1640 (Bio Whittaker). An Zusätzen enthält das Medium 10 ml/l L-Glutamin 200 mM (Biochrom), 20 ml/l RPMI1640 sowie Aminosäure-Mix (Aminoacid-Solution, 50 x, Sigma), um eine bessere Proliferation der Zellen zu erreichen. Als zusätzlichen Wachstumsfaktor gibt man dem Medium einen Anteil von 10 % an fetalem Kälberserum (FCS) hinzu. Zusätzlich werden dem Medium noch 10 ml/l Penicillin-Streptomycin (10.000 I.E., Gibco) hinzugegeben. Der Wechsel des Nährmediums erfolgte nach Verbrauch der Substrate alle zwei bis drei Tage.

Tabelle 13: Charakteristika der verwendeten Nierenzellkarzinom-Zelllinien

Bezeichnung	Typ	Geschlecht	Alter	Bezugsquelle
A-498	Klarzelliges Nierenzellkarzinom	männlich	52 J.	DSMZ, Braunschweig
CAKI-1	Klarzelliges Nierenzellkarzinom	männlich	64 J.	DSMZ, Braunschweig
CAKI-2	Klarzelliges Nierenzellkarzinom	männlich	69 J.	DSMZ, Braunschweig

2.4.1 Passagieren der Zelllinien

Bei Monolayer-Kulturen tritt bei zu hoher Zelldichte eine Verminderung der Proliferationsrate ein. Bei normalen, nicht maligne transformierten Zelllinien führt dies zum Wachstumsstopp oder gar zum Absterben der Zellen. Obwohl maligne transformierte Zelllinien aufgrund der fehlenden Kontakthemmung auch nach Konfluenz noch weiter wachsen, führt dies allerdings zu einer veränderten Stoffwechsellage und Proteinsynthese (Miyao et al. 1989). Deshalb empfiehlt es sich, die Zellkulturen bei Konfluenz regelmäßig zu

passagieren. Zu Beginn des Passagierens wird das Medium sorgfältig abgesaugt, da es mit seinen Serumproteasen die Trypsinwirkung zum Ablösen der Zellen vom Flaschenboden inhibieren würde. Hiernach wird die 50 cm³-Kulturflasche gründlich mit 3 ml Phosphatgepufferter Natriumchlorid-Lösung (PBS) gewaschen. Anschließend werden 2 ml Trypsin/EDTA 0,05/0,02 % (Sigma) zur Ablösung der Zellen in die Kulturflasche gegeben. Um die Kontaktzeit der Zellen mit dem zytotoxisch wirkenden Trypsin möglichst kurz zu halten, wurde das Trypsin/EDTA auf 37 °C vorgewärmt. Nach ca. 5 Minuten wurde der Ablösungsvorgang unter dem Mikroskop (ID03, Fa. Zeiss) kontrolliert. Zellen, die sich noch nicht gelöst hatten, wurden durch vorsichtiges Beklopfen der Kulturflasche mobilisiert. Die gelösten Zellen wurden mit dem Trypsin in ein mit 2 ml RPMI1640 gefülltes Zentrifugenröhrchen gegeben. Zu den in der Kulturflasche verbliebenen Zellen wurde wieder etwas Medium gegeben. Die Zellen im Zentrifugenröhrchen wurden 10 min bei 800 U/min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet, je nach Größe, mit 1-5 ml Nährmedium resuspendiert und in eine neue Kulturflasche gegeben.

Vor jeder Passage oder jedem Nährmediumwechsel wurden die Zellkulturen unter dem Mikroskop auf eine Kontamination durch Mikroorganismen untersucht.

2.5 RNA-Präparation

2.5.1 RNA-Extraktion aus Zellkultur

Für die RNA-Extraktion wurden die Zellkulturen abgelöst, mit PBS gewaschen und durch Zentrifugation mit 800 U/min pelletiert. Der überschüssige PBS-Waschpuffer wurde so weit wie möglich abpipettiert. Zur RNA-Extraktion wurde das RNeasy Mini Kit von QIAGEN verwendet. Die Zellkulturpellets wurden in 350 µl RLT-Lysispuffer (10 µl β-Mercaptoethanol und 1.000 µl RLT-Lysispuffer) aufgenommen und homogenisiert. Anschließend wurde das entstandene Zellhomogenisat in QIA-Shredder und -Säulen überführt und bei 13.000 U/min

für zwei Minuten zentrifugiert. Zum Binden der RNA wurde das Lysat mit 70 %igem Ethanol auf 700 µl aufgefüllt, gemischt, in die RNA-Säulen überführt und für 20 Sekunden bei 10.200 U/min zentrifugiert. Es folgte nun ein Waschschriff mit 700 µl Waschpuffer RW 1, indem die Säule auf ein neues Gefäß gesetzt und wie zuvor bei 10.200 U/min für 20 sec zentrifugiert wurde. Um störende DNA zu beseitigen, wurde anschließend ein DNase-Verdau auf der RNA-haltigen Säule durchgeführt, indem diese mit 10 µl DNase und 70 µl RDD-Puffer für 30 min bei Raumtemperatur unter der Sterilbank inkubiert wurde. Anschließend wurde die RNeasy-Säule mit 350 µl RW 1 aufgefüllt und mit 8.000 U/min für 15 sec zentrifugiert. Es folgten die Waschschriffe II (mit 500 µl RPE-Puffer und erneuter Zentrifugation bei 10.200 U/min für 20 sec) und III (mit 500 µl RPE-Zubereitung und Zentrifugation bei 10.200 U/min für 2 min). Zur Elution der RNA wurden 30 µl RNase-freies Reinst-Wasser direkt auf den Filter der RNeasy-Säule pipettiert und nachfolgend 1 min bei 10.200 U/min zentrifugiert. Die eluierte RNA wurde auf Eis gelagert, die RNA-Konzentration zunächst photometrisch bestimmt, nachfolgend aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei - 80 °C im Tiefkühlschrank gelagert.

2.5.2 Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentrationen in wässrigen Lösungen

Die Konzentration von Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen wurde durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm bestimmt. Bidestilliertes Wasser diente als Referenz. Die Messungen in einem Spektralphotometer wurden mit Quarz-Halbmikroliterküvetten (Schichtdicke 1 cm) durchgeführt.

• Eine Extinktion E260 = 1 entspricht:	50 µg doppelsträngiger DNA/ml
	40 µg RNA/ml
	33-40 µg Oligonukleotide/ml
• doppelsträngige DNA:	1 Mol entspricht 660 g
• einzelsträngige DNA:	1 Mol entspricht 330 g

2.5.3 Quantitative Bestimmung der RNA-Konzentration mittels Agilent 2100 bioanalyzer

Der „Agilent 2100 bioanalyzer“ und der „RNA 6000 Nano LabChip Kit“ liefern eine einfache, schnelle Alternative für die Charakterisierung der RNA-Proben. Es handelt sich um ein kleines „benchtop“-System, welches die „Lab-on-a-Chip“-Technologie von Caliper Technologies Corp. (Hopkinton, MA, USA) verwendet, um eine Separation, Detektion, Quantifizierung und Datenanalyse von RNA-Proben zu integrieren. Jeder RNA-Chip wird einmal benutzt, um die Konzentration und die Reinheit der RNA-Proben zu bestimmen. Durch die Agilent-Methode ist eine sehr genaue qualitative Kontrolle von extrahierter RNA mit geringem Verbrauch von Proben im Bezug auf Degradation und Kontamination möglich. Mit dieser Methode kann die qualitative Analyse der gesamten RNA mit einem Umfang zwischen 5 und 500 ng/µl durchgeführt werden. Die Probe fließt aus dem Probennapf durch die Mikrokanäle, welche mit gesiebten Polymeren und fluoridierten Färbemitteln gefüllt sind, hindurch und wird dann in die Trennungskanäle injiziert. Die einzelnen Probenkomponenten werden elektrophoretisch voneinander getrennt, durch ihre Fluoreszenz detektiert und als Elektropherogramm dargestellt.

Eine hohe Qualität der totalen RNA-Extraktion zeichnet sich durch klar erkennbare 18S-/28S-Banden der ribosomalen RNA und eine Ratio von 2 aus. Schwankungen zu dieser Ratio weisen auf eine Teildegradierung oder Kontaminierung der Proben mit Ribonuklease (RNase) während der Extraktion hin. Im Fall einer kompletten Degradierung der Proben sind keine ribosomalen Banden zu sehen.

2.6 RT-PCR

2.6.1 Amplifikation von spezifischen DNA-Sequenzen durch die PCR

Eine spezielle DNA-Polymerase kann ein DNA-Fragment, welches zwischen zwei Regionen mit bekannter Sequenz liegt, mit einem sogenannten „aufwärts“ und einem „abwärts“ gerichteten Oligonukleotid (Primer) amplifizieren. Drei Reaktionsschritte (Denaturierung, Annealing und Neusynthese) werden hierbei in einem automatischen Thermocycler vollzogen und zyklisch wiederholt.

2.6.2 cDNA-Synthese

Bevor es im 2. Schritt zur Anwendung der PCR kommt, wird die RNA der zu untersuchenden Proben einer Reversen-Transkriptase-PCR unterzogen (RT-PCR). Dies gelingt mit dem aus einem Retrovirus stammenden Enzym Reverse Transkriptase (RT). Nach Zugabe von genspezifischen Reverse-Primern oder Random-Hexamer-Primern und dNTP's wurde aus der jeweils vorliegenden RNA die entsprechende cDNA hergestellt, welche im Folgenden in der PCR analysiert werden konnte.

In einem 0,5-ml-Reaktionsgefäß wurden 2 pmol Oligo-(dT)-Primer mit 1 µg Gesamt-RNA auf 11 µl mit Aqua dest. (DEPC) aufgefüllt und 10 min bei 70 °C denaturiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz, bestehend aus 4 µl Synthesepuffer (5 x), 1 µl dNTP-Mix (10 mM)

und 2 µl DTT (0,1 M), 2 min bei 37 °C vorinkubiert. Durch Zugabe von 1 µl Superscript™-Reverse-Transkriptase (200 I.E./µl) wurde die Erststrangsynthese gestartet (60 min bei 37 °C). Die Reaktion wurde durch Erhitzung auf 70 °C für 5 min gestoppt und die RNA 10 min mit 1 µl RNase H (2 I.E./µl) bei 55 °C degradiert.

2.6.3 PCR-Bedingungen

Die Reaktionsansätze (Tabelle 14) wurden stets auf Eis pipettiert. Die Primersequenzen der sens- und antisens-Primer für CCL-19, CCL-20 und CCL-21 sind in Tabelle 15 aufgeführt. Die Reaktion wurde sofort nach Zugabe der DNA-Polymerase im automatischen Thermocycler gestartet. Als Kontrolle dienten PCR-Ansätze mit Primern für β-Actin (Tabelle 15). Nach Beendigung der PCR wurden die Amplifikate vom Mineralöl getrennt und in 1-2 %igen Agarosegelen analysiert.

Tabelle 14: Zusammensetzung von 50 µl Reaktionsansatz

DNA	10 ng
Taq-Puffer (10 x)	5 µl
dNTP-Mix (je 10 mM)	1 µl
“aufwärts”-Primer (20 pmol)	1 µl
“abwärts”-Primer (20 pmol)	1 µl
Taq-Polymerase	1-2 I.E.
Aqua dest.	ad 50 µl

Tabelle 15: Verwendete Oligonukleotide

Gen	Primer-Sequenz	Produktlänge
CCL19	5'-CCAGCCTCACATCACTCACACCTTGC-3' 5'-TGTGGTGAACACTACAGCAGGCACCC-3'	324 bp
CCL20	5'- CTGTACCAAGAGTTTGCTCC -3' 5'- GCACAATATATTTACCCAAG -3'	193 bp
CCL21	5'-AACCAAGCTTAGGCTGCTCCATCCCA-3' 5'-TATGGCCCTTTAGGGGTCTGTGACCG-3'	249 bp
β -Actin	5'- CTACAATGAGCTGCGTGTGGC -3' 5'- CAGGTCCAGACGCAGGATGGC -3'	270 bp

2.6.4 Temperaturprofile der Oligonukleotide

Unter definierten Bedingungen lässt sich die Stabilität eines Doppelstranges durch Berechnung der Schmelztemperatur T_m bestimmen. T_m ist die Temperatur, bei der die Hälfte der doppelsträngigen Moleküle in Einzelstränge dissoziiert.

Die T_m lässt sich anhand der folgenden Formel annähernd berechnen:

$$T_m = 2 \times (\text{Anzahl AT}) + 4 \times (\text{Anzahl GC})$$

Durch Austesten verschiedener Temperaturprofile wurde für die einzelnen verwendeten Oligonukleotid-Primer die optimale Temperatur bestimmt. Die optimierten Temperaturprofile sind in Tabelle 16 (CCL19, CCL20 und CCL21) und Tabelle 17 aufgeführt (β -Actin).

Tabelle 16: Temperaturprofil für CCL19, CCL20 und CCL21

1 Zyklus	Denaturierung	95 °C	3 min
35 Zyklen	Denaturierung	95 °C	30 sec
	Annealing	60 °C	30 sec
	Synthese	72 °C	20 sec
1 Zyklus	Synthese	72 °C	7 min

Tabelle 17: Temperaturprofil für β -Actin

1 Zyklus	95 °C	3 min
35 Zyklen	95 °C	30 sec
	56 °C	1 min
	72 °C	1 min
1 Zyklus	72 °C	7 min

2.6.5 Agarosegelelektrophorese

Zur Überprüfung und Größenbestimmung der PCR-Produkte erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel. Die Agarosegellösung (je nach aufzutrennender Fragmentgröße 1-2 %) wurde kurz aufgekocht, auf ca. 50 °C abgekühlt und auf einen Gelschlitten gegossen. Nachdem das Gel polymerisiert war, wurde die Auftrennung der DNA-Fragmente bei konstanter Spannung (max. 4 V/cm) durchgeführt. Das im Ethidiumbromidbad (Konzentration 0,5 $\mu\text{g/ml}$) angefärbte Gel wurde unter UV-Bestrahlung (254 nm) mit einer Polaroid-Kamera zur Dokumentation fotografiert.

2.6.6 Real-time RT-PCR

Zur Quantifizierung der CCL19-, CCL20-, CCL21- und β -Actin-mRNA wurde eine real-time RT-PCR durchgeführt. Hierzu wurden die bei der cDNA-Synthese gewonnenen Proben aus Tumorgewebe und Normalgewebe wie beschrieben eingesetzt. Parallel wurden eine Standard-cDNA in absteigender Konzentration und eine Negativkontrolle eingesetzt. Die Kunststoffreaktionsgefäße wurden jeweils mit einem Gesamtvolumen von 20 μ l aufgefüllt. Die Reaktionsansätze wurden stets auf Eis pipettiert. Pro Reaktionsgefäß wurden 5 μ l der Gewebeprobe mit einem cDNA-Gehalt von 5 ng eingesetzt. 15 μ l Mastermix mit Polymerase, sens- und antisens-Primern sowie 5 μ l cDNA aus Tumor- bzw. Normalgewebeprobe wurden pro Reaktionsgefäß zu 20 μ l Gesamtvolumen addiert. Zur Herstellung des cDNA-Standards wurde eine Lymphknoten-cDNA mit einem absteigenden cDNA-Gehalt von 50 ng, 5 ng, 0,5 ng und 0,05 ng hergestellt. 15 μ l Mastermix und jeweils 5 μ l der Standards wurden auch hier zu einem Gesamtvolumen von 20 μ l addiert. Die Negativkontrolle setzte sich aus 15 μ l Mastermix und 5 μ l PCR-Wasser (Sigma, RNase-frei) zusammen. Die Proben wurden in den iCycler (Biorad) eingesetzt und folgendes Temperaturprofil ausgeführt:

Die doppelsträngige DNA wurde zur Aktivierung der Polymerase für 10 Minuten bei 95 °C erhitzt, anschließend folgten 40 Zyklen mit je 30 Sekunden Denaturierung bei 95 °C, der Annealing-Schritt in 40 Zyklen für je 30 Sekunden bei 60 °C sowie die Extension der PCR-Produkte in 40 Zyklen für je 30 Sekunden bei 72 °C. Abschließend erfolgte ein Zyklus über 7 Minuten bei 72 °C zur terminalen Elongation der PCR-Produkte und zuletzt die Kühlung des PCR-Ansatzes auf 4 °C zur Vermeidung unspezifischer Reaktionen von Primern, Nukleotiden und Polymerasen.

Die softwaregesteuerte Auswertung zur Quantifizierung beruht auf der Berechnung eines Fluoreszenzschwellenwertes, des sogenannten Thresholdcycles, der sich aus der

Schwankungsbreite der Basisfluoreszenz der PCR-Reaktionen während der ersten PCR-Zyklen ergibt, zu einem Zeitpunkt also, zu dem noch keine PCR-Produktbildung messbar ist. Um eine Quantifizierung unbekannter Proben vorzunehmen (in μg DNA oder Anzahl der Kopien), wurden Standards bekannten DNA-Gehaltes (hier: 50 ng, 5 ng, 0,5 ng, 0,05 ng) eingesetzt. Zu einem bestimmten Zyklus der PCR lässt sich so anhand der Fluoreszenzzunahme die PCR-Produktentwicklung für jeden Standard sowie jede der unbekannt Proben beobachten. Unter der Voraussetzung, dass die Fluoreszenzzunahme größer ist als der berechnete Schwellenwert und auch kontinuierlich über wenigstens zwei PCR-Zyklen messbar ist, wird der Zyklus, in dem dies passiert, dem jeweiligen Standard und der jeweiligen unbekannt Probe als sogenannter Threshold-Zyklus zugewiesen. Aus den Threshold-Zyklen der bekannten Standards lässt sich eine Korrelationsgerade ableiten, mittels der nun auch die Quantifizierung der unbekannt Proben erfolgen kann. In diesem Versuchsansatz wurde der Fluoreszenzfarbstoff Sybr-Green (Sigma, München) verwendet. Diesem Farbstoff fehlt allerdings jede Spezifität hinsichtlich des zu untersuchenden Templates (Ausgangs-DNA), denn auch Primer-Dimere, die sich während der Reaktion bilden, verursachen einen Fluoreszenzanstieg. Dieser ist zunächst nicht von dem spezifischen Produkt zu unterscheiden. Eine Differenzierung zwischen spezifischem Produkt und Primer-Dimeren kann jedoch nach abgeschlossener PCR mittels einer sogenannten Schmelzpunktanalyse erfolgen. Dabei werden die neu gebildeten PCR-Produkte unter kontinuierlicher Temperaturzunahme um $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einem Bereich zwischen $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgeheizt und denaturiert, so dass sie nur noch als Einzelstrang vorliegen. Die dabei abnehmende Fluoreszenz wird aufgezeichnet. Primer-Dimere, die aus kleineren Fragmenten als das gewünschte PCR-Produkt bestehen, schmelzen früher und können somit anhand eines früheren Schmelzpunktes davon unterschieden werden.

3 Ergebnisse

3.1 Quantifizierung dendritischer/antigenpräsentierender Zellen mittels S100-Darstellung in der Immunhistochemie

Zu Beginn unserer Untersuchungen führten wir an Nephrektomiepräparaten von 24 Patienten, welche an verschiedenen Subtypen von Nierenzellkarzinomen erkrankt waren (Tabelle 8, Abbildung 1), immunhistochemische Untersuchungen durch, um die Verteilung der verschiedenen Subtypen dendritischer Zellen im Gewebe des Nierentumors, im gesunden Nierengewebe und in der dazwischen liegenden Infiltrationszone vergleichend zu untersuchen (Abbildung 2).

In einer ersten Analyse wurden Untersuchungen zum Nachweis von S100-Protein durchgeführt, da sowohl reife als auch unreife antigenpräsentierende dendritische Zellen eine Expression für S100-Protein aufweisen und somit ein möglichst großer Anteil myeloischer dendritischer Zellen nachweisbar ist.

Unter dem Mikroskop wurden bei zehnfacher Vergrößerung und unter Verwendung eines Zählrasters die angefärbten Zellen ausgezählt. Dies geschah für jeden Gewebeschnitt an 3 verschiedenen Stellen und jeweils für die Tumorzone, die Infiltrationszone und das Normalgewebe getrennt (Abbildung 3). Die statistische Auswertung erfolgte anhand des t-Tests für verbundene Stichproben unter Verwendung des Programms Graph Pad Prism 4.00, wobei Verteilungsunterschiede bei einem p-Wert von $p < 0,05$ als signifikant angesehen wurden.

In der Infiltrationszone konnte eine signifikant ($p < 0,001$) höhere Expression von S100 durch dendritische Zellen festgestellt werden als im Tumorgewebe oder im gesunden Nierenparenchym (jeweils $p < 0,001$). Ebenso waren im Normalgewebe signifikant mehr dendritische Zellen vorhanden als im Tumorgewebe ($p < 0,001$). Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 grafisch dargestellt. Eindeutige Unterschiede hinsichtlich der Zahl S100-

positiver Zellen konnten zwischen den einzelnen Subtypen des Nierenzellkarzinoms nicht identifiziert werden.

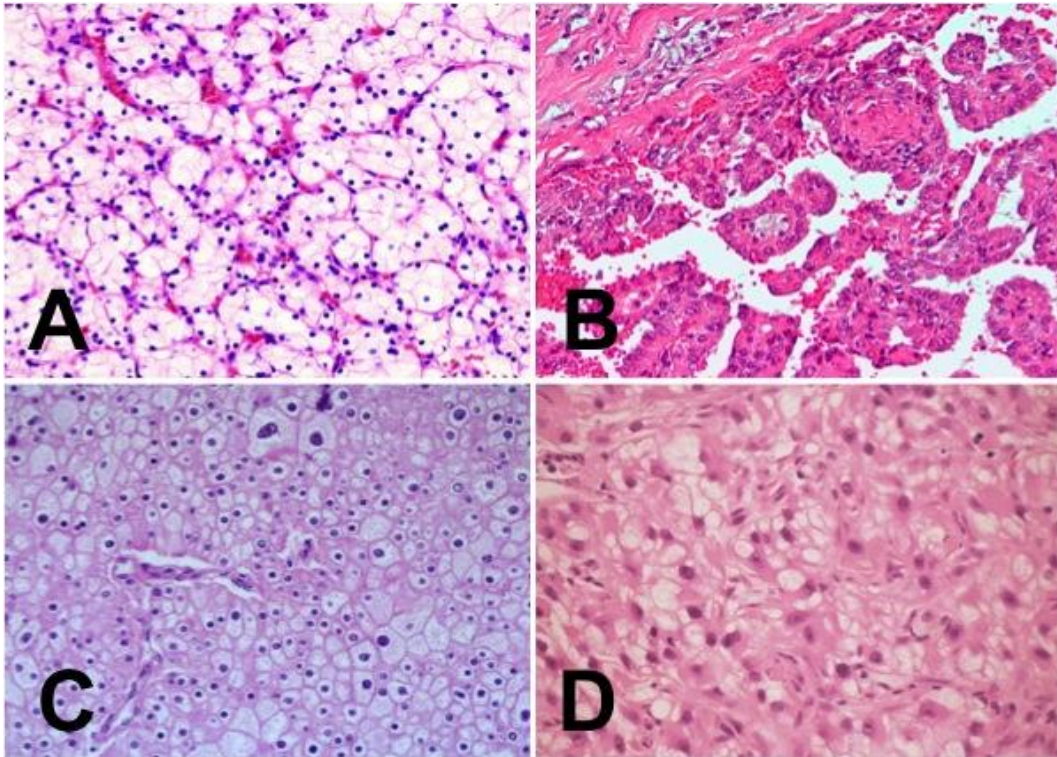


Abbildung 1: Darstellung der in dieser Arbeit untersuchten Subtypen des Nierenzellkarzinoms: Klarzelliges Nierenzellkarzinom (A, 200x, HE), papilläres Nierenzellkarzinom (B, 200x, HE), chromophobes Nierenzellkarzinom (C, 200x, HE) und pleomorphzelliges/sarkomatoides Nierenzellkarzinom (D, 200x, HE).

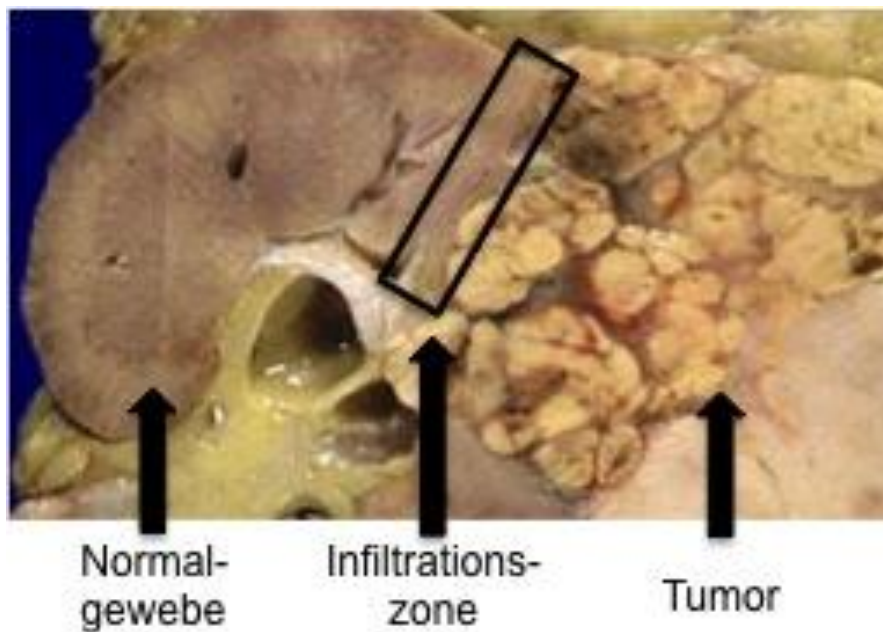


Abbildung 2: Makroskopie eines klarzelliges Nierenzellkarzinoms mit Darstellung von Normalgewebe, Infiltrationszone und Tumorgewebe. Die Infiltrationszone stellt die unmittelbare peritumorale Zone tumorfreien Gewebes dar, die im Wesentlichen aus der Tumorkapsel und dem hieran unmittelbar angrenzenden Normalgewebe besteht (siehe eingezeichnetes Quadrat). Im Gegensatz zu Tumor und Normalgewebe handelt es sich hierbei um eine deutlich schmalere Region.

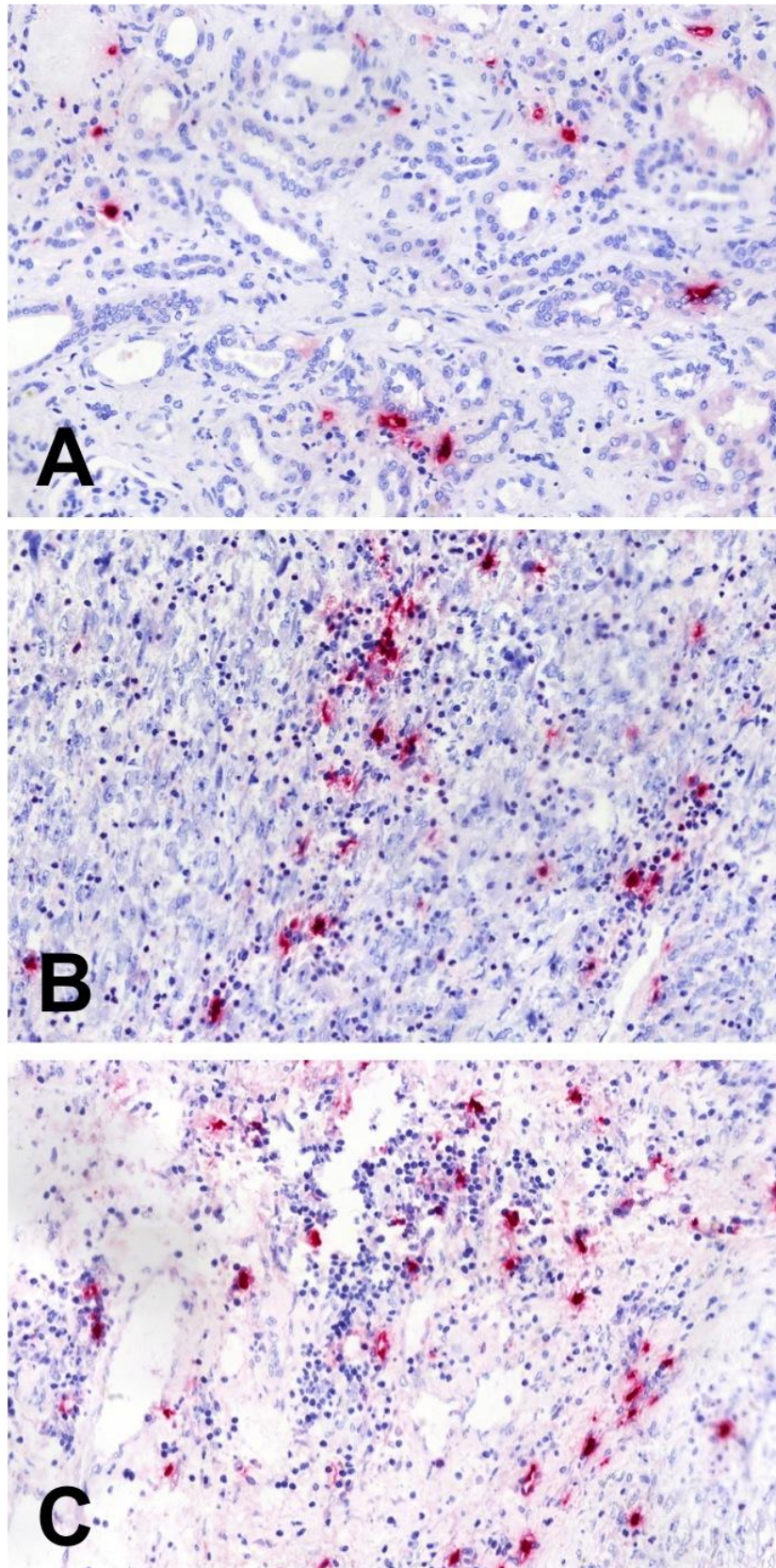


Abbildung 3: In der immunhistochemischen Untersuchung an Präparaten mit Nierenzellkarzinom finden sich in der Junctionszone („C“) signifikant mehr S100-positive dendritische Zellen als im gesunden („A“) oder Tumorgewebe („B“; 200x)

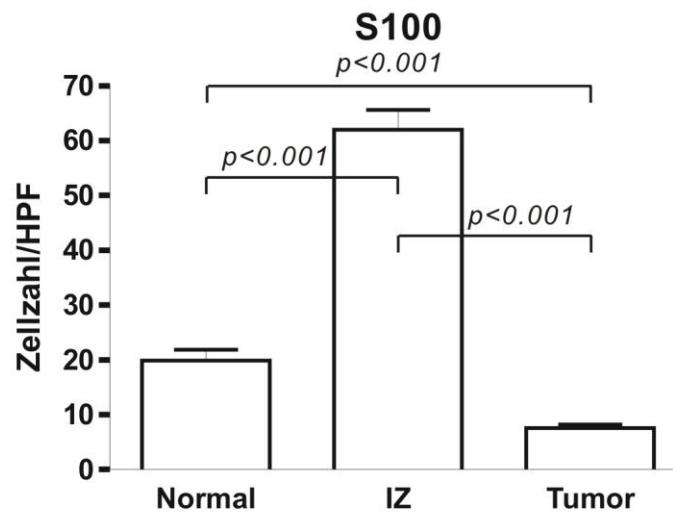


Abbildung 4: Verteilung der Anzahl S100-Protein-positiver dendritischer Zellen bei Patienten mit Nierenzellkarzinom in Tumor, Infiltrationszone sowie tumorfreiem Nierengewebe: Die Infiltrationszone weist signifikant mehr S100-positive dendritische Zellen auf als normales Nierengewebe oder Tumorgewebe ($p < 0,001$, $n = 24$).

3.2 Quantifizierung unreifer dendritischer Zellen in Tumorgewebe, Infiltrationszone und Normalgewebe mittels CD1a-spezifischer Immunhistochemie

Im weiteren Verlauf führten wir immunhistochemische Untersuchungen mit Antikörpern gegen CD11c und Fascin durch, da beide Marker sowohl von unreifen als auch von reifen myeloischen dendritischen Zellen exprimiert werden und wir damit die Gesamtzahl dieser Zellen im Tumorgewebe, der Infiltrationszone sowie im gesunden Nierengewebe bestimmen wollten. Leider scheiterte dieser Versuch einerseits an der CD11c-Koexpression durch zahlreiche Makrophagen im Tumorgewebe (siehe Abbildung 5), andererseits an der bei 90 % der untersuchten Fälle auffälligen überwiegend starken und homogenen zytoplasmatischen Expression von Fascin im Tumorgewebe, so dass diese Marker für unsere Untersuchungen unbrauchbar waren. Für die Expression von Fascin zeigte sich eine Tendenz zu einer

stärkeren Expression in gering differenzierten Karzinomen, wie z. B. beim sarkomatoiden Subtyp (Abbildung 6).

Wir führten somit weitere immunhistochemische Färbungen mit einem Antikörper gegen das für unreife myeloische dendritische Zellen spezifische Antigen CD1a durch. Ergänzend erfolgten bei den unreifen CD1a-positiven myeloischen Zellen Untersuchungen mit einem Antikörper gegen Langerin, einem Oberflächenmerkmal von Langerhans-Zellen.

Am Ende dieses Versuches zeigten sich typische Verteilungsmuster unreifer DC-Subtypen: Konnten in allen untersuchten Proben CD1a-positive Zellen mit dendritischer Morphologie diffus verteilt im Bereich des Nierentumorgewebes nachgewiesen werden, so waren es nur wenige verstreute Exemplare im gesunden Nierengewebe. Die Anzahl CD1a-positiver unreifer dendritischer Zellen pro hochauflösendem Gesichtsfeld innerhalb des Tumorgewebes reichte dabei von einer bis 24 Zellen. Der Mittelwert lag bei 12 und der Median bei 7 Zellen pro hochauflösendem Gesichtsfeld innerhalb des Tumors (s. Abbildungen 7 und 8). Eindeutige Unterschiede hinsichtlich der Zahl CD1a-positiver Zellen konnten zwischen den einzelnen Subtypen des Nierenzellkarzinoms nicht identifiziert werden.

Wie aus Abbildung 9 zu entnehmen ist, wies die überwiegende Zahl (80 %) CD1a-positiver Zellen in den durchgeführten Doppelfärbungen eine Koexpression für Langerin auf. Allerdings zeigten sich auch CD1a-positive und Langerin-negative unreife dendritische Zellen. Darüber hinaus fand sich bei den unreifen myeloischen dendritischen Zellen keine Koexpression reifungsassoziierter Marker wie DC-LAMP, CD40 oder RelB. In 3 Fällen waren keine und in 9 der insgesamt 24 untersuchten Fälle weniger als drei CD1a-positive Zellen im normalen Nierengewebe über die gesamte Schnittfläche nachweisbar.

Allerdings zeigten 4 Fälle eine leichte bis mittelgradige chronische unspezifische Nephritis mit kleineren fokalen Aggregaten CD1a-positiver dendritischer Zellen. Der chronische Entzündungsprozess führt dabei konsekutiv zu einer verstärkten Akkumulation unreifer myeloischer Zellen.

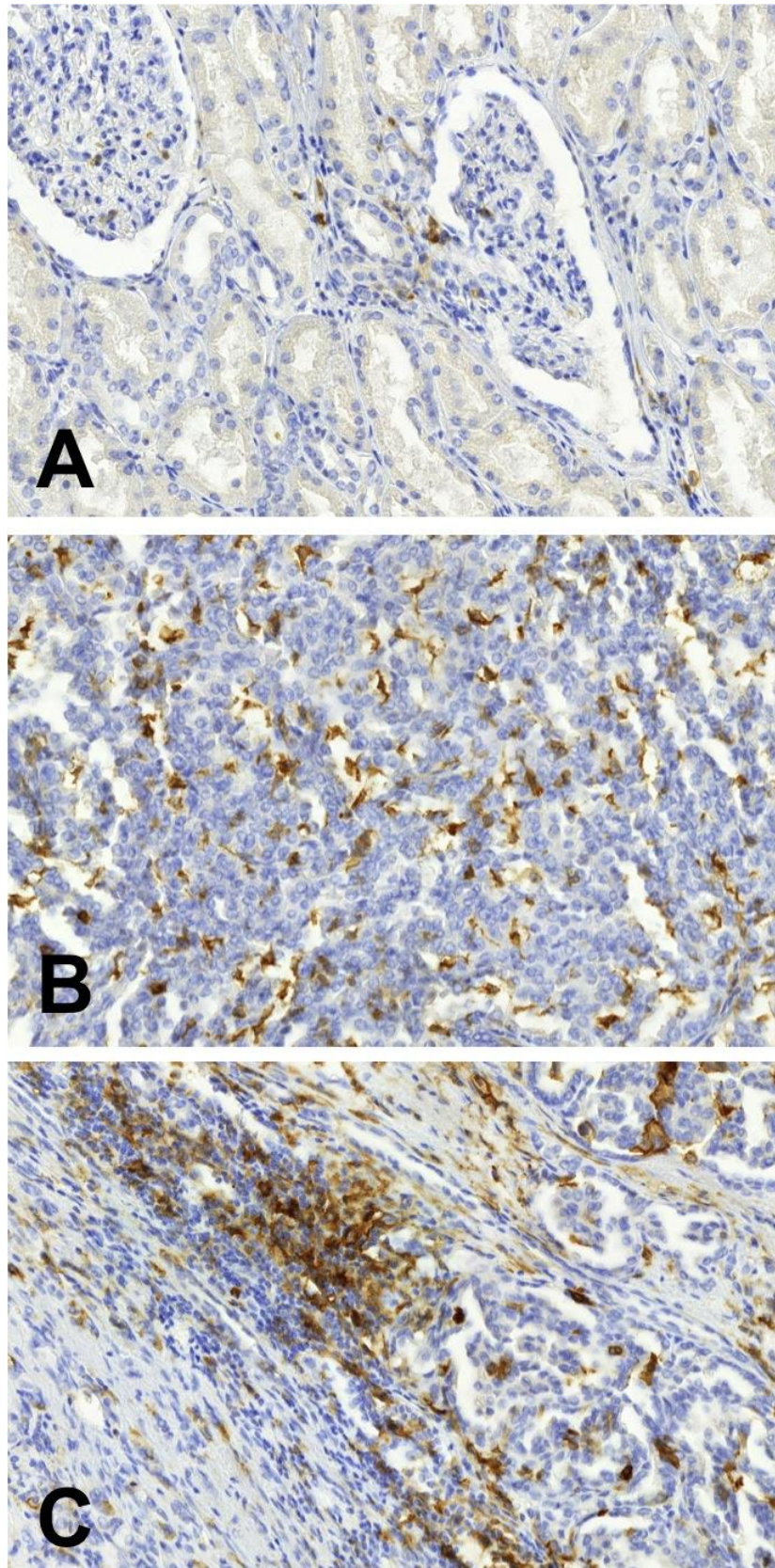


Abbildung 5: Das Antigen CD11c wird von zahlreichen, hier schaumzellig umgewandelten, Makrophagen innerhalb des Tumorgewebes („B“) eines hier klarzelligen/hellzelligen Nierenzellkarzinoms exprimiert. Gesundes Nierengewebe = „A“, Infiltrationszone = „C“ (IHC, 200 x).

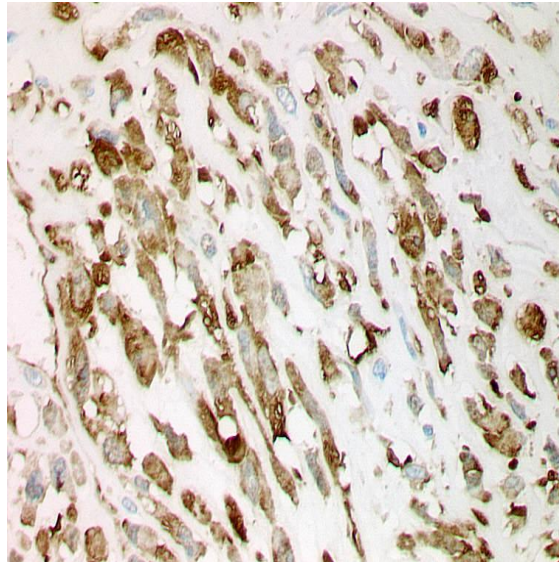


Abbildung 6: Die Tumorzellen des hier gering differenzierten sarkomatoiden Nierenzellkarzinoms (Malignitätsgrad G3) weisen eine mäßige bis starke homogene Fascin-Expression auf (IHC, 400 x).

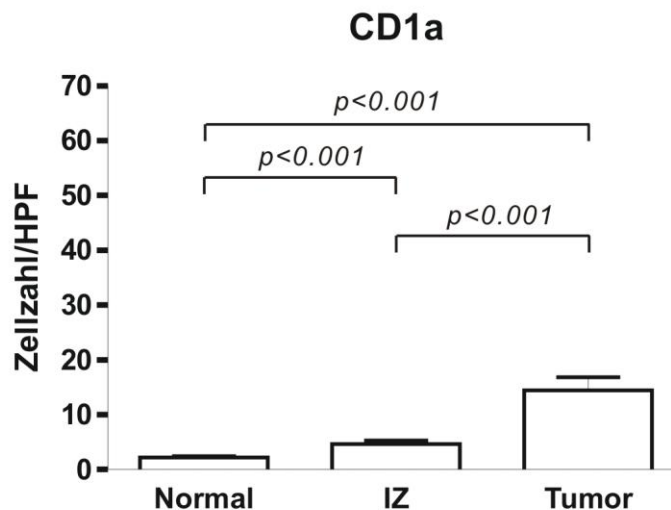


Abbildung 7: Verteilung CD1a-positiver myeloischer dendritischer Zellen bei Patienten mit Nierenzellkarzinom im Tumor, der Infiltrationszone sowie im tumorfreien Nierengewebe (n = 24): Sowohl im gesunden Nierenparenchym, in der Infiltrationszone als auch im Tumorgewebe konnte die Expression von CD1a, welches einen Marker für unreife dendritische Zellen darstellt, nachgewiesen werden. Bei der quantitativen Gegenüberstellung der Verteilung CD1a-positiver myeloischer dendritischer Zellen fand sich im Tumorgewebe des Nierenzellkarzinoms eine signifikant größere Anzahl dieser Zellen als im gesunden Nierengewebe bzw. in der Infiltrationszone (jeweils $p < 0,001$). Ebenso war die Anzahl der unreifen Dendriten in der Infiltrationszone signifikant größer als im gesunden Gewebe ($p < 0,001$).

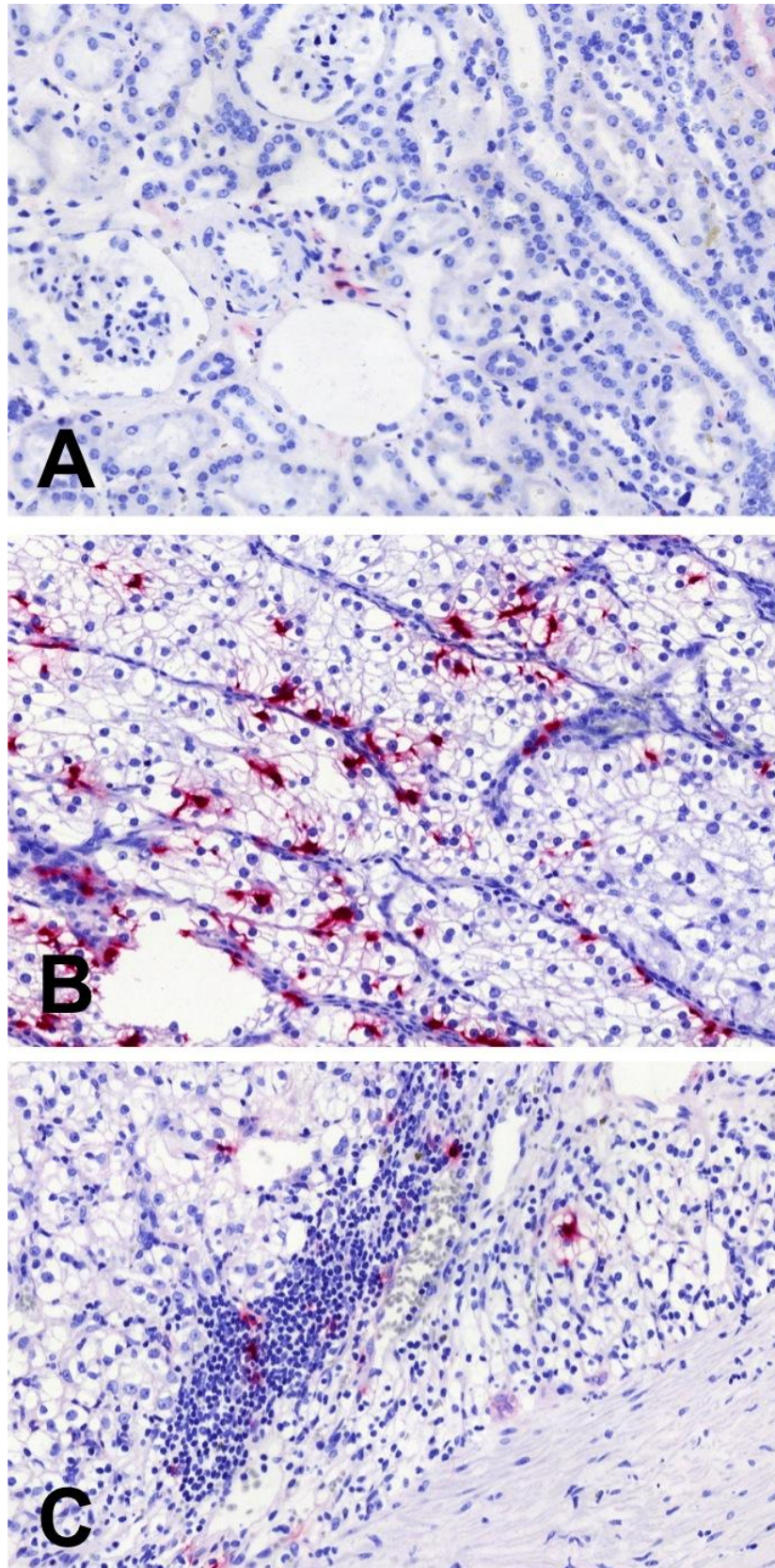


Abbildung 8: Immunhistochemischer Nachweis von CD1a: Zahlreiche CD1a-positive unreife myeloische dendritische Zellen finden sich im Tumorgewebe („B“) eines hier sarkomatoid differenzierten Nierenzellkarzinoms. Normalgewebe = „A“, die Infiltrationszone sieht man in „C“ (200 x).

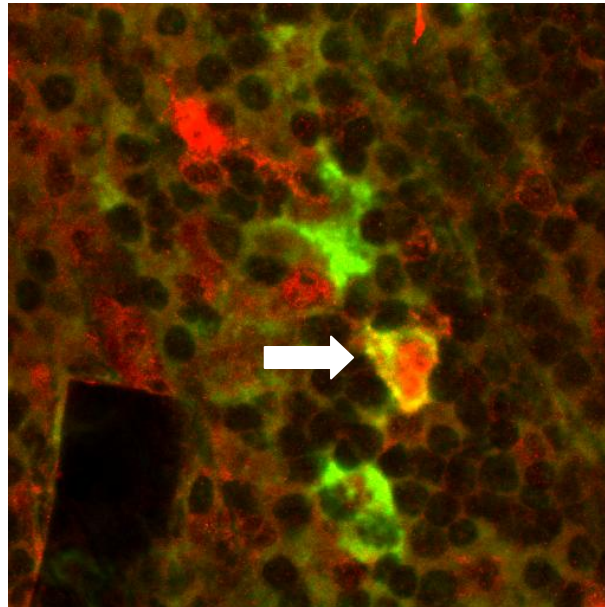


Abbildung 9: In der Doppelimmunfluoreszenzuntersuchung zeigen CD1a-positive DC (Indocarbocyanin – Cy3 = roter Farbstoff) im Tumorgewebe eine Koexpression von Langerin (Carbocyanin – Cy2 = grüner Farbstoff) mit gelber Färbung auf Grund der Farbüberlagerung von rot und grün, siehe Pfeil (400 x; Middel et al. 2010).

3.3 Quantifizierung reifer dendritischer Zellen in Tumorgewebe, Infiltrationszone und Normalgewebe mittels CD83-spezifischer Immunhistochemie sowie weiterer Reifungsmarker

Zur Bestimmung des Verteilungsmusters reifer myeloischer dendritischer Zellen bei Patienten mit Nierenzellkarzinom führten wir immunhistochemische Untersuchungen zum Nachweis des spezifischen Oberflächenmerkmals CD83 durch. Während CD83-positive reife myeloische dendritische Zellen in allen Tumoren nachgewiesen werden konnten, zeigte sich eine typische Verteilung dieser Zellen zwischen Tumor, normalem Nierengewebe und der peritumoralen Zone. Sowohl im normalen, nicht entzündlich veränderten Nierengewebe als auch im Tumorgewebe waren nur ganz vereinzelt CD83-positive dendritische Zellen zu finden. Im normalen Nierengewebe ohne Entzündungsprozess konnten in der Regel nicht mehr als drei CD83-positive dendritische Zellen innerhalb eines kompletten histologischen Schnittes entdeckt werden. Darüber hinaus wurden in 17 von 24 untersuchten Fällen mit

Nierenzellkarzinom keine CD83-positiven dendritischen Zellen im gesamten Tumorgewebe nachgewiesen. Erstaunlicherweise fanden sich in einer Größenordnung von bis zu 28 pro hochauflösendem Gesichtsfeld die größten Ansammlungen CD83-positiver reifer dendritischer Zellen in der peritumoralen Zone, einer Region nicht tumorös infiltrierten Gewebes, welches in unmittelbarer Nachbarschaft der oft nachweisbaren tumorösen Pseudokapsel angesiedelt war. Im Mittelwert fanden sich sechs und im Median sieben CD83-positiv Zellen (Abbildungen 10 und 11). Eindeutige Unterschiede hinsichtlich der Zahl CD83-positiver reifer dendritischer Zellen konnten auch hier zwischen den einzelnen Subtypen des Nierenzellkarzinoms nicht erkannt werden.

Durch anschließend durchgeführte Doppelimmunfluoreszenzuntersuchungen mit konfokaler Laser-Mikroskopie war uns der Nachweis weiterer Reifungsmarker wie DC-LAMP (Abbildungen 12 und 13), CD40 (Abbildung 14) und nukleärem ReIB (Abbildung 15) auf diesen reifen CD83-positiven Zellen möglich.

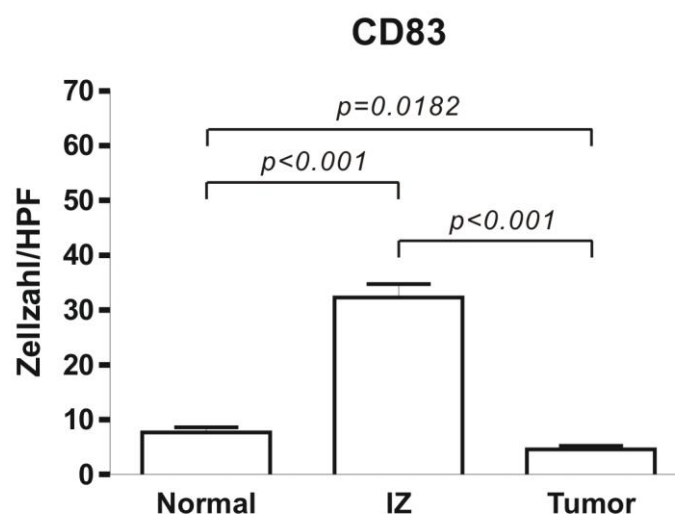


Abbildung 10: Verteilung CD83-positiver reifer myeloischer dendritischer Zellen bei Patienten mit Nierenzellkarzinom im Tumor, der Infiltrationszone sowie im tumorfreien Nierengewebe: Es zeigt sich eine signifikant höhere Anzahl innerhalb der Infiltrationszone (IZ) verglichen mit Normal- und Tumorgewebe ($p < 0,001$, $n = 24$).

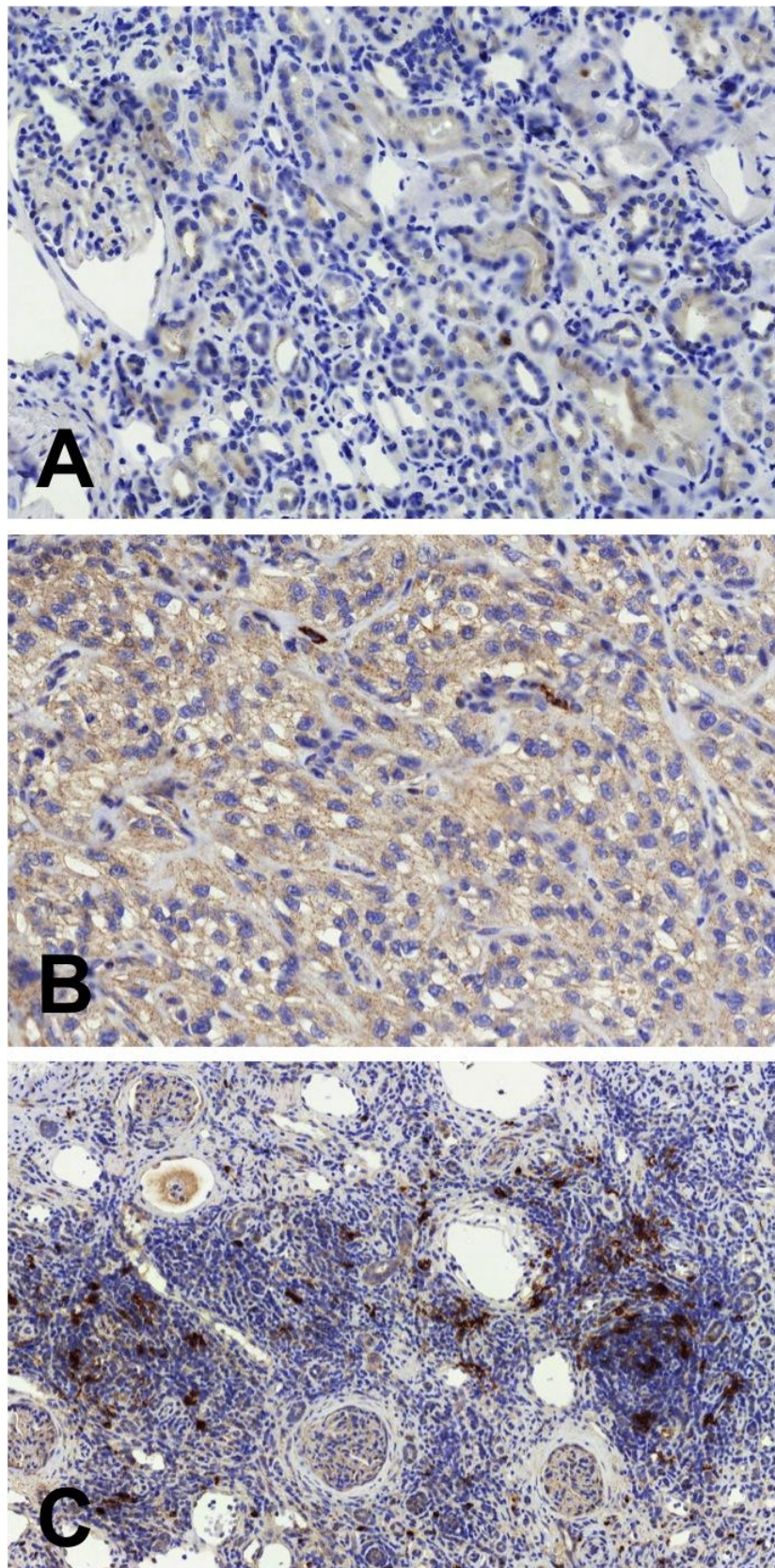


Abbildung 11: Immunhistochemischer Nachweis für CD83: Die Expression von CD83 durch reife myeloische dendritische Zellen findet sich typischerweise am häufigsten in der Infiltrationszone („C“) innerhalb von T-Zellinfiltraten. Gesundes Nierengewebe = „A“, Tumorgewebe = „B“ (IHC, 200 x).

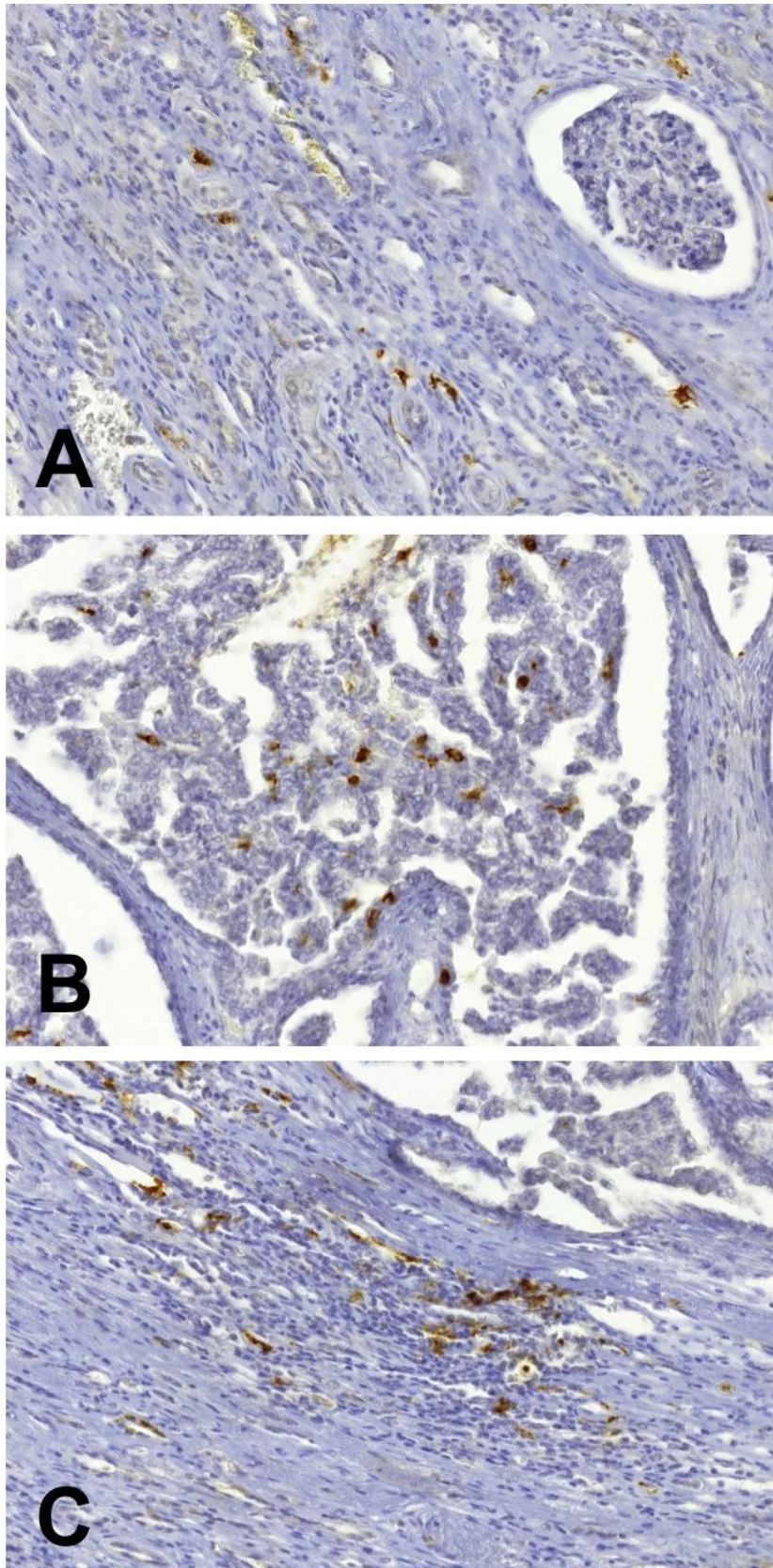


Abbildung 12: DC-LAMP-exprimierende reife dendritische Zellen finden sich in der Infiltrationszone („C“) deutlich häufiger als in normalem („A“) oder Tumorgewebe („B“) (IHC, 200x).

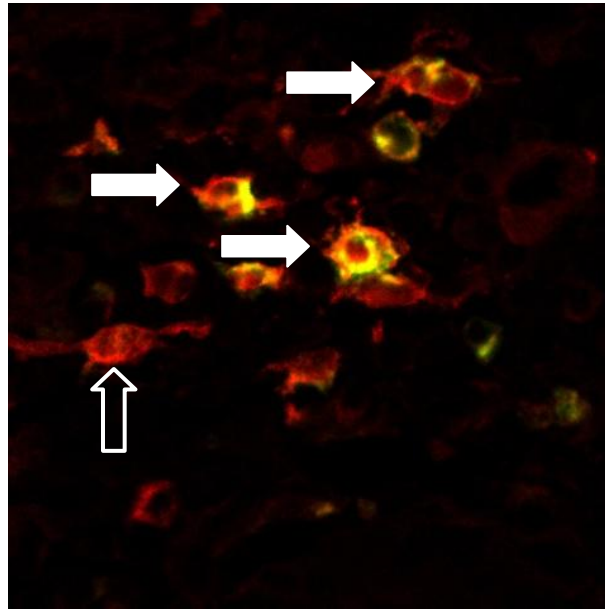


Abbildung 13: CD83-positive DC (Cy3 = roter Farbstoff; offener Pfeil) der Tumorrandzone zeigen eine Koexpression des reifungsassoziierten Antigenes DC-LAMP (Cy2 = grüner Farbstoff, geschlossene Pfeile; Doppelimmunfluoreszenz, 400 x; Middel et al. 2010).

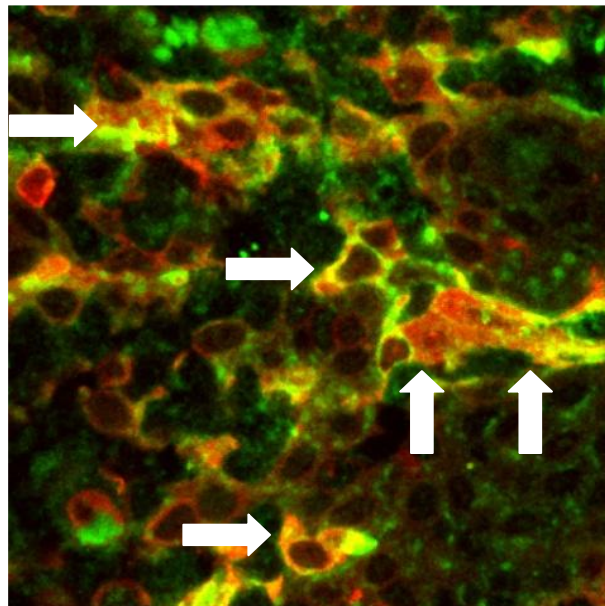


Abbildung 14: CD83-positive DC (Cy3 = roter Farbstoff) der Tumorrandzone zeigen eine Koexpression des reifungsassoziierten Antigenes CD40 (Pfeile; Cy2 = grüner Farbstoff, Doppelimmunfluoreszenz, 400 x; Middel et al. 2010).

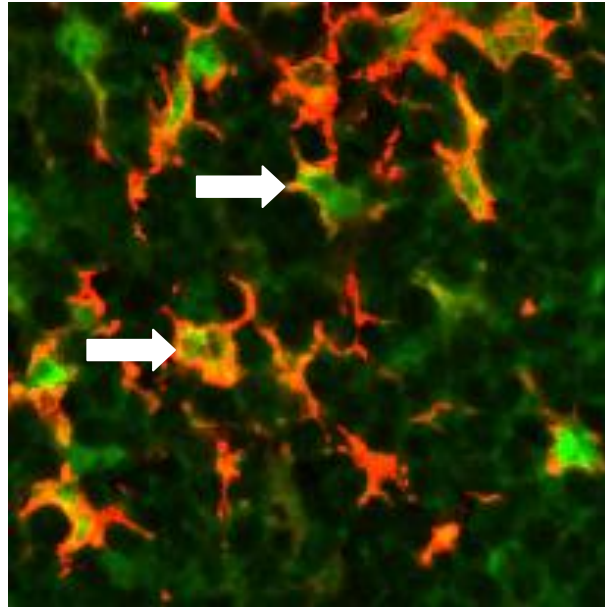


Abbildung 15: CD83-positive DC (Cy3 = roter Farbstoff) der Tumorrandozone zeigen eine Koexpression des reifungsassoziierten Antigenes RelB (Pfeile; Cy2 = grüner Farbstoff, Doppelimmunfluoreszenz, 400 x; Middel et al. 2010).

3.4 Nachweis tertiärer lymphatischer Strukturen in der peritumoralen Zone als Hinweis auf eine lokale, gegen den Tumor gerichtete T-Zellimmunantwort

Außerdem fielen uns Anhäufungen von reifen dendritischen Zellen und T-Lymphozyten, sogenannte Cluster, in der peritumoralen Zone der untersuchten Nierenzellkarzinome auf, was wir durch immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen CD83 (Abbildung 16) bzw. CD3 in 22 der 24 untersuchten Gewebeproben nachweisen konnten. Diese Aggregate waren typischerweise in enger Nachbarschaft, zum Teil sogar innerhalb peritumoraler ektatischer Lymphgefäße zu beobachten. Dieser Befund ist insofern atypisch, da reife dendritische Zellen normalerweise lediglich in sekundären lymphatischen Organen nachweisbar sind.

Eine gesteigerte Proliferationsaktivität fanden wir bei etwa 5-10 % der sich innerhalb der Cluster befindlichen CD3-positiven T-Lymphozyten, was wir durch eine zusätzliche Färbung mittels Mib-1 (Ki-67) nachweisen konnten (Abbildung 17). Die Mehrheit der CD3-positiven

T-Zellen innerhalb dieser Aggregate zeigte eine Koexpression für CD4. Diese tertiären lymphatischen Formationen konnten unabhängig vom Subtyp der Nierenzellkarzinome gefunden werden. Nennenswerte Unterschiede hinsichtlich der Größe der lymphatischen Aggregate waren nicht erkennbar.

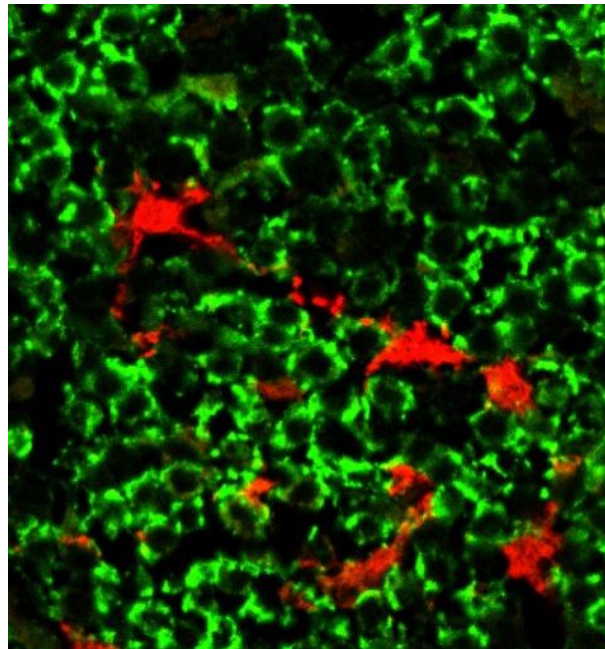


Abbildung 16: CD83-positive DC (Cy3 = roter Farbstoff) bilden Ansammlungen mit CD3-positiven T-Zellen (Doppelimmunfluoreszenz, 400 x, Cy2 = grüner Farbstoff; Middel et al. 2010).

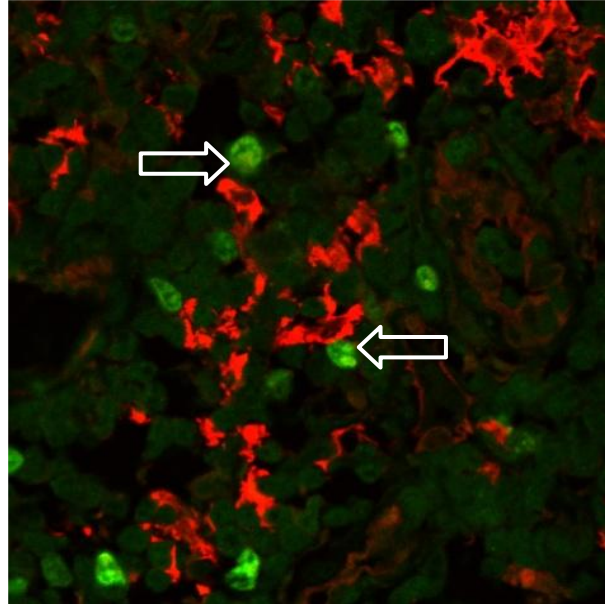


Abbildung 17: T-Zellen in Nachbarschaft reifer CD83-positiver DC (Cy3 = roter Farbstoff) zeigen eine vermehrte Proliferationsaktivität, was durch Mib-1-Expression (offene Pfeile; Antikörper gegen Ki-67, Doppelimmunfluoreszenz, 400 x, Cy2 = grüner Farbstoff) belegt wird (Middel et al. 2010).

3.5 mRNA-Expression der lymphoiden Chemokine CCL19, CCL20 und CCL21 in Tumorzellkulturen sowie Tumorgewebe des Nierenzellkarzinoms

Anhand der etablierten Tumorzelllinien des Nierenzellkarzinoms A498, CAKI-1 und CAKI-2 wurde geprüft, ob diese Tumorzelllinien eine ggf. differenzielle Expression für die Chemokine CCL19, CCL20 und CCL21 aufweisen. Als Kontrolle diente bei den Untersuchungen mRNA aus Lymphknotengewebe sowie als Negativkontrolle PCR-Ansätze mit Wasser als Template. In der RT-PCR-Analyse zeigte die mRNA aller drei Zelllinien ein spezifisches PCR-Produkt für CCL20, welches auch in der Kontroll-mRNA aus Lymphknotengewebe nachweisbar war. In den PCR-Reaktionen für CCL19 und CCL21 ließ sich in den Tumorzelllinien kein spezifisches Produkt nachweisen. Hingegen zeigte hier die Kontrolle in Lymphknotengewebe ein entsprechendes Amplifikat (s. Abbildung 18).

In weiteren Untersuchungen wurde mRNA aus Frischgewebe von 10 Patienten mit ausschließlich klarzelligen Nierenzellkarzinomen sowie angrenzendem Normalgewebe isoliert. Verwendet wurde Gewebe der Patientenproben Nr. 7 sowie 11-19 der in Tabelle 8 aufgeführten Präparate. Anhand dieser Proben wurden zusätzliche real-time RT-PCR-Analysen zum Nachweis einer mRNA-Expression von CCL19, CCL20 und CCL21 durchgeführt. Als Kontrolle diente auch hier mRNA aus Lymphknotengewebe. Als Negativkontrolle diente der PCR-Ansatz mit Wasser ohne Template. In der real-time RT-PCR-Analyse zeigte sich, dass das Tumorgewebe für CCL20 eine deutlich höhere mRNA-Expression im Vergleich zum Normalgewebe aufwies ($p < 0,05$). Kein signifikanter Unterschied konnte zwischen Tumorgewebe und Normalgewebe hinsichtlich der mRNA-Expression für CCL19 ($p = 0,395$) und CCL21 ($p = 0,137$) nachgewiesen werden (Abbildung 19).

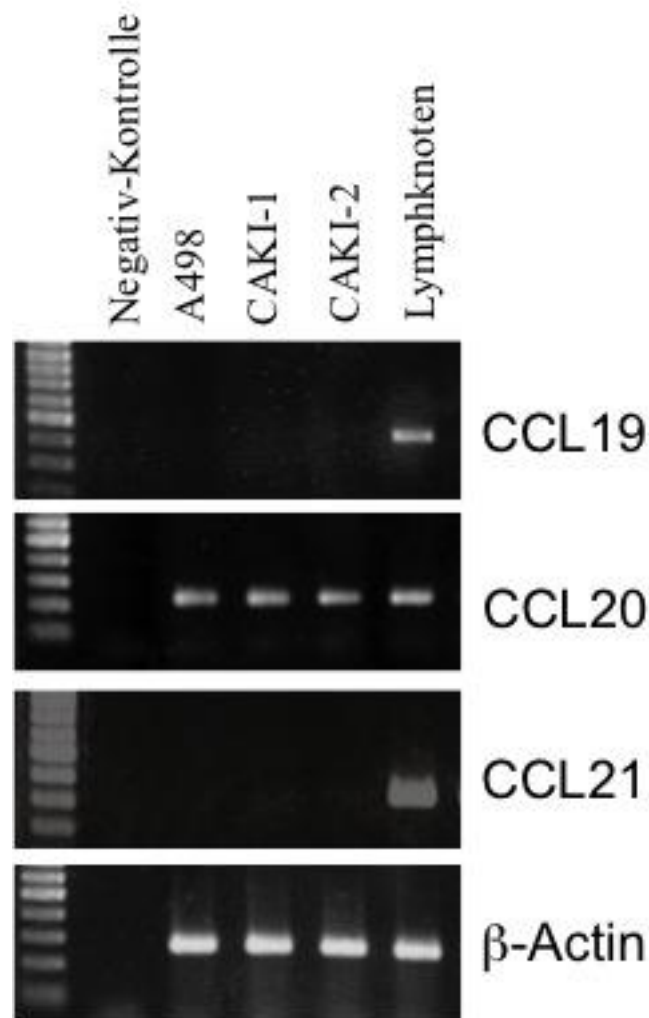


Abbildung 18: RT-PCR-Analyse zum Nachweis von CCL19-, CCL20- und CCL21-mRNA in Tumorzelllinien des Nierenzellkarzinoms (Middel et al. 2010): Die RT-PCR-Analysen wurden anhand von mRNA der Tumorzelllinien A498, CAKI-1 und CAKI-2 durchgeführt. Als positive Kontrolle diente mRNA eines Lymphknotens; als Negativkontrolle diente der PCR-Ansatz mit Wasser. Alle drei Tumorzelllinien zeigten eine spezifische Bande in der RT-PCR für CCL20 (Mitte). Keine Amplifikate konnten in den spezifischen Ansätzen der RT-PCR für CCL19 (oben) und CCL21 (unten) nachgewiesen werden. In der Kontrollreaktion mit Primern für beta-Actin zeigten alle drei Tumorzelllinien sowie die Positivkontrolle der Lymphknoten-mRNA ein spezifisches PCR-Produkt.

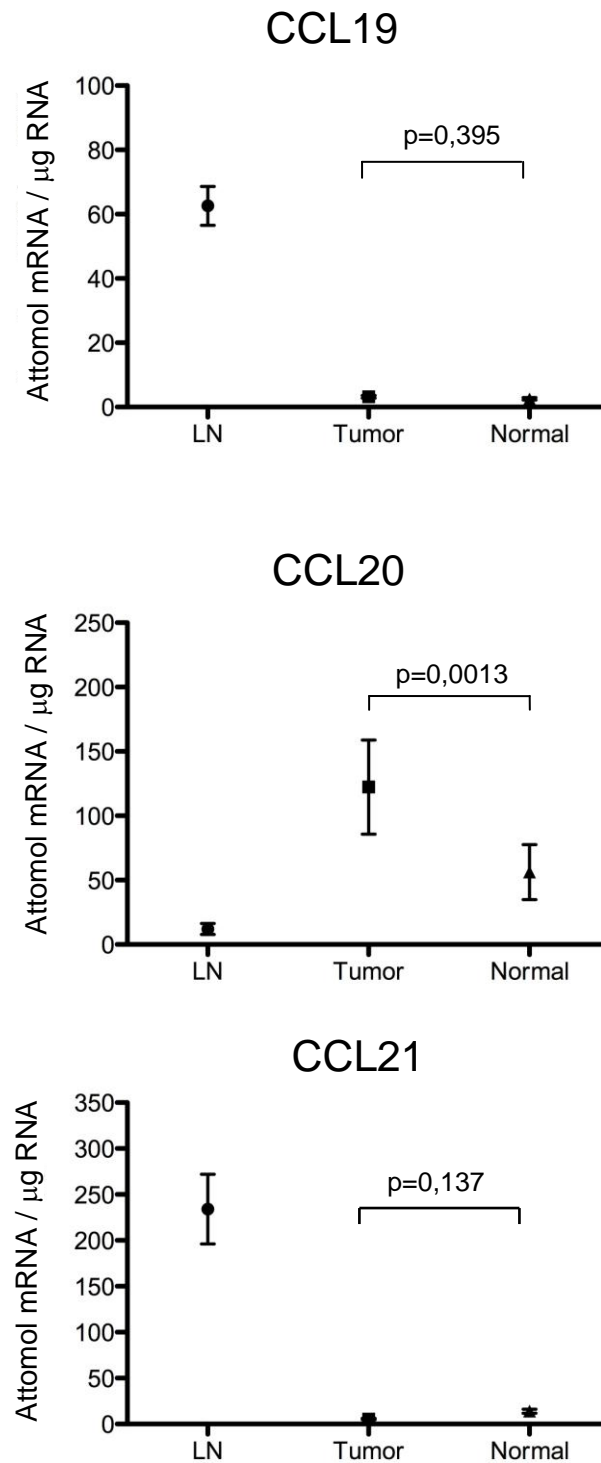


Abbildung 19: Real-time RT-PCR-Analyse für CCL19-, CCL20- und CCL21-mRNA im Tumorgewebe klarzelliger Nierenzellkarzinome und Normalgewebe: Die Untersuchung wurde an 10 Proben von Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom sowie korrespondierendem Normalgewebe durchgeführt. Als Kontrolle diente mRNA aus Lymphknotengewebe (LN). In der real-time RT-PCR zeigte das Tumorgewebe eine signifikant größere mRNA-Expression für CCL20 (Mitte) als das korrespondierende Normalgewebe ($p = 0,0013$). Keine signifikanten Unterschiede konnten hinsichtlich der Expression zwischen Tumorgewebe und Normalgewebe für CCL19 ($p = 0,395$; oben) und CCL21 ($p = 0,137$; unten) nachgewiesen werden (Middel et al. 2010).

3.6 Nachweis der Verteilung der Chemokine CCL19, CCL20 und CCL21 sowie der Chemokinrezeptoren CCR6 und CCR7 in Tumorproben von Nierenzellkarzinomen mittels Immunhistochemie und Doppelimmunfluoreszenzfärbungen

Anschließend wurde die Expression von CCL19, 20 und 21 mittels immunhistochemischer und Doppelimmunfluoreszenzuntersuchungen an Paraffinschnitten von Nierenzellkarzinomgewebe geprüft. Verwendet wurde auch hier nur Gewebe von Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom der unter 3.5 genannten Patienten. Die Ergebnisse zeigen eine wechselnd stark ausgeprägte Expression für CCL20 im Zytoplasma der Tumorzellen in allen untersuchten Fällen (Abbildung 20). Eine CCL20-Expression wurde darüber hinaus in tumorassoziierten Makrophagen nachgewiesen, wie Doppelimmunfluoreszenzuntersuchungen mit dem Monozyten-/Makrophagen-Marker CD68 zeigten. Eine schwache bis zum Teil auch moderate Immunreaktion konnte vereinzelt in den Tubuluszellen von normalem Nierengewebe gefunden werden.

Die immunhistochemischen Untersuchungen für CCL19 und 21 erbrachten keine positive Farbreaktion in epithelialen Zellen, seien es Tumorzellen oder normale Tubulusepithelien der Niere. Darüber hinaus zeigten auch tumorassoziierte Makrophagen oder andere Entzündungszellen keine Expression für CCL19 und 21. Im Gegensatz dazu kamen CCL19-exprimierende Zellen innerhalb der T-Zell-Cluster aus der Tumorrandzone zur Darstellung (Abbildung 21). Aus den Doppelimmunfluoreszenzuntersuchungen ergab sich, dass die CCL19-positiven Zellen reife myeloische dendritische Zellen mit einer Expression von CD83 waren (Abbildung 27). Darüber hinaus fanden sich CCL21-exprimierende Zellen mit teils dendritischer Morphologie innerhalb der T-Zell-Aggregate, welche oft in direktem Kontakt mit CD11c-positiven und CD83-positiven dendritischen Zellen nachweisbar waren. Diese CCL21-positiven Zellen innerhalb der T-Zell-Cluster waren jedoch negativ für Marker dendritischer Zellen (CD1a, CD11c und CD83) wie auch negativ für T-Zell-Marker (CD3)

und B-Zell-Marker (CD79a). Eine Expression der CCL21-positiven Zellen für den Makrophagen-Marker CD68 konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Allerdings zeigten die CCL21-positiven Zellen eine Expression von Vimentin, so dass bei Ausschluss einer myeloischen oder lymphatischen Herkunft die Ergebnisse in erster Linie dafür sprechen, dass es sich bei den CCL21-positiven Zellen um Stromazellen mit vermutlich fibroblastärer Herkunft handelt. Gleichartige CCL21-positive Zellen konnten auch im Parakortex von Lymphknoten nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigten zahlreiche peritumorale lymphatische Gefäße eine Expression von CCL21, wie dies in Doppelimmunfluoreszenzuntersuchungen mit dem Lymphgefäßmarker D2-40 nachgewiesen werden konnte (Abbildung 28). Diese CCL21-positiven Lymphgefäße fanden sich typischerweise in Nachbarschaft der Cluster aus dendritischen Zellen und T-Lymphozyten in der Tumorrandzone. Vereinzelt waren die Cluster auch innerhalb CCL21-positiver Lymphgefäße nachweisbar (Abbildung 22).

Zur Chemokin-Rezeptorexpression wurden ergänzende Untersuchungen mit Antikörpern gegen CCR6 und CCR7 durchgeführt. CCR6-positive Zellen mit dendritischer Morphologie fanden sich diffus im Bereich des Tumorbettes verstreut (Abbildung 23). Nur ganz vereinzelt fanden sich CCR6-positive unreife dendritische Zellen in Nachbarschaft der T-Zell-Cluster im Bereich der Tumorrandzone (Abbildung 24).

In Doppelimmunfluoreszenzuntersuchungen wiesen die CD1a-positiven unreifen dendritischen Zellen eine Koexpression von CCR6 auf (Abbildung 25), wohingegen keine Expression von CCR7 durch dendritische Zellen im Bereich der Tumoreale gefunden werden konnte. Eine schwache Expression von CCR6 konnte zum Teil in den Tumorzellen wie auch in Tubuluszellen des normalen Nierengewebes nachgewiesen werden. Des Weiteren wiesen zum Teil tumorassoziierte Makrophagen eine zytoplasmatische CCR6-Expression auf. Im Gegensatz dazu ergab sich eine Expression von CCR7 im Bereich der Aggregate aus T-Lymphozyten und dendritischen Zellen der Tumorrandzone (Abbildung 26). Innerhalb der

Cluster CCR7-positiver T-Zellen fanden sich CD83-positive dendritische Zellen mit Koexpression von CCR7 (Abbildung 29). Diese Zellen wiesen keine Expression von CCR6 auf. In den mitgeführten Negativkontrollen der Doppelimmunfluoreszenz waren jeweils keine Farbsignale nachweisbar (Abbildung 30).

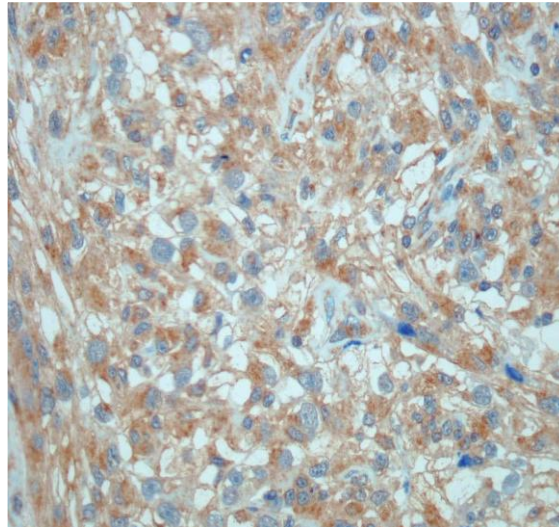


Abbildung 20: Immunhistochemie von Chemokinen und der Expression von Chemokin-Rezeptoren beim hier klarzelligen Nierenzellkarzinom (Middel et al. 2010): die Tumorzellen zeigen eine moderate zytoplasmatische Expression von CCL20 (400 x).

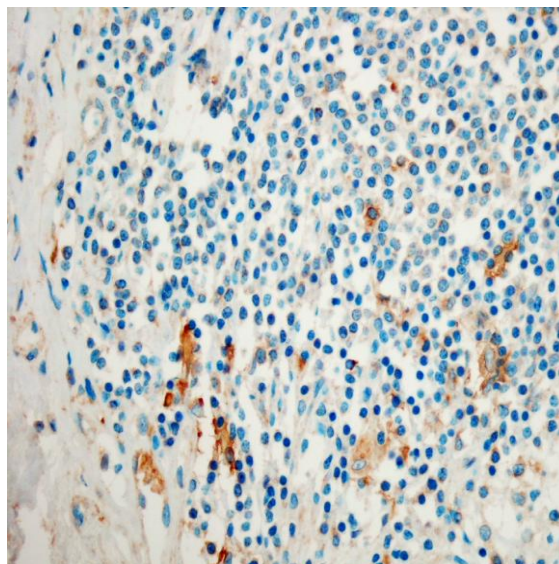


Abbildung 21: Eine Expression von CCL19 ist bei dendritischen Zellen innerhalb von Lymphozytenansammlungen der Tumorinfiltrationszone zu beobachten (IHC, 400 x).

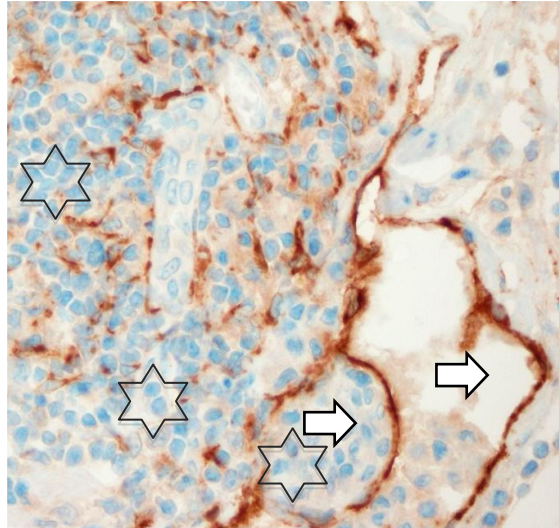


Abbildung 22: CCL21 wird von Lymphgefäßen (offene Pfeile) sowie zusätzlich durch Stromazellen (schwarze Pfeilspitzen) in der Junctionszone exprimiert. In Nachbarschaft der CCL21-positiven Stromazellen der Tumorrandszone finden sich Cluster aus lymphatischen Zellen (Sterne; IHC, 400 x; Middel et al. 2010).

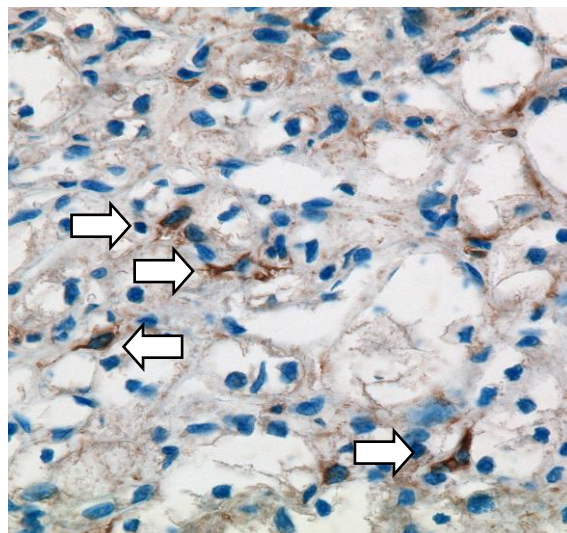


Abbildung 23: CCR6-positive Zellen mit dendritischer Morphologie sind willkürlich zwischen den hellzellig differenzierten Tumorzellen eines klarzelligen Nierenzellkarzinoms verteilt (Pfeile; IHC, 400 x; Middel et al. 2010).

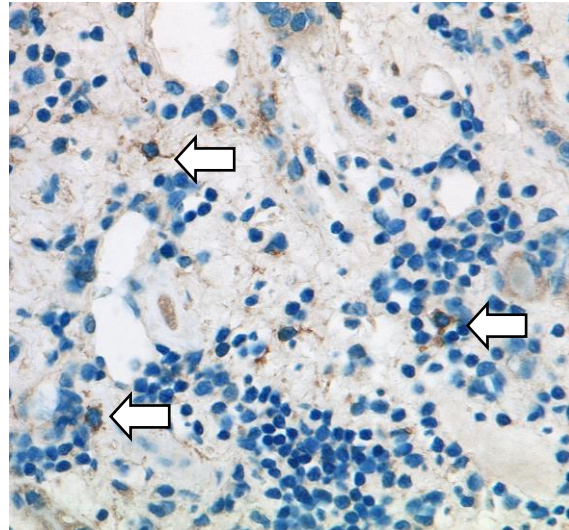


Abbildung 24: Einige CCR6-positive DC können innerhalb von Lymphozyteninfiltraten der Tumorrandzone beobachtet werden (offene Pfeile; IHC, 400 x; Middel et al. 2010).

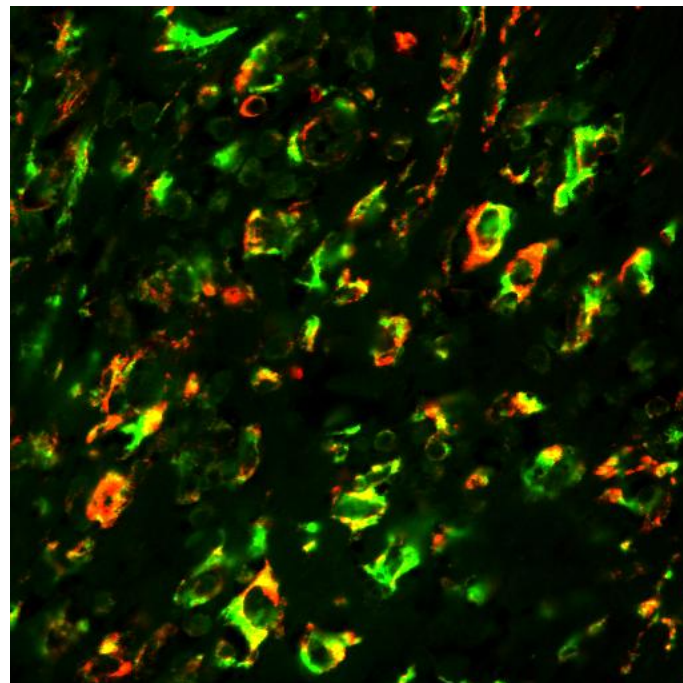


Abbildung 25: CCR6 (Cy3 = roter Farbstoff) wird von CD1a positiven unreifen DC (Cy2 = grüner Farbstoff) exprimiert (Doppelimmunfluoreszenz, 400 x). Koexpression auch hier durch Gelbfärbung auf Grund der Überlagerung der roten und grünen Fluoreszenzfärbung.

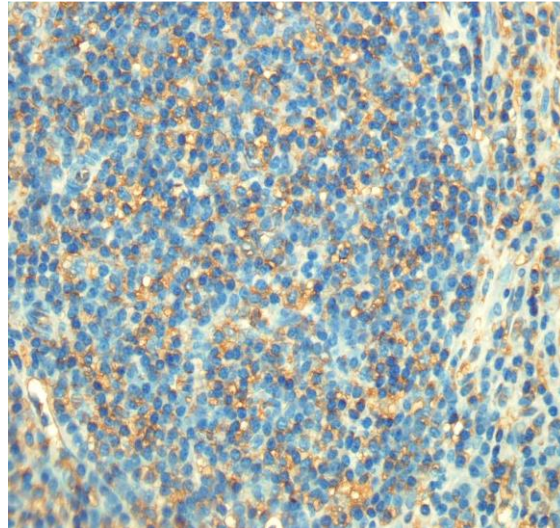


Abbildung 26: Zahlreiche CCR7-positive Zellen mit dendritischer Morphologie sind innerhalb der Lymphozyteninfiltrate zu finden (IHC, 400 x; Middel et al. 2010).

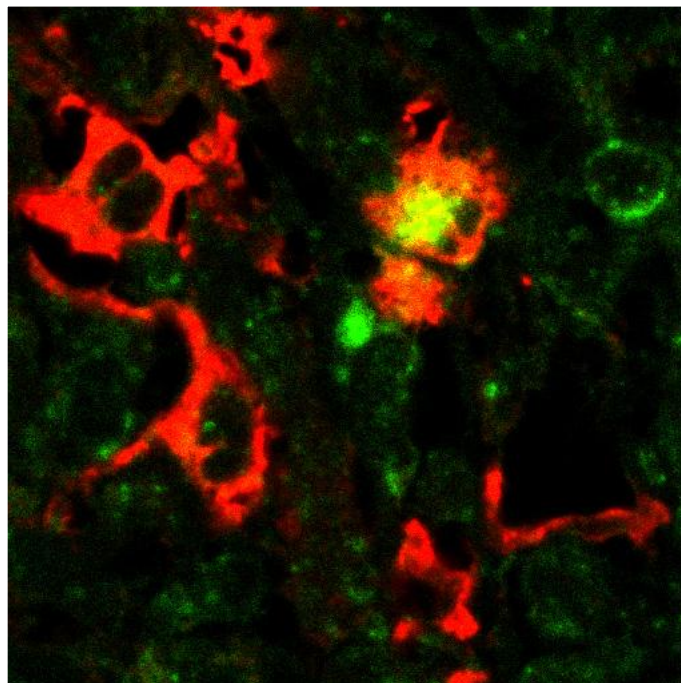


Abbildung 27: CCL19 (Cy2 = grüner Farbstoff) wird hier durch einzelne CD83-positive DC exprimiert (Cy3 = roter Farbstoff, 600 x). Die Koexpression wird durch ein gelbes Farbprodukt dargestellt (Middel et al. 2010).

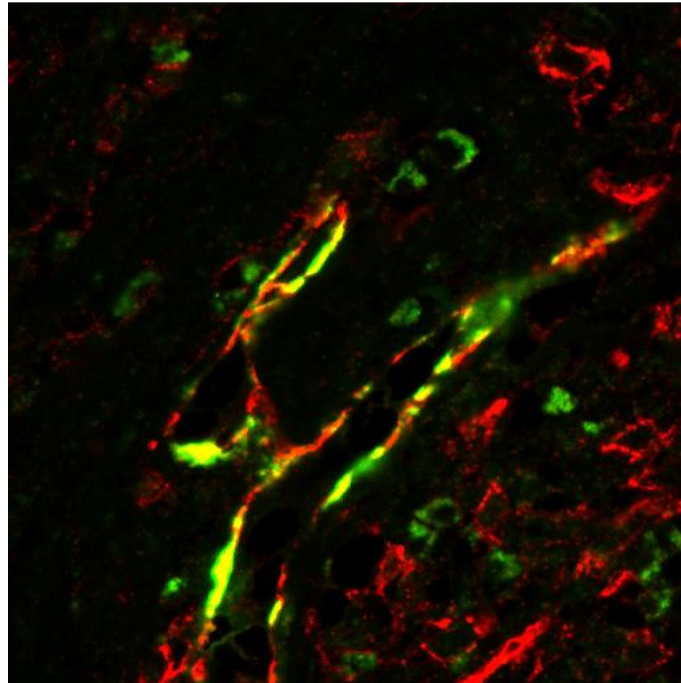


Abbildung 28: CCL21 (Cy3 = roter Farbstoff) wird von D2-40-positiven lymphatischen Endothelzellen (Cy2 = grüner Farbstoff, 400 x; Middel et al. 2010) exprimiert. Koexpression auch hier durch Gelbfärbung auf Grund der Überlagerung der roten und grünen Fluoreszenzfärbung.

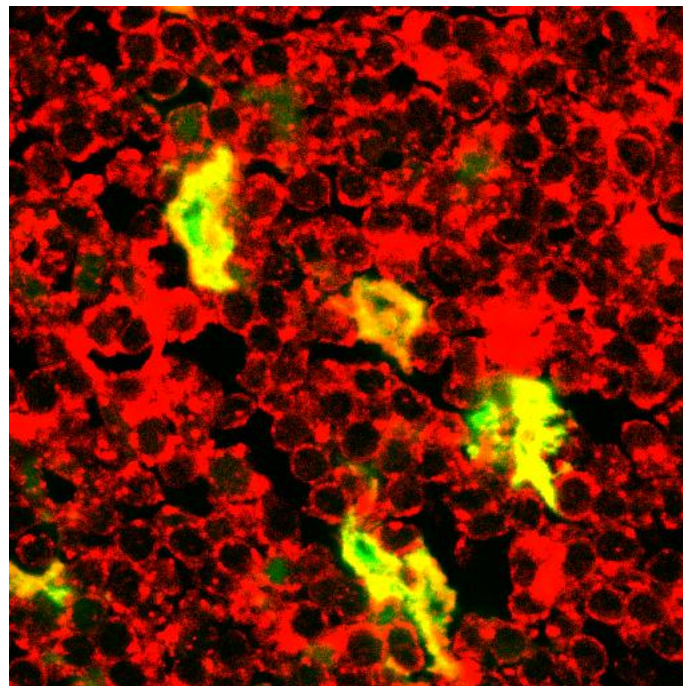


Abbildung 29: Innerhalb der lymphatischen Infiltrate der Tumorrandzone wird CCR7 (Cy3 = roter Farbstoff) von CD83-positiven reifen DC (Cy2 = grüner Farbstoff, 400 x; Middel et al. 2010) exprimiert (Gelbfärbung).

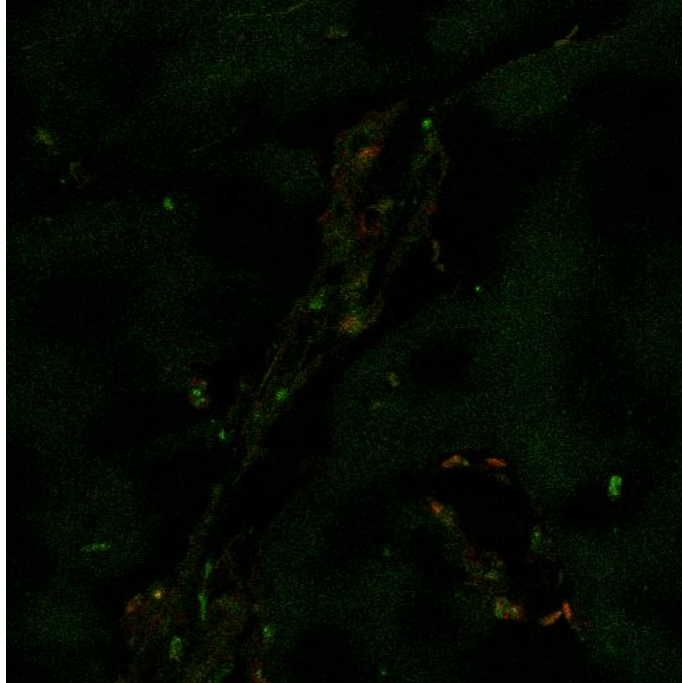


Abbildung 30: Negativkontrolle (Doppelimmunfluoreszenz, 400 x; Middel et al. 2010).

4 Diskussion

Die Inzidenz des Nierenzellkarzinoms ist in den letzten Jahren kontinuierlich gestiegen. Derzeit erkranken weltweit pro Jahr mehr als 200.000 Menschen an einem bösartigen Tumor der Nieren (Jocham und Miller 2007). Das Nierenzellkarzinom stellt insgesamt den dritthäufigsten bösartigen urologischen Tumor dar und macht etwa 2-3 % aller malignen Krebserkrankungen aus (Buti et al. 2013). Obwohl das Nierenzellkarzinom immer häufiger in frühen Tumorstadien entdeckt wird, so weisen doch ca. 25 % aller Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits eine fortgeschrittene Krebserkrankung mit Metastasen auf. Wie auch bei anderen bösartigen Tumoren ist die Prognose des metastasierten Nierenzellkarzinoms als ungünstig einzuschätzen, so dass die 5-Jahres-Überlebenschance bei nachgewiesener Metastasierung nur noch etwa 10 % beträgt. Diese schlechte Prognose ist vor allem auf die eingeschränkte Wirksamkeit der gängigen Chemo-, Hormon- und Strahlentherapien beim Nierenzellkarzinom zurückzuführen. Aufgrund dessen wurde schon frühzeitig nach alternativen Therapieoptionen, wie z. B. Immuntherapien, für das Nierenzellkarzinom gesucht. Insbesondere die Immuntherapie mit Zytokinen, wie Interleukin-2 und Interferon-alpha, gilt nach wie vor als adjuvante Standardtherapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms (Baldewijns et al. 2008, Buti et al. 2013).

Ein zunehmendes Verständnis der Immunabläufe bei malignen Tumoren führte zu der Hoffnung, besser wirksame Tumorimmuntherapien zu entwickeln. In diesem Zusammenhang konnte anhand zahlreicher Untersuchungen gezeigt werden, dass insbesondere die dendritischen Zellen des Immunsystems als aktive Immunregulatoren eine entscheidende therapeutische Zielstruktur in der immunologischen Krebstherapie darstellen können. Dendritische Zellen sind professionelle, antigenpräsentierende Zellen. Sie sind durch die Fähigkeit der effizienten Aufnahme, Prozessierung und Präsentation von Antigenen gekennzeichnet. Über die hohe Expression von MHC-Peptid-Komplexen und anderer

kostimulatorischer Moleküle auf deren großer Oberfläche können dendritische Zellen effektiv eine T-Zell-Immunantwort durch die Aktivierung naiver CD4-positiver und CD8-positiver T-Lymphozyten induzieren (Banchereau et al. 2000, Lee und Iwasaki 2007, Ueno et al. 2007). Dendritische Zellen entwickeln sich aus den hämatopoetischen Vorläuferzellen des Knochenmarks und wandern nachfolgend in die peripheren Organe ein, wo sie mit Fremd- oder auch Tumorantigenen in Kontakt kommen. In der Regel befinden sich die dendritischen Zellen in den peripheren Organen in einem unreifen Zustand, in welchem sie jedoch durch die Fähigkeit gekennzeichnet sind, Antigene optimal zu erkennen und in großer Menge aufzunehmen. Unter dem Einfluss von zusätzlichen Aktivatoren wie proinflammatorischen Zytokinen erfolgt die Ausreifung der dendritischen Zellen. Anschließend vollziehen sie eine Wanderung (Migration) in die regionären Lymphknoten, wo die jetzt fertig ausgereiften dendritischen Zellen in der Lage sind, unreife naive T-Lymphozyten zu stimulieren und zu aktivieren (Brode und Macary 2004, Angeli und Randolph 2006, Macagno et al. 2002, Sabatté et al. 2007). Im Rahmen dieser Aktivierung setzen die reifen dendritischen Zellen Zytokine frei und ermöglichen die anschließende Ausreifung und Expansion von CD8-positiven zytotoxischen T-Lymphozyten und CD4-positiven T-Helferzellen (Van der Merwe und Davis 2003).

Diese Mechanismen gelten nicht nur für die Entzündungsreaktion, sondern auch für die immunologischen Abläufe in der Tumorummunreaktion. Für eine Vielzahl maligner Tumoren konnte gezeigt werden, dass im Rahmen der antitumoralen Immunreaktion reife dendritische Zellen die Ausbildung von gegen den Tumor gerichteten TH-1-Zellen fördern. TH-1-Zellen fördern hierbei zusätzlich die Aktivierung von CD8-positiven zytotoxischen T-Lymphozyten durch die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin-2, was wiederum die Verstärkung einer Antigenpräsentation durch reife dendritische Zellen stimuliert. CD4-positive TH-1-Zellen und CD8-positive zytotoxische T-Lymphozyten steigern nach Aktivierung durch dendritische Zellen darüber hinaus durch Induktion einer

entzündungsfördernden Immunantwort und direkte Zytolyse die Elimination von Tumorzellen (Boyman et al. 2007, Sato und Fujita 2007).

Die Fähigkeit dendritischer Zellen zur Stimulation einer antitumoralen T-Zell-vermittelten Immunantwort prädestiniert dendritische Zellen somit als wichtigen Ansatzpunkt für die Immuntherapie von Tumoren, da sie eine zentrale Rolle in der Induktion der T-Zellimmunantwort spielen. Untersuchungen anhand verschiedener Mausmodelle konnten zeigen, dass Vakzinierungsstrategien mit Verwendung dendritischer Zellen sowohl die Ausbildung von Tumoren im Xenograft-Modell verhindern können, als auch zur Regression existenter Tumoren in diesen Modellen führen (Zitvogel et al. 1996, Banchereau und Palucka 2005). Anhand inzwischen zahlreicher klinischer Studien konnte ferner für den Menschen gezeigt werden, dass z. B. mit Tumorzellysat oder Tumorpeptid beladene dendritische Zellen zur Induktion tumorspezifischer T-Lymphozyten führen und klinisch eine Tumorregression hervorrufen können (Nestle et al. 1998, Thurner et al. 1999).

Der Ablauf einer effektiven Antitumorimmunreaktion hängt, wie oben bereits angedeutet, ganz wesentlich von der geordneten Interaktion der beteiligten Immunzellen ab. Nur wenn die entsprechenden Immunzellen am richtigen Ort miteinander in Kontakt treten, kann eine erfolgreiche Immunreaktion ablaufen. In diesem Zusammenhang spielt die Expression von Chemokinen und deren Rezeptoren auf den beteiligten Zelltypen eine entscheidende Rolle; dies speziell auch bei der Migration und Rekrutierung antigenpräsentierender Zellen sowie von T-Lymphozyten (Franciszkiwicz et al. 2012). Unreife dendritische Zellen unterliegen hierbei in erster Linie dem Einfluss sogenannter inflammatorischer Chemokine (insbesondere CCL1, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7 und CCL20), welche dazu führen, dass diese naiven, unreifen dendritischen Zellen durch die Expression verschiedener Chemokinrezeptoren auf ihrer Zelloberfläche (wie z.B. CCR1, CCR2, CCR5 und CCR6) an den Ort der Entzündung oder eines Gewebeschadens sowie in das Tumorgewebe einwandern. Nach Antigenkontakt kommt es zur Hochregulation von für die T-Zellaktivierung wichtigen kostimulatorischen

Molekülen durch die dendritischen Zellen und sie differenzieren wie beschrieben auch Chemokin-vermittelt zu aktivierten reifen dendritischen Zellen aus.

Dieser Reifungsprozess geht mit einer Herabregulation der oben genannten Chemokinrezeptoren einher, wohingegen andere Rezeptoren wie insbesondere der Rezeptor CCR7 jetzt hochreguliert werden (Dell'Agnola und Biragyn 2007, McColl 2002). Als Liganden für CCR7 fungieren CCL19 und CCL21, welche überwiegend durch mesenchymale Stromazellen in den T-Zellzonen der sekundären lymphatischen Organe produziert werden. Somit führt die Expression von CCR7 auf reifen dendritischen Zellen zu einer Förderung der Migration in die sekundären lymphatischen Organe, wo diese Zellen prozessierte Antigene, wie Tumorantigene, den ebenfalls CCR7-exprimierenden T-Lymphozyten präsentieren (Dell'Agnola und Biragyn 2007, McColl 2002, Sallusto et al. 1999).

Die Entwicklung zytotoxischer T-Lymphozyten bedarf eines effektiven "Priming" durch reife dendritische Zellen, welche jedoch wiederum selbst einer Aktivierung durch CD4-positive T-Helferzellen bedürfen (Smith et al. 2004). Innerhalb des lymphatischen Gewebes kommt es Chemokin-vermittelt zu einem kontinuierlichen Kontakt naiver CD8-positiver T-Lymphozyten und CD4-positiver T-Zellen, welche ebenso wie die reifen dendritischen Zellen CCR7 exprimieren. CCR7-vermittelt wird das "Absuchen" der Oberfläche der dendritischen Zellen durch die naiven T-Zellen in den sekundären Organen nach Antigenen im Rahmen dieses engen Kontaktes dieser Zellpopulationen gefördert (Kaiser et al. 2005). In dieser Interaktion von CD4- und CD8-positiven naiven T-Zellen sowie reifen dendritischen Zellen spielen neben den genannten jedoch auch weitere Chemokine eine bedeutende Rolle. So führt die Expression von CCL3 und CCL4 durch dendritische Zellen innerhalb der Lymphknoten zu einer Rekrutierung von CD8-positiven T-Zellen, welche den Liganden CCR5 auf der Oberfläche aufweisen, sodass letztere verbessert mit den CD4-positiven T-Zellen und den reifen dendritischen Zellen in Interaktion treten können, was wiederum die nachfolgende Entwicklung von CD8-positiven Memory-T-Zellen fördert (Castellino et al. 2006, Hugues et

al. 2007). Eine gleichartige Funktion besitzt die CCL19-Expression durch reife dendritische Zellen in der Antigenpräsentation (Kaiser et al. 2005).

Nach dieser initialen Phase des sogenannten "T-Zell-Priming" erfolgt ein Wechsel der Chemokinrezeptor-Expression auf den T-Lymphozyten, sodass diese in der Lage sind, die sekundären lymphatischen Organe zu verlassen und in das entsprechende Zielgewebe einwandern zu können, um ihrer Effektorfunktion nachzukommen. Hierbei zeigen die spezifisch aktivierten T-Lymphozyten eine Herabregulation von CCR7 und eine Hochregulation anderer Chemokinrezeptoren wie CCR1, CCR2, CCR3, CCR5 und CXCR3 (Franciszkiewicz et al. 2012, Moser und Loetscher 2001).

Trotz dieser äußerst komplexen Wirkmechanismen der Chemokine mit einer Vielzahl überlappender Liganden und Funktionen, stellen die Chemokine attraktive Zielstrukturen für Immuntherapien bei malignen Tumoren dar. Unterschiedliche Ansätze Chemokin-basierter Antitumorimmuntherapien wurden in den letzten Jahren überwiegend im Tiermodell untersucht. Eine grundsätzliche Herausforderung bei derartigen Therapien, welche die Manipulation von Chemokinen beinhalten, ist jedoch, dass Chemokine insbesondere wegen dieser häufig redundanten Funktionen nicht nur Einfluss auf die Interaktion von Immunzellen besitzen, sondern insbesondere auch deren Rolle in der Förderung sowohl der Tumormetastasierung als auch der Tumorangiogenese und des Tumorwachstums (Lechner et al. 2011).

Ziel der in dieser Arbeit vorgelegten Untersuchungen war es, die Verteilung der verschiedenen Subtypen myeloischer dendritischer Zellen bei Patienten mit verschiedenen Subtypen von Nierenzellkarzinomen zu untersuchen. Hierbei wurde das Augenmerk auf das Tumorgewebe selbst, das gesunde angrenzende Nierengewebe sowie die sogenannte Infiltrationszone, d. h. den Übergang zwischen Tumorgewebe und Normalgewebe, gelegt. Die initial durchgeführten immunhistochemischen Analysen mit einem Antikörper gegen das S100-Protein wiesen die höchste Anzahl S100-positiver Zellen in der Infiltrationszone nach.

Allerdings kamen zu viele S100-positive Zellen zur Darstellung, da es sich bei den markierten Zellen nicht nur um antigenpräsentierende Zellen, sondern auch andere Zellpopulationen, wie z. B. Makrophagen, handelte.

Nachfolgende immunhistochemische Analysen mit einem Antikörper gegen Fascin, welches ebenfalls die verschiedenen Populationen dendritischer Zellen darstellt, erwiesen sich als nicht sinnvoll, da in einer Vielzahl der Fälle mit Nierenzellkarzinomen eine kräftige zytoplasmatische Färbung für Fascin im Zytoplasma der Tumorzellen auftrat. Färbungen mit einem Antikörper gegen CD11c zeigten ebenfalls keinen zusätzlichen Nutzen, da sich hier zahlreiche Makrophagen positiv darstellten, sodass mit diesem Marker eine absolute Quantifizierung der dendritischen Zellen im Untersuchungsmaterial gleichfalls nicht zuverlässig möglich war.

Aufgrund dessen wurde in der weiteren Planung das Augenmerk darauf gelegt, die entsprechenden Subpopulationen reifer und unreifer dendritischer Zellen in den Tumorproben direkt zu analysieren. Als sehr brauchbarer Marker erwies sich zum Nachweis der unreifen dendritischen Zellen das Antigen CD1a, was daraufhin immunhistochemisch an den Gewebeproben der Tumoren untersucht wurde. Es zeigte sich, dass insbesondere im Tumorgewebe selbst eine große Anzahl CD1a-positiver unreifer dendritischer Zellen nachweisbar war, während die Zahl CD1a-positiver Zellen im Bereich der Infiltrationszone und im Normalgewebe deutlich geringer war. Anhand von Doppelimmunfluoreszenzuntersuchungen konnte nachfolgend gezeigt werden, dass die CD1a-positiven unreifen dendritischen Zellen eine Koexpression für Langerin aufwiesen, welches ebenfalls ein Differenzierungsmarker für unreife dendritische Zellen ist und somit den Befund der "Unreife" der dendritischen Zellen im Tumorgewebe unterstützte.

Bei den Untersuchungen mit dem Reifemarker CD83 zeigte sich ein anderes Verteilungsmuster dendritischer Zellen in den Tumorproben. Hierbei fiel uns auf, dass insbesondere im Bereich der Infiltrationszone des Tumorrandes zahlreiche CD83-positive

dendritische Zellen nachweisbar waren, während im normalen Nierengewebe und im Tumorgewebe selbst eine deutlich geringere Anzahl zur Darstellung kam. In vielen Fällen fanden sich sowohl im Tumorgewebe als auch im normalen Nierengewebe nur einzelne, isoliert liegende CD83-positive reife dendritische Zellen, welche keinen Bezug zu Lymphozyten oder lymphatischen Aggregaten aufwiesen. Dass es sich um ausgereifte funktionsfähige antigenpräsentierende Zellen mit ausgeprägter T-Zell-stimulatorischer Aktivität handelt, zeigen die zusätzlich erhobenen Befunde der Doppelimmunfluoreszenzanalysen mit weiteren reifungsassoziierten Markern wie DC-LAMP, CD40 und RelB. Ferner stützt die Beobachtung, dass die CD83-positiven reifen dendritischen Zellen in unmittelbarer Nachbarschaft von proliferierenden T-Lymphozyten nachweisbar sind, die T-Zell-stimulatorische Funktion. Unterschiedliche Befunde hinsichtlich der Verteilung unreifer und reifer dendritischer Zellen zwischen den einzelnen Subtypen des Nierenzellkarzinoms konnten nicht gefunden werden. Lymphoide Infiltrate fanden sich bevorzugt peritumoral bei allen Gruppen ohne erkennbare Unterschiede in Verteilung und Dichte der Infiltrate, wobei die peritumorale Zone bei den zwei untersuchten Fällen des sarkomatoiden Subtyps auf Grund des häufig unscharfen Tumorrandes, respektive diffuser Infiltrationszone, ohne abgrenzbare Tumor-Pseudokapsel nur eingeschränkt beurteilbar war.

Um nähere Einblicke in die Mechanismen der durch uns aufgezeigten räumlichen Verteilungsmuster reifer und unreifer dendritischer Zellen beim Nierenzellkarzinom zu erhalten, wurden weitere Untersuchungen zum Nachweis von Chemokinen und deren Rezeptoren, welche typischerweise eine besondere Bedeutung für die Rekrutierung unreifer und reifer dendritischer Zellen besitzen, durchgeführt. Diese Untersuchungen wurden, im Gegensatz zu den oben dargelegten, zur Verteilung dendritischer Zellen an Tumorproben von 10 Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom durchgeführt.

Von besonderer Bedeutung für die Rekrutierung unreifer dendritischer Zellen ist hierbei in erster Linie die Expression von CCL20, welches über seinen Liganden CCR6 chemotaktisch

auf unreife dendritische Zellen wirkt. Anhand von Koexpressionsuntersuchungen mittels Doppelimmunfluoreszenz zeigte sich eine Expression von CCR6 durch CD1a-positive unreife dendritische Zellen im Tumorgewebe, was somit nahe legt, dass im Tumorgewebe auch eine ausreichende Expression des Liganden CCL20 vorkommt.

Die daraufhin durchgeführten immunhistochemischen Analysen für CCL20 bestätigten diese Hypothese und die Ergebnisse zeigen, dass insbesondere die Tumorzellen des klarzelliges Nierenzellkarzinoms eine kräftige Positivität für CCL20 aufweisen. Dieser Befund einer spezifischen Expression für CCL20 durch die Tumorzellen wurde mittels RT-PCR an mRNA von verschiedenen Tumorzelllinien sowie auch anhand von mRNA aus Tumorgewebe und Normalgewebe bestätigt. Interessanterweise zeigte das peritumorale Normalgewebe der Niere eine deutlich geringere CCL20-Expression, was mit dem Befund einer niedrigeren Anzahl CD1a-/CCR6-koexprimierender unreifer dendritischer Zellen an diesem Ort einhergeht.

Hinsichtlich der Rekrutierung reifer dendritischer Zellen erfolgten zusätzliche Untersuchungen zum Nachweis von CCL19 und CCL21 sowie deren Liganden CCR7. In den zuerst angefertigten immunhistochemischen Untersuchungen zeigte sich, dass sowohl CCL19 als auch CCL21 nicht durch Tumorzellen produziert werden. Diese Färbungen wiesen ferner, bestätigt durch ergänzende Doppelimmunfluoreszenzanalysen, auf eine Produktion von CCL19 durch Stromazellen sowie reife dendritische Zellen selbst hin. CCL21 kam ebenfalls in Stromazellen und zusätzlich auch Lymphgefäßendothelien zur Darstellung, nicht jedoch in dendritischen Zellen oder Lymphozyten. Die nachbarschaftlich der CCL19- und CCL21-positiven Zellen gelegenen CD83-positiven dendritischen Zellen zeigten, ebenso wie die auch hier lokalisierten T-Lymphozyten der lymphatischen Aggregate der Tumorrandozone, eine Expression von CCR7. Diese Ergebnisse legen nahe, dass im Bereich der Tumorrandozone ein Chemokin-Milieu herrscht, welches dem der sekundären lymphatischen Organe gleicht und somit die Rekrutierung reifer dendritischer Zellen fördert. Hierdurch entstehen vor Ort, in Nachbarschaft des Tumors, Bedingungen, welche zur Ausbildung von lymphatischen

Aggregaten aus reifen dendritischen Zellen und T-Zellen führen und sehr wahrscheinlich einer lokalen, gegen den Tumor gerichteten Immunreaktion entsprechen.

Dass dieses Szenario höchstwahrscheinlich korrekt ist, zeigt eine Reihe von Studien, welche die Infiltration von Tumoren durch dendritische Zellen bei unterschiedlichen Tumorentitäten näher untersucht haben und Rückschlüsse auf die Prognose gezogen haben. Es konnte im Rahmen dieser Studien gezeigt werden, dass eine dichte Infiltration bzw. große Anzahl dendritischer Zellen im Tumorgewebe z. B. mit einem verlängerten Überleben sowie einer verringerten Inzidenz von Metastasen beim Kolonkarzinom, Magenkarzinom, Ösophaguskarzinom sowie Bronchialkarzinom einhergeht (Inoshima et al. 2002, Ishigami et al. 2003, Reichert et al. 2001). Für das Mammakarzinom konnte gezeigt werden, dass die Zahl CD83-positiver reifer dendritischer Zellen, jedoch nicht die Zahl CD1a-positiver unreifer dendritischer Zellen, eine bedeutende prognostische Relevanz besitzt (Iwamoto et al. 2003). Darüber hinaus konnte für weitere Tumorentitäten gezeigt werden, dass z. B. die Regression primärer kutaner Melanome mit der vermehrten Anzahl von Langerhans-Zellen korreliert war, welche dem Immunphänotyp unreifer dendritischer Zellen entsprechen (Nestor et al. 1987). Diese Befunde konnten später bei weiteren soliden Tumoren bestätigt werden. So zeigte sich anhand von immunhistochemischen Analysen, dass die Anzahl S100- und HLA-DR-positiver dendritischer Zellen bei einer ganzen Reihe von Tumoren negativ mit dem klinischen Stadium und der Lymphknotenmetastasierung korreliert. Bei Untersuchungen zum Endometriumkarzinom fiel auf, dass die Infiltration dendritischer Zellen im Tumorgewebe mit einer verzögerten Tumorprogression und verminderten Lymphknotenmetastasierung einhergeht (Lijun et al. 2012). Gleichartige Befunde konnten für das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle aufgezeigt werden (Reichert et al. 2001). Hier wurde nachgewiesen, dass eine geringe Zahl S100-positiver intratumoraler dendritischer Zellen eine prädiktive Aussage für ein schlechtes Tumorüberleben darstellt, während sich für die Lymphknotenmetastasierung oder auch das Tumorstadium keine Korrelation hinsichtlich der Infiltration mit dendritischen

Zellen für diese Tumormanifestation ergab. Im Detail zeigte sich in dieser Studie, dass eine deutlich vermehrte Anzahl S100-positiver intratumoraler dendritischer Zellen einen signifikanten prognostischen Faktor darstellt, welcher als unabhängiger prädiktiver Parameter sowohl für das Gesamtüberleben, das krankheitsfreie Überleben sowie die Zeit zur Krankheitsprogression bei oralen Plattenepithelkarzinomen gewertet werden kann (Reichert et al. 2001). Generell lässt sich anhand dieser Studien ableiten, dass in der Mehrzahl solider Tumoren eine vermehrte Anzahl intratumoraler dendritischer Zellen in erster Linie in gut differenzierten und weniger invasiven Tumoren nachweisbar ist, was mit einer besseren Prognose der Tumorerkrankung einhergeht (Ma et al. 2013). Diese Beobachtung stützt darüber hinaus das Konzept der bereits weiter oben dargestellten bedeutenden Rolle von dendritischen Zellen in der Tumorummunabwehr. Ob hierbei jedoch in diesem Prozess grundsätzlich eine Aktivierung der antitumoralen T-Zellen in den sekundären lymphatischen Organen notwendig ist, ist jedoch nach neueren Untersuchungen wie auch anhand der hier dargestellten Ergebnisse am Nierenzellkarzinom unklar. So konnte gezeigt werden, dass naive T-Lymphozyten durchaus in der Lage sind, unter bestimmten Bedingungen direkt in den Tumor einzuwandern (Ma et al. 2013).

Anhand von Studien am Tumormodell der Maus konnte gezeigt werden, dass es unter der vermehrten Expression von Lymphotoxin-alpha im Melanom-Xenograft-Modell zur vermehrten Ausbildung tertiärer lymphoider Strukturen kommt, welche mit einer klonalen Expansion von T-Zellen einhergeht. Diese Ergebnisse legen nahe, dass das T-Zell-Priming primär im Tumor erfolgt und nicht erst einer Aktivierung der T-Zellen im sekundären lymphatischen Gewebe bedarf (Schrama et al. 2001). Dieses Konzept der Rekrutierung naiver T-Zellen konnte darüber hinaus in Untersuchungen anderer muriner Tumoren aufgezeigt werden, wobei hier sogar in Abwesenheit entzündlicher Faktoren eine Proliferation und Differenzierung der T-Lymphozyten nachgewiesen werden konnte. Dabei ist offenbar auch hier die Interaktion der T-Zellen mit lokalen, in Nachbarschaft des Tumors ausgereiften

dendritischen Zellen von Nöten (Thompson et al. 2010).

Diese Ergebnisse werden zusätzlich durch immunhistochemische Analysen an Tumorgewebe gestützt. So konnte bei Studien am nicht kleinzelligen Bronchialkarzinom gezeigt werden, dass die Anwesenheit peritumoraler tertiärer lymphoider Strukturen prognostische Relevanz bei dieser Tumorerkrankung besitzt (Dieu-Nosjean et al. 2008). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Dichte bzw. Anzahl reifer dendritischer Zellen statistisch signifikant positiv mit einer guten Prognose der Patienten korreliert. Immunhistochemisch konnte des Weiteren gezeigt werden, dass die Dichte tumorinfiltrierender Lymphozyten, speziell CD4-positiver TH1-Lymphozyten, in den Tumoren vermindert war, welche lediglich eine geringe Infiltration reifer dendritischer Zellen aufwies. Die Autoren schließen somit aus ihren Ergebnissen, dass anhand der Zahl tumorinfiltrierender reifer dendritischer Zellen solche Patienten identifiziert werden können, welche im Frühstadium des nicht kleinzelligen Bronchialkarzinoms ein hohes oder im Umkehrschluss geringes Risiko eines Tumorrezidivs aufweisen (Dieu-Nosjean et al. 2008).

Diese Hypothese, dass der Reifung dendritischer Zellen eine besondere Bedeutung hinsichtlich der Prognose bei Tumorerkrankungen zukommt, wird durch weitere Untersuchungen gestützt. In immunhistochemischen Untersuchungen zur Dichte und Verteilung CD1a-positiver unreifer dendritischer Zellen sowie reifer DC-LAMP-positiver dendritischer Zellen beim malignen Melanom konnte analog zu den hier dargestellten Ergebnissen gezeigt werden, dass sich CD1a-positive unreife dendritische Zellen sowohl im Tumorgewebe als auch im umgebenden Stroma befanden, während reife DC-LAMP-positive dendritische Zellen nur in der peritumoralen Zone nachgewiesen werden konnten. Wie in unseren Untersuchungen befanden sich diese reifen dendritischen Zellen ebenfalls innerhalb von T-Zellproliferaten (Ladányi et al. 2007). Der Grad der Infiltration durch sowohl CD1a-positive unreife wie auch DC-LAMP-positive reife dendritische Zellen zeigte in dieser Studie eine signifikante negative Korrelation mit der Dicke der Melanome. Eine hohe peritumorale

Zahl reifer dendritischer Zellen korrelierte dabei eindeutig mit einem besseren Gesamtüberleben, während die Zahl CD1a-positiver unreifer dendritischer Zellen keine prognostische Signifikanz besaß (Ladányi et al. 2007). Die Autoren interpretieren die Ergebnisse dahin gehend, dass die Anwesenheit CD1a-positiver dendritischer Zellen in erster Linie von der Dicke der Melanome abhängt, ihre Zahl jedoch keine direkte Beziehung zum Patientenüberleben aufweist. Andererseits besitzen die Dichte sowie vermehrte Zahl reifer dendritischer Zellen, insbesondere wenn diese in Assoziation mit aktivierten T-Zellen nachweisbar sind, eine prognostische Signifikanz beim malignen Melanom.

In Arbeiten zum Nierenzellkarzinom konnte gezeigt werden, dass es nach Zytokinvorbehandlung mit Interleukin-2 und Interferon-alpha zu einer Zunahme reifer CD83-positiver dendritischer Zellen kommt (Verra et al. 2005). Zwar konnte im Rahmen dieser Untersuchung auch nachgewiesen werden, dass es zu einer Zunahme CD8-positiver T-Zellen sowie tumorassoziierter Makrophagen kommt, jedoch konnte lediglich im Bezug auf eine vermehrte Infiltration durch reife dendritische Zellen eine statistisch signifikant bessere Prognose abgeleitet werden. Es wird von den Autoren postuliert, dass eine vermehrte Zahl CD83-positiver reifer dendritischer Zellen mit einer gesteigerten Antitumorimmunreaktion einhergeht und dieser Befund somit einen prädiktiven Faktor für die Prognose von Patienten mit Nierenzellkarzinom darstellt (Kobayashi et al. 2007).

Zusammenfassend zeigen also die oben dargestellten Ergebnisse verschiedener Studien an Tumorgewebe, dass wohl die Anwesenheit tumorinfiltrierender dendritischer Zellen, hier insbesondere eine gesteigerte Zahl reifer dendritischer Zellen, mit einer besseren Prognose von Patienten mit malignen Tumoren korreliert.

Die Ergebnisse aus der Literatur sowie unsere Untersuchungsergebnisse zeigen somit, dass verschiedene Ereignisse Einfluss auf die koordinierte Rekrutierung von Immunzellen bei Tumorerkrankungen haben. Diese Einflüsse beziehen sich auf die Aktivierung,

Differenzierung und Migration der Immunzellen. Darüber hinaus zeigt die gegenwärtige Literatur, dass verschiedene Subtypen dendritischer Zellen, seien es reife oder unreife, eine wichtige Rolle in der Induktion einer Antitumorimmunreaktion spielen. Die hier zusätzlich vorgelegten Beobachtungen legen nahe, dass beim Nierenzellkarzinom, wie bei anderen Tumorentitäten auch, eine lokale, gegen den Tumor gerichtete Immunreaktion stattfindet, welche möglicherweise prognostische Relevanz besitzt. In diesem Kontext würde postuliert, dass eine verminderte Zahl dendritischer Zellen, speziell wohl reifer dendritischer Zellen, mit einer verminderten Zahl aktivierter, gegen den Tumor gerichteter T-Zellen einhergeht, was eine Prognose zur Verschlechterung bedeuten könnte. Im Gegensatz hierzu würde eine große Anzahl reifer dendritischer Zellen mit Nachweis aktivierter T-Zellen unter Ausbildung sogenannter tertiärer lymphatischer Aggregate im Bereich des Tumors auf einen günstigen Krankheitsverlauf hindeuten.

Zusammenfassend beweisen die hier vorgelegten Beobachtungen, dass es über eine Chemokin-vermittelte Regulation zu einer klaren Verteilung reifer und unreifer dendritischer Zellen bei Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom kommt. Der Nachweis aktivierter T-Lymphozyten in Nachbarschaft des Tumorgewebes, welche mit reifen antigenpräsentierenden Zellen in Kontakt stehen, legt nahe, dass es sich auch hier um einen funktionell relevanten Befund handelt. Allerdings erlaubt die geringe Anzahl der in dieser Studie untersuchten Tumorproben keine weitreichenderen Aussagen hinsichtlich einer prognostischen Bedeutung der Tumordinfiltration durch dendritische Zellen oder zur Relevanz des Ausmaßes einer peritumoralen T-Zellinfiltration bei Patienten mit Nierenzellkarzinom. Hinsichtlich der prognostischen Relevanz müsste eine größere Anzahl von Proben in prospektiven oder retrospektiven Studien untersucht werden.

Somit sind weitere Untersuchungen über die funktionellen Zusammenhänge von Interaktion und Rekrutierung dendritischer Zellen notwendig, um die Abläufe der Entwicklung und Funktion des Tumor-assoziierten lymphatischen Infiltrates sowie die an diesem Prozess

beteiligten chemotaktischen Faktoren in Verbindung mit dem Nierenzellkarzinom besser zu verstehen. Ziel weiterer Forschungsarbeiten muss es sein, eine verbesserte Effektivität von Immuntherapien bei dieser Tumorentität, aber auch anderen Tumorarten, zu erreichen.

5 Zusammenfassung

Mit der vorliegenden Arbeit wurde an Präparaten mit Nierenzellkarzinomen von 24 Patienten untersucht, auf welche Art und Weise die verschiedenen bekannten Subtypen dendritischer Zellen als antigenpräsentierende Zellen in die zelluläre Immunantwort bei dieser Tumorentität eingebunden sind. Dazu wurden die entsprechenden Zellen charakterisiert und chemotaktische Faktoren identifiziert, die zur Rekrutierung der verschiedenen dendritischen Zellpopulationen beitragen. Die gewonnenen Erkenntnisse sind von großer Bedeutung für die Entwicklung einer spezifischen Antitumortherapie mit Hilfe modifizierter dendritischer Zellen. Unsere Ergebnisse zeigen, dass Tumorzellen des klarzelliges Nierenzellkarzinoms eine Expression von CCL20 aufweisen, dessen Rezeptor CCR6 auf CD1a-positiven unreifen dendritischen Zellen exprimiert wird, was hierüber zu einer gesteigerten Akkumulation unreifer DC im Tumorbett führt.

Das Chemokin CCL19 wird von reifen myeloischen DC innerhalb der T-Zellinfiltrate der Tumordinfiltrationszone ebenso wie weitere reifungsassoziierte Antigene, z.B. CD40, CD83, DC-LAMP und RelB, exprimiert. Die T-Zellen in unmittelbarer Nachbarschaft reifer myeloischer DC zeigen eine gesteigerte Proliferationsaktivität, was auf eine T-Zellaktivierung durch die DC hindeutet. Die reifen myeloischen DC der Infiltrationszone tragen auf ihrer Oberfläche außerdem CCR7, den Liganden für CCL19 und CCL21, welches von lymphatischen Gefäßen der Infiltrationszone exprimiert wird.

Hierdurch entsteht unter Chemokineinfluss ein Milieu, das dem der sekundären lymphatischen Organe gleicht und somit eine direkte Antitumorantwort in der Tumorrandszone des Nierenzellkarzinoms durch tumorspezifische T-Zellen fördert.

5.1 Schlussfolgerungen

Tumorzellen von klarzelligem Nierenzellkarzinom fördern über die Expression von CCL20 die Rekrutierung unreifer myeloischer DC in das Tumorgewebe.

Nach Umwandlung verlassen reife myeloische DC unter dem Einfluss der Chemokine CCL19 und CCL21 das Tumorgewebe (Abbildung 31).

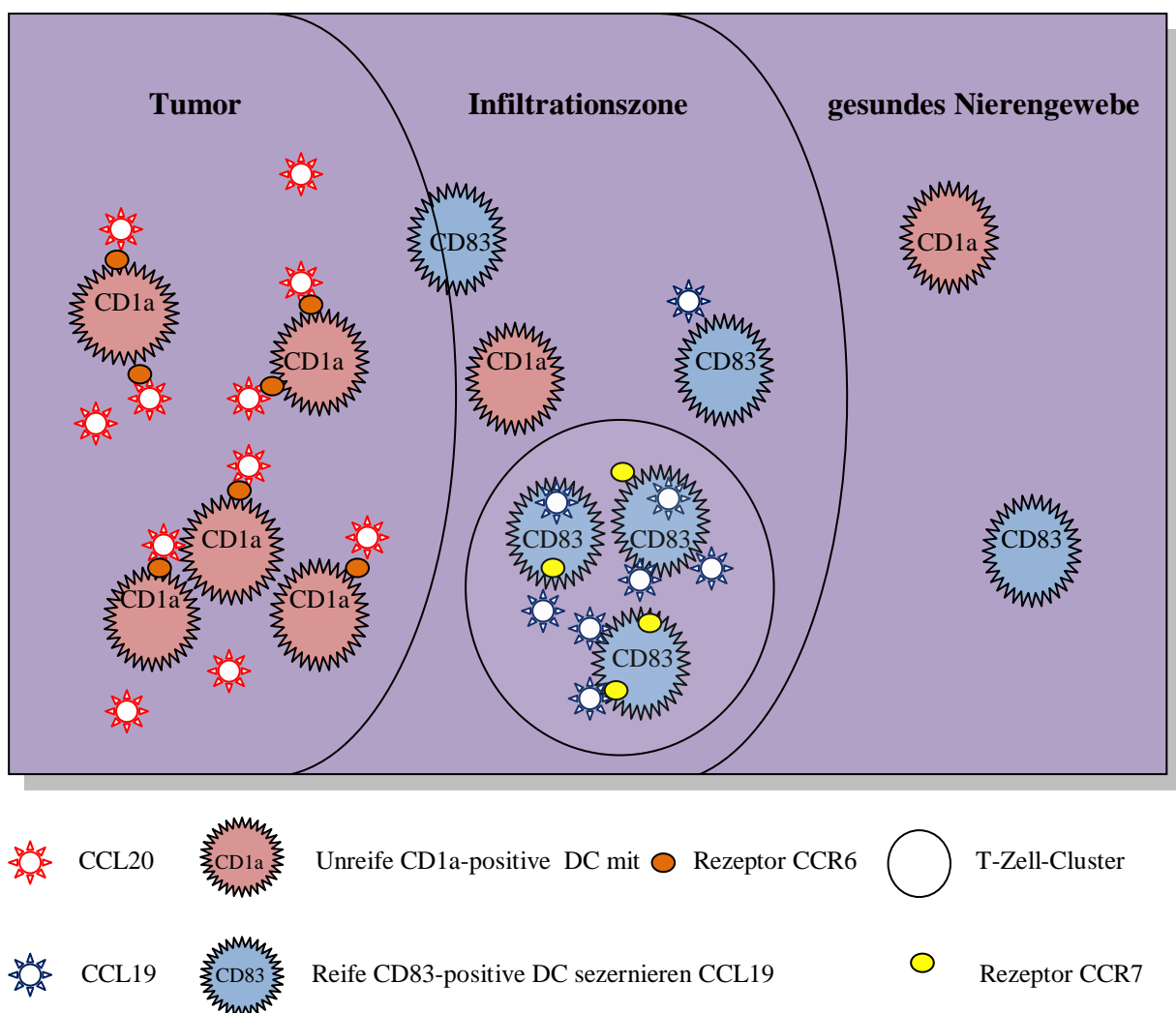


Abbildung 31: Reife myeloische dendritische Zellen der tumornahen Infiltrationszone fördern die T-Zell vermittelte Tumorimmunantwort beim Nierenzellkarzinom und bedingen somit die Entstehung einer TH1-Immunantwort, die zur Tumorabstoßung führt.

6 Literaturnachweis

- Angeli V, Randolph GJ (2006): "Inflammation, lymphatic function, and dendritic cell migration." *Lymphat Res Biol* 4(4):217-228
- Bacon K, Baggiolini M, Broxmeyer H, Horuk R, Lindley I, Mantovani A, Maysushima K, Murphy P, Nomiyama H, Oppenheim J (2002): "Chemokine/chemokine receptor nomenclature." *J Interferon Cytokine Res* 22(10): 1067-68
- Baldewijns MM, van Vlodrop IJ, Schouten LJ, Soetekouw PM, de Bruïne AP, van Engeland M (2008): "Genetics and epigenetics of renal cell cancer." *Biochim Biophys Acta* 1785(2):133-155
- Balfe DM, McClennan BL, Stanley RJ, Weyman PJ, Sagel SS (1982): "Evaluation of renal masses considered indeterminate on computed tomography." *Radiology* 142(2): 421-428
- Banchereau J, Palucka AK (2005): "Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer." *Nat Rev Immunol* 5(4):296-306
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K (2000): "Immunobiology of dendritic cells." *Annu Rev Immunol* 18:767-811
- Bennington JL, Ferguson BR, Campbell PB (1968): "Epidemiologic studies of carcinoma of the kidney. II. Association of renal adenoma with smoking." *Cancer* 22(4):821-23

- Boyman O, Purton JF, Surh CD, Sprent J (2007): "Cytokines and T-cell homeostasis." *Curr Opin Immunol* 19(3):320-326
- Bretan PN jr, Busch MP, Hricak H, Williams RD (1986): "Chronic renal failure: a significant risk factor in the development of acquired renal cysts and renal cell carcinoma. Case reports and review of the literature." *Cancer* 57(9):1871-1879
- Brode S, Macary PA (2004): "Cross-presentation: dendritic cells and macrophages bite off more than they can chew!" *Immunology* 112(3):345-351
- Buti S, Bersanelli M, Sikokis A, Maines F, Faccinetti F, Bria E, Ardizzoni A, Tortora G, Massari F (2013): "Chemotherapy in metastatic renal cell carcinoma today? A systematic review." *Anticancer Drugs* 24(6):535-554
- Carroll PR, Murty VV, Reuter V, Jhanwar S, Fair WR, Whitmore WF, Chaganti RS (1987): "Abnormalities at chromosome region 3p12-14 characterize clear cell renal carcinoma." *Cancer Genet Cytogenet* 26(2):253-259
- Castellino F, Huang AY, Altan-Bonnet G, Stoll S, Scheinecker C, Germain RN (2006): "Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8+ T cells to sites of CD4+ T cell-dendritic cell interaction." *Nature* 440(7086):890-895
- Caux C (1998): "Pathways of development of human dendritic cells." *Eur J Dermatol* 8(6):375-384
- Caux C, Liu YJ, Banchereau J (1995): "Recent advances in the study of dendritic cells and follicular dendritic cells." *Immunol Today* 16(1):2-4

- Caux C, Ait-Yahia S, Chemin K, de Bouteiller O, Dieu-Nosjean MC, Homey B, Massacrier C, Vanbervliet B, Zlotnik A, Vicari A (2000): "Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines." *Springer Semin Immunopathol* 22(4):345-369
- Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Ait-Yahia S, Vaure C, Chemin K, Dieu-Nosjean MC, Vicari A (2002): "Regulation of dendritic cell recruitment by chemokines." *Transplantation* 73(1 Suppl):S7-11
- Dell'Agnola C, Biragyn A (2007): "Clinical utilization of chemokines to combat cancer: the double-edged sword." *Expert Rev Vaccines* 6(2):267-283
- Delves PJ, Roitt IM (2000 a): "The immune system. First of two parts." *N Engl J Med* 343(1):37-49
- Delves PJ, Roitt IM (2000 b): "The immune system. Second of two parts." *N Engl J Med* 343(2):108-117
- Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und medizinische Onkologie DGHO (2013): [http://www.dgho-onkopedia.de/de/onkopedia/leitlinien/nierenzellkarzinom%20\(hypernephrom\)](http://www.dgho-onkopedia.de/de/onkopedia/leitlinien/nierenzellkarzinom%20(hypernephrom))
- Dieu-Nosjean MC, Antoine M, Danel C, Heudes D, Wislez M, Poulot V, Rabbe N, Laurans L, Tartour E, de Chaisemartin L, Lebecque S, Fridman WH, Cadranel J (2008): "Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures." *J Clin Oncol* 26(27):4410-4417
- Foley FB, Mulvaney WP, Richardson EJ, Victor I (1952): "Radical nephrectomy of neoplasms." *J Urol* 68(1):39-49

- Franciszkiewicz K, Boissonnas A, Boutet M, Combadière C, Mami-Chouaib F (2012): "Role of chemokines and chemokine receptors in shaping the effector phase of the antitumor immune response." *Cancer Res* 72(24):6325-6332
- Golimbu M, Joshi P, Sperber A, Tessler A, Al-Askari S, Morales P (1986): "Renal cell carcinoma: survival and prognostic factors." *Urology* 27(4):291-301
- Hugues S, Scholer A, Boissonnas A, Nussbaum A, Combadiere C, Amigorena S, Fetler L (2007): "Dynamic imaging of chemokine-dependent CD8+ T cell help for CD8+ T cell responses." *Nat Immunol* 8(9):921-930
- Inoshima N, Nakanishi Y, Minami T, Izumi M, Takayama K, Yoshino I, Hara N (2002): "The influence of dendritic cell infiltration and vascular endothelial growth factor expression on the prognosis of non-small cell lung cancer." *Clin Cancer Res* 8(11):3480-3486
- Ishigami S, Natsugoe S, Matsumoto M, Okumura H, Sakita H, Nakashima S, Takao S, Aikou T (2003): "Clinical implications of intratumoral dendritic cell infiltration in esophageal squamous cell carcinoma." *Oncol Rep* 10(5):1237-1240
- Iwamoto M, Shinohara H, Miyamoto A, Okuzawa M, Mabuchi H, Nohara T, Gon G, Toyoda M, Tanigawa N (2003): "Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells expressing CD83 in human breast carcinomas." *Int J Cancer* 104(1):92-97
- Jocham D, Miller K: Maligne Nierentumoren/Nierenzellkarzinom; in: *Praxis der Urologie*, Band 2, 3. Auflage; hrsg. v. Jocham D, Miller K; Georg Thieme Verlag, Stuttgart/New York 2007, 14-41

- Jocham D, Richter A, Hoffmann L, Iwig K, Fahlenkamp D, Zakrzewski G, Schmitt E, Dannenberg T, Lehmacher W, von Wietersheim J, Doehn C (2004): "Adjuvant autologous renal tumour cell vaccine and risk of tumour progression in patients with renal-cell carcinoma after radical nephrectomy: phase III, randomised controlled trial." *Lancet* 363(9409):594–599
- Kaiser A, Donnadieu E, Abastado JP, Trautmann A, Nardin A (2005): "CC chemokine ligand 19 secreted by mature dendritic cells increases naive T cell scanning behavior and their response to rare cognate antigen." *J Immunol* 175(4):2349-2356
- Kobayashi M, Suzuki K, Yashi M, Yuzawa M, Takayashiki N, Morita T (2007): "Tumor infiltrating dendritic cells predict treatment response to immunotherapy in patients with metastatic renal cell carcinoma." *Anticancer Res* 27(2):1137-1141
- Ladányi A, Kiss J, Somlai B, Gilde K, Fejos Z, Mohos A, Gaudi I, Timár J (2007): "Density of DC-LAMP(+) mature dendritic cells in combination with activated T lymphocytes infiltrating primary cutaneous melanoma is a strong independent prognostic factor." *Cancer Immunol Immunother* 56(9):1459-1469
- Lechner MG, Russell SM, Bass RS, Epstein AL (2011): "Chemokines, costimulatory molecules and fusion proteins for the immunotherapy of solid tumors." *Immunotherapy* 3(11):1317-1340
- Lee HK, Iwasaki A (2007): "Innate control of adaptive immunity: dendritic cells and beyond." *Semin Immunol* 19(1):48-55
- Lijun Z, Xin Z, Danhua S, Xiaoping L, Jianliu W, Huilan W, Lihui W (2012): "Tumor-infiltrating dendritic cells may be used as clinicopathologic prognostic factors in endometrial carcinoma." *Int J Gynecol Cancer* 22(5):836-841

- Ma Y, Shurin GV, Peiyuan Z, Shurin MR (2013): Dendritic cells in the cancer microenvironment." J Cancer 4(1):36-44
- Macagno A, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F (2007): "Duration, combination and timing: the signal integration model of dendritic cell activation." Trends Immunol 28(5):227-233
- Martin-Fontecha A, Sebastiani S, Höpken UE, Ugucioni M, Lipp M, Lanzavecchia A, Sallusto F (2003): "Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming." J Exp Med 198(4):615-621
- McColl SR (2002): "Chemokines and dendritic cells: a crucial alliance." Immunol Cell Biol 80(5):489-496
- McDonald MW (1982): "Current therapy for renal cell carcinoma." J Urol 127(2): 211-217
- Middel P, Brauneck S, Meyer W, Radzun HJ (2010): "Chemokine-mediated distribution of dendritic cell subsets in renal cell carcinoma." BMC Cancer 10:578
- Moser B, Loetscher P (2001): "Lymphocyte traffic control by chemokines." Nat Immunol 2(2):123-128
- Nestle FO, Aljagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D (1998): "Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells." Nat Med 4(3):328-332
- Nestor MS, Cochran AJ (1987): "Identification and quantification of subsets of mononuclear inflammatory cells in melanocytic and other human tumors." Pigment Cell Res 1(1):22-27

- Paganini-Hill A, Ross RK, Henderson BE: Epidemiology of kidney cancer in Urological cancer; hrsg. v. Skinner DG; Grune & Stratton, Inc., New York 1983, 383-407
- Page G, Lebecque S, Miossec P (2002): "Anatomic localization of immature and mature dendritic cells in an ectopic lymphoid organ: correlation with selective chemokine expression in rheumatoid synovium." J Immunol 168(10):5333-5341
- Patel NP, Lavengood RW (1978): "Renal cell carcinoma: natural history and results of treatment." J Urol 119(6):722-726
- Pathak S, Strong LC, Ferrell RE, Trindade A (1982): "Familial renal cell carcinoma with a 3;11 chromosome translocation limited to tumor cells." Science 217(4563): 939-941
- Randolph GJ (2001): "Dendritic cell migration to lymph nodes: cytokines, chemokines, and lipid mediators." Semin Immunol 13(5):267-274
- Reichert TE, Scheuer C, Day R, Wagner W, Whiteside TL (2001): "The number of intratumoral dendritic cells and zeta-chain expression in T cells as prognostic and survival biomarkers in patients with oral carcinoma." Cancer 91(11):2136-2147
- Riede UN, Wehner H: Allgemeine und Spezielle Pathologie, 3. Auflage, hrsg. v. Schaefer HE, Riede UN, Georg Thieme Verlag, Stuttgart/New York 1993, 828-833
- Rosenberg SA (1984): "Adoptive immunotherapy of cancer: accomplishments and prospects." Cancer Treat Rep 68(1):233-255

- Sabatté J, Maggini J, Nahmod K, Amaral MM, Martinez D, Salamone G, Ceballos A, Giordano M, Vermeulen M, Geffner J (2007): "Interplay of pathogens, cytokines and other stress signals in the regulation of dendritic cell function." *Cytokine Growth Factor Rev* 18(1-2):5-17
- Sallusto F, Palermo B, Lenig D, Miettinen M, Matikainen S, Julkunen I, Forster R, Burgstahler R, Lipp M, Lanzavecchia A (1999): "Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function." *Eur J Immunol* 29(5):1617-1625
- Sato K, Fujita S (2007): "Dendritic cells: nature and classification." *Allergol Int* 56(3):183-191
- Schön D, Bertz J, Hoffmeister H: *Bevölkerungsbezogene Krebsregister in der Bundesrepublik Deutschland, Band 2, BGA-Schrift 4/89*, hrsg. v. Hoffmeister H, MMV Medizin Verlag, München 1989
- Schrama D, Straten P, Fischer WH, McLellan AD, Bröcker EB, Reisfeld RA, Becker JC (2001): "Targeting of lymphotoxin-alpha to the tumor elicits an efficient immune response associated with induction of peripheral lymphoid-like tissue." *Immunity* 14(2):111-121
- Serra HM, Baena-Cagnani CE, Eberhard Y (2004): "Is secondary lymphoid-organ chemokine (CCL21) much more than a constitutive chemokine ?" *Allergy* 59(11):1219-1223
- Smith CM, Wilson NS, Waithman J, Villadangos JA, Carbone FR, Heath WR, Belz GT (2004): "Cognate CD4(+) T cell licensing of dendritic cells in CD8(+) T cell immunity." *Nat Immunol* 5(11):1143-1148

- Steinman RM, Cohn ZA (1973): "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice." *J Exp Med* 137(5):1142-1162
- Störkel S: Tumoren der Niere; in: Pathologie 5, hrsg. V. Remmele W, Springer Verlag, Berlin 1997, 173-192
- Thoenes W, Störkel S, Rumpelt HJ, Moll R (1990): "Cytomorphological typing of renal cell carcinoma – a new approach." *Eur Urol* 18(Suppl2):6-9
- Thompson ED, Enriquez HL, Fu YX, Engelhard VH (2010): "Tumor masses support naive T cell infiltration, activation, and differentiation into effectors." *J Exp Med* 207(8):1791-1804
- Thurner B, Haendle I, Röder C, Dieckmann D, Keikavoussi P, Jonuleit H, Bender A, Maczek C, Schreiner D, von den Driesch P, Bröcker EB, Steinman RM, Enk A, Kämpgen E, Schuler G (1999): "Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma." *J Exp Med* 190(11):1669-1678
- Ueno H, Klechevsky E, Morita R, Aspod C, Cao T, Matsui T, Di Pucchio T, Connolly J, Fay JW, Pascual V, Palucka AK, Banchereau J (2007): "Dendritic cell subsets in health and disease." *Immunol Rev* 219:118-142
- Van der Merwe PA, Davis SJ (2003): "Molecular interactions mediating T cell antigen recognition." *Annu Rev Immunol* 21:659-684

- Verra N, de Jong D, Bex A, Batchelor D, DelleMijn T, Sein J, Nooijen W, Meinhardt W, Horenblas S, de Gast G (2005): "Infiltration of activated dendritic cells and T cells in renal cell carcinoma following combined cytokine immunotherapy." *Eur Urol* 48(3):527-533
- Vincent LM, Parker LA, Mittelstaedt CA (1987): "Sequela of continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) mimicking primary gynecologic pathology." *J Ultrasound Med* 6(8):483-485
- Vissers JL, Hartgers FC, Lindhout E, Teunissen MB, Figdor CG, Adema GJ (2001): "Quantitative analysis of chemokine expression by dendritic cell subsets in vitro and in vivo." *J Leukoc Biol* 69(5):785-793
- Wei YC, Sticca RP, Li J, Holmes LM, Burgin KE, Jakubchak S, Bouton-Verville H, Williamson J, Meyer K, Evans L (2007): "Combined treatment of dendritoma vaccine and low-dose interleukin-2 in stage IV renal cell carcinoma patients induced clinical response: A pilot study." *Oncol Rep* 18(3):665-671
- Weninger W, von Andrian UH (2003): "Chemokine regulation of naïve T cell traffic in health and disease." *Semin Immunol* 15(5):257-270
- Whitmore WF jr. (1989): "Renal cell carcinoma. Overview." *Semin Urol* 7(4):271-273
- Yoneyama H, Matsuno K, Matsushimaa K (2005): "Migration of dendritic cells." *Int J Hematol* 81(3):204-207
- Zitvogel L, Mayordomo JI, Tjandrawan T, DeLeo AB, Clarke MR, Lotze MT, Storkus WJ (1996): "Therapy of murine tumors with tumor peptide-pulsed dendritic cells: dependence on T cells, B7 costimulation, and T helper cell 1-associated cytokines." *J Exp Med* 183(1):87-97

- Zlotnik A, Yoshie O (2000): "Chemokines: a new classification system and their role in immunity." *Immunity* 12(2):121-127
- Zou GM, Tam YK (2002): "Cytokines in the generation and maturation of dendritic cells: recent advances." *Eur Cytokine Netw* 13(2):186-199