

Aus der Klinik für Urologie und Kinderurologie

Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg (Saar)

Direktor: Prof. Dr. Michael Stöckle

**Etablierung einer Kollagenase-freien Methode
zur Untersuchung regulatorischer T-Zellen in Tumorfrischgewebe
des Nierenzellkarzinoms**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2019

vorgelegt von: Fiona Crossey

geb. am: 09.05.1988 in Homburg (Saar)

Tag der Promotion: 23.06.2020

Dekan: Prof. Dr. med. Michael D. Menger

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Michael Stöckle

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Markus Hoth

Inhaltsverzeichnis

1. ZUSAMMENFASSUNG	6
1.1. Summary	8
2. EINLEITUNG	10
2.1. Nierenzellkarzinom	11
2.1.1. Epidemiologie.....	11
2.1.2. Ätiologie und Risikofaktoren	12
2.1.3. Klinik und Diagnostik	14
2.1.4. Histologie	15
2.1.5. Hereditäre Nierenzellkarzinome.....	16
2.1.6. Klassifikation und Stadieneinteilung	18
2.1.7. Therapie des Nierenzellkarzinoms.....	20
2.1.7.1. Aktive Überwachung.....	20
2.1.7.2. Operative Therapie	20
2.1.7.3. Nachsorge	22
2.1.7.4. Systemische Therapie	22
2.1.7.4.1. Targeted therapy	23
2.1.7.4.2. Checkpoint-Inhibitoren.....	24
2.1.7.5. Alternative Therapieoptionen	25
2.2. Regulatorische T-Zellen (T_{reg}).....	26
2.2.1. Oberflächenmarker.....	26
2.3. Rationale für die Arbeit.....	27
3. STUDIENKOLLEKTIV, MATERIAL UND METHODEN	29
3.1. Geräte und Reagenzien	29
3.1.1. Materialien und Geräte	29
3.1.2. Liste der verwendeten Reagenzien	30
3.1.3. Lösungen	30
3.1.4. Antikörper.....	30

3.2. Methoden	31
3.2.1. Studienkollektiv	31
3.2.2. Herkunft des Nierengewebes und Probengewinnung	31
3.2.3. Gewebeaufschluss mittels Kollagenase.....	32
3.2.4. Gewebeaufschluss mittels MiniLys©-Homogenisator	34
3.2.5. Gewebeaufschluss mittels Vortex©-Mixer	34
3.2.6. gentleMACS©.....	35
3.2.7. Neubauer-Zählkammer und Vitalfärbung mit Trypanblau.....	36
3.2.8. Färbung mit fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern.....	37
3.2.9. Messung und Auswertung der Proben.....	38
<u>4. ERGEBNISSE</u>	41
4.1. Etablierung eines Protokolls zur Herstellung einer Einzel- Zellsuspension aus Frischtumorgewebe von Nierentumoren	41
4.1.1. Probandenkollektiv	41
4.1.2. Verarbeitung nach Kollagenase-Protokoll.....	42
4.1.3. Verarbeitung nach MiniLys©-Protokoll.....	43
4.1.4. MiniLys©-Protokoll: Tumorkonsistenz und Histologie	46
4.1.5. Verarbeitung nach Vortex©-Protokoll	48
4.1.6. Verarbeitung nach gentleMACS©-Protokoll.....	50
4.1.7. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) im Vergleich	52
4.1.8. Weitere Aspekte des Methodenvergleichs.....	54
<u>5. DISKUSSION</u>	57
5.1. Enzymatischer Gewebeaufschluss	57
5.1.1. Gewebeaufschluss auf Kollagenase-Basis	57
5.1.2. Gewebeaufschluss mittels gentleMACS©.....	58
5.2. Rein mechanische Separationsverfahren als mögliche Alternative?	59
5.2.1. Gewebeaufschluss mittels MiniLys©	59
5.2.2. Probengröße und Zeitfaktor	60

5.2.3. Tumorkonsistenz	60
5.2.4. Gewebeaufschluss mittels Vortex©	61
5.3. Die Bedeutung des vitalen Zellanteils	61
5.4. Die Bedeutung intakter Zellmarker und -funktion.....	62
<u>6. STANDARD OPERATING PROCEDURES (SOP)</u>	<u>64</u>
6.1. Isolierung von Nierenzellen aus Frischgewebe mittels Kollagenase	64
6.2. Isolierung von Nierenzellen aus Frischgewebe mittels MiniLys©	68
6.3. Isolierung von Nierenzellen aus Frischgewebe mittels Vortex©	73
6.4. Isolierung von Nierenzellen aus Frischgewebe mittels gentleMACS©	77
<u>7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</u>	<u>81</u>
<u>8. TABELLENVERZEICHNIS</u>	<u>82</u>
<u>9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>83</u>
<u>10. LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>85</u>
<u>11. PUBLIKATIONEN.....</u>	<u>94</u>
<u>12. DANKSAGUNG</u>	<u>94</u>
<u>13. LEBENSLAUF</u>	<u>95</u>

1. Zusammenfassung

Das Nierenzellkarzinom (NZK) ist ein maligner Tumor mit stetig steigender Inzidenzrate im Erwachsenenalter. Das Malignitätspotential differiert je nach Histologie, jedoch gilt in allen Fällen die operative Therapie als der einzige kurative Ansatz. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung liegt in 20-30 % der Fälle bereits ein metastasiertes NZK vor und im Rahmen des follow-ups nach Nephrektomie treten in Abhängigkeit vom Primärstadium in 13-30 % der Fälle innerhalb von 36 bis 48 Monaten Metastasen auf. In diesen Fällen wird eine systemische Therapie empfohlen. Das in den Karzinomzellen erhöhte ABC-Transporter-Expressionslevel (im Speziellen p-Glykoprotein) führt jedoch zu einer natürlichen Resistenz der Tumorzellen gegenüber konventionellen Chemotherapeutika. Die Therapie des metastasierten NZK erfolgt daher im Rahmen der Systemtherapie mittels Multi-Kinase-Inhibitoren, Zytokinen, mTOR-Inhibitoren und Checkpoint-Inhibitoren.

Vor dem Hintergrund des heterogenen Ansprechens auf die Immuntherapie ist die immunmodulatorische Aktivität der regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) Gegenstand der Forschung. Von maßgeblichem Interesse ist insbesondere die endogene Immunsuppression durch die T_{reg} -Zellen. Im Rahmen einer Immuntherapie besteht hier ein Ansatzpunkt, um eine optimale Modulation mit verstärkter Tumorabwehr zu erreichen. Zu diesem Zweck ist eine effiziente Isolationsmethode von TIL aus Tumorfriischgewebe mit hoher vitaler Zellausbeute und einer ausreichenden Menge an intakten TIL unabdingbar.

Als Standardmethode zur Isolation von tumorinfiltrierenden T-Zellen im Rahmen der weiterführenden Zellanalyse dienen bisher meist Protokolle, die Kollagenase zum Gewebeaufschluss verwenden. Die Kollagenase ist eine natürlicherweise beim Menschen vorkommende Peptidase und liegt in unterschiedlichen Subtypen vor. Aufgrund der hohen vitalen Zellausbeute galt diese Methode lange Zeit als Mittel der Wahl. Durch die proteolytische Eigenschaft der Kollagenase kommt es jedoch unter anderem zu einer Veränderung membrangebundener Rezeptoren und Oberflächenmoleküle von T-Zellen. Dies erweist sich als problematisch, da intakte Zellstrukturen und Oberflächenmolekülprofile eine unabdingbare Voraussetzung für hochauflösende durchflusszytometrische Messungen oder in vitro Zellkultur-Assays darstellen.

Um die T_{reg} -Zellpopulationen im Nierentumorgewebe mittels Immunfluoreszenzverfahren genauer analysieren zu können, verwendeten wir gemäß etablierter Protokolle zunächst das Kollagenase-basierte Protokoll zur Herstellung einer Einzelzellsuspension. Wir stellten fest, dass sich der enzymatische Gewebeaufschluss signifikant negativ auf die Fluoreszenzintensität unterschiedlicher Oberflächenmarker auswirkte. Dies führte zu einer Verfälschung der durchflusszytometrischen Messergebnisse, sodass zur genaueren Analyse der T-Zellen und

auch der T_{reg}-Zellen die Etablierung eines kollagenasefreien Protokolls notwendig war. Es wurden im Vergleich zur rein enzymatischen Methode eine kombiniert enzymatisch-mechanische und eine rein mechanische Methode (MiniLys©) untersucht. Der rein mechanische Gewebeaufschluss zeigte sich in Bezug auf die Zellausbeute als gleichwertig. Im Hinblick auf die Gewebestruktur zeigte sich diese Methode bei Tumoren von harter Konsistenz sogar signifikant überlegen gegenüber den rein enzymatisch prozessierten Proben. Des Weiteren zeichnet sich das MiniLys©-Protokoll neben einem geringeren Zeitaufwand insbesondere durch eine geringe Menge an benötigtem Tumormaterial aus. Diese Effizienz der Isolationsmethode ist besonders relevant im Hinblick auf die Stadienverteilung bei Diagnose des NZK. So wird aktuell in 65 % der Fälle im lokal begrenzten Stadium der Erkrankung operiert (Howlader N 2018).

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die rein mechanische Methode eine mögliche Alternative zum enzymatischen Verdau darstellt und dieser in den oben genannten Punkten teilweise signifikant überlegen ist. Als Ergebnis konnte daher das „MiniLys“©-Protokoll „a-20 Sek.“ als neues Standardprotokoll (SOP) zur zukünftigen Herstellung von Einzel-Zellsuspension aus frischem Nierentumorgewebe etabliert werden.

1.1. Summary

Establishing a Collagenase-free method to study regulatory T-cells in Renal Cell Carcinoma tissue

Renal cell carcinoma is a malignant tumor with a steadily increasing incidence rate in adulthood. The malignancy potential differs depending on the histology, however, surgical treatment is currently the only curative approach. At the time of diagnosis, 20-30 % of RCC have already metastasized and as part of the follow-up after nephrectomy, metastases occur within 36 to 48 months in 13-30 % of the cases, depending on the primary stage. In these cases, a systemic therapy is recommended. However, increased ABC transporter expression in the carcinoma cells (in particular of p-glycoprotein) can lead to a natural resistance of the tumor cells to conventional chemotherapeutic agents. Therapy of metastatic renal cell carcinoma therefore takes place as part of systemic therapy using multi-kinase inhibitors, cytokines, mTOR inhibitors and checkpoint inhibitors.

Against the background of heterogenous response to immunotherapy, the immunomodulatory activity of the regulatory T cells (T_{reg}) is the subject of research. Of particular interest regarding the modulation of anti-tumor defense is the endogenous immunosuppression by T_{reg} cells. For this purpose, an efficient isolation method of tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) from fresh tumor tissue with high vital cell yield and a sufficient amount of intact TIL is indispensable.

Up to now, tissue digestion protocols based on collagenase have been used as the standard method for TIL isolation for subsequent further cell analysis. Collagenase is a naturally occurring peptidase in humans and exists in different subtypes. Due to the high vital cell yield, this method has long been considered the method of choice. However, the proteolytic nature of collagenase is known to result in modifications of membrane-bound receptors and other surface molecules on the T cells. The latter proves to be problematic since intact cell structures and surface protein profiles are an indispensable prerequisite for high-resolution flow cytometric measurements or functional in vitro cell culture assays.

In order to analyze the T_{reg} cell populations in the kidney tumor tissue more accurately by means of immunofluorescence methods, we first used the standard collagenase method to produce a single cell suspension according to established protocols. We found that the collagenase-based enzymatic tissue digestion protocol had a significantly negative effect on the fluorescence intensity of different surface markers. This led to a distortion of the flow cytometry results. In contrast, a collagenase-free protocol allowed more detailed and accurate anal-

ysis of T cells and T_{reg} cells. A combined enzymatic-mechanical, as well as a purely mechanical method (MiniLys ©) were therefore investigated. The purely mechanical tissue dissociation was found to be equivalent to the standard protocol in terms of cell yield. Moreover, the cell yield was significantly higher in tumors of hard consistency than the purely enzymatically processed samples. Furthermore, the MiniLys © protocol is not only less time-consuming, but also requires a smaller amount of tumor material. This efficiency of the isolation method is particularly relevant with regard to the stage distribution in RCC diagnosis, as an estimated 65 % are being operated at the locally limited stage of the disease (Howlader N 2018).

The present thesis shows that the purely mechanical method represents a possible alternative to the enzymatic digestion and that it can be significantly superior with respect to efficiency and accuracy. As a result, the "Mini-Lys" © protocol "a-20 sec" could be established as a new standard operation procedure (SOP) for the future production of single cell suspension from fresh kidney tumor tissue.

2. Einleitung

Das Nierenzellkarzinom (NZK) weist trotz verbesserter diagnostischer Methoden eine stabile bis leicht steigende Inzidenzrate mit annähernd gleichbleibender Mortalitätsrate, eine hohe Rezidivrate und ein häufig bereits fortgeschrittenes Tumorstadium bei Erstdiagnose auf. Beim Nierenzellkarzinom wurden im Vergleich zu anderen Tumorentitäten besonders viele tumorinfiltrierende T-Zellen (TIL) beschrieben. Die hemmende T_{reg}-Funktion gegenüber der physiologischen Immunantwort gegen den Tumor wird auch als einer der „Escape-Mechanismen“ beim Nierenzellkarzinom bezeichnet (Liotta, Gacci et al. 2011, Ljungberg, Bensalah et al. 2013). Durch diese Einflussnahme auf Effektorfunktionen zytotoxischer T-Zellen, NK-Zellen und anderer Subtypen gegen Tumorantigene sowie durch die Hemmung der Proliferation und zytotoxischen Aktivität der T-Lymphozyten tragen T_{reg}-Zellen durch Modulation der körpereigenen Immunantwort zum Tumorwachstum bei und sind unmittelbar in die Förderung der Angiogenese des Tumorgewebes involviert (Facciabene, Motz et al. 2012). In den letzten Jahren haben Forschungsergebnisse gezeigt, dass die regulatorischen T-Zellen nicht relevant für die Pathogenese des NZK sein mögen, dass aber durchaus eine Assoziation zwischen der Anzahl der systemischen sowie tumor-infiltrierenden T_{reg}-Zellen und einer schlechten Prognose des NZK besteht. (Siddiqui, Frigola et al. 2007, Geissler, Fornara et al. 2015, Shang, Liu et al. 2015)

Vor diesem Hintergrund ist insbesondere die Immunmodulation eine wichtige Therapieoption und somit die Erforschung der regulatorischen T-Zellen hier von zentraler Bedeutung, um ein besseres Monitoring des Tumors auch auf zellulärer Ebene gewährleisten zu können.

Voraussetzung für aussagekräftige Studien und Versuchsreihen ist das Vorliegen funktionsfähiger regulatorischer T-Zellen. Erschwert wird dies durch die in der Regel kleine Tumorgroße und konsekutiv kleine Tumorproben, die für wissenschaftliche Zwecke zur Verfügung stehen. Bisherige konventionelle Methoden zur Zellisolation beinhalten den Kollagenase-Verdau. Unter Verwendung der Kollagenase wird die Zellausbeute als hoch angegeben, doch meist liegt lediglich eine kleine Anzahl wirklich funktionstüchtiger Zellen vor. Gegenstand dieser Arbeit ist daher die Etablierung eines Kollagenase-freien Protokolls zur Isolation von regulatorischen T-Zellen aus Tumorgewebeproben des Nierenzellkarzinoms.

2.1. Nierenzellkarzinom

2.1.1. Epidemiologie

Etwa 3 % aller malignen Tumore im Erwachsenenalter sind Nierenzellkarzinome (NZK). In etwa 90 % der Fälle handelt es sich um ein von den proximalen Tubulusepithelzellen ausgehendes Karzinom (Chow, Dong et al. 2010)

Die Inzidenzrate stieg in den letzten Jahren jährlich um ca. 2 %, dabei zeichnen sich jedoch globale Unterschiede ab – die höchsten Neuerkrankungsraten finden sich in Europa, Nordamerika sowie in Australien; in Indien, Japan, Afrika und China hingegen sind die Raten niedriger. Innerhalb Europas sind die Inzidenzraten in der Tschechischen Republik, Litauen, Lettland, Estland und Island am höchsten, in Rumänien, Zypern und Portugal hingegen am niedrigsten. Obwohl global gesehen in den letzten Jahrzehnten ein leichter Anstieg der Inzidenz zu verzeichnen war, ist diese in einigen europäischen Ländern (Schweden, Polen, Finnland, Niederlande) gesunken. Die höchsten Sterblichkeitsraten finden sich in Nordamerika, Australien/Neuseeland und Europa, die niedrigsten in Afrika und Asien. Innerhalb Europas variiert die Sterblichkeitsrate mit steigenden Zahlen in Irland und Slowenien und sinkenden Zahlen in Skandinavien, Frankreich, Deutschland, Italien, Österreich und den Niederlanden (Chow, Dong et al. 2010, Ljungberg, Campbell et al. 2011, Znaor, Lortet-Tieulent et al. 2015, Ljungberg, Bensalah et al. 2016).

Für das Jahr 2008 gab es in den Industriestaaten folgendes Verhältnis von Inzidenz zu Mortalität: 11,8 : 4,1 (Jemal, Bray et al. 2011). In den 27 EU-Staaten gab es 2012 geschätzt 84.400 Patienten mit neu diagnostizierten Nierenzellkarzinomen, davon waren 53.800 Patienten männlich und 30.600 weiblich. Insgesamt wurden 34.700 Todesfälle verzeichnet (22.300 männliche und 12.400 weibliche) (Ferlay, Steliarova-Foucher et al. 2013). In Deutschland wurden im gleichen Jahr 15.030 Neuerkrankungen registriert (9.500 Männer und 5.530 Frauen). Für das Jahr 2016 prognostizierte das Zentrum für Krebsregisterdaten einen leichten Anstieg auf 16.500 Neuerkrankungen (10.400 Männer und 6.100 Frauen) (Robert Koch-Institut 2015).

Laut Robert Koch-Institut liegt das mittlere Erkrankungsalter bei Männern bei 68 Jahren und bei Frauen bei 71 Jahren. Die Anzahl der absoluten Neuerkrankungen ist seit 1998 stetig, wenn auch nur leicht, ansteigend, wohingegen die absolute Zahl der Sterbefälle weitgehend gleichbleibend ist. Die Inzidenzrate steigt stetig mit dem Alter und zeigt einen Erkrankungsgipfel in der Altersgruppe 75-79 Jahre. (Robert Koch-Institut 2015)

2.1.2. Ätiologie und Risikofaktoren

Die genaue Ätiologie des Nierenzellkarzinoms ist bisher nicht eindeutig geklärt. Wie bei anderen Krebserkrankungen wird eine multifaktorielle Genese diskutiert. Dennoch gibt es eine Reihe von Risikofaktoren, die eine wichtige Rolle im Rahmen der Primärprävention spielen. Hierbei handelt es sich laut der European Association of Urology (Ljungberg, Albiges et al. 2018) und dem Zentrum für Krebsregisterdaten (Robert Koch-Institut 2013) um passiven und aktiven Nikotinabusus, arterielle Hypertonie sowie Adipositas. Als Risikofaktoren gelten außerdem demografische Faktoren, chronische Niereninsuffizienz, Nierentransplantation, berufsbedingte Exposition gegenüber potentiell nierenschädigenden Substanzen sowie genetische Veränderungen oder eine positive Familienanamnese (ca. 4 % der NZK sind hereditär bedingt und treten vor allem multifokal und bei jüngeren Patienten auf) (Ljungberg, Campbell et al. 2011).

Demographische Risikofaktoren wie ethnische Herkunft, Alter und Geschlecht gehören zu den nicht beeinflussbaren Entstehungsfaktoren. Im Vergleich zu Menschen asiatischer Herkunft weisen Kaukasen ein erhöhtes Erkrankungsrisiko auf. Die niedrigste Inzidenz wird in Afrika verzeichnet, die höchste Inzidenz findet sich unter Afroamerikanern in den USA (Chow and Devesa 2008). Diese Unterschiede haben neben dem genetischen Aspekt vermutlich noch weitere Ursachen, zu denen neben dem Zugang zur Gesundheitsversorgung inklusive diagnostischer Möglichkeiten auch Lebenswandel, Ernährungsgewohnheiten und andere Umweltfaktoren zählen.

Zu den sogenannten Lifestylefaktoren gehören Nikotinkonsum sowie Adipositas. Nikotinkonsum ist ein anerkannter Risikofaktor und steigert im Vergleich zu Nichtrauchen das Erkrankungsrisiko bei Männern um 54 % und bei Frauen um 22 %. Nach Beendigung des Nikotinkonsums sinkt das Erkrankungsrisiko erst nach 11-20 Jahren Abstinenz. Im Falle von Nichtrauchern konnte das Passivrauchen über mindestens 20 Jahre im häuslichen Umfeld als relevanter Faktor gemessen werden (Theis, Dolwick Grieb et al. 2008). Eine direkte Beziehung zwischen Nikotinkonsum und dem Auftreten eines NZK ist nicht nachzuweisen, allerdings besteht offensichtlich ein Zusammenhang zwischen der Höhe des Nikotinkonsums und einem erhöhten Erkrankungsrisiko. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit > 20 pack years (py) ein signifikant erhöhtes Risiko für ein fortgeschrittenes Tumorstadium haben. Allerdings kann das Rauchen nicht unabhängig von Alter oder Geschlecht gewertet werden, sodass es nicht als eigenständige Variable zu sehen ist. Trotz fehlender statistischer Signifikanz bei der Untersuchung des Zusammenhangs von Nikotinkonsum und spezifischem Überleben haben Raucher im Allgemeinen ein höheres Sterberisiko, das in multivariablen Studien das spezifische Überleben nachteilig beeinflusst (Ehdaie, Furberg et al. 2014).

Ein erhöhter Body Mass Index (BMI) ist vor allem bei Frauen mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko vergesellschaftet (Renehan, Tyson et al. 2008). Bei Männern scheint die Verteilung des Körperfetts eine Rolle zu spielen, die Datenlage ist jedoch nicht ausreichend, um unabhängig vom BMI einen Zusammenhang zwischen abdomineller Fettleibigkeit und erhöhtem Erkrankungsrisiko herzustellen. Neue Studien haben nun gezeigt, dass der BMI nur beim männlichen Geschlecht eine unabhängige prognostische Wertigkeit besitzt (Ohno, Nakashima et al. 2013).

Patienten mit arterieller Hypertonie sowie antihypertensiver Medikation gelten unabhängig vom Geschlecht ebenfalls als eine der drei wichtigsten Risikogruppen. Mehrere prospektive Kohortenstudien haben gezeigt, dass ein Zusammenhang zwischen Hypertonie und dem gehäuftem Auftreten des NZK besteht (Weikert, Boeing et al. 2008). Jedoch ist gemäß der aktuellen Studienlage nicht ausreichend geklärt, ob arterielle Hypertonie und Diuretika-Einnahme möglicherweise als zwei getrennte Risikofaktoren zu betrachten sind. Da die Diagnose der arteriellen Hypertonie fast immer die Einnahme von Antihypertensiva nach sich zieht, können diese zwei Faktoren kaum getrennt voneinander gesehen werden, was die Durchführung von Studien und die Bewertung dieser Fragestellung erschwert.

Als ein weiterer Hochrisikofaktor ist die erworbene zystische Nierenerkrankung nach Dialyse (ARCD) zu nennen (Hurst, Jindal et al. 2011). Sie entsteht häufig im Endstadium der terminalen Niereninsuffizienz (ESRD) sowie nach langjähriger Hämodialyse und ist assoziiert mit Adenomen, die in ein meist papilläres NZK von niedriger maligner Potenz übergehen können. Im Gegensatz zum klassischen NZK sind die Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung jünger (Denton, Magee et al. 2002). Es ist bisher nicht eindeutig klar, ob eine Nierentransplantation das Risiko senkt, da das Vorhandensein von Symptomen, Tumorgroße, TNM-Stadium und Grading als weitere prognostische Faktoren berücksichtigt werden müssen. In multivariablen Analysen konnte bisher nur das T-Stadium als unabhängiger Prognosefaktor für die 5-Jahres-Überlebensrate gewertet werden (Gigante, Neuzillet et al. 2012).

Obwohl das Nierenzellkarzinom ein selten durch Umwelteinflüsse bedingter Tumor ist, sollte in diesem Zusammenhang im Rahmen einer berufsbedingten Exposition das Lösungsmittel Trichlorethylen (TCE) erwähnt werden. Es handelt sich um einen von der International Agency for Research on Cancer (IARC) anerkannten humankanzerogenen Stoff, für den eine direkte Assoziation mit dem NZK nachgewiesen werden konnte (Guha, Loomis et al. 2012). Im Allgemeinen ist ein Nachweis des Zusammenhangs zwischen Exposition und Entstehung des NZK jedoch aufgrund der äußerst variablen Rahmenbedingungen sehr schwierig.

2.1.3. Klinik und Diagnostik

In der Regel verursacht das Nierenzellkarzinom klinisch keine Frühsymptome. Da es meist von Epithelzellen des distalen Tubulus ausgeht, ist es im Parenchym lokalisiert, sodass dadurch zunächst meist kein Anschluss an das renale Hohlraumsystem gegeben ist. In der Bundesrepublik wird das Nierenzellkarzinom überwiegend in den klinischen Stadien T1 - T2 als Zufallsbefund im Rahmen einer Abdominal-Sonographie oder einer Computertomografie diagnostiziert (Robert Koch-Institut 2013). Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung liegt bei 20-30 % jedoch bereits ein metastasiertes NZK vor (Choueiri and Motzer 2017). Bei primär nicht metastasiertem NZK treten nach initial kurativem Therapieansatz bei 25 % der Patienten lokale Rezidive auf. Im Rahmen des follow-ups nach Nephrektomie treten in Abhängigkeit des Primärstadiums in 13-30 % der Fälle innerhalb von 36 bis 48 Monaten Metastasen auf (Capogrosso, Capitanio et al. 2016).

Bei unklaren Befunden erfolgt intraoperativ eine Schnellschnittdiagnostik, um differentialdiagnostisch ein Urothelkarzinom des Nierenbeckens zu erkennen.

In den letzten Jahren hat die Häufigkeit der sonografischen Zufallsbefunde kleiner Tumoren zugenommen. Der Anteil benigner Läsionen bei renalen Tumormassen mit einem Durchmesser von ≤ 4 cm ist vergleichsweise hoch. Eine Biopsie stellt hier eine diagnostische Option im Rahmen einer Observation kleiner solider Läsionen dar, wie eine prospektive Studie von Wunderlich et al. zeigen konnte (Wunderlich, Hindermann et al. 2005). Bei der Untersuchung von insgesamt 250 Stanzbiopsien nach (Hemi-) Nephrektomie zeigte sich, dass bei einem Tumordurchmesser ≤ 4 cm Malignität, Herkunft des Tumors, Grading und Zelltyp bzw. Wachstumsmuster hinreichend akkurat durch eine Biopsie bestimmt werden konnten. Somit könnte man auch das anschließende, gegebenenfalls invasive, therapeutische Vorgehen festlegen. Dieser Befund wurde auch durch Arbeiten von Barocas et al. und Volpe et al. gestützt (Barocas, Rohan et al. 2006, Volpe, Kachura et al. 2007).

In den letzten Jahren wurden vermehrt perkutane Tumorbiopsien durchgeführt. Sie dienen der Diagnostik bei Tumoren mit unklarer Dignität in der Bildgebung, als Entscheidungshilfe bei kleineren Tumoren im Rahmen der aktiven Überwachung und bei der Auswahl der passenden Systemtherapie bei metastasierten NZK sowie zur Probengewinnung vor ablativen Therapiemaßnahmen. Gemäß der aktuellen EAU-Guidelines 2018 ist zum Bestimmen der Malignität, Histologie und des Gratings eine Stanzbiopsie mit oder ohne Feinnadelaspiration möglich. Bei soliden renalen Tumoren ist die Stanzbiopsie der Feinnadelaspiration jedoch vorzuziehen. Unter der Vermeidung nekrotischer Areale (bei größeren Raumforderungen daher Probenentnahme vorzugsweise aus den peripheren Tumoranteilen) sollten mindestens zwei nicht-fragmentierte Stanzpräparate mit > 10 mm Länge gewonnen werden. Die

Biopsie kann je nach Lage und Darstellbarkeit in der Bildgebung Ultraschall- oder CT-assistiert unter Lokalanästhesie in koaxialer Technik durchgeführt werden; es empfiehlt sich, hierzu eine 18-Gauge-Nadel zu verwenden, da so ausreichend Gewebe zu diagnostischen Zwecken gewonnen werden kann (Breda, Treat et al. 2010). Unter Verwendung der koaxialen Technik mit der Entnahme multipler Biopsien hat es in den vergangenen Jahren keine Berichte über Stichkanalmetastasen gegeben. Auch im Rahmen der Punktion sind Blutungen in Form von relevanten transfusionspflichtigen Hämatomen oder ein Pneumothorax laut Literatur nur sehr selten aufgetreten (1-2 %) (Volpe, Finelli et al. 2012). Gemäß der S3-Leitlinie beläuft sich die Sensitivität bei einer Spezifität von 100 % auf 93,5 bis 97,7 %, die Bestimmung des Fuhrmann-Grades im Rahmen einer Biopsie ist bisher jedoch noch recht ungenau (46 bis 76 %) und könnte in Zukunft möglicherweise durch den Einsatz molekularer Marker verbessert werden (Onkologie 2017).

Die S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Urologie aus dem Jahre 2017 empfiehlt eine Biopsie nur dann, wenn das weitere therapeutische Vorgehen davon beeinflusst wird. Aufgrund der hohen diagnostischen Genauigkeit der abdominalen Bildgebung ist eine Tumorbio-opsie bei körperlich sonst gesunden Patienten mit einer hohen Lebenserwartung sowie einem malignitätsverdächtigen kontrastmittel-anreichernden renalen Herd in der Computertomografie oder Magnetresonanztomografie präoperativ nicht notwendig.

2.1.4. Histologie

Das NZK ist zumeist am oberen Nierenpol lokalisiert und in 85 % der Fälle ein Tumor epithelialen Ursprungs (Kirkali Z 2011). Generell gilt es als ein stark immunogener Tumor, histologisch gesehen handelt es sich jedoch um eine sehr heterogene Erkrankung (siehe Abbildung 1). Dies hat zur Folge, dass 4-7 % aller NZK nicht eindeutig klassifiziert werden können und daher als „unklassifizierte Nierenzellkarzinome (NOS)“ bezeichnet werden. Sie setzen sich aus mehreren histologischen Komponenten zusammen oder lassen keine eindeutige Differenzierung erkennen. (Stohr, Amann et al. 2013) (Algaba, Akaza et al. 2011)

Die histologische Klassifikation des Nierenzellkarzinoms geht auf Kovacs zurück (Kovacs G 1997) und wurde unter Berücksichtigung neuer Erkenntnisse hinsichtlich Pathologie, Epidemiologie und Genetik regelmäßig überarbeitet, zuletzt in der Vancouver Klassifikation (Strigley, Delahunt et al. 2013) und in der aktuellen WHO Klassifikation aus dem Jahre 2016 (Moch, Cubilla et al. 2016). Sie beinhaltet auch benigne epitheliale Neoplasien der Niere wie das papilläre Adenom und das Onkozytom. Eine wichtige Neuerung im Rahmen der WHO-Klassifikation ist die Auflistung translokationsassoziierter Nierentumore (Ewing-Sarkom, sy-

noviales Sarkom, mesoblastisches Nephrom und klarzelliges Sarkom), da es sich hierbei um selten auftretende Tumoren handelt, für die sich jedoch im Falle einer korrekten Diagnosestellung teils wichtige Änderungen hinsichtlich Behandlung und verbesserter Prognose ergeben.

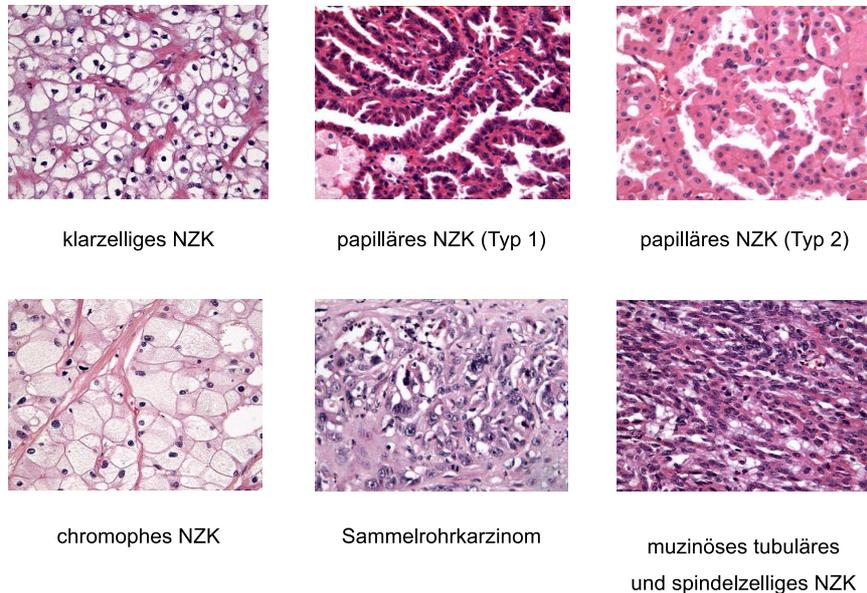


Abbildung 1 Histologische Subtypen des Nierenzellkarzinoms

Quelle: Current Pathology Keys of Renal Cell Carcinoma, EAU 2011

2.1.5. Hereditäre Nierenzellkarzinome

Bei jungen Patienten mit multifokalen oder bilateralen NZK sollte immer eine hereditäre Erkrankung in Betracht gezogen werden; diese tritt ursächlich in 2-3 % der Fälle auf. Nierenzellkarzinome treten bei 40-50 % der Genträger und in der Regel erst gegen Ende der dritten Lebensdekade auf. Eine Übersicht über die häufigsten hereditären Nierenzellkarzinome findet sich in Tabelle 1 (Eble, Sauter et al. 2004).

Von großer Relevanz ist die genetische Veränderung des Von Hippel-Lindau-Gens (VHL), die sich am häufigsten beim klarzelligen NZK findet (Poston, Jaffe et al. 1995). In einer Vielzahl der Fälle manifestiert sich die Erkrankung um das 25. Lebensjahr als retinales Angiom. Neben Niere und Auge zählen ZNS, Nebennieren, Pankreas, Innenohr und Nebenhoden zu den weiteren möglichen Manifestationsorten (Goldfarb 1998). Je nach Auftreten eines zusätzlichen Phäochromozytoms wird das VHL-Syndrom in verschiedene Subtypen eingeteilt. Bei etwa 76 % der Patienten finden sich multifokal oder bilateral renale Zysten, die häufig mit Karzinomzellen ausgekleidet sind. In 24-28 % entwickeln sich Nierenzellkarzinome, sie gel-

ten trotz häufig geringer Größe und Begrenzung auf die Niere als potentiell hoch maligne und frühzeitig metastasierende Tumore.

Tabelle 1 Hereditäre Nierenzellkarzinome

Syndrom	Gen	Chromosom	Niere	Haut	Andere Gewebe
von Hippel-Lindau	<i>VHL</i> pVHL	3p25	Multiple, bilaterale klarzellige NZK (CCRCC), Nierenzysten	-	Retinale und zerebrale Hämangioblastome, Phäochromozytom, Pankreaszysten und neuroendokrine Tumore, Innenohrtumore, Zystadenome des Nebenhodens
Hereditäres papilläres NZK	<i>c-MET</i> HGF-R	7q31	multiple, bilaterale papilläre NZK (PRCC) Typ 1	-	-
Hereditäre Leiomyomatose und NZK-Syndrom	<i>FH</i> FH	1q42-43	Papillary renal cell carcinoma (PRCC), non-Type 1	Leiomyome	Leiomyome und Leiomyosarkome des Uterus
Birt-Hogg-Dubé	<i>BHD</i> Folliculin	17p11.2	Multiple chromophobe NZK, conventional RCC, Onkozytom, papilläres NZK	Faziale Fibrofollikulome	Pulmonale Zysten, Spontan-Pneumothorax
Tuberöse Sklerose	<i>TSC1</i> Hamartin <i>TSC2</i> Tuberin	9q34 16p13	Multiple, bilaterale Angiomyolipome, Lymphangioliomyome	Kutane Angiofibrome (,adenoma sebaceum') <i>peau chagrin</i> , subunguale Fibrome	Kardiale Rhabdomyome, adenoide Polypen des Dünndarms, pulmonale und renale Zysten, subependymale Knötchen und Riesenzellastrozytome (SEGA)
Konstitutionelle Chromosom 3-Translokation	Unbekannt	Unbekannt	Multiple, bilaterale klarzellige NZK (CCRCC)	-	-

Quelle: modifiziert nach Eble, Sauter et al. (2004). "WHO Classification of Tumours - Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs."

2.1.6. Klassifikation und Stadieneinteilung

Staging und Grading sind wichtig für die Einschätzung des Stadiums der Tumorerkrankung und der Prognose sowie für die Therapieplanung.

In die zum Staging verwendete international gebräuchliche TNM-Klassifikation fließen neben der Größe des Primärtumors (T) auch der Lymphknotenbefall (N) und das Vorliegen von Fernmetastasen (M) ein. Hierzu werden neben der klinischen Untersuchung eine Bildgebung und ein Laborbefund benötigt, außerdem eine während der Operation entnommene Biopsie bzw. ein Operations-Präparat.

Das Staging des NZK erfolgt nach der TNM-Klassifikation (UICC 2017, 8. Auflage) (Brierley, Gospodarowicz et al. 2017), welche in den letzten Jahren mehrfach verändert wurde. Eine Übersicht gibt die Tabelle 3 (Eggner 2010). Die 8. Auflage beinhaltet keine wesentlichen Änderungen und entspricht der 7. Auflage.

Weiterhin gilt gemäß der TNM-Klassifikation: Lymphknotenbefall **N1**: Solitäre regionäre LK (< 2 cm) (regionär = perirenal und paraaortal), **N2**: Multiple regionäre LK (> 2 cm bis 5 cm), **N3**: Multiple regionäre LK (> 5 cm), Fernmetastasen **M0**: keine, **M1**: Fernmetastasen.

Anhand histologischer Untersuchungen wird nach Differenzierungsgrad des Tumorgewebes dem UICC-Schema gemäß das Grading vorgenommen: Grad 1 (G1) - gut differenziertes bösartiges Gewebe („low-grade“), hohe Übereinstimmung mit Ursprungsgewebe; Grad 2 (G2) – mäßig differenziertes bösartiges Gewebe; Grad 3 (G3) – schlecht differenziertes bösartiges Gewebe; Grad 4 (G4) – undifferenziertes bzw. anaplastisches bösartiges Gewebe („high-grade“); Grad 9 (G9) – Grad der Differenzierung nicht beurteilbar. Im Falle des NZK wird das Grading nach Fuhrmann (Fuhrmann, Lasky et al. 1982) angewandt.

Tabelle 2 Grading nach Fuhrmann

Grad	Kerngröße in µm	Kernform	Chromatin	Nukleolen
I	unter 10	rund	dicht	unauffällig
II	15	rund	fein-granulär	klein, nicht sichtbar bei 10facher Vergrößerung
III	20	rund/oval	grob-granulär	prominent

Quelle: eigene Darstellung

Tabelle 3 Übersicht über die TNM-Klassifikationen des Nierenzellkarzinoms

	4. Edition, 1987	5. Edition, 1997	6. Edition, 2002	7. Edition, 2010
T1	organbegrenzt, ≤ 2,5 cm	organbegrenzt, ≤ 7 cm	NA	NA
T1a	∅	∅	organbegrenzt, ≤ 4 cm	organbegrenzt, ≤ 4 cm
T1b	∅	∅	organbegrenzt, 4-7 cm	organbegrenzt, 4-7 cm
T2	organbegrenzt, > 2,5 cm	organbegrenzt, > 7 cm	organbegrenzt, > 7 cm	NA
T2a	∅	∅	∅	organbegrenzt, 7-10 cm
T2b	∅	∅	∅	organbegrenzt, > 10 cm
T3a	Perirenales Gewebe oder kontinuierlich in Nebenniere	Perirenales Gewebe oder kontinuierlich in Nebenniere	Perirenales Gewebe, renaler Sinus oder kontinuierlich in Ne- benniere	Perirenales Gewebe, renaler Sinus oder Nierenvene mit seg- mentalenen Ästen
T3b	Nierenvene	Nierenvene oder Vena cava unter- halb des Diaphrag- mas	Nierenvene oder Vena cava unterhalb des Diaphragmas	Vena cava unterhalb des Diaphragmas
T3c	Vena cava unterhalb des Diaphragmas	Vena cava oberhalb des Diaphragmas	Vena cava oberhalb des Diaphragmas	Vena cava oberhalb des Zwerchfells oder Infiltration der Wand der Vena cava
T4	Infiltration über Gerota-Faszie hinaus oder Vena cava oberhalb des Dia- phragmas	Infiltration über Gerota-Faszie hin- aus	Infiltration über Gerota-Faszie hinaus	Infiltration über Gerota-Faszie hinaus, Nebenniere einge- schlossen
NA = nicht anwendbar				

Quelle: Eggener, S. (2010). "TNM staging for renal cell carcinoma: time for a new method."

2.1.7. Therapie des Nierenzellkarzinoms

Primäre Ziele in der Therapie des Nierenzellkarzinoms sind: ein bestmögliches onkologisches Ergebnis - eine Kuration, der Erhalt der renalen Funktion und einer bestmöglichen Lebensqualität mit geringer Morbidität und Mortalität des Eingriffes für den Patienten. Die nachfolgenden Therapieoptionen werden daher immer individuell für und mit dem Patienten besprochen und gegebenenfalls angepasst.

2.1.7.1. Aktive Überwachung

Im Gegensatz zu anderen malignen Tumorerkrankungen wie zum Beispiel dem Prostatakarzinom liegen beim NZK weder Tumormarker zur Verlaufskontrolle noch eine in jedem Fall erfolgte histologische Sicherung vor einer operativen Therapie vor. Das Konzept einer aktiven Überwachung richtet sich daher primär nach der Tumorgöße (in der Regel bis 4 cm, sogenannte „small renal mass“ (SRM)) nach bioptischer, histologischer Sicherung. Bei kleinen renalen Tumormassen < 4 cm kombiniert mit reduziertem Allgemeinzustand und reduzierter Lebenserwartung des Patienten sollte initial eine engmaschige Überwachung erfolgen, bei schnellem Wachstum oder dem Erreichen eines Durchmessers von > 4 cm dann eine Therapie mit kurativer Intention in Erwägung gezogen werden (Jewett, Mattar et al. 2011, Lane, Tobert et al. 2012).

Tumoren kleiner als 4 cm werden häufig im Stadium cT1a bei älteren Patienten diagnostiziert. Da bis zu 20 % dieser Tumoren benigne sind und ein langsames Wachstumsmuster sowie eine geringe Metastasierungstendenz aufweisen, wird bei komorbiden Patienten initial eine engmaschige Überwachung einem interventionellen Ansatz vorgezogen (Mason, Abdolell et al. 2011, Volpe 2016). Hinzu kommt, dass in der Altersgruppe > 75 Jahre 14 % der Patienten bereits eine stark ausgeprägte Niereninsuffizienz aufweisen (Roos and Thuroff 2011) und so die Aufrechterhaltung der Nierenfunktion von essentieller Bedeutung ist.

2.1.7.2. Operative Therapie

Die operative Therapie gilt als einziger kurativer Ansatz und somit unabhängig von der histologischen Entität und der Aggressivität des Tumors als Goldstandard (Onkologie 2017, Ljungberg, Albiges et al. 2018)

Die EAU-Guidelines (Ljungberg, Albiges et al. 2018) empfehlen bei Nierenzellkarzinomen im Stadium T1 eine Nierenteilresektion, bei größeren Tumoren eine radikale Nephrektomie. Bei der Nierenteilresektion wird die imperative von der elektiven Indikation zur Nierenteilresektion unterschieden. Eine imperative Nierenteilresektion ist obligat bei vorbestehender Niereninsuffizienz, bei kontralateralem Tumorbefall sowie bei Patienten mit nur einseitig angelegter Niere. „Nephron sparing surgery“ (NSS) im Sinne einer partiellen Nephrektomie ist die erste Wahl bei nicht metastasiertem NZK und hat sich als vergleichbare Alternative zu der immer seltener durchgeführten Heminephrektomie und Nephrektomie erwiesen (Becker, Roos et al. 2011, Fernando, Fowler et al. 2016). Dies gilt in ausgesuchten Fällen auch für Tumore ≥ 7 cm (Janssen, Linxweiler et al. 2018). Bei präoperativer Computertomografie ohne Nachweis von Metastasierung oder Invasion der Nebenniere ist keine Adrenalektomie indiziert, ebenso keine erweiterende Lymphadenektomie (Bekema, MacLennan et al. 2013). Eine Tumorembolisation sollte laut EAU-Leitlinie 2018 der Symptomkontrolle im Rahmen des palliativen Regimes vorbehalten bleiben (May, Brookman-Amisshah et al. 2009).

Die elektive Indikation einer Nierenteilresektion wird bei möglicher R₀-Resektion bis zu einem Tumordurchmesser von 7 cm gestellt. Vorteilhaft sind eine bessere Erhaltung der Nierenfunktion (MacLennan, Imamura et al. 2012) und ein reduziertes Risiko hinsichtlich chronischen Nierenversagens. Potentiell von Nachteil kann ein erhöhtes Lokalrezidivrisiko aufgrund unzureichender Resektionsränder sein. Bei Patienten mit einem NZK im Stadium T1b-T3 zeigt die laparoskopische partielle Nephrektomie (LPN) im Vergleich zur laparoskopischen radikalen Nephrektomie (LRN) neben einem vergleichbaren onkologischen Outcome einen geringeren Abfall der GFR sowie einen geringeren Prozentsatz an Patienten mit einem Anstieg des CKD-Stadiums (0 % vs. 12 %). Im Rahmen des medianen Follow-Ups (LRN 57 Monate, LPN 44 Monate) erwiesen sich Gesamtüberleben, Nierenkarzinom-spezifische Mortalität und Rezidivraten als äquivalent. (Simmons, Weight et al. 2009)

Die offene radikale Nephrektomie wird aufgrund der vergleichbaren 5-Jahres-Überlebensrate, eines möglichen späteren Auftretens eines NZK oder einer Verschlechterung (new-onset chronic kidney disease – CKD) der kontralateralen Niere sowie der sich durchsetzenden abwartenden Haltung bei kleineren renalen Raumforderungen in Frage gestellt und sollte laut EAU-Guidelines 2018 Tumoren vorbehalten bleiben, bei denen eine partielle Nephrektomie technisch nicht möglich ist oder außer Frage steht. Dies ist der Fall bei einem sich als schwierig gestaltenden operativen Zugangsweg, bei einem insgesamt schlechten Allgemeinzustand des Patienten sowie bei einem lokal ausgedehnten Tumorbefund und großen Tumoren, da bei partieller Nephrektomie und nicht erfolgreicher R₀-Resektion das Lokalrezidivrisiko steigt (Van Poppel, Becker et al. 2011).

2.1.7.3. Nachsorge

Nach erfolgter Therapie sollten die Patienten in regelmäßigen Abständen gemäß dem aktuellen Nachsorgeschema aus den EAU-Guidelines 2018 (vergleiche Tabelle 4) urologisch nachbetreut werden. Die in den Leitlinien vorgeschlagene Einteilung der Risikogruppe erfolgt nach Lokaloperation - geringes Risiko = pT1a/b cN0 cM0 G1-2; mittleres Risiko = pT1a/b cN0 cM0 G3, pT2 c/pN0 cM0 G1-2, ablative Therapie bzw. R1-Situation eines ansonsten „low risk“ Karzinoms; hohes Risiko = pT2 c/pN0 cM0 G4, pT3-4 u./o. pN+.

Tabelle 4 Nachsorgeschema aus den aktuellen EAU-Guidelines 2018

Risikoprofil	6 Monate	1 Jahr	2 Jahre	3 Jahre	> 3 Jahre
gering	US	CT	US	CT	CT alle 2 Jahre
mittel/hoch	CT	CT	CT	CS	CT alle 2 Jahre

Quelle: EAU-Guidelines 2018

CT = Computertomografie Thorax und Abdomen, alternativ Magnetresonanztomografie des Abdomens; US = Ultraschall Abdomen, Nieren und Nierenbett

2.1.7.4. Systemische Therapie

Wie eingangs schon erwähnt liegt bei ungefähr einem Drittel der Patienten bei Erstdiagnose bereits ein lokal invasives oder bereits metastasiertes Stadium des NZK vor. Bei ca. 25 % der Patienten kommt es trotz primär kurativ erfolgtem Therapieansatz zu einem Rezidiv (Chae, Kim et al. 2005), sodass eine systemische Therapie in Erwägung gezogen werden muss. Leider hat sich das NZK aufgrund seines erhöhten p-Glykoprotein (p-GP)-Expressionslevels (Familie der ABC-Transporter) (Nishiyama, Shirahama et al. 1993) als resistent gegenüber den gängigen zytotoxischen Chemotherapeutika erwiesen (Amato 2000).

Die Therapie des metastasierten NZK erfolgt risikostratifiziert. Unterschiedliche Scoring-Systeme sind in der klinischen Anwendung, am weitesten verbreitet ist das MSKCC (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center)-Scoringssystem, in den als Kenngrößen der Karnofsky-Index (< 80 %), ein um mehr als das 1,5fach erhöhter LDH-Spiegel, ein erhöhtes Serum-Calcium, ein erniedrigter Hämoglobin-Wert und die Zeit von Erstdiagnose bis Behandlung (< 1 Jahr) einfließen. Je nach Punktzahl ergeben sich folgende Prognosen: 0 Punkte = günstige Prognose, 1-2 Punkte = intermediäre Prognose, > 2 Punkte = ungünstige Prognose (Motzer, Mazumdar et al. 1999). Das mediane Überleben mit günstiger Prognose liegt bei 30 Mona-

ten, bei intermediärer Prognose bei 14 Monaten und bei schlechter Prognose bei circa 5 Monaten (Ljungberg, Bensalah et al. 2013).

Heute sind zur systemischen Therapie des Nierenzellkarzinoms neben den immunmodulatorischen, unspezifischen Zytokinen (IL-2 und INF-gamma) die große Gruppe der Multi-Kinase-Inhibitoren zugelassen, die auch als targeted therapy bezeichnet werden. In den letzten zwei Jahren wurden aus der Gruppe der Checkpoint-Inhibitoren mehrere Substanzen auf Ihre Wirksamkeit getestet und einzelne zur Sequenz nach Versagen eines Multi-Kinase-Therapeutikums zugelassen (Onkologie 2017).

2.1.7.4.1. Targeted therapy

Grundlage der sogenannten „targeted therapy“ ist das duale Wirkprinzip mit Hemmung der Angiogenese und direkter Hemmung der Tumorzellen. In diesem Falle relevant für die Therapie eines klarzelliges NZK ist die Beeinflussung des Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktors HIF- α durch das VHL-Gen, da es durch die VHL-Inaktivierung zu einer Akkumulation des HIF- α und somit zu einer verstärkten Expression von Wachstumsfaktoren wie VEGF, PDGF, TGF α , EGFR und CAIX kommt. Es folgen Angiogenese, Proliferation und konsekutiv eine weitere Metastasierung. Eine weitere Funktion des VHL-Gens ist die p53-Stabilisierung sowie die Veränderung der primären Zilien, die zu einer Zystenbildung mit Karzinomentstehung zu führen scheint (Thoma, Frew et al. 2007).

Therapieansatzpunkte sind neben dem Ersatz der VHL-Proteinfunktion also auch die Regulation des HIF- α . Die Blockade des VEGF-Signalweges erfolgt mithilfe des monoklonalen Antikörpers Bevacizumab (Avastin[®]) (Rini, Halabi et al. 2010), der Tyrosinkinase-Inhibitors wie Sunitinib (Sutent[®]) (Motzer, Hutson et al. 2007), Sorafenib (Nexavar[®]) (Escudier, Eisen et al. 2007) und Pazopanib (Votrient[®]) (Sternberg, Davis et al. 2010), oder auch der Multi-Kinase-Inhibitoren wie Axitinib (Inlyta[®]) (Rini, Escudier et al. 2011), Cabozantinib (Cabometyx[®]) (Choueiri, Escudier et al. 2016), Lenvatinib (Lenvima[®]) (Motzer, Hutson et al. 2015) und Tivozanib. Der m-TOR-Signalweg wird mittels der mTOR-Inhibitoren Temsirolimus (Torisel[®]) (Hudes, Carducci et al. 2007) und Everolimus (Certican[®]) (Motzer, Escudier et al. 2008) blockiert, die therapeutische Bedeutung dieser Substanzklasse ist in den letzten Jahren jedoch deutlich zurückgegangen.

2.1.7.4.2. Checkpoint-Inhibitoren

Im Jahr 2016 wurde erstmalig auch ein als PD1-Inhibitor fungierender Checkpoint-Inhibitor (Nivolumab, Opdivo®) zur Behandlung von Patienten mit fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom nach Vortherapie zugelassen. Die Substanz wurde klinisch im Vergleich zur Therapie mit Everolimus als Standardtherapie untersucht. Nivolumab zeigte hier einen signifikanten Vorteil im Hinblick auf das Gesamtüberleben. (Topalian, Hodi et al. 2012, McDermott, Drake et al. 2015, Zhang, Xie et al. 2016, Mazza, Escudier et al. 2017). Aktuell laufen mehrere Phase-III-Studien zur Erstlinientherapie mit Checkpoint-Inhibitoren, die neben Nivolumab auch Atezolizumab, Avelumab, Pembrolizumab auch in Kombination mit Target-Therapien untersuchen.

Bei klarzelligen Nierenzellkarzinomen werden bei günstigem oder intermediärem Risiko als „First line“-Therapie momentan empfohlen: Sunitinib (Sutent®), Bevacizumab (Avastin®) plus Interferon und Pazopanib (Votrient®) sowie alternativ hochdosiert IL2. Bei ungünstigem Risiko zugelassen sind Temsirolimus (Torisel®) sowie Pazopanib (Votrient®) oder Sunitinib (Sutent®). Als „Second line“-Therapie nach vorausgegangener Zytokin-Gabe: Axitinib (Inlyta®) und alternativ Pazopanib (Votrient®) und Sorafenib (Nexavar®), nach VEGF-Versagen: Cabozantinib (Cabometyx®) oder Nivolumab (Opdivo®) sowie alternativ nach Sunitinib-Gabe Axitinib (Inlyta®) oder Everolimus (Certican®) mono sowie in Kombination mit Lenvatinib (Lenvima®), nach Temsirolimus (Torisel®): Axitinib (Inlyta®), Cabozantinib (Cabometyx®), Pazopanib (Votrient®), Sorafenib (Nexavar®) oder Sunitinib (Sutent®). Als „Third line“-Therapie empfohlen wird Everolimus (Certican®).

Tabelle 5 Systemtherapieoptionen gemäß Risikoprofil

Therapielinie	Risikoprofil	Standard	Option
Erstlinie	günstig/intermediär	Bevacizumab + IFN Pazopanib Sunitinib	hochdosiertes IL2
	ungünstig	Temsirolimus	Pazopanib Sunitinib
Zweitlinie	nach Zytokinen	Axitinib	Pazopanib Sorafenib
	nach VEGF- Versagen	Cabozantinib Nivolumab	Axitinib (nach Sunitinib) Everolimus (+ Lenvatinib)
	nach Temsirolimus	Axitinib Cabozantinib Pazopanib Sorafenib Sunitinib	

Quelle: Modifiziert nach S3 Leitlinie

Vor dem Hintergrund der aktuellen Studienlage zu Checkpoint-Inhibitoren finden sich in den aktuellen EAU-Guidelines von 2018 folgende Neuerungen hinsichtlich der systemischen Erst-, Zweit- und Drittlinientherapie (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6 Neuerungen der Systemtherapieoptionen

Risikoprofil	Erstlinie	Zweitlinie	Drittlinie
günstig	Sunitinib oder Pazopanib	Cabozantinib oder Nivolumab	Cabozantinib oder Nivolumab
intermediär o. ungünstig	Ipilimumab/ Nivolumab	Cabozantinib oder VEGF-Inhibitor	Cabozantinib oder alternative target-Therapie
	Cabozantinib, Sunitinib oder Pazopanib*	VEGF-Inhibitor oder Nivolumab	alternative target-Therapie oder Nivolumab

Quelle: Modifiziert nach EAU-Guidelines 2018

* Pazopanib nur bei intermediärem Risiko

2.1.7.5. Alternative Therapieoptionen

Im Zusammenhang mit einem raschen Wachstum oder dem Erreichen eines Durchmessers von > 4 cm im Rahmen der engmaschigen Überwachung stellt die perkutane Kryoablation einen möglichen Therapieansatz dar. In einer Studie (Thompson, Atwell et al. 2014) zur Untersuchung einer partiellen Nierenteilresektion versus perkutane Kryoablation versus Nephrektomie konnte für die Stadium pT1a und pT1b gezeigt werden, dass die partielle Nephrektomie und die Kryoablation sowohl bezüglich der Lokalrezidivrate als auch des Metastasen-freien Gesamtüberlebens gleichwertig waren. Bei Hochrisiko-Patienten mit low-grade Tumoren und hohem präoperativem Eingriffsrisiko, bei denen eine engmaschige Überwachung im Sinne des „Watchful waiting“ nicht in Frage kommt, stellt also die ablative Therapie eine Therapieoption dar (Kunkle, Egleston et al. 2008, Chen and Uzzo 2009, Van Poppel, Becker et al. 2011).

Die Datenlage zur Radiotherapie hat laut aktueller S3-Leitlinie (Onkologie 2017) keinen signifikanten Überlebensvorteil ergeben, ihr Stellenwert liegt vor allem in der lokalen Symptomkontrolle bei ossär und zerebral metastasierten NZK. Insgesamt ist die Studienlage jedoch aufgrund verschiedener Studienvoraussetzungen und –grundlagen sehr heterogen (Parashar, Patro et al. 2014).

2.2. Regulatorische T-Zellen (T_{reg})

Anfang der 1970iger Jahre stellten Gershon et al die Hypothese auf, dass eine Subgruppe von T-Zellen möglicherweise eine immunhemmende Funktion haben und somit den Ablauf der Immunantwort regulieren könnte (Gershon, Cohen et al. 1972). Die Existenz dieser sogenannten regulatorischen T-Zellen (früher: T-Suppressorzellen) wurde Mitte der neunziger Jahre mit der Entdeckung der CD25-exprimierenden CD4⁺-T-Zellen durch Sakaguchi et al. endgültig belegt. Es konnte gezeigt werden, dass die Depletion von CD25⁺CD4⁺-T-Zellen Autoimmunkrankheiten auslöste und die Immunantwort gegen fremde Antigene verstärkte. Gleichzeitig konnte jedoch durch den Co-Transfer der CD25⁺CD4⁺-T-Zellen das Auftreten von Autoimmunkrankheiten dosisabhängig verhindert werden (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 1995). Zudem konnten CD25⁺CD4⁺-T-Zellen die Proliferation und IL-2-Produktion anderer CD25⁺CD4⁺-T-Zellen durch direkten Zellkontakt inhibieren (Thornton and Shevach 1998).

Die Hypothese, dass es sich bei den T_{reg} -Zellen um eine eigene Zellentität handelt, wurde durch die Entdeckung des Transkriptionsfaktors FOXP3 (Brunkow, Jeffery et al. 2001, Fontenot, Gavin et al. 2003, Hori, Nomura et al. 2003) gestützt, dessen Expression eine Konversion der CD25⁺CD4⁺-T-Zellen zu CD25⁺CD4⁺-T-Zellen zur Folge hat (Hori, Nomura et al. 2003).

2.2.1. Oberflächenmarker

Die heterogene Beschaffenheit der T_{reg} -Population führt zu einer Vielzahl von phänotypischen Markern. Die intrazelluläre Lage des spezifischen Transkriptionsfaktors FOXP3 erfordert eine vorherige Fixierung und Permeabilisierung der Zellen, was eine nachfolgende funktionelle Analyse der Zellen unmöglich macht. Dass eine zuverlässige Identifizierung der regulatorischen T-Zellen jedoch auch ohne eine direkte FOXP3-Bestimmung möglich ist, konnte unter anderem in der Arbeit von Presser et al. (Presser, Sester et al. 2009) gezeigt werden.

Basierend auf unserer Literaturrecherche haben wir zur Identifizierung der regulatorischen T-Zellen und deren funktioneller Subgruppen folgende Oberflächenmarker parallel gemessen: CD4, CD8, CD25 als α -Kette des IL2-Rezeptors (Borsellino, Kleinewietfeld et al. 2007) sowie CD127 als α -Kette des IL7-Rezeptors (Liu, Putnam et al. 2006). Mit steigendem FOXP3-Expressionslevel sinkt die CD127-Expression (Liu, Putnam et al. 2006), sodass T_{reg} -Zellen als CD4⁺CD25⁺CD127⁻FOXP3⁺-T-Zellen zu sehen sind.

Des Weiteren gemessen wurde CD39, eine NTPDase mit ATPase-Aktivität, die 90 % der FOXP3⁺-T_{reg}-Zellen konstitutiv exprimieren (Borsellino, Kleinewietfeld et al. 2007, Mandapathil, Lang et al. 2009). Durch das perizellulär entstehende inhibitorisch und anti-proliferativ wirkende Adenosin (Robson, Seigny et al. 2006) ermöglicht es die Identifikation und Isolierung von über 90 % der FOXP3⁺-T_{reg}-Zellen mit hoher Suppressoraktivität (Mandapathil, Lang et al. 2009).

Ebenso verwendet wurden CD28, welches durch Co-Stimulation auf der Oberfläche der sich entwickelnden Thymozyten die konstitutive Expression von FOXP3 induziert (McHugh, Whitters et al. 2002) sowie die Homing-Rezeptoren CD62L (Berg, McEvoy et al. 1993) und CD45RO (Valmori, Merlo et al. 2005). Letzterer ermöglicht die Unterscheidung zwischen naiven (CD45RA) und aktivierten (CD45RO) T_{reg}-Zellen (Ruitenbergh, Boyce et al. 2011).

In unseren Antikörperansätzen sind außerdem vertreten: CD272 als BTLA-Äquivalent sowie CD279, ein Glykoprotein der CD28-Familie für weitergehende, spätere Untersuchungen.

2.3. Rationale für die Arbeit

Neben der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen peripherer Toleranz und Autoimmunität sind die regulatorischen T-Zellen in ihrer Rolle als Immunsuppressoren auch relevant im Rahmen der Entwicklung sogenannter „Tumor-Escape-Mechanismen“. Die Modulation der immunologischen Toleranz durch T_{reg}-Zellen kann dazu führen, dass diese durch ihre immunsuppressive Wirkung die Erkennung und Immunreaktion gegen den Tumor abschwächen (Curiel 2007). Am murinen Modell *in vitro* und *in vivo* konnte nachgewiesen werden, dass die Depletion der CD4⁺CD25⁺-T_{reg}-Zellen zu einer verbesserten endogenen Immunsystem-vermittelten Tumorabwehr durch tumorspezifische CD8⁺-zytotoxische T-Zellen und nicht-tumorspezifische zytotoxische CD4⁺-NK-Zellen führt (Shimizu, Yamazaki et al. 1999). Dies wurde in der Melanomforschung im murinen Modell *in vivo* bestätigt, außerdem konnte gezeigt werden, dass sich durch die Depletion (Steitz, Brück et al. 2001) und deren Kombination mit einer CTLA-4-Blockade (Sutmoller, Van Duivenvoorde et al. 2001) die Wirksamkeit der IFN- α -Immuntherapie verbessert.

Bei Patienten mit epithelialen Tumoren (Wolf, Wolf et al. 2003) und Adenokarzinomen der Brust und des Pankreas (Liyanage, Moore et al. 2002) ist die Anzahl der regulatorischen T-Zellen sowohl im peripheren Blut als auch im Tumorgewebe und den Lymphabflusswegen signifikant erhöht (Woo, Chu et al. 2001). Dies ist auch der Fall bei Patienten mit Nierenzellkarzinomen. Hier zeigte sich bei immunhistochemischen Analysen eine erhöhte Dichte der

T_{reg}-Zellen vor allem in den Randbereichen des Tumors (Sell, Barth et al. 2012). Dies führt zu der Annahme, dass die T-Effektorzellen in diesem Bereich durch die T_{reg}-Zellen aktiv gehemmt werden.

Zur Analyse der Subpopulationen wurden die Tumorproben aus der Klinik für Urologie und Kinderurologie zunächst von Dr. M. Janssen durch Zugabe von Kollagenase enzymatisch aufbereitet und untersucht. Nachdem sich hier zeigte, dass die Anwendung der Kollagenase einen signifikanten Einfluss auf die Auswertbarkeit unterschiedlicher Oberflächenmarker hat, ergab sich die Notwendigkeit der Erarbeitung eines Kollagenase-freien Protokolls. Dabei galt es zu beachten, dass insbesondere im Hinblick auf die ohnehin niedrig-frequenten T_{reg}-Subpopulationen zur immunologischen Analyse eine signifikante Zellzahl notwendig ist. Dank der verbesserten Diagnostik und der aktuell mehrheitlich durchgeführten Nierenteilresektion fallen meist nur kleine Tumorproben an, somit ist die für wissenschaftliche Fragestellungen zur Verfügung stehende Tumorgewebemenge stark reduziert.

Ziel unseres Projektes war daher die Etablierung eines standardisierbaren Protokolls zur rein mechanischen und Kollagenase-freien Herstellung einer Einzel-Zellsuspension aus frischem Nierentumorgewebe zur Untersuchung der tumorinfiltrierenden T-Zellen. Hierbei sollte auch aus einer kleinen Tumorgewebeprobe eine möglichst große Anzahl vitaler Zellen zur hochauflösenden durchflusszytometrischen Analyse gewonnen werden. Dazu wurde das in der Klinik etablierte Standardprotokoll des Gewebeaufschlusses mittels Kollagenase mit der rein mechanischen Separation mit Hilfe des MiniLys©-Systems und eines Vortex-Geräts sowie mit der kombiniert enzymatisch-mechanischen Separation mittels gentleMACS©-System verglichen.

3. Studienkollektiv, Material und Methoden

3.1. Geräte und Reagenzien

3.1.1. Materialien und Geräte

Name	Hersteller
1,5 ml Reagenzgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
2 ml Reagenzgefäße	Eppendorf
5 ml und 50 ml Polypropylen Rundboden Röhren (FACS-Röhren)	Sarstedt, Nümbrecht
15 ml Polypropylen-Röhren (Falcon)	Sarstedt, Nümbrecht
20 ml BD Discardit II Spritzen	Becton Dickinson S.A., Fraga, Spanien
20 ml B. Braun Injekt Spritzen	B. Braun, Melsungen
50 ml Polypropylen-Röhren (Falcon)	Sarstedt, Nümbrecht
BD Falcon cell strainer 40 µm	BD Biosciences, Bedford, MA, USA
Brutschrank (Hera cell 150)	Heraeus, Hanau
Durchflusszytometer BD FACS Canto II	BD Biosciences, Heidelberg
EDTA-Röhren S Monovette	Sarstedt, Nümbrecht
Einmal-Plastikpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht; Costar, Corning, NY, USA
FACS-Röhren 5 ml unsteril	Sarstedt, Nümbrecht
gentleMACS®-Röhren (C tubes)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
gentleMACS®-Roller	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Kolbenhubpipetten (10, 20, 100, 200, 1000 µl)	Gilson / Labmate, Abimed, Langenfeld
Laborfuge GL	Heraeus, Hanau
Megafuge 1.0R (≥ 5 ml Röhren) Ausschwingrotor #2704, Herstellnummer: 40826102	Heraeus, Hanau
Feinwaage KernPBC250-3	Kern+Sohn, Balingen
Mikroskop Olympus CKX31	Olympus, Hamburg
MiniLys Keramik Kit, 1,4 mm, 2 ml Röhren	Bertin Technologies, Bretonneux, Frankreich
MiniLys®-Homogenisator	Bertin Technologies, Bretonneux, Frankreich
Neubauer-Zählkammer mit Deckglas	neolab Migge Laborbedarf, Heidelberg
Pinzette atraumatisch	Gebrüder Martin GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Pipettierhilfe (Pipetboy acu)	Integra Biosciences, Fernwald
Precellys®-Keramik-Kit	Bertin Technologies, Bretonneux, Frankreich
Reaktionsgefäße mit Deckel (1,5 ml)	Gebrüder Martin GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Serum-Röhren S-Monovette	Sarstedt, Nümbrecht
Skalpelle Fig. 10	B. Braun
Sterile Pasteurpipette lang (ungestopft), kurz (gestopft)	Sarstedt, Nümbrecht
Sterile Petrischale	Sarstedt, Nümbrecht
Sterile Pipettenspitzen für Kolbenhubpipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Sterile Werkbank "Clean Air" Typ DLF BSS4 Tecnoflow	Clean Air Technik bv, Woerden, NL Integra Biosciences, Fernwald
MiniLys Keramik Kit, 1,4 mm, 2ml Röhren	Bertin Technologies, Bretonneux, Frankreich
MiniLys®-Homogenisator	Bertin Technologies, Bretonneux, Frankreich
Vortex®-Mixer	Neolab, Heidelberg
Zentrifuge Labofuge GL	Heraeus, Hanau
Zentrifuge 5415C (≤ 1,5 ml Röhren), Rotor F-38-30-6	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugenröhren (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht

3.1.2. Liste der verwendeten Reagenzien

Name	Hersteller
Aqua bidest	B. Braun, Melsungen
BD FACS Lysingsolution (10-fach)	BD Biosciences, Heidelberg
BD FACS Clean	BD Biosciences, Heidelberg
BD FACS Flow	BD Biosciences, Heidelberg
PFA 1 %	BD Biosciences, Heidelberg
BD FACS Shutdown Solution	BD Biosciences, Heidelberg
Collagenase IA 100 U/ml	Sigma, Steinheim

3.1.3. Lösungen

Name	Zusammensetzung
EDTA 10 %	10 g EDTA auf 100 ml mit Aqua dest auffüllen
FACS-Puffer	500 ml PBS (1fach) 25 ml FCS für FACS-Puffer 2,5 g BSA 305 ml 10 % NaN ₃
Lysing-Solution (1fach)	450 ml Aqua dest. 50 ml 10fach Lysing-Solution
PBS-0,02 % EDTA	50 ml PBS 10fach 450 ml Aqua bidest 1 ml 10 % EDTA
PFA 1 %	25 ml 4 % PFA 75 ml PBS (1fach)
RPMI Transportmedium	RPMI-1640 von Sigma (R8758) plus 2 % Penicillin- Streptomycin von Sigma (P4333))
Trypanblau stock (0,4 %)	Trypanblau ready to use = 1 Teil Stock + 9 Teile PBS

3.1.4. Antikörper

Tabelle 7 Antikörper zur durchflusszytometrischen Analyse

Antigen (FLUOROCHROM)	Klon	Ig-Klasse	Firma	Katalognummer
CD4 (APC-H7)	SK3	IgG1	BD	641398
CD8 (V500)	RPA-T8	IgG1	BD	560787
CD25 (V450)	M-A251	IgG1	BD	561257
CD28 (PerCP-Cy5.5)	L293	IgG1	BD	337181
CD39 (APC)	TU66	IgG2b	BD	560239
CD45RO (PE-Cy7)	UCHL-1	IgG2a	BD	337168
CD62L (PE)	DREG-56	IgG1	BD	560966
CD127 (FITC)	eBioRDR5	IgG1	eBioscience	11-1278
CD272 (PE)	J168-540	IgG1	BD	558485
CD279 (PD-1 APC)	MIH4	IgG1	BD	558694

3.2. Methoden

3.2.1. Studienkollektiv

Insgesamt wurden nach ausführlicher Aufklärung und Dokumentation im Rahmen der von der Ethik-Kommission vorgesehenen Einverständniserklärung (Ärztekammer des Saarlandes, #141/14) Proben von 71 Studienteilnehmern untersucht. Zudem wurden demographische, präoperative und onkologische Daten der Studienteilnehmer anonymisiert und prospektiv zur späteren Auswertung erfasst. Es wurden Vollblut- und Gewebeproben entnommen. Die Proben wurden im Rahmen des stationären Aufenthaltes und der operativen Versorgung der Patienten in der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums des Saarlandes gewonnen. Dabei wurde stets darauf geachtet, dass die nachfolgende histopathologische Gewebeuntersuchung in keinem Fall beeinflusst wurde. Die epidemiologischen und klinischen Daten der Patienten, von denen für die vorliegende Arbeit Proben verwendet wurden, sind in Tabelle 8 genauer aufgelistet.

3.2.2. Herkunft des Nierengewebes und Probengewinnung

Zu jedem Patienten wurde ein Differentialblutbild angefertigt. Die Vollblutentnahme (1x EDTA, 1x Serum) erfolgte vor Schnittbeginn des Operateurs, um eine eventuelle Verfälschung durch ausgeschwemmte Tumorzellen zu verhindern. Bis zur Verarbeitung am gleichen Tag wurden die Proben auf Eis gelagert.

Die Gewebeentnahme wurde intraoperativ in der Klinik für Urologie nach vorheriger ausführlicher Aufklärung und unterschriebener Einverständniserklärung der Patienten durchgeführt. Das Nierenteilresektat oder Nephrektomiepräparat wurde im Operationssaal von Dr. M. Janssen unter sterilen Kautelen von peripher nach zentral hin aufgeschnitten und aufgeklappt. Bei der Probenentnahme wurde darauf geachtet, dass mindestens 4 mm Abstand vom gesunden Gewebe zur makroskopisch sichtbaren Tumorgrenze eingehalten wurden. Die Tumor- und die gesunden Gewebeproben wurden mit größter Sorgfalt behandelt und konnten somit mehrfach verwendet werden. Sie wurden in separate, mit RPMI Transportmedium gefüllte Transportröhrchen überführt und bis zur Verarbeitung am gleichen Tag auf Eis gelagert. Zur Beurteilung der Intra- und Inter-Assay-Varianz wurden die Proben bei ausreichender Tumormenge mittels aller unter 3.2.3. bis 3.2.6. genannten Verfahren prozessiert.



Abbildung 2 Exemplarische Fotodokumentation

Die Aufnahmen zeigen die unter sterilen Kautelen erfolgte Probenentnahme von Tumor- sowie gesundem Gewebe, in diesem Fall aus einem Nephrektomiepräparat. Bei der Probenentnahme wurde darauf geachtet, dass mindestens 4 mm Abstand vom gesunden Gewebe zur makroskopisch sichtbaren Tumorgrenze eingehalten wurden. Die Proben wurden in separate, mit Transportmedium gefüllte Transportröhrchen überführt und bis zur Verarbeitung am gleichen Tag auf Eis gelagert. Außerdem wurden je eine Tumorprobe und eine Probe des makroskopisch gesunden Nierengewebes jedes Patienten in der Gewebekbank für Nierentumoren der Klinik für Urologie und Kinderurologie eingelagert. Auf dem Histologieeinsendeschein wurde vermerkt, dass der Tumor für die Studie geöffnet und Gewebe entnommen wurde.

3.2.3. Gewebeaufschluss mittels Kollagenase

Nach der unter 3.2.2. beschriebenen perioperativen Probenentnahme wurde diese umgehend in einem Transportmedium auf Eis gelagert. Unter sterilen Kautelen (Sterilwerkbank) wurde 1 g Frischgewebe in einer Petrischale manuell mit Hilfe zweier Skalpelle (B. Braun

Fig. 10) zerkleinert, bis die Teilstücke eine ungefähre Kantenlänge von einem Millimeter aufwiesen. Anschließend wurden 5 ml Collagenase IA 100 U/ml hinzugegeben und die Probe für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Dann wurde der Inhalt der Petrischale mithilfe einer 5 ml Pipette resuspendiert und in ein 15 ml Polypropylenröhrchen überführt. Dieses wurde in 30°-Schräglagerung für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert, erneut mithilfe einer 5 ml Pipette resuspendiert und ein drittes Mal für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Dann folgte die Überführung durch einen 40 µm Cell Strainer in ein 50 ml Polypropylenröhrchen.

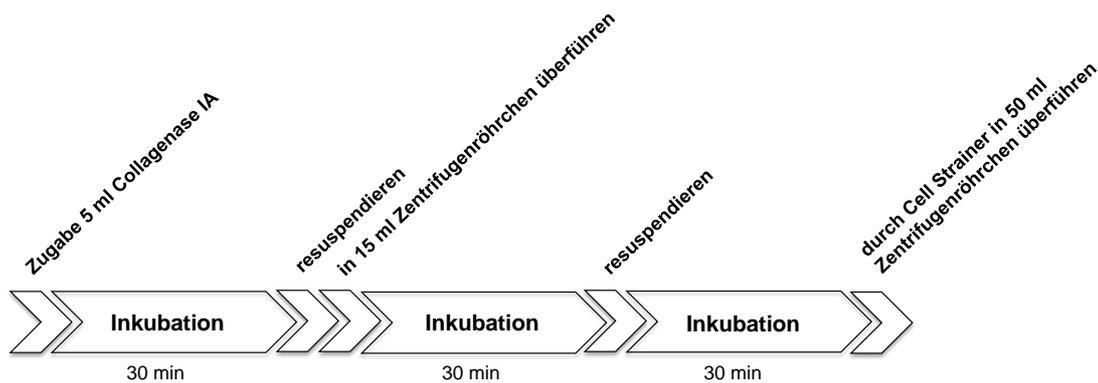


Abbildung 3 Kollagenase-Protokoll

Die Abbildung zeigt die wesentlichen Arbeitsschritte des Gewebeaufschlusses unter Verwendung von Kollagenase. Nach einer manuellen Zerkleinerung der Gewebeprobe auf eine ungefähre Kantenlänge von 1 mm werden 5 ml Kollagenase zur Probe hinzugegeben. Diese wird über eine Gesamtzeit von 90 Minuten unter zwischenzeitlich zweifachem Resuspendieren inkubiert und zuletzt durch einen Cell Strainer in ein Zentrifugenröhrchen überführt.

Um möglichst wenige Zellen zu verlieren wurde der Cell Strainer mit 5 ml RPMI Medium nachgespült. Das Röhrchen wurde für drei Minuten bei 1100 U/min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und in 10 ml FACS-Puffer aufgenommen.

In der Folge wurde die Gesamtzellzahl unter Zuhilfenahme einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Zusätzlich wurden die vitalen Zellen mittels Trypanblau-Vitalfärbung identifiziert und ausgezählt. Anhand des vitalen Zellanteils wurde das benötigte Volumen mit einem Mindestanteil von einer Million vitaler Zellen berechnet und in FACS-Röhrchen überführt. Die nachfolgende Antikörperfärbung und Probenmessung erfolgte nach dem unter 3.2.8. und 3.2.9. beschriebenen Procedere.

3.2.4. Gewebeaufschluss mittels MiniLys©-Homogenisator

Der MiniLys©-Homogenisator (Bertin MiniLys© Bretonneux, Frankreich) dient dem rein mechanischen Probenaufschluss unterschiedlicher Gewebe. Dazu bewegt das Gerät ein mit Gewebeprobe und Beads gefülltes Probenröhrchen in Form einer dreidimensionalen Acht und setzt die Gewebeprobe somit intensiven Scherkräften aus. Mittels der so hochbeschleunigten Beads wird die in den Röhrchen befindliche Gewebeprobe mechanisch aufgeschlossen. Die Geschwindigkeitsstufen A (= 2000 rpm), B (= 3000 rpm) und C (= 4000 rpm) variieren die Intensität des Aufschlusses.

Die Gewebeentnahme, -lagerung und -zerkleinerung erfolgten analog zum Vorgehen im Rahmen des Gewebeaufschlusses mittels Kollagenase. Anschließend wurden je 0,2 g Tumorgewebe steril direkt in ein mit 1,4 mm Keramikkügelchen befülltes 2 ml Röhrchen (Precellys©-Keramik-Kit, Bertin Technologies, Bretonneux, Frankreich) überführt. So war es möglich, mit der gleichen Tumorseite unterschiedliche Intensitätsstufen zu vergleichen. Die Proben durchliefen nach der Zugabe von 1 ml PBS-EDTA 0,02 % pro Röhrchen das jeweilige MiniLys©-Programm (siehe Anhang SOP). Anschließend wurde der Inhalt der Röhrchen durch einen 40 µm Strainer in ein 50 ml Polypropylenröhrchen überführt und der Strainer mit jeweils 4 ml PBS-EDTA 0,02 % ausgewaschen. Die Probe wurde für drei Minuten bei 1100 U/min zentrifugiert und nach Absaugen des Überstandes anschließend in 4 ml PBS-EDTA 0,02 % aufgenommen.

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl, des vitalen Zellanteils sowie die nachfolgende Antikörperfärbung und Probenmessung erfolgten nach dem unter 3.2.7., 3.2.8. und 3.2.9. beschriebenen Procedere.

3.2.5. Gewebeaufschluss mittels Vortex©-Mixer

Das Vortex©-Protokoll wurde erarbeitet, um bei einem Ausfall des MiniLys©-Gerätes als Ersatz zu dienen. Die Zellisolierung mithilfe des Vortex©-Mixer erfolgte wie das MiniLys©-Verfahren mittels eines mechanischen Aufschlussverfahrens. Die Gewebeentnahme und -zerkleinerung erfolgte analog zum Vorgehen im Rahmen des Gewebeaufschlusses mittels Kollagenase. Nach der manuellen Zerkleinerung wurden wie beim vorher beschriebenen MiniLys©-Verfahren je 0,2 g zerkleinertes Gewebe in ein Precellys©-Röhrchen überführt und mit 1 ml PBS-EDTA 0,02 % aufgefüllt. Die erste Probe wurde mit dem Vortex©-Mixer 20 Sekunden, die zweite 40 Sekunden und die dritte 60 Sekunden mit dem Vortex©-Gerät prozessiert. Anschließend wurden die Proben durch einen 40 µm Strainer in ein 50 ml Polypropy-

lenröhrchen überführt und der Strainer mit je 4 ml PBS-EDTA 0,02 % ausgewaschen. Die Probe wurde drei Minuten bei 1100 U/min zentrifugiert und nach Absaugen des Überstandes anschließend in 4 ml PBS-EDTA 0,02 % aufgenommen.

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl, des vitalen Zellanteils sowie die nachfolgende Antikörperfärbung und Probenmessung erfolgten nach dem unter 3.2.7., 3.2.8. und 3.2.9. beschriebenen Procedere.

3.2.6. gentleMACS®

Die gentleMACS®-Methode (Miltenyi Biotec) kombiniert den rein mechanischen mit dem enzymatischen Gewebeaufschluss. Die Gewebeentnahme und -zerkleinerung erfolgten wie unter 3.2.4. beschrieben. Nach der manuellen Zerkleinerung wurden 0,2 g Tumorgewebe in ein gentleMACS®-Röhrchen überführt und 5 ml Collagenase IA hinzugefügt. Anschließend wurde die Probe nach dem gentleMACS®-Protokoll bearbeitet: Programm h_Tumor_01, Inkubation bei 37 °C für 30 Minuten auf dem MACS®-Roller, Programm h_Tumor_02.01, erneut Inkubation bei 37 °C für weitere 30 Minuten auf dem MACS®-Roller und abschließend Programm h_Tumor_03.01. Dieser Ablauf entspricht dem von der Firma Miltenyi Biotec empfohlenen Protokoll für den Aufschluss von menschlichem Tumorgewebe.

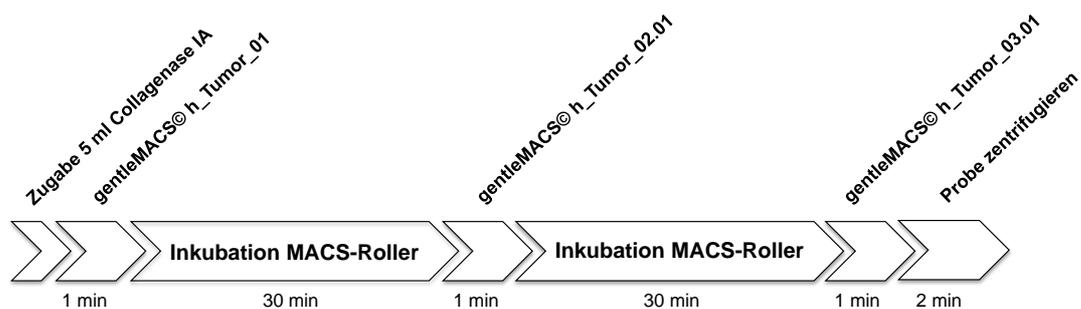


Abbildung 4 gentleMACS®-Protokoll

Die Abbildung zeigt die wesentlichen Arbeitsschritte des Gewebeaufschlusses anhand des gentleMACS®-Protokolls. Nach einer manuellen Zerkleinerung der Gewebeprobe auf eine ungefähre Kantenlänge von 1 mm werden 5 ml Kollagenase zur Probe hinzugegeben. Diese wird gemäß Protokollvorgabe nach Durchlaufen des gentleMACS®-Programms h_Tumor_01 über eine Gesamtzeit von 60 Minuten unter zwischenzeitlicher Anwendung der Programme h_Tumor_02.01 und zuletzt h_Tumor_03.01. inkubiert und abschließend für 2 Minuten zentrifugiert.

Anschließend wurde das gentleMACS®-Röhrchen für zwei Minuten bei 600 rpm zentrifugiert. Nach der Zugabe von 10 ml Transportmedium RPMI Basal wurde die Probe für einige Sekunden geschüttelt und dann mithilfe einer 10 ml Pipette mehrfach resuspendiert. Zum Schluss erfolgte durch einen 40 µm Strainer die Überführung in ein 50 ml Polypropylenröhrchen. Der Strainer wurde zweimalig mit 5 ml Transportmedium nachgewaschen. Die Probe wurde dann für drei Minuten bei 1100 U/min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt.

Wie schon zuvor erfolgten die Bestimmung der Gesamtzellzahl, des vitalen Zellanteils sowie die nachfolgende Antikörperfärbung und Probenmessung nach dem unter 3.2.7., 3.2.8. und 3.2.9. beschriebenen Procedere.

3.2.7. Neubauer-Zählkammer und Vitalfärbung mit Trypanblau

Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl wurden die Zellen zunächst ungefärbt gezählt. Hierzu wurden 10 µl des Zellsuspensates mit 90 µl PBS EDTA 0,02 % verdünnt und die Probe kurz mittels Vortex®-Gerät prozessiert. 8 µl des Zellsuspensates wurden unter das Deckglas der Neubauer-Zählkammer pipettiert und die Zellen in den vier Großquadranten unter dem Mikroskop ausgezählt. Falls dies aufgrund einer zu hohen Zelldichte nicht möglich war, wurde die Probe erneut verdünnt. Hierzu wurden 10 µl der zuvor hergestellten Verdünnung mit weiteren 90 µl PBS EDTA 0,02 % versetzt. Der Verdünnungsfaktor wurde später bei der Berechnung der Gesamtzellzahl berücksichtigt.

Als nächster Schritt erfolgte die quantitative Bestimmung des vitalen Zellanteils mithilfe des Farbstoffes Trypanblau. Dieser dringt auf Grund der nicht mehr intakten Zellmembran ausschließlich in tote Zellen ein, lebende bzw. vitale Zellen hingegen erscheinen weiterhin farblos. Dazu wurden 10 µl des Suspensates für die Bestimmung der Gesamtzellzahl mit 10 µl Trypanblau gemischt und vorsichtig mit Hilfe einer Pipette resuspendiert. Anschließend wurden 8 µl der Verdünnung in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

Anhand der vitalen Zellzahl wurde das benötigte Probenvolumen berechnet und ein Mindestanteil von einer Million vitaler Zellen vorgelegt.

3.2.8. Färbung mit fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern

Unabhängig vom Zellisolierungsverfahren wurden sowohl Tumorgewebe als auch gesundes Nierengewebe und Blutproben der Patienten und der Kontrollgruppe mit Antikörpern versetzt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert.

Pro FACS-Röhrchen wurde ein Probenvolumen mit einem Mindestanteil von einer Million vitaler Zellen vorgelegt. Dazu wurde die benötigte Menge des Zellsuspensates nach beendtem Aufschluss des Tumorgewebes und der quantitativen Bestimmung des vitalen Zellanteils in ein FACS-Röhrchen überführt. Die Probe wurde für drei Minuten bei 1100 U/min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 100 µl PBS-EDTA 0,02 % aufgenommen.

Die Antikörper-Mischung wurde unter sterilen Kautelen hergestellt. Vollblut- und Kollagenase-Proben wurden mit den Antikörper-Mischungen P01 (CD4, CD8, CD25, CD127, CD39, CD28, CD62L, CD45RO) und P02 (CD4, CD8, CD25, CD127, CD272, CD279) gefärbt. Zu jeder Probe wurde eine ungefärbte Kontrolle gemessen.

Nachdem die Probe mit Antikörpern (vergleiche Tabelle 7) für 30 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert hatte, wurden 2 ml Lysing-Solution hinzugegeben. Nach dem Vortexen des Röhrchens folgte eine erneute Inkubationszeit von 10 Minuten unter gleichen Bedingungen, dann wurde die Probe für 7 Minuten bei 1300 rpm zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Nach der Zugabe von 2 ml FACS Puffer wurde das Röhrchen vorsichtig gevortext und erneut 7 Minuten bei 1300 rpm zentrifugiert. Abschließend wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet gevortext und unter vorsichtigem Resuspendieren in 200 µl PFA 1 % aufgenommen. Bis zur Messung wurde die Probe bei 4-8 °C gelagert.

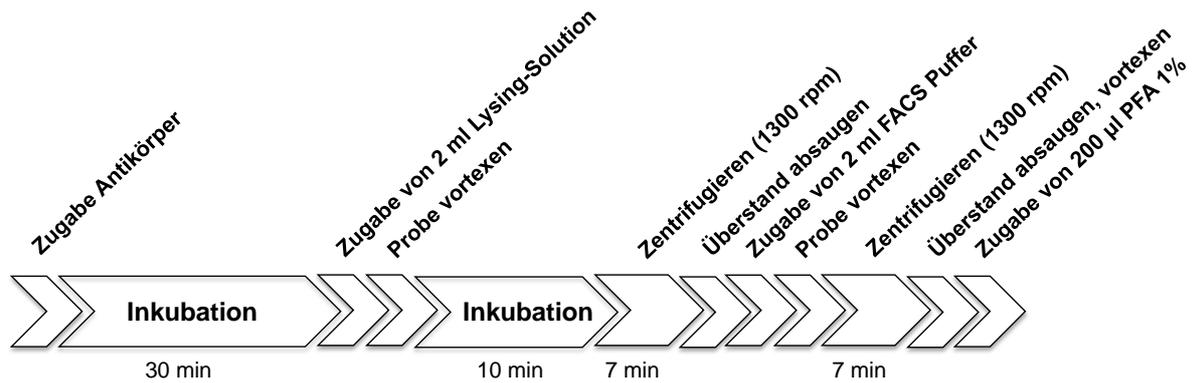


Abbildung 5 Antikörperfärbung

Die Abbildung beschreibt die wesentlichen Arbeitsschritte der Herstellung der verwendeten Antikörper-Mischung unter sterilen Kautelen. Nach Inkubation der Probe mit Antikörpern für 30 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit wurden 2 ml Lysing-Solution hinzugegeben und die Probe gevortext. Es folgte eine erneute Inkubation über 10 Minuten unter gleichen Bedingungen mit anschließender Probenzentrifugation für 7 Minuten bei 1300 rpm. Der Überstand wurde nachfolgend vorsichtig abgesaugt. Nach der Zugabe von 2 ml FACS Puffer wurde das Röhrchen vorsichtig gevortext und erneut 7 Minuten bei 1300 rpm zentrifugiert. Nach erneutem Absaugen des Überstandes wurde das Pellet ein letztes Mal gevortext und unter vorsichtigem Resuspendieren in 200 µl PFA 1 % aufgenommen.

3.2.9. Messung und Auswertung der Proben

Die Analyse und quantitative Bestimmung der fluoreszenzmarkierten Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie (FACS = Fluorescence Activated Cell Sorting). Grundlage der sogenannte FACS-Analyse ist die Antigen-Antikörper-Reaktion unter Verwendung Fluoreszenzfarbstoff-markierter Antikörper.

Zunächst wird durch die Trägerflüssigkeit eine laminare Strömung (Hüllstrom) erzeugt und durch die Querschnittsverringering in der Messküvette sowohl Proben- als auch Hüllstrom beschleunigt (hydrodynamische Fokussierung). So werden die Zellen mit vergrößerten Zwischenabständen einzeln durch den Mikrokanal und durch den Messbereich des Laserstrahls geführt. Die verwendeten fluoreszierenden Verbindungen absorbieren zunächst die Energie des Laserlichtes, wobei Elektronen auf ein höheres Energieniveau angehoben werden. Beim Zurückfallen auf das Grundenergieniveau kommt es zu einer als „Fluoreszenz“ bezeichneten Photonenemission. Die Emission verhält sich proportional zur Menge der gebundenen Antikörper. Die verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe werden über die gleiche Wellenlänge angeregt, verfügen jedoch über unterschiedliche charakteristische Emissionsspektren, anhand

derer sie klassifiziert und die Zellen nach Oberflächenmarkerprofil unterschieden werden können.

Die Analyse macht sich außerdem zu Nutze, dass die Menge des gestreuten Lichts mit der Größe und Struktur der Zellen korreliert, sodass sich Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten und Zelltrümmer (< 50 kb) voneinander trennen lassen. Im Forward-Scatter wird das vom Zellvolumen abhängige Vorwärtsstreulicht als Maß für die Beugung des Lichts gemessen; der Side-Scatter hingegen zeigt das Seitwärtsstreulicht an, das als Maß für die Lichtbrechung im rechten Winkel von der Granularität, der Zellkernbeschaffenheit und der Vesikelanzahl der Zelle abhängt. So ist eine primäre Lokalisation der Zielpopulation möglich.

Das von uns verwendete Durchflusszytometer BD FACS Canto II© der Firma Becton Dickinson (BD Biosciences, Heidelberg) analysiert die Messungen mithilfe der FACS-Diva© Software. Im Anschluss an die Analyse der einzelnen Zellpopulationen erfolgte die Unterscheidung der Lymphozytenpopulation in CD4⁺- und CD8⁺-Subpopulationen. Hierzu verwendeten wir die im Abschnitt 3.2.8. aufgeführten Oberflächenmarker.

Zur Identifizierung der CD4⁺- und CD8⁺-Subpopulationen wählten wir den sogenannten „Dot plot“-Darstellungsmodus, welcher die Korrelationsverteilung der Parameter anzeigt, und legten mithilfe von Kontrollmessungen eine einheitliche Gatingstruktur fest. Die Auswertung erfolgte durch Ermittlung des prozentualen Anteils (% of parent) der CD4⁺- und CD8⁺-Fraktion an der Lymphozytenpopulation oder über die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) als Maß für die Expressionsstärke eines Antigens. Mithilfe dieser Parameter war es möglich, die prozentuale Veränderung der jeweiligen Population sowie Veränderungen in der Expressionsintensität der Oberflächenmarker zu erkennen. Durch das CD4⁺CD25⁺CD127^{low}-Gate wurden die regulatorischen T-Zellen detektiert und mithilfe des CD39-Gates weiter eingegrenzt. So konnten die T_{reg}-Zellen phänotypisch als CD4⁺CD25⁺CD127^{low}CD39⁺-T-Zellen charakterisiert werden.

Die deskriptiven und vergleichenden statistischen Analysen sowie die Erstellung der Graphen wurde mit Hilfe der GraphPad© Prism-Software (Version 6, La Jolla, CA, USA) durchgeführt. Bei Annahme einer Gauss'schen Normalverteilung der Daten wurde eine one-way ANOVA Analyse mit anschließendem Bonferroni-Test zum Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander durchgeführt, in wenigen Fällen fand der t-Test Anwendung. Ein $p < 0,05$ wurde als signifikant angenommen. Die abgebildeten Schaubilder der statistischen Analysen enthalten Median und Interquartilsabstand.

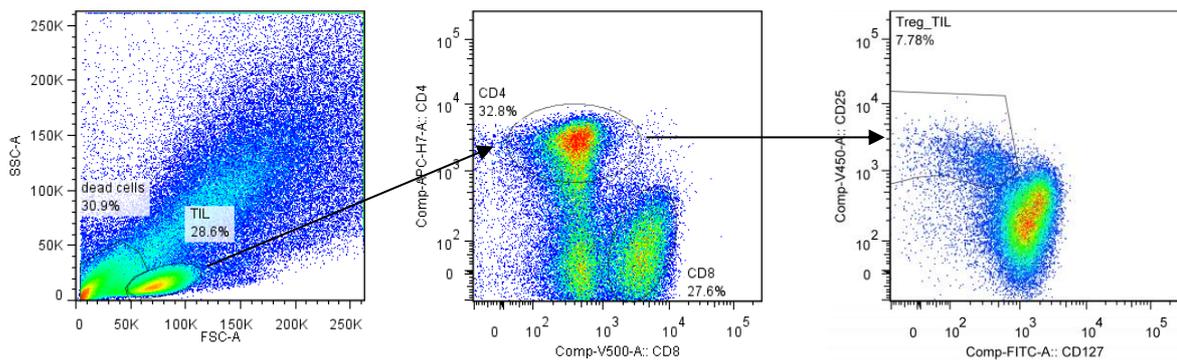


Abbildung 6 Exemplarisches Gating der T-Zell-Subpopulationen

Gating der T_{reg}-Subpopulation am Beispiel einer Tumorprobe Die Identifizierung der CD4⁺- und CD8⁺-Subpopulationen erfolgte im „Dot plot“-Darstellungsmodus unter Verwendung einer einheitlichen Gatingstruktur. Mittels CD4⁺CD25⁺CD127^{low}-Gate wurden die regulatorischen T-Zellen detektiert und nachfolgend mithilfe des CD39-Gates phänotypisch als CD4⁺CD25⁺CD127^{low}CD39⁺-T-Zellen charakterisiert.

4. Ergebnisse

4.1. Etablierung eines Protokolls zur Herstellung einer Einzel-Zellsuspension aus Frischtumorgewebe von Nierentumoren

Wir definierten als wichtigste Kriterien zur Etablierung eines standardisierbaren Protokolls zur rein mechanischen und Kollagenase-freien Herstellung einer Einzel-Zellsuspension aus frischem Nierentumorgewebe: gute Reproduzierbarkeit, eine möglichst kleine Gewebemenge und vor allem eine hohe Ausbeute an vitalen Zellen. Hierzu verglichen wir das in der Klinik etablierte Standardprotokoll des Gewebeaufschlusses mittels Kollagenase, die rein mechanische Separation mit Hilfe des MiniLys© und des Vortex©-Gerätes sowie in einem Fall die enzymatisch-mechanische kombinierte Separationsmethode mittels gentleMACS©.

Des Weiteren spielte der benötigte Zeitaufwand eine entscheidende Rolle, Einzelheiten hierzu sind dem Kapitel 4.1.7. zu entnehmen.

4.1.1. Probandenkollektiv

Die Charakteristika der Tumorpatienten und der Kontrollgruppe sowie die Operationstechnik und die histologischen Ergebnisse sind in Tabelle 8 und 9 aufgeführt. Insgesamt wurden Gewebeproben von 24 Patienten untersucht.

Tabelle 8 Charakteristika des Patientenkollektivs

Histologie		Durchschnittsalter	Geschlecht (männlich/weiblich)
ccRCC	n = 15 (mit papillärem Anteil: n = 2)	68,97 Jahre	14/10
papRCC	n = 3		
Onkozytom	n = 3		
Leiomyom	n = 1		
DBK	n = 1		
CAP	n = 1		

n = Probandenzahl, ccRCC = clear renal cell carcinoma, papRCC = papillary renal cell carcinoma, DBK = Ductus Bellini-Karzinom, CAP = chronisch abszendierende Pyelonephritis

Tabelle 9 Übersicht über Operationstechnik mit Tumorstadium und Histologie

OP-Methode	Patienten	benigner Tumor	Metastasierung	Histologie	TNM
DaVinci©: Nephrektomie	n = 4	n = 0	n = 0	ccRCC n = 4	pT1b n = 1 pT3a n = 3
DaVinci©: Teilresektion	n = 6	n = 3	n = 0	ccRCC n = 3 Onkozytom n = 2 Leiomyom n = 1	pT1a n = 3 benigne n = 3
Offene Nephrektomie	n = 11	n = 1	n = 2	ccRCC n = 4 papRCC n = 3 cc/papRCC n = 2 DBK n = 1 CAP n = 1	pT2a n = 2 pT2b n = 1 pT3a n = 7 M1 n = 1
Offene Teil- resektion	n = 3	n = 1	n = 0	ccRCC n = 2 Onkozytom n = 1	pT1b n = 1 pT3a n = 1 benigne n = 1

n = Probandenanzahl, ccRCC = clear renal cell carcinoma, papRCC = papillary renal cell carcinoma, DBK = Ductus Bellini-Karzinom, CAP = chronisch abszendierende Pyelonephritis

4.1.2. Verarbeitung nach Kollagenase-Protokoll

Durch den Gewebeaufschluss nach Kollagenase-Protokoll konnte beim Vergleich der Tumorgewebeproben eine hohe Anzahl vitaler Zellen gewonnen werden. Vergleichbare Ergebnisse erzielten nur die MiniLys©-Ansätze a-20 Sek. und b-20 Sek..

Tabelle 10 Übersicht Median_%_vital_cells der einzelnen Aufschlussverfahren

Koll P01	a-20 Sek.	b-20 Sek.	V1	V2	V3	gentleMacs©
69,31	65,41	64,73	51,35	50,08	55,03	69,1

Koll P01 = Kollagenase Färbung P01, a-20 Sek./b-20 Sek. = MiniLys©-Ansätze, V1-3 = Vortex©-Ansätze 1-3

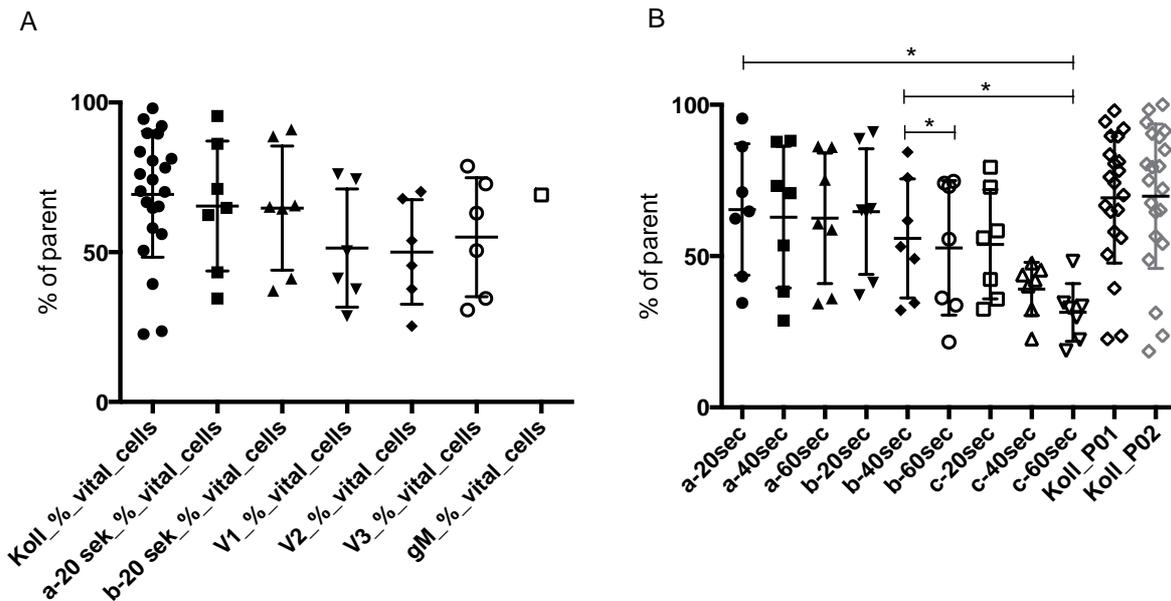


Abbildung 7 Vitaler Zellanteil aller vier Protokolle im Vergleich

(A) Vergleichende Übersicht aller vier Gewebeaufschlussmethoden Dargestellt ist der prozentuale vitale Zellanteil. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede unter der Annahme, dass $p < 0,05$. Größe der Probandengruppen: Kollagenase $n = 22$, MiniLys© a-20 Sek. $n = 7$. MiniLys© b-20 Sek. $n = 7$, Vortex© V1-v3 $n = 6$, gentleMACS© gM $n = 1$. **(B) Vitaler Zellanteil nach MiniLys©- und Kollagenase-Protokoll** Es zeigen sich signifikante Unterschiede in Bezug auf die MiniLys©-Ansätze untereinander, jedoch nicht beim Vergleich der MiniLys©-Ansätze a-20 Sek. und b-20 Sek. mit den Kollagenaseproben P01 und P02. * = $p < 0,05$.

4.1.3. Verarbeitung nach MiniLys©-Protokoll

Die Probandenanzahl betrug für das MiniLys©-Verfahren ursprünglich $n = 14$. Aufgrund kleiner Primärtumore und konsekutiv kleiner Tumorgewebeprobe konnten nur sieben vollständige Versuchsreihen durchgeführt und verglichen werden. Für die Publikation (Crossey, Marx et al. 2018) wurden im Nachgang weitere fünf Tumorproben prozessiert, sodass die Probandenanzahl sich dort auf $n = 12$ erhöhte. Die Ansatzreihen a, b und c unterscheiden sich hinsichtlich der Intensitätsstufe (a = 3000 rpm, b = 4000 rpm, c = 5000 rpm) sowie der Zeit (Angaben in Sekunden, siehe auch SOP MiniLys© unter 6.2.). Bei Betrachtung des vitalen Zellanteils zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Ansätzen a-20 Sek. und b-20 Sek. im Vergleich zu den restlichen Proben. Die Analyse der CD4⁺- und der T_{reg}-TIL-Subpopulationen der Ansätze a-20 Sek. und b-20 Sek. ergab keine Hinweise auf einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Expression der analysierten Oberflächenmarker.

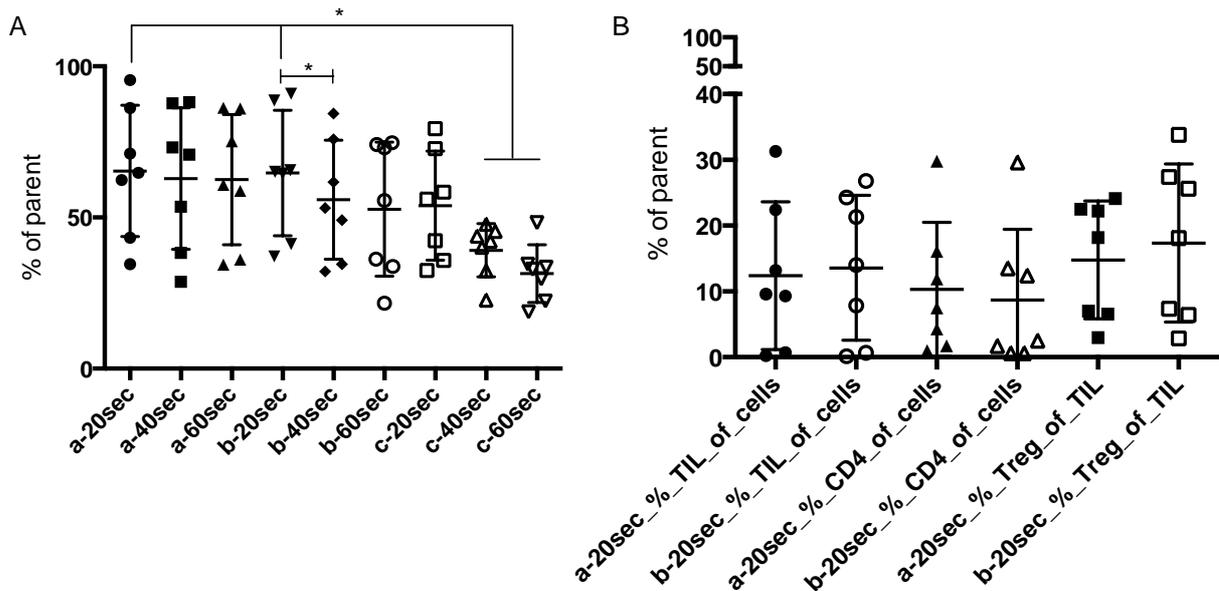


Abbildung 8 Vitaler Zellanteil und T-Zell-Subpopulationen nach MiniLys©-Protokoll

(A) MiniLys©-Intensitätsstufen mit Anteil vitaler Zellen Anteil vitaler Zellen in % of parent, n = 7. Signifikante Unterschiede zwischen den Ansätzen a-20 Sek. und c-40 Sek./c-60 Sek. sowie zwischen den Ansätzen b-20 Sek. und c-40 Sek./c-60 Sek. und dem Ansatz b-20 Sek. und b-40 Sek., * = $p < 0,05$. **(B) Analyse der T-Zell-Subpopulationen der Ansätze a-20 Sek. und b-20 Sek.** Analysiert werden die TIL-Subpopulation, die CD4⁺-Subpopulation sowie die T_{reg}-Subpopulation. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede unter der Annahme, dass $p < 0,05$. n = 7.

Bei höherem Median und nur geringfügig größerem Interquartilsabstand (vergleiche Tabelle 11) entschieden wir uns, für weitere Analysen und Vergleiche die Messwerte der a-20 Sek.-Proben zu verwenden. Ebenso werden in Zukunft weitere Tumorproben nach dem MiniLys©-Protokoll a-20 Sek. prozessiert.

Tabelle 11 Median und Interquartilsabstand der vitalen Zellpopulation

	a-20 Sek.	b-20 Sek.
Median	65,41	64,73
Interquartilsabstand	21,67	20,73

Beim Vergleich der drei für uns interessanten T-Zell-Subpopulationen zeigen sich beim Vergleich aller prozessierten Proben zur Kollagenase (n = 22) keine signifikanten Unterschiede.

Es fällt jedoch eine vergleichsweise kleinere CD4⁺-Population der nach MiniLys© a-20 Sek. (n = 7) prozessierten Proben auf. Dieser Unterschied ist knapp als signifikant zu werten (p < 0,042).

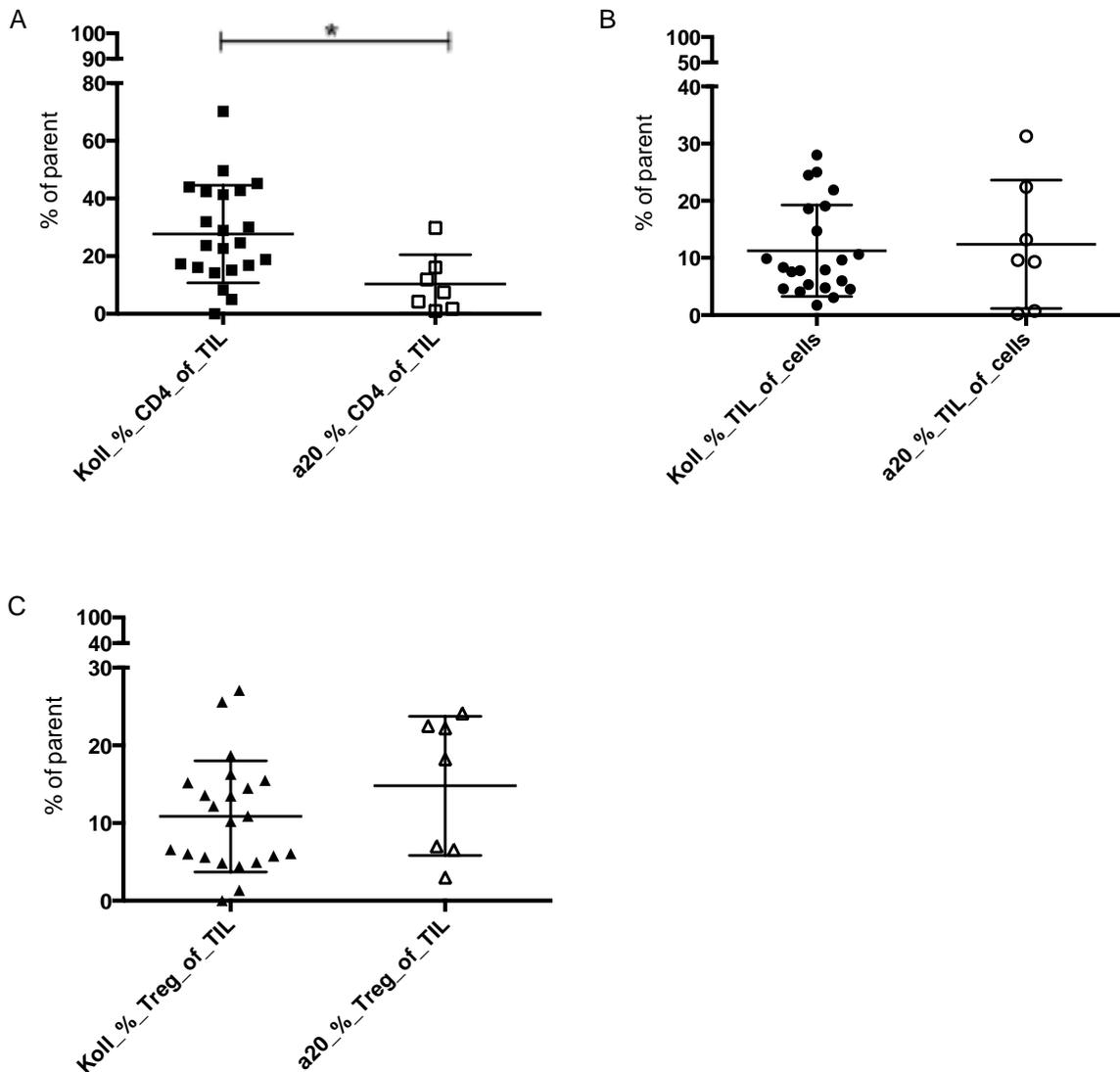


Abbildung 9 T-Zell-Populationen (Kollagenase vs MiniLys© a-20-Sek.)

Verglichen wurden die T-Zell-Populationen (TIL, CD4⁺, T_{reg}) der Kollagenase-Ansätze sowie der nach dem MiniLys©-Protokoll a-20 Sek. prozessierten Proben. **(A) CD4⁺-Populationen der Kollagenase- und MiniLys©-Ansätze (B) TIL- Populationen der Kollagenase- und MiniLys©-Ansätze (C) T_{reg}- Populationen der Kollagenase- und MiniLys©-Ansätze.** Unter der Annahme, dass p < 0,05 knapp signifikant kleinere CD4⁺-Population der Proben MiniLys© a-20 Sek. (n = 7) (p < 0,042).

Aufgrund der sehr unterschiedlichen Größe der Probandengruppen ist es sinnvoll, sich die zu den MiniLys© a-20 Sek.-Proben gehörenden Kollagenase-Proben anzuschauen (Reduk-

tion der Probandengruppe auf n = 6, da zu einem Patienten aufgrund der zu geringen Tumormasse keine dazugehörige Kollagenase-Probe vorlag). Hier fällt auf, dass der Interquartilsabstand der CD4⁺-Population zwar größer ist, dass aber kein solch deutlicher Unterschied wie in der vorausgehenden Abbildung zu sehen ist. Bei Betrachtung der TIL-Population ergibt sich ein höherer Mittelwert der MiniLys© a-20 Sek.-Proben. Des Weiteren ist in diesem Vergleich die Population der regulatorischen T-Zellen der nach dem MiniLys©-Protokoll verarbeiteten Proben signifikant größer.

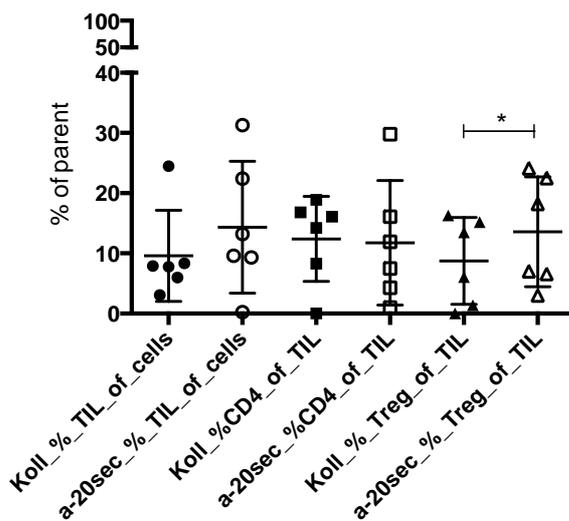


Abbildung 10 Direkter Vergleich der T-Zell-Populationen bei sechs Probanden (Kollagenase vs MiniLys© a-20 Sek.)

Zum direkten Vergleich wurden die T-Zell-Populationen (TIL, CD4⁺, T_{reg}) in sechs Proben analysiert, die jeweils nach dem Kollagenase-Protokoll sowie nach dem MiniLys©-Protokoll a-20 Sek. prozessiert wurden. Es findet sich eine signifikant größere Treg-Population der nach dem MiniLys©-Protokoll a-20 Sek. prozessierten Proben. n = 6.

4.1.4. MiniLys©-Protokoll: Tumorkonsistenz und Histologie

Zur Untersuchung, ob sich das MiniLys©-Protokoll a-20 Sek. auch unabhängig von der Tumorkonsistenz als neue Standardmethode anwenden lässt, wurde der vitale Zellanteil von Patientenproben, die sowohl nach dem Kollagenase-Protokoll als auch nach dem MiniLys©-Protokoll a-20 Sek. prozessiert wurden, im Hinblick auf ihre subjektiv beurteilte Konsistenz verglichen (vergleiche Tabelle 12). Wie bereits eingangs erwähnt, ergaben sich aufgrund der geringen Tumormengen für diesen Vergleich nur sechs Ansätze.

Tabelle 12 Charakteristika der Tumorproben mit Histologie und vitalem Zellanteil

	Konsistenz des Tumorgewebes	prozentualer Anteil vitaler Zellen (%)		Histologie
		MiniLys©	Kollagenase	
#1	unauffällig	95,49	89,70	papillär
#2	weich	43,30	58	klarzellig
#3	weich	64,80	66,70	papillär
#4	sehr hart	34,57	22,60	klarzellig
#5	sehr hart	62,40	39,40	papillär
#6	sehr hart	71,10	56	Ductus Bellini

Teilt man die Tumorproben in zwei Gruppen nach Konsistenz unauffällig (#1)/weich (#2-3) versus sehr hart (#4-6), so zeigen sich in den ersten beiden Gruppen vergleichbare Ergebnisse. Bei Betrachtung der dritten Gruppe weisen die mit Kollagenase behandelten Proben eine signifikant geringere Menge vitaler Zellen auf. Damit ist das rein mechanische MiniLys©-Protokoll a-20 Sek. auch bei harter Tumorkonsistenz und unabhängig vom histologischen Subtyp die Methode der Wahl.

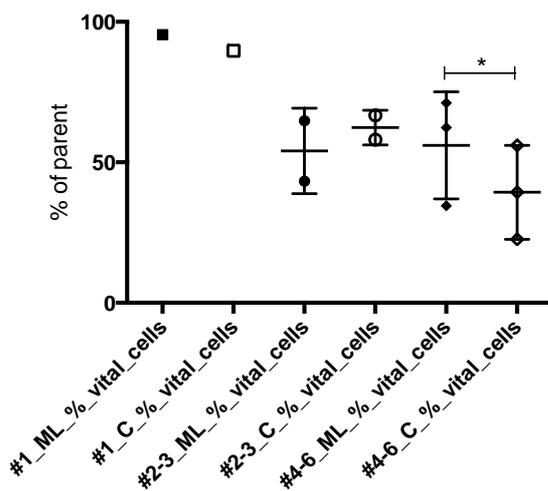


Abbildung 11 Prozentualer Anteil vitaler Zellen (Kollagenase vs MiniLys© a-20 Sek.)

Im t-Test signifikanter Unterschied beim Vergleich der Proben #4-6 mit * = $p < 0,05$.

4.1.5. Verarbeitung nach Vortex®-Protokoll

Die Anzahl der Probanden betrug sechs, da aufgrund der kleinen Tumormengen kein ausreichendes Material für weitere Ansätze zur Verfügung stand. Es zeigten sich bei konstanter Intensitätsstufe (3000 rpm) mit variierender Dauer (V1 = 20 Sek., V2 = 40 Sek., V3 = 60 Sek.) keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Anzahl vitaler Zellen und des Expressionsmusters.

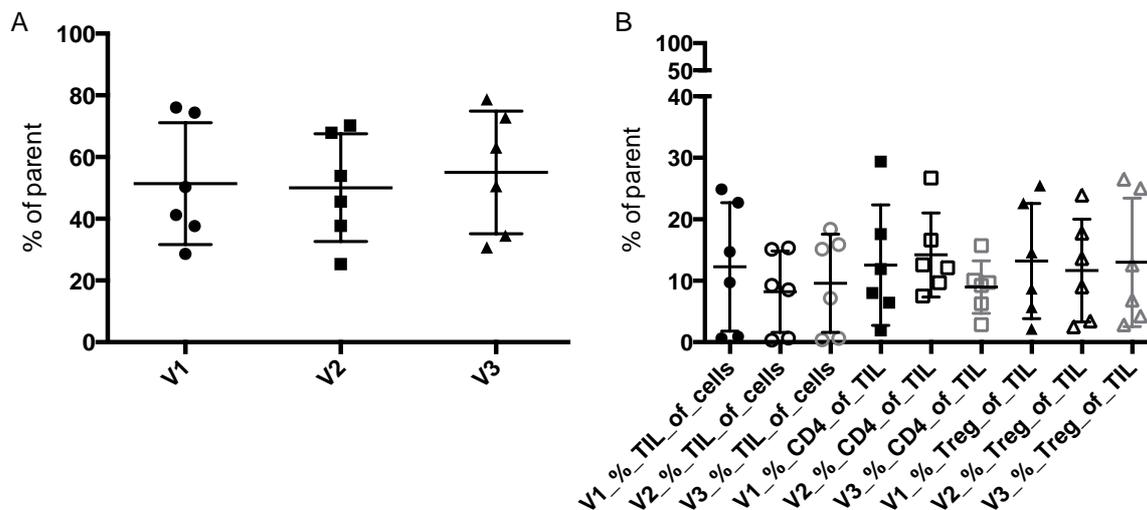


Abbildung 12 T-Zell-Subpopulationen der Vortex®-Proben V1-V3

(A) Vitaler Zellanteil der Vortex®-Proben V1-V3 Keine signifikanten Unterschiede des vitalen Zellanteils im Vergleich der Ansätze V1-V3 unter der Annahme, dass $p < 0,05$. **(B) T-Zell-Subpopulationen der Vortex®-Proben V1-V3** Keine signifikanten Unterschiede im Expressionsmuster der TIL-Population sowie der CD4⁺- und der T_{reg}-Subpopulation in den Versuchen V1-V3, $p < 0,05$.

Vergleicht man den vitalen Zellanteil der einzelnen Vortex®-Ansätze V1 bis V3 miteinander (vergleiche Tabelle 13), so sollte aufgrund der Varianz der mechanischen Einwirkdauer auch die Tumorkonsistenz betrachtet werden. Innerhalb der ersten (Konsistenz unauffällig, #1-2) sowie der dritten Gruppe (sehr hart, #5-6) lässt sich kein eindeutiger Einfluss der Dauer der mechanischen Einwirkung erkennen. In der zweiten Gruppe (weich, #3-4) hingegen erzielt V3 mit einer Dauer von 60 Sek. in beiden Proben den größten vitalen Zellanteil. Es lässt sich also keine eindeutige Aussage darüber treffen, inwiefern die vitale Zellausbeute mit der Dauer der mechanischen Einwirkung und der Tumorkonsistenz zusammenhängt.

Tabelle 13 Charakteristika der Tumorproben mit vitalem Zellanteil im Vortex®-Protokoll

	Auffälligkeiten beim Schneiden des Tumorgewebes	Prozentualer Anteil vitaler Zellen (%)			Histologie
		V1	V2	V3	
#1	unauffällig	74,4	70,2	72,8	klarzellig
#2	unauffällig	28,6	25,3	30,7	klarzellig
#3	weich	50,3	53,9	63,0	papillär
#4	weich	41,2	37,7	50,5	klarzellig
#5	sehr hart	76,0	67,9	78,7	papillär
#6	sehr hart	37,6	45,5	34,5	klarzellig

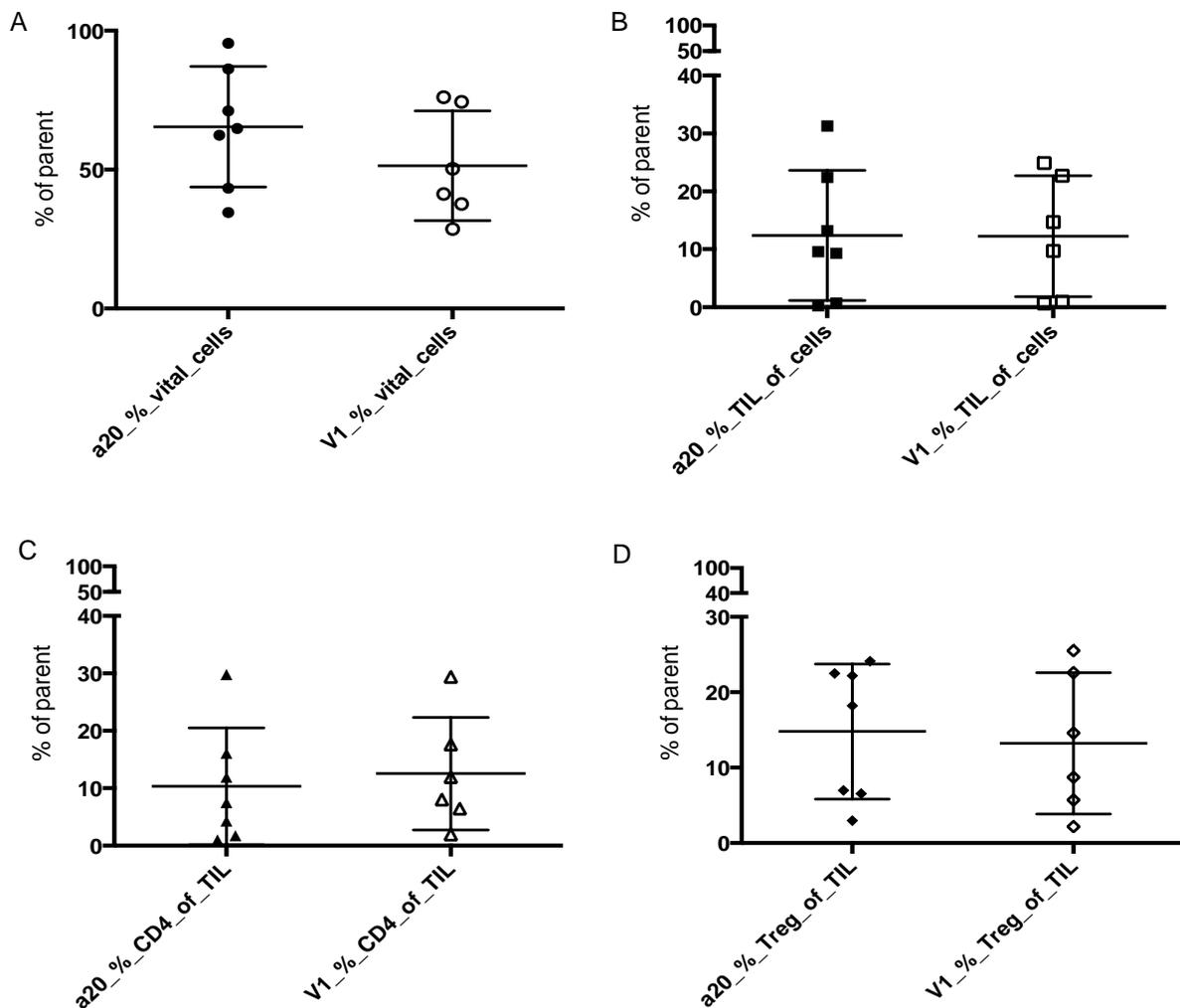


Abbildung 13 Vitaler Zellanteil und T-Zellpopulationen (MiniLys© a-20 Sek. vs Vortex® V1)

Verglichen wurden der vitale Zellanteil sowie die T-Zell-Populationen (TIL, CD4⁺, T_{reg}) der Vortex V1-Ansätze sowie der nach dem MiniLys©-Protokoll a-20 Sek. prozessierten Proben. **(A) Vitaler Zellanteil der Vortex- und MiniLys©-Ansätze (B) TIL- Populationen der Vortex- und MiniLys©-Ansätze**

(C) CD4⁺-Populationen der Vortex- und MiniLys[®]-Ansätze (D) T_{reg}-Populationen der Vortex- und MiniLys[®]-Ansätze. Keine signifikanten Unterschiede unter der Annahme, dass $p < 0,05$.

Das Vortex[®]-Gerät entspricht mit 3000 rpm der Intensitätsstufe der MiniLys[®]-Versuchsreihe a. Vergleicht man die Ansätze V1 (n = 7) und MiniLys[®] a-20 Sek. (n = 7), so zeigen sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Anzahl vitaler Zellen und der relevanten T-Zellpopulationen (vergleiche Abbildung 13).

4.1.6. Verarbeitung nach gentleMACS[®]-Protokoll

Da uns das gentleMACS[®]-Gerät nur als Leihgabe im Rahmen einer Probestellung der Firma für wenige Tage zur Verfügung gestellt wurde, war es leider nicht möglich, mehrere Proben verschiedener Probanden mit Hilfe des gentleMACS[®]-Gerätes zu prozessieren. Daher lagen uns lediglich die Ergebnisse einer singulären Patientenprobe (n=1) zum Vergleich vor. Auch bei Verwendung des gentleMACS[®]-Protokolls erfolgt der Gewebeaufschluss enzymatisch mittels Kollagenase, jedoch in Kombination mit einer mechanischen Komponente. Beim Vergleich der T-Zell-Subpopulationen zeigen sich keine Unterschiede. Es fällt jedoch auf, dass trotz einer größeren TIL-Population weniger CD4⁺- und T_{reg}-Zellen gemessen wurden. Im Vergleich zum mechanischen Aufschluss mittels MiniLys[®]-Protokoll a-20 Sek. fällt eine vergleichsweise kleine T_{reg}-Population ins Auge (vergleiche Abbildung 14).

Tabelle 14 Median und Interquartilsabstand im Überblick

Median und Interquartilsabstand von ...	Kollagenase	gentleMACS [®]	MiniLys [®] a20
TIL	11,25±7,99	26,43±0	12,34±11,26
CD4	27,68±16,91	17,33±0	10,32±10,17
Treg	10,86±7,17	8,89±0	14,79±8,95

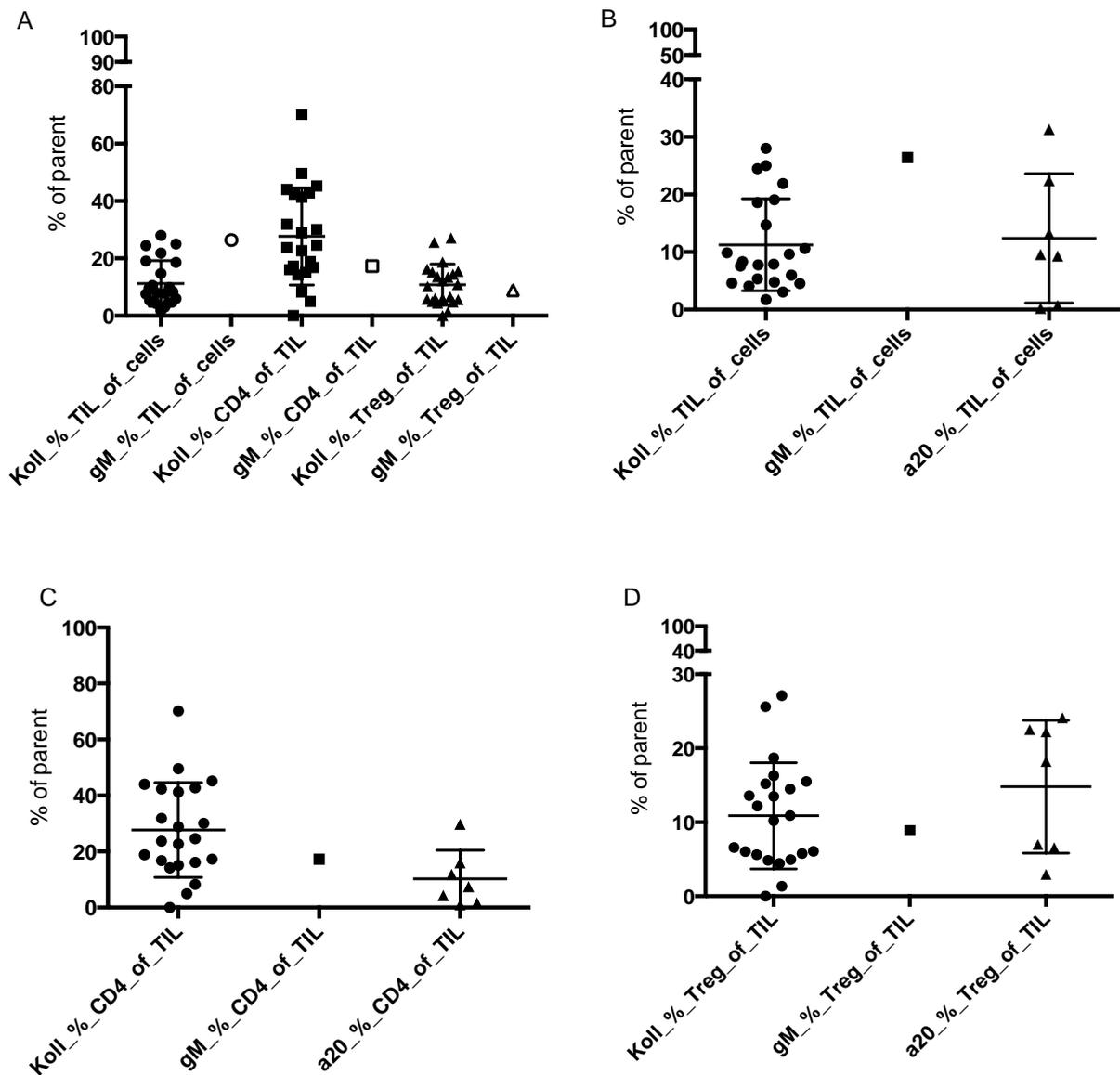


Abbildung 14 Vergleich der T-Zell-Subpopulationen nach enzymatischer, enzymatisch-mechanischer und mechanischer Methode

Vergleich der T-Zell-Subpopulationen nach enzymatischer, enzymatisch-mechanischer und mechanischer Methode. **(A)** TIL-, CD4⁺- und T_{reg}-Populationen der gentleMACS[®]- und Kollagenase-Ansätze **(B)** TIL-Populationen der gentleMACS[®]-, Kollagenase- und MiniLys[®]-a-20 Sek.-Ansätze **(C)** CD4⁺-Populationen der gentleMACS[®]-, Kollagenase- und MiniLys[®]-a-20 Sek.-Ansätze **(D)** T_{reg}-Populationen der gentleMACS[®]-, Kollagenase- und MiniLys[®]-a-20 Sek.-Ansätze. Kollagenase n = 22, gentleMACS[®] n = 1. Keine signifikanten Unterschiede unter der Annahme, dass $p < 0,05$.

4.1.7. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) im Vergleich

Im Rahmen der Publikation wurden von der Arbeitsgruppe Janssen zum Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) Tumorproben mechanisch und enzymatisch prozessiert. Es zeigte sich, dass, wie in Abbildung 15 dargestellt, eine CD4-Messung in 8 von 9 enzymatisch aufgeschlossenen Proben nicht mehr möglich war, während die mechanische Prozessierung darauf keinen Einfluss hatte. Dies führte dazu, dass die Anzahl der gemessenen CD4⁺-T-Zellen nach mechanischer Zellisolation signifikant höher war. Auf die CD8-Messung hatte die Art der Zellisolation hingegen keinen Einfluss. Als weitere Oberflächenmoleküle wurden das PD-1- und BTLA-Expressionslevel auf drei je mechanisch und enzymatisch prozessierten Proben durchflusszytometrisch gemessen. Auch hier zeigte sich, dass zumindest das BTLA-Expressionslevel nach enzymatischem Zellaufschluss deutlich reduziert war (Crossey, Marx et al. 2018).

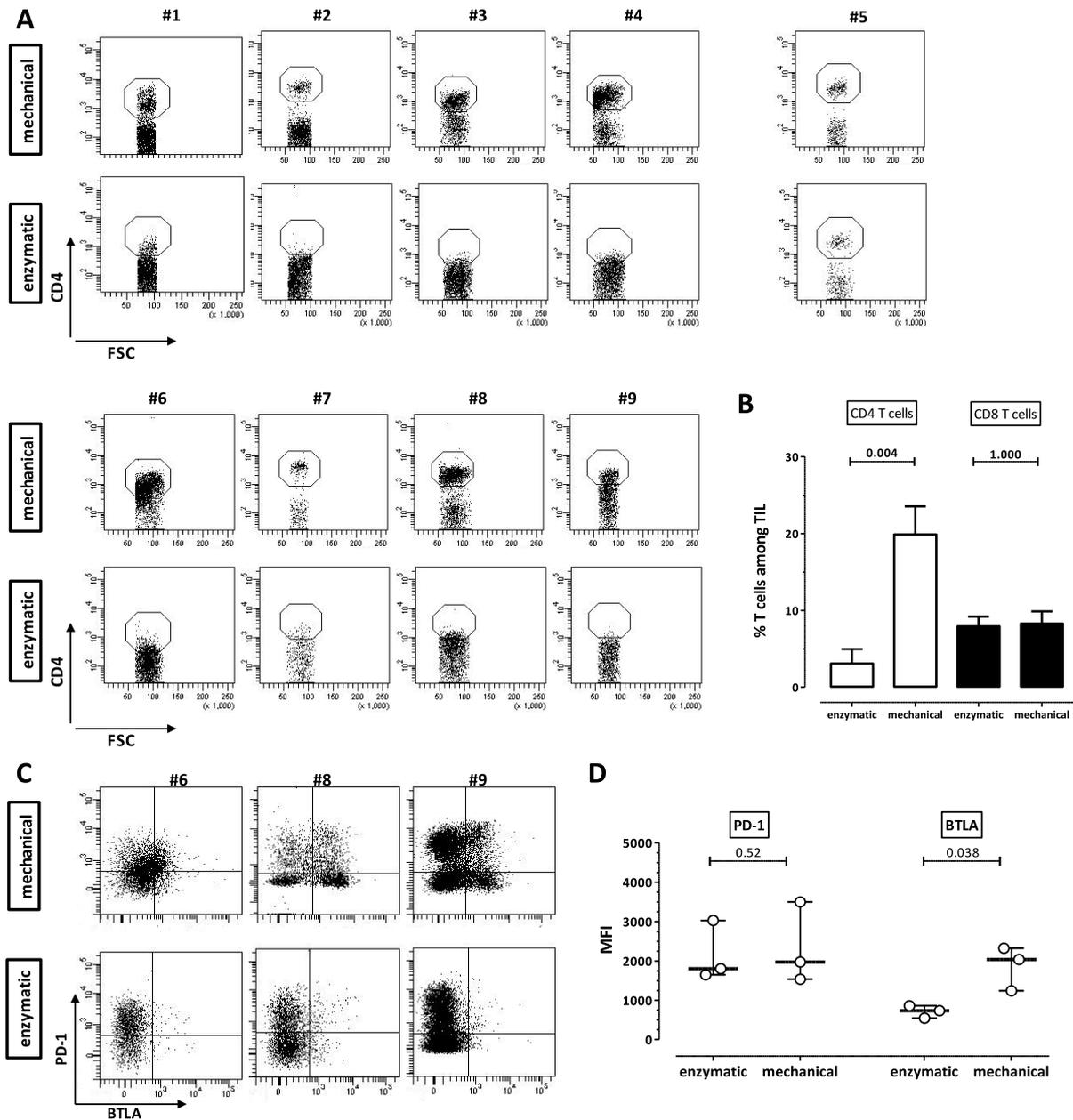


Abbildung 15 Die mittlere Fluoreszenzintensität im Vergleich

(A) In 8 von 9 Proben (Ausnahme #5) ist nach enzymatischem Aufschluss keine CD4-Messung mehr möglich. Die CD4-Messung nach mechanischer Zellisolation hingegen ist in allen 9 Proben uneingeschränkt möglich. **(B)** Der prozentuale Anteil der CD4⁺Zellen in der TIL-Population ist nach mechanischer Zellisolation signifikant höher ($p = 0,004$) als nach der enzymatischen Isolationsmethode. Hinsichtlich der Messung der CD8⁺Zellen ergeben sich keine signifikanten Unterschiede. **(C)** Die Proben #6, #8 und #9 wurden durchflusszytometrisch auf die Expression von PD-1 und BTLA hin untersucht. **(D)** Die BTLA-Messung ergibt nach enzymatischem Probenaufschluss deutlich niedrigere Werte als nach mechanischer Zellisolation ($p = 0,038$). BTLA = B- and T-lymphocyte attenuator (CD272), PD-1 = Programmed cell death protein 1 (CD279).

Quelle: (Crossey, Marx et al. 2018)

4.1.8. Weitere Aspekte des Methodenvergleichs

Aufgrund der epidemiologischen Gegebenheiten hinsichtlich Inzidenz, Diagnosestadium und Therapie des Nierenzellkarzinoms ergibt sich die Notwendigkeit zur Etablierung eines Standardprotokolls zum Gewebeaufschluss, welches mit einer möglichst kleinen Tumorprobe und geringer Gewebemenge durchgeführt werden kann. Auch unser Patientenkollektiv spiegelt dies wider. Hier zeigt sich, dass von 19 vorliegenden TNM-Stadien das T1-Stadium über 25 % ausmacht. In diesem Stadium wird nach den aktuellen EAU-Guidelines von 2018 eine Nierenteilresektion empfohlen. Dies bedeutet gleichzeitig, dass in der Mehrzahl der Fälle, wenn überhaupt, dann nur eine sehr kleine Gewebeprobe zu Forschungszwecken entnommen werden kann.

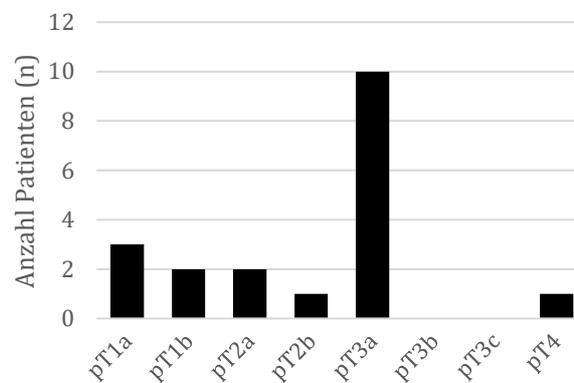


Abbildung 16 Patientenkollektiv nach TNM-Stadien

Mit über 25 % macht das T1-Stadium einen verhältnismäßig großen Anteil aus. Dies spiegelt die aktuellen epidemiologischen Gegebenheiten hinsichtlich Inzidenz, Diagnosestadium und Therapie des Nierenzellkarzinoms wider. Um ausreichend Tumorgewebe für die vorliegende Studie zu erlangen, wurden überproportional viele Patienten mit großen Tumoren (cT3) ausgewählt.

Im Methodenvergleich wird für die Durchführung des Standardprotokolls zum Gewebeaufschluss mittels Kollagenase mit 1 g die größte Menge an Tumorgewebe benötigt. Wie sich im Vergleich zum MiniLys©-Protokoll zeigt, führt dies jedoch nicht zu einem signifikant höheren vitalen Zellanteil.

Für das MiniLys©-Protokolls ist nur ein Fünftel der Probenmenge notwendig, um einen ausreichend hohen vitalen Zellanteil für die Antikörperfärbung und FACS-Messung vorlegen zu können. Ebenso verringert sich durch den Wegfall der Inkubationszeit im Vergleich zum Kollagenase- sowie zum gentleMACS©-Protokoll der benötigte Zeitaufwand. Im Speziellen schlüsselt sich die nötige Zeit zur Durchführung des jeweiligen Protokolls wie folgt auf: Zum

Gewebeaufschluss mittels Kollagenase benötigt man für einen Probenansatz (Gewebe) eine Gesamtarbeitszeit von mindestens 295 Minuten (intraoperative Biopsie: 20 Minuten; manuelle Zerkleinerung von einem Gramm Frischgewebe: 20 Minuten (Menge gemäß des bestehenden Standardprotokolls); Inkubation mit 5 ml Kollagenase IA (100 U/ml), 37 °C: 110 Minuten; Zellfärbung und -zählung: 30 Minuten; Inkubation mit Antikörpern: 100 Minuten; FACS-Durchflusszytometrie: 15 Minuten). Die benötigte Zeit für einen Probenansatz mittels MiniLys[®] beträgt mindestens 180 Minuten (intraoperative Biopsie: 20 Minuten; manuelle Zerkleinerung von 0,2 g Frischgewebe: 5 Minuten; MiniLys[®]: 10 Minuten; Zellfärbung und -zählung: 30 Minuten; Inkubation mit Antikörpern: 100 Minuten; FACS-Durchflusszytometrie: 15 Minuten). Für das Vortex[®]-Protokoll beträgt die Arbeitszeit pro Probenansatz ebenfalls mindestens 180 Minuten (intraoperative Biopsie: 20 Minuten; manuelle Zerkleinerung von 0,2 g Frischgewebe: 5 Minuten; Vortex[®]: 10 Minuten; Zellfärbung und -zählung: 30 Minuten; Inkubation mit Antikörpern: 100 Minuten; FACS-Durchflusszytometrie: 15 Minuten). Bei Verwendung des gentleMACS[®]-Protokolls müssen pro Probenansatz mindestens 255 Minuten aufgewendet werden (intraoperative Biopsie: 20 Minuten; manuelle Zerkleinerung von 0,2 g Frischgewebe: 5 Minuten; gentleMACS[®]: 85 Minuten; Zellfärbung und -zählung: 30 Minuten; Inkubation mit Antikörpern: 100 Minuten; FACS-Durchflusszytometrie: 15 Minuten).

Die folgenden Abbildungen geben einen Überblick über die Tumormenge sowie die Zeit, die für die Durchführung der jeweiligen SOP-Protokolle benötigt wird.

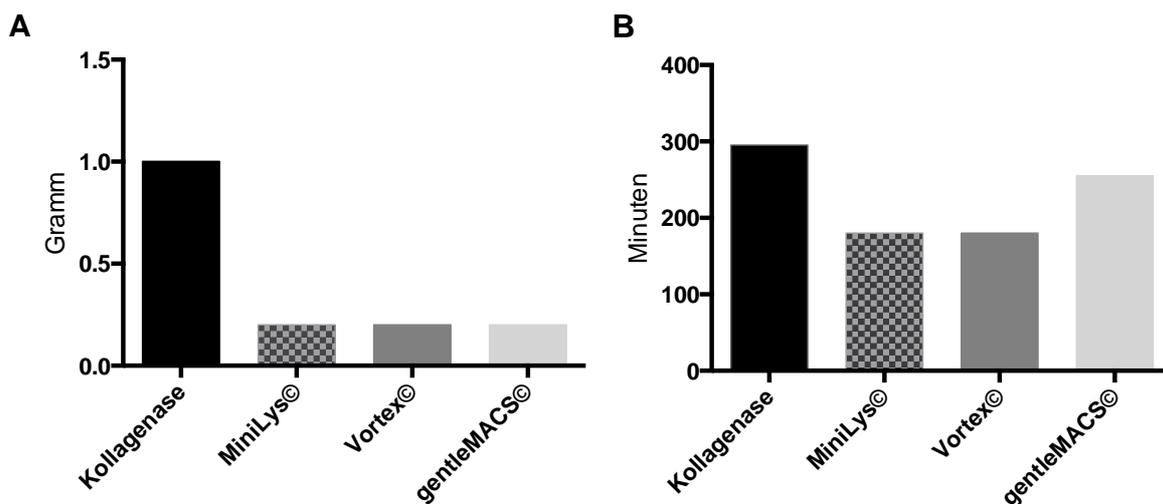


Abbildung 17 Probenmenge und Zeitaufwand im Vergleich

(A) nach SOP benötigte Tumorprobenmenge, Angaben in Gramm. **(B)** Zeitdauer der Protokolle, Angaben in Minuten.

Das Vortex©-Protokoll unterscheidet sich weder hinsichtlich des vitalen Zellanteils noch hinsichtlich der TIL-Subpopulationen signifikant von den Ergebnissen des MiniLys©-Protokoll, jedoch sollte es aus den unter 5.2.3. genannten Gründen nur in Ausnahmefällen als Ersatz des MiniLys©-Protokolls dienen.

Auch für das gentleMACS©-Protokoll wird die gleiche Probenmenge benötigt, und es wird eine vergleichbare vitale Zellzahl gemessen. Das Verfahren ist durch die enzymatische Komponente durch Verwendung von Kollagenase ähnlich zeitaufwendig wie das Kollagenase-Protokoll. Aufgrund der geringen Probandenanzahl ($n = 1$) kann dieser Vergleich nur als richtungsweisend gesehen werden, für prägnantere Ergebnisse müssten mehr Proben nach dem gentleMACS©-Protokoll prozessiert und ausgewertet werden.

Beim Vergleich der MiniLys©-Ansätze zeigte das Protokoll a-20 Sek. gegenüber dem Protokoll b-20 Sek. mit ebenfalls signifikant höherem vitalen Zellanteil einen geringfügig höheren Median bei nur minimal größerem Interquartilsabstand. Aufgrund der Ergebnisse der vorangegangenen Testreihen haben wir uns daher dazu entschieden, die rein mechanische und kollagenasefreie Herstellung einer Einzel-Zellsuspension mittels MiniLys©-Protokoll a-20 Sek. als neues standardisiertes Protokoll für weitere Versuchsreihen mit Nierengewebeproben zu verwenden.

5. Diskussion

5.1. Enzymatischer Gewebeaufschluss

5.1.1. Gewebeaufschluss auf Kollagenase-Basis

In der Literatur finden sich zahlreiche Arbeiten über den enzymatischen Aufschluss von Gewebe, für den häufig Enzyme wie Kollagenase, Hyaluronidase, Dispase I oder Trypsin verwendet werden. Um Zelldissoziation zu fördern und einer Zelladhäsion entgegenzuwirken, erfolgt dies meist in Kombination mit DNase sowie den chemischen Agenzien Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und Dithiothreitol (DTT) (Van Damme, Baeten et al. 1999, Van Damme, Baeten et al. 2000, Autengruber, Gereke et al. 2012).

Bei der Kollagenase handelt es sich um eine natürlicherweise beim Menschen vorkommende Peptidase. Das Enzym, das ursprünglich von dem Bakterium *Clostridium hydrolyticum* gewonnen (Seifter, Gallop et al. 1959) wurde, wird für den Laborgebrauch synthetisch hergestellt. Nachdem die Kollagenase bei der Extraktion interstitieller Zellen aus Lungengewebe vielversprechende Ergebnisse zeigte (Holt, Degebrot et al. 1985), etablierten sich über die Jahrzehnte Kollagenase-basierte Protokolle vor allem aufgrund ihrer hohen vitalen Zellausbeute zu einer Standardmethode beim Aufschluss humanen Gewebes. Ein weiterer Vorteil ist, dass epitheliale Zellen durch die Kollagenase in einem geringeren Maße angegriffen werden als durch andere Enzyme wie zum Beispiel der Dispase (Holt, Robinson et al. 1986, Autengruber, Gereke et al. 2012). Aufgrund dieser Erfahrungswerte prozessierten wir renales Frischtumorgewebe zu Beginn der Versuchsreihe zur Isolierung tumorinfiltrierender T-Lymphozyten (TIL) mittels enzymatischen Gewebeaufschlusses unter Verwendung von Kollagenase IA, wie bereits im Labor der Klinik für Urologie und Kinderurologie etabliert.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass mittels Kollagenase-Verdau der größte Anteil vitaler Zellen isoliert werden kann (69,31 % \pm 21,03 %). Jedoch erweisen sich die mittels rein enzymatischem Gewebeaufschluss prozessierten Proben in der FACS-Messung aufgrund eines Einbruches der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) mit Abnahme der Expressionsstärke als problematisch, was nicht nur durch die Arbeitsgruppe Janssen gezeigt werden konnte (siehe 4.1.7), sondern auch von Autengruber et al. nach der Untersuchung von 48 immunologisch relevanten Oberflächenmolekülen (darunter auch CD4, CD8, BTLA, CD25 und CD62L, jedoch nicht CD39) (Autengruber, Gereke et al. 2012). Dies erschwert das Gating der CD4⁺-TIL-Subpopulation und damit auch die Ermittlung des prozentualen Anteils der CD4⁺CD25⁺CD127^{low}CD39⁺-T_{reg}-Zellen, einer wichtigen Zellpopulation unter den regulatorischen T-Zellen. Der Intensitätsverlust der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) des monoklonalen CD4-Antikörpers ist auf die enzymatische Eigenschaft der Kollagenase zu-

rückzuführen. Diese schädigt als proteolytisches Enzym membrangebundene Rezeptoren und kann so die Dichte der Oberflächenmoleküle reduzieren. Dieses Phänomen ist bereits mehrfach in der Literatur beschrieben worden (Abuzakouk, Feighery et al. 1996, Diederichsen, Zeuthen et al. 1999, Van Damme, Baeten et al. 2000), wird aber erst mit der hochauflösenden FACS Analyse klinisch relevant. Die Arbeitsgruppe um Chen et. al. wies zudem einen selektiven Effekt der Kollagenasen I und IV auf die Expressionsdichte des Oberflächenmoleküls CD27 auf Lymphozyten nach, wohingegen in der gleichen Studie das Expressionsmuster des Moleküls CD11b davon unbeeinflusst blieb (Chen, Chen et al. 2014). Ähnliches gilt für die Expression von CD25 und L-Selectin (Van Damme, Baeten et al. 2000).

Über genau diese Expressionsintensität der Oberflächenmoleküle werden jedoch immunologische Zellfunktionen determiniert. Intakte Zellstrukturen und Oberflächenmoleküle sind daher unabdingbare Voraussetzungen, um mittels durchflusszytometrischer Messungen oder in-vitro Zellkultur-Assays verlässliche Aussagen über die Zellfunktion treffen zu können. Daher erweisen sich Zellisolationmethoden als ungeeignet, die aufgrund enzymatischer Eigenschaften die Analyse der T-Zellen erschweren oder beeinflussen.

5.1.2. Gewebeaufschluss mittels gentleMACS®

Dass ein direkter Transfer solcher Forschungsergebnisse unabhängig von der Gewebeentität jedoch nicht immer möglich ist, zeigen die von der Arbeitsgruppe um Novelli et. al. publizierten Ergebnisse. Sie isolierten aus Proben des kutanen T-Zell-Lymphoms mit der Kombination aus mechanischem (Medimachine®) und enzymatischem Gewebeverdau (Kollagenase IA) den höchsten vitalen Zellanteil (Novelli, Savoia et al. 2000). Die für den Immunphänotyp des kutanen T-Zell-Lymphoms relevanten Oberflächenproteine zeigten keine Veränderungen ihrer Expressionsintensität.

Der von uns getestete enzymatisch-mechanische Gewebeaufschluss ist das gentleMACS®-Protokoll. Die Probandengruppe ist nicht groß genug, um valide Rückschlüsse ziehen zu können, jedoch lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass dieser mechanisch-enzymatische Aufschluss vergleichbar ist mit den Ergebnissen des Kollagenase-Protokolls (vitaler Zellanteil: 69,1 %, vitaler Zellanteil Kollagenase: 69,31 % ± 21,03 %). Auch die Arbeitsgruppe um Baldan et. al. (Baldan, Griffiths et al. 2015) kam zu dem Ergebnis, dass sich mit enzymatischer (Kollagenase) sowie mechanisch-enzymatischer (gentleMACS®) Gewebeprozessierung eine vergleichbare Menge an TIL isolieren lasse. Jedoch finden sich in unseren Ergebnissen eine im Vergleich hierzu kleine CD4⁺-Population und zudem insbesonde-

re im Vergleich zum MiniLys©-Protokoll a-20 Sek. eine kleine T_{reg}-Population. Aufgrund des enzymatischen Gewebeaufschlusses ist es, wie auch schon beim Kollagenase-Protokoll möglich, dass dies durch die von der Kollagenase verursachte Veränderung der Zelloberfläche bedingt ist. Zu hinterfragen ist in diesem Zusammenhang nicht nur, ob die Kombination der enzymatischen und mechanischen Methode die Oberflächenstruktur der Zellen in größerem Maße schädigt, sondern auch, ob die applizierte Enzymdosis möglicherweise eine Rolle spielt und optimiert werden kann (Quatromoni, Singhal et al. 2015).

Zusammenfassend zeigt sich, dass die Prozessierung von renalem Tumorfriischgewebe mit einer, wenn auch nur anteiligen, Verwendung von Kollagenase keine optimale Grundlage für die durchflusszytometrische Analyse der T-Zell-Subpopulationen darstellt.

5.2. Rein mechanische Separationsverfahren als mögliche Alternative?

5.2.1. Gewebeaufschluss mittels MiniLys©

Vor dem Hintergrund der unter 5.1. gezogenen Schlussfolgerungen besteht die dringende Notwendigkeit, eine Kollagenase-freie nicht-enzymatische robuste Zellextraktionsmethode zu etablieren, die routinemäßig im Labor Anwendung finden kann. Nachdem sich die Kollagenase ursprünglich nicht zuletzt wegen des hohen Anteils vitaler Zellen als Standard-Isolierungsmethode etablieren konnte, liegt die besondere Schwierigkeit darin, eine vergleichbare Menge vitaler Zellen zu isolieren. Dies ist uns mit dem MiniLys©-Protokoll a-20 Sek. gelungen (vitaler Zellanteil: 65,41 % ± 21,67 %, vitaler Zellanteil Kollagenase: 69,31 % ± 21,03 %). Auch der Vergleich des Interquartilsabstandes zeigt, dass das MiniLys©-Protokoll ähnlich reproduzierbar ist und damit eine wesentliche Voraussetzung für die Standardisierung der Methode erfüllt.

Ähnlich vielversprechende Ergebnisse zeigt die Publikation der Arbeitsgruppe um Grange, Létourneau et. al aus dem Jahre 2011. Sie verglichen Extraktionsmethoden zur Isolierung tumorinfiltrierender Immunzellen (TIIC) aus Tumorgewebe der Brust, der Niere und der Lunge. Hierbei zeigte sich, dass beim enzymatischen Gewebeaufschluss (Kollagenase IA oder in Kombination mit DNase I Typ II) die Zellproliferation und die Detektion der Oberflächenmoleküle CD4, CD8, CD45RA und CD14 signifikant niedriger war als bei Proben, die mechanisch mittels Medimachine© prozessiert wurden (Grange, Letourneau et al. 2011). Medimachine© ist ebenfalls ein Gerät zur standardisierten Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus Proben solider Tumoren. Im Gegensatz zu den Plastikkügelchen der MiniLys©-Falcons enthalten die Medicons der Medimachine© metallene Schneideblätter mit Rotationsmecha-

nismus. In der vorliegenden Veröffentlichung wurden die Proben mit einer Größe von ca. 2 mm³ unter Zugabe von 1-2 ml RPMI-Puffer drei bis vier Mal für je 30 Sekunden bei einer Geschwindigkeit von 100 rpm prozessiert. Auch Attig et. al. verwendete Medimachine© erfolgreich zur Isolierung von TIL aus Nierenzellkarzinomgewebe (Attig, Hennenlotter et al. 2009). In der weiteren Analyse fokussierte sich die Arbeitsgruppe auf die phänotypische Erscheinung der isolierten T-Effektorzellen. Ergebnisse hinsichtlich des vitalen Zellanteils gegliedert nach histologischem Typ oder Gewebekonsistenz finden sich in keiner der beiden Veröffentlichungen. Daher lassen sich die Ergebnisse dieser Arbeiten nicht direkt mit dem MiniLys©-Protokoll vergleichen, jedoch zeigen auch sie, dass sich mittels rein mechanischer Verfahren sehr gute Ergebnisse hinsichtlich der T-Zell-Isolation erzielen lassen.

5.2.2. Probengröße und Zeitfaktor

Wesentliche Vorteile der MiniLys©-Methode sind der Mengen- sowie der Zeitfaktor. Aus nur einem Fünftel der vorher benötigten Tumormenge konnten wir mit erheblich geringerem Zeitaufwand eine vergleichbare Menge vitaler Zellen gewinnen. Die prozessierte Probengröße ist insbesondere relevant hinsichtlich der Stadienverteilung bei Diagnosestellung des Nierenzellkarzinoms mit geschätzten 50 % im Stadium T1, also einem maximalen Tumordurchmesser von kleiner oder gleich 4 cm (Robert Koch-Institut 2013). Diese Entwicklung führt dazu, dass immer weniger Tumormaterial zu Forschungszwecken gewonnen werden kann.

5.2.3. Tumorkonsistenz

Neben der Tumorgröße ist auch die Tumorkonsistenz relevant. Es besteht eine große Varianz hinsichtlich der Gewebestruktur von Nierentumoren, auch wenn diese der gleichen histologischen Entität entspringen. Zu hinterfragen ist daher, ob das MiniLys©-Protokoll auch bei unterschiedlichen Gewebestrukturen vergleichbare Ergebnisse zeigt, oder ob gerade bei harter Gewebekonsistenz die Kollagenase durch ihren proteolytischen Effekt im Vorteil ist. Zum direkten Vergleich prozessierten wir daher Tumorproben des gleichen Patienten nach dem MiniLys©-Protokoll a-20 Sek. sowie nach dem Kollagenase-Protokoll. Die Ergebnisse konnten jedoch bei harter Tumorkonsistenz keinen Vorteil der Kollagenase zeigen – ganz im Gegenteil war hier das rein mechanische Separationsverfahren hinsichtlich der vitalen Zellzahl signifikant überlegen. Damit stellte sich das MiniLys©-Protokoll auch unabhängig von Gewebestruktur sowie histologischer Entität des Tumors als Verfahren der Wahl heraus.

5.2.4. Gewebeaufschluss mittels Vortex®

Auf der Suche nach weiteren rein mechanischen Zellisolationmethoden prozessierten wir auch Proben nach dem Vortex®-Protokoll, das sich bei Lymphom- und Knochenmark-Biopsien als verlässliche Methode erwiesen hatte (Vos, Simurdak et al. 2003). Beschrieben werden in der Arbeit reduzierte vitale Zellmengen bei fester Gewebekonsistenz. Dies konnten wir nicht eindeutig bestätigen, da die Proben auch innerhalb der nach Konsistenz gebildeten Gruppen eine recht große Varianz aufwiesen.

Das Vortex®-Gerät entspricht mit 3000 rpm der Intensitätsstufe der MiniLys®-Versuchsreihe a. Vergleicht man die Ansätze V1 (n = 7) und MiniLys® a-20 Sek. (n = 7), so zeigen sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Anzahl vitaler Zellen und der relevanten T-Zellpopulationen (vergleiche Abbildung 13). Auch in Bezug auf die benötigte Tumormenge sowie den Zeitfaktor sind beide Ansätze identisch. Daher kann das Vortex®-Protokoll V1 bei einem Ausfall des MiniLys®-Gerätes als Ersatz dienen. Die notwendige Anwendung einer Stoppuhr sowie das manuelle Assistieren machen dieses Protokoll jedoch weniger standardisierbar. Kleinere Abweichungen im Vortex®-SOP-Protokoll sind daher immer möglich. Als verlässliche Alternative sehen wir das Vortex®-Protokoll jedoch nicht, da sich hier im Vergleich der vier Verfahren die geringste vitale Zellmenge ergab.

5.3. Die Bedeutung des vitalen Zellanteils

Der vitale Zellanteil und damit auch die Anzahl tumorinfiltrierender Lymphozyten (TIL) sind insbesondere im Hinblick auf die immunmodulierenden Therapieansätze des Nierenzellkarzinoms von Bedeutung. Wie auch das Maligne Melanom wird das Nierenzellkarzinom vor allem aufgrund seiner spontanen Regression und intratumoraler Lymphozyteninfiltration als immunogener Tumor eingestuft (Rosenberg 1995). Während beim Malignen Melanom die Therapie mit IL-2 jedoch routinemäßig eingesetzt wird (Dudley, Wunderlich et al. 2003, Rosenberg and Dudley 2004), haben sich im fortgeschrittenen Stadium des Nierenzellkarzinoms keine vergleichbaren Therapieerfolge gezeigt (Figlin, Thompson et al. 1999, Dillmann, Schiltz et al. 2004). Im metastasierten Tumorstadium finden aktuell sowohl die sogenannte „targeted therapy“, die auf eine Blockade des VEGF-Wachstumsfaktors mittels Tyrosinkinase-Inhibitoren, Antikörpern und mTOR-Inhibitoren abzielt, als auch Checkpoint-Inhibitoren Anwendung. Die Immuntherapie mit den als gleichwertig geltenden Zytokinen Interferon- α und Interleukin-2 ist hingegen in den Hintergrund getreten (Coppin, L. et al. 2008, Ko, Xie et al. 2015), obwohl die IL-2-Therapie im Gegensatz zur neuen Generation der verwendeten

Tyrosinkinase-Inhibitoren in einzelnen Fällen tatsächlich eine anhaltende Remission oder ein Stopp des Tumorwachstums zeigt (Parton, Gore et al. 2006). Bedingt scheint dies unter anderem durch die bisher als problematisch gehandelte optimale Isolierungsmethode der TIL aus Tumorfrischgewebe zu sein, anhand derer es möglich sein muss, eine ausreichende Menge intakter TIL vorzulegen, die in vitro mit einer Hochdosis IL-2 stimuliert und zur Expansion angeregt werden können.

Vielversprechende neuere Ergebnisse hinsichtlich des adaptiven Zelltransfers (Markel, Cohen-Sinai et al. 2009) zeigen, dass TIL mithilfe einer in der Melanom-Forschung bewährten enzymbasierten Kultivierungsmethode (Dudley, Wunderlich et al. 2003, Dudley, Wunderlich et al. 2005) erfolgreich aus metastasiertem Tumorgewebe von Nierenzellkarzinom-Patienten generiert werden konnten. Insgesamt wurden zehn Gewebeproben prozessiert, von denen jedoch nur aus Proben des klarzelligen Nierenzellkarzinoms erfolgreich TIL gewonnen werden konnten.

Nachdem nun mit der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass die rein mechanische Methode eine mögliche Alternative zum enzymatischen Verdau darstellt, müsste sich als nächster Schritt eine Versuchsreihe mit Kultivierung der mittels MiniLys©-Protokoll a-20 Sek. gewonnen Zellen anschließen. So ließe sich analysieren, inwiefern sich diese Methode zur Isolierung tumorinfiltrierender Lymphozyten hinsichtlich deren Stimulations- und Expansionsfähigkeit eignet.

5.4. Die Bedeutung intakter Zellmarker und -funktion

Neben vitalem Zellanteil einschließlich der Anzahl tumorinfiltrierender Lymphozyten (TIL) ist insbesondere im Hinblick auf die Immuntherapie des Nierenzellkarzinoms die Erhaltung der Oberflächenmarker von elementarer Bedeutung. In diesem Zusammenhang wird auf die weiterführende und in der vorliegenden Publikation (Crossey, Marx et al. 2018) ebenfalls enthaltene polyklonale Stimulation der CD4⁺- und CD8⁺-Zellen mittels SEB (Staphylokokken-Enterotoxin B) verwiesen. Diese Versuchsreihe wurde durch Frau Dipl. Biol. Stefanie Marx durchgeführt und ist nicht Bestandteil dieser Promotion. Die gemäß MiniLys©-Protokoll a-20 Sek. mechanisch isolierten Zellen zeigten in der durchflusszytometrischen Messung eine starke Induktion der IFN- γ - sowie der TNF- α -Ausschüttung als Zeichen der erhaltenen Zellfunktion der tumorinfiltrierenden Lymphozyten. Auch die Expression der Oberflächenmarker konnte im Gegensatz zum enzymatischen Aufschlussverfahren mit der mechanischen Isolationsweise erhalten werden; dies spiegelte sich sowohl in der Quantifizierung der CD4⁺-

Zellen als auch des Rezeptors CD272 (BTLA) wider. Letzterer dient der Beurteilung des anergen Zustandes der T-Zellen (Crossey, Marx et al. 2018).

Als nächster Schritt wäre eine Charakterisierung der Anti-Tumor-Aktivität der mechanisch isolierten aktiven CD4⁺- und CD8⁺-Zellen vorzunehmen.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, dass die rein mechanische Methode eine mögliche Alternative zum enzymatischen Verdau darstellt und diesem in Hinblick auf die diskutierten Punkte teilweise signifikant überlegen ist. Als Ergebnis konnte daher das „MiniLys“©-Protokoll „a-20 Sek.“ als neues Standardprotokoll (SOP) zur zukünftigen Herstellung von Einzel-Zellsuspension aus frischem Nierentumorgewebe etabliert werden.

6. Standard Operating Procedures (SOP)

6.1. Isolierung von Nierenzellen aus Frischgewebe mittels Kollagenase

	SOP - Zellkultur Klinik für Urologie und Kinderurologie	Seite 1 v. 4
Datum: 01.05.2011	Standardarbeitsanweisung zur Isolierung von Nierenzellen aus Frischgewebe durch Gewebeaufschluss mittels Kollagenase	Version: 2

!

Arbeitsanweisung SOP Standard Operating Procedure	
Titel:	Isolierung von Nierenzellen aus Frischgewebe durch Gewebeaufschluss mittels Kollagenase
Diese SOP gilt ab:	01.05.2011
Diese SOP ersetzt die Fassung vom:	02.10.2010
Zielsetzung:	Allgemeine Arbeitsanweisung (SOP) für das Isolieren von Nierenzellen aus Frischgewebe
Verantwortlich für die Ausführung:	Martin Janssen
Änderungshinweise:	Keine Aussaat mit anschließender Aufnahme in Zellkultur
Datum / Unterschrift	
Verfasst: Fiona Crossey
Überprüft: Dr. med. M. Janssen
Verteiler:	AG Janssen
1. Ziel der Methode:	Isolierung von Nierenzellen aus Frischgewebe
2. Prinzip der Methode:	Enzymatischer Aufschluss des Frischgewebes

	SOP - Zellkultur Klinik für Urologie und Kinderurologie	Seite 2 v. 4
Datum: 01.05.2011	Standardarbeitsanweisung zur Isolierung von Nierenzellen aus Frischgewebe durch Gewebeaufschluss mittels Kollagenase	Version: 2

!

3. Materialien und Geräte				
3.1. Geräte und Hilfsmittel: <ul style="list-style-type: none"> - 2 x Skalpell (B. Braun Fig. 10) - Cell Strainer, 40 µm - FACS-Röhrchen - Neubauer Zählkammer mit Deckglas - Pinzette - Pipettierhilfen - Reaktionsgefäße mit Deckel (1,5 ml) - sterile Pasteurpipetten lang (ungestopft), kurz (gestopft) - sterile Petrischalen - sterile Pipetten - Vortex-Gerät - Zentrifuge - Zentrifugenröhrchen 15ml - Zentrifugenröhrchen 50ml 				
3.2. Messgeräte: <ul style="list-style-type: none"> - Mikroskop - Messwaage (micro scales) - FACS Canto II© (BD, Heidelberg) 				
3.3. Reagenzien: <ul style="list-style-type: none"> - Collagenase IA, 100U/ml - Transportmedium RPMI Basal (= RPMI-1640 (Sigma, R8758) + 2% Penicillin-Streptomycin (Sigma, P4333)) - PBS-EDTA 0,02% - Trypanblau stock (0,4%) (Trypanblau ready-to-use = 1Teil Stock + 9Teile PBS) - Lysing-Solution - FACS-Puffer - PFA 1% 				
AK (Fluorochrom)	Klon	Ig-Klasse	Firma	Katalognr.
CD4 (APC-H7)	SK3	IgG1	BD	641398
CD8 (V500)	RPA-T8	IgG1	BD	560787
CD25 (V450)	M-A251	IgG1	BD	561257
CD28 (PerCP-Cy5.5)	L293	IgG1	BD	337181
CD39 (APC)	TU66	IgG2b	BD	560239
CD45RO (PE-Cy7)	UCHL-1	IgG2a	BD	337168

	SOP - Zellkultur Klinik für Urologie und Kinderurologie	Seite 3 v. 4
Datum: 01.05.2011	Standardarbeitsanweisung zur Isolierung von Nierenzellen aus Frischgewebe durch Gewebeaufschluss mittels Kollagenase	Version: 2

!

	CD62L (PE)	DREG-56	IgG1	BD	560966
	CD127 (FITC)	eBioRDR5	IgG1	eBioscience	11-1278
	CD272 (PE)	J168-540	IgG1	BD	558485
	CD279 (PD-1 APC)	MIH4	IgG1	BD	558694

4. Methodendurchführung	Benötigte Zeit für einen Probenansatz (Gewebe): 295 min <ul style="list-style-type: none"> - Intraoperative Biopsie (Tumor- und Normalgewebe): 20 min - Manuelle Zerkleinerung von 1 g Frischgewebe: 20 min - Kollagenase: 110 min - Zellfärbung und -zählung: 30 min - Inkubation mit Antikörpern: 100 min - Messung FACS-Durchflusszytometrie: 15 min
--------------------------------	--

4.1. Vorbereitung:	Aufklärung des Patienten, Unterschrift der Einverständniserklärung
---------------------------	--

4.2. Durchführung:	Gewebeaufschluss mittels Kollagenase: <ul style="list-style-type: none"> - perioperativ Tumor- und Normalgewebeentnahme nach Nephrektomie/Nierenteilresektion - Probe unverzüglich in RPMI Basalmedium auf Eis lagern - unter sterilen Kautelen 1g Gewebe in einer Petrischale ohne Medium manuell mit Skalpell zerkleinern (ca. 1mm Kantenlänge) - unter sterilen Kautelen 5ml Collagenase IA, 100 U/ml dazugeben - 30 min bei 37°C inkubieren - mit 5ml Pipette in ein 15ml Zentrifugenröhrchen überführen, dabei etwas resuspendieren - 30 min bei 37°C inkubieren (Lagerung in 30° Schräglage) - mit 5ml Pipette resuspendieren - 30 min bei 37°C inkubieren (Lagerung in 30° Schräglage) - durch 40µm Cell Strainer in 50ml Zentrifugenröhrchen überführen, mit 5 ml Transportmedium nachspülen - 3 min bei 1100 U/min zentrifugieren - Überstand absaugen - in 10 ml FACS-Puffer aufnehmen Zellzählung: <ul style="list-style-type: none"> - 90 µl PBS-EDTA 0,02% und 10 µl jeder Probe in Reaktionsgefäß mit Deckel überführen, vorsichtig vortexen - Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer CAVE: falls nicht möglich, dann weitere Verdünnung wie folgt: 10 µl der 100 µl mit weiteren 90 µl PBS-EDTA 0,02% verdünnen, vorsichtig vortexen
---------------------------	---

	SOP - Zellkultur Klinik für Urologie und Kinderurologie	Seite 4 v. 4
Datum: 01.05.2011	Standardarbeitsanweisung zur Isolierung von Nierenzellen aus Frischgewebe durch Gewebeaufschluss mittels Kollagenase	Version: 2

!

<p>Tryphanblau-Vitalfärbung:</p> <ul style="list-style-type: none"> - zu 10 µl des Zellsuspensats 10 µl Tryphanblau hinzugeben und resuspendieren (nicht vortexen!) - Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer <p>Antikörperzusatz:</p> <ul style="list-style-type: none"> - benötigtes Zellsuspensat-Volumen (mind. 1 mio vitale Zellen) in FACS Tubes überführen - FACS-Tubes 3 min bei 1100 U/min zentrifugieren - Überstand absaugen - 100 µl PBS-EDTA 0,02% hinzufügen - Antikörpermischung vorbereiten und hinzugeben <p>P1 CD4, CD8, CD25, CD127, CD39, CD28, CD62L, CD45RO P2 CD4, CD8, CD25, CD127, CD272, CD279</p> <ul style="list-style-type: none"> - 30 min bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubieren - Zugabe von 2 ml Lysing-Solution - vorsichtig vortexen - 10 min bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubieren - 7 min bei 1300 rpm zentrifugieren - Überstand absaugen - 2 ml FACS Puffer hinzugeben und vortexen - 7 min bei 1300 rpm zentrifugieren - Überstand absaugen - Pellet vortexen - in 200 µl PFA 1% aufnehmen und resuspendieren - bis zur Messung bei 4-8°C lagern <p>Abschließend: Probenmessung mittels Durchflusszytometrie mithilfe der FACS-Diva© Software</p>
<p>5. Dokumentation:</p> <p>Beschriftung der Proben nach folgendem Schema:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Tumor: Kürzel Name_RCC_P01 oder P02 - Niere: Kürzel Name_Niere_P01 oder P02 - Kontrolle: Kürzel Name_RCC oder Niere_unstained

6.2. Isolierung von Nierenzellen aus Frischgewebe mittels MiniLys©

	SOP - Zellkultur Klinik für Urologie und Kinderurologie	Seite 1 v. 5
Datum: 01.05.2011	Standardarbeitsanweisung zur Isolierung von Nierenzellen aus Frischgewebe mittels MiniLys©	Version: 1

!

Arbeitsanweisung SOP Standard Operating Procedure	
Titel:	Isolierung von Nierenzellen aus Frischgewebe mittels MiniLys©
Diese SOP gilt ab:	01.05.2011
Diese SOP ersetzt die Fassung vom:	1. Fassung
Zielsetzung:	Allgemeine Arbeitsanweisung (SOP) für das Isolieren von Nierenzellen aus Frischgewebe
Verantwortlich für die Ausführung:	Martin Janssen
Änderungshinweise:	keine
Datum / Unterschrift	
Verfasst:	<p>..... Fiona Crossey</p>
Überprüft:	<p>..... Dr. med. M. Janssen</p>
Verteiler:	AG Janssen
1. Ziel der Methode:	Isolierung von Nierenzellen aus Frischgewebe
2. Prinzip der Methode:	Mechanischer Aufschluss des Frischgewebes

	SOP - Zellkultur Klinik für Urologie und Kinderurologie	Seite 2 v. 5
Datum: 01.05.2011	Standardarbeitsanweisung zur Isolierung von Nierenzellen aus Frischgewebe mittels MiniLys©	Version: 1

!

3. Materialien und Geräte																																							
3.1. Geräte und Hilfsmittel:	<ul style="list-style-type: none"> - 2 x Skalpell (B. Braun Fig. 10) - Cell Strainer, 40 µm - FACS-Röhrchen - MiniLys©-Keramik-Kit, 1,4 mm, 2 ml Röhrchen - MiniLys©-Gerät - Neubauer Zählkammer mit Deckglas - Pinzette - Pipettierhilfen - Reaktionsgefäße mit Deckel (1,5 ml) - sterile Pasteurpipetten lang (ungestopft), kurz (gestopft) - sterile Petrischalen - sterile Pipetten - Vortex-Gerät - Zentrifuge - Zentrifugenröhrchen 15ml - Zentrifugenröhrchen 50ml 																																						
3.2. Messgeräte:	<ul style="list-style-type: none"> - Mikroskop - Messwaage (micro scales) - FACS Canto II© (BD, Heidelberg) 																																						
3.3. Reagenzien:	<ul style="list-style-type: none"> - Transportmedium RPMI Basal (= RPMI-1640 (Sigma, R8758) + 2% Penicillin-Streptomycin (Sigma, P4333)) - PBS-EDTA 0,02% - Trypanblau stock (0,4%) (Trypanblau ready-to-use = 1Teil Stock + 9Teile PBS) - Lysing-Solution - FACS-Puffer - PFA 1% 																																						
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">AK (Fluorochrom)</th> <th style="text-align: left;">Klon</th> <th style="text-align: left;">Ig-Klasse</th> <th style="text-align: left;">Firma</th> <th style="text-align: left;">Katalognr.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>CD4 (APC-H7)</td> <td>SK3</td> <td>IgG1</td> <td>BD</td> <td>641398</td> </tr> <tr> <td>CD8 (V500)</td> <td>RPA-T8</td> <td>IgG1</td> <td>BD</td> <td>560787</td> </tr> <tr> <td>CD25 (V450)</td> <td>M-A251</td> <td>IgG1</td> <td>BD</td> <td>561257</td> </tr> <tr> <td>CD28 (PerCP-Cy5.5)</td> <td>L293</td> <td>IgG1</td> <td>BD</td> <td>337181</td> </tr> <tr> <td>CD39 (APC)</td> <td>TU66</td> <td>IgG2b</td> <td>BD</td> <td>560239</td> </tr> <tr> <td>CD45RO (PE-Cy7)</td> <td>UCHL-1</td> <td>IgG2a</td> <td>BD</td> <td>337168</td> </tr> </tbody> </table>	AK (Fluorochrom)	Klon	Ig-Klasse	Firma	Katalognr.	CD4 (APC-H7)	SK3	IgG1	BD	641398	CD8 (V500)	RPA-T8	IgG1	BD	560787	CD25 (V450)	M-A251	IgG1	BD	561257	CD28 (PerCP-Cy5.5)	L293	IgG1	BD	337181	CD39 (APC)	TU66	IgG2b	BD	560239	CD45RO (PE-Cy7)	UCHL-1	IgG2a	BD	337168				
AK (Fluorochrom)	Klon	Ig-Klasse	Firma	Katalognr.																																			
CD4 (APC-H7)	SK3	IgG1	BD	641398																																			
CD8 (V500)	RPA-T8	IgG1	BD	560787																																			
CD25 (V450)	M-A251	IgG1	BD	561257																																			
CD28 (PerCP-Cy5.5)	L293	IgG1	BD	337181																																			
CD39 (APC)	TU66	IgG2b	BD	560239																																			
CD45RO (PE-Cy7)	UCHL-1	IgG2a	BD	337168																																			

	SOP - Zellkultur Klinik für Urologie und Kinderurologie	Seite 3 v. 5
Datum: 01.05.2011	Standardarbeitsanweisung zur Isolierung von Nierenzellen aus Frischgewebe mittels MiniLys©	Version: 1

!

	CD62L (PE)	DREG-56	IgG1	BD	560966
	CD127 (FITC)	eBioRDR5	IgG1	eBioscience	11-1278
	CD272 (PE)	J168-540	IgG1	BD	558485
	CD279 (PD-1 APC)	MIH4	IgG1	BD	558694

4. Methodendurchführung	Benötigte Zeit für einen Probenansatz (Gewebe): 180 min <ul style="list-style-type: none"> - Intraoperative Biopsie (Tumor- und Normalgewebe): 20 min - Manuelle Zerkleinerung von 0,2 g Frischgewebe: 5 min - MiniLys©: 10 min - Zellfärbung und -zählung: 30 min - Inkubation mit Antikörpern: 100 min - Messung FACS-Durchflusszytometrie: 15 min
--------------------------------	---

4.1. Vorbereitung:	Aufklärung des Patienten, Unterschrift der Einverständniserklärung
---------------------------	--

4.2. Durchführung:	MiniLys©: <ul style="list-style-type: none"> - perioperativ Tumor- und Normalgewebeentnahme nach Nephrektomie/Nierenteilresektion - Probe unverzüglich in RPMI Basalmedium auf Eis lagern - unter sterilen Kautelen 1,8 g Gewebe in einer Petrischale ohne Medium manuell mit Skalpell zerkleinern (ca. 1mm Kantenlänge) - 0,2 g Tumor pro MiniLys©-Röhrchen überführen und 1 ml PBS-EDTA 0,02% hinzufügen - MiniLys©-Run der 9 Proben nach folgendem Schema: Speed: A=3.000 rpm B=4.000 rpm C=5.000 rpm
---------------------------	--

!

Röhrchen	Speed	Zeit (sek.)
1	A	20
2	A	40
3	A	60
4	B	20
5	B	40
6	B	60
7	C	20
8	C	40
9	C	60

!

	SOP - Zellkultur Klinik für Urologie und Kinderurologie	Seite 4 v. 5
Datum: 01.05.2011	Standardarbeitsanweisung zur Isolierung von Nierenzellen aus Frischgewebe mittels MiniLys©	Version: 1

!

!

- Inhalt der Röhrchen durch 40 µm Strainer in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführen
- Strainer mit 4 ml PBS-EDTA 0,02% auswaschen
- 3 min bei 1100 U/min zentrifugieren
- Überstand absaugen
- In 4 ml PBS-EDTA aufnehmen

Zellzählung:

- 90 µl PBS-EDTA 0,02% und 10 µl jeder Probe in Reaktionsgefäß mit Deckel überführen, vorsichtig vortexen
- Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer
CAVE: falls nicht möglich, dann weitere Verdünnung wie folgt:
10 µl der 100 µl mit weiteren 90 µl PBS-EDTA 0,02% verdünnen, vorsichtig vortexen

Tryphanblau-Vitalfärbung:

- zu 10 µl des Zellsuspensats 10 µl Tryphanblau hinzugeben und resuspendieren (nicht vortexen!)
- Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer

Antikörperzusatz:

- benötigtes Zellsuspensat-Volumen (mind. 1 mio vitale Zellen) in FACS Tubes überführen
- FACS-Tubes 3 min bei 1100 U/min zentrifugieren
- Überstand absaugen
- 100 µl PBS-EDTA 0,02% hinzufügen
- Antikörpermischung vorbereiten und hinzugeben

P1 CD4, CD8, CD25, CD127, CD39, CD28, CD62L, CD45RO
P2 CD4, CD8, CD25, CD127, CD272, CD279
M CD4, CD8, CD25, CD127

- 30 min bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubieren
- Zugabe von 2 ml Lysing-Solution
- vorsichtig vortexen
- 10 min bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubieren
- 7 min bei 1300 rpm zentrifugieren
- Überstand absaugen
- 2 ml FACS Puffer hinzugeben und vortexen
- 7 min bei 1300 rpm zentrifugieren
- Überstand absaugen
- Pellet vortexen
- in 200 µl PFA 1% aufnehmen und resuspendieren
- bis zur Messung bei 4-8°C lagern

	SOP - Zellkultur Klinik für Urologie und Kinderurologie	Seite 5 v. 5
Datum: 01.05.2011	Standardarbeitsanweisung zur Isolierung von Nierenzellen aus Frischgewebe mittels MiniLys©	Version: 1

!

Abschließend: Probenmessung mittels Durchflusszytometrie mithilfe der FACS-Diva© Software
5. Dokumentation: Beschriftung der Proben nach folgendem Schema: <ul style="list-style-type: none"> - Tumor: Kürzel Name_RCC_a20 etc. - Niere: Kürzel Name_Niere_a20 etc. - Kontrolle: Kürzel Name_RCC oder Niere_a20_unstained etc.

6.3. Isolierung von Nierenzellen aus Frischgewebe mittels Vortex©

	SOP - Zellkultur Klinik für Urologie und Kinderurologie	Seite 1 v. 4
Datum: 01.05.2011	Standardarbeitsanweisung zur Isolierung von Nierenzellen aus Frischgewebe mittels Vortex©	Version: 1

!

Arbeitsanweisung SOP Standard Operating Procedure	
Titel:	Isolierung von Nierenzellen aus Frischgewebe mittels Vortex©
Diese SOP gilt ab:	01.05.2011
Diese SOP ersetzt die Fassung vom:	1. Fassung
Zielsetzung:	Allgemeine Arbeitsanweisung (SOP) für das Isolieren von Nierenzellen aus Frischgewebe
Verantwortlich für die Ausführung:	Martin Janssen
Änderungshinweise:	keine
Datum / Unterschrift	
Verfasst: Fiona Crossey
Überprüft: Dr. med. M. Janssen
Verteiler:	AG Janssen
1. Ziel der Methode:	Isolierung von Nierenzellen aus Frischgewebe
2. Prinzip der Methode:	Mechanischer Aufschluss des Frischgewebes

	SOP - Zellkultur Klinik für Urologie und Kinderurologie	Seite 2 v. 4
Datum: 01.05.2011	Standardarbeitsanweisung zur Isolierung von Nierenzellen aus Frischgewebe mittels Vortex©	Version: 1

!

3. Materialien und Geräte																																							
3.1. Geräte und Hilfsmittel:	<ul style="list-style-type: none"> - 2 x Skalpell (B. Braun Fig. 10) - Cell Strainer, 40 µm - FACS-Röhrchen - MiniLys©-Keramik-Kit, 1,4 mm, 2 ml Röhrchen - Neubauer Zählkammer mit Deckglas - Pinzette - Pipettierhilfen - Reaktionsgefäße mit Deckel (1,5 ml) - sterile Pasteurpipetten lang (ungestopft), kurz (gestopft) - sterile Petrischalen - sterile Pipetten - Vortex-Gerät - Zentrifuge - Zentrifugenröhrchen 15ml - Zentrifugenröhrchen 50ml 																																						
3.2. Messgeräte:	<ul style="list-style-type: none"> - Mikroskop - Messwaage (micro scales) - FACS Canto II© (BD, Heidelberg) 																																						
3.3. Reagenzien:	<ul style="list-style-type: none"> - Transportmedium RPMI Basal (= RPMI-1640 (Sigma, R8758) + 2% Penicillin-Streptomycin (Sigma, P4333)) - PBS-EDTA 0,02% - Trypanblau stock (0,4%) (Trypanblau ready-to-use = 1Teil Stock + 9Teile PBS) - Lysing-Solution - FACS-Puffer - PFA 1% <table border="1" data-bbox="574 1332 1394 1865" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th data-bbox="574 1332 778 1411">AK (Fluorochrom)</th> <th data-bbox="778 1332 928 1411">Klon</th> <th data-bbox="928 1332 1061 1411">Ig-Klasse</th> <th data-bbox="1061 1332 1228 1411">Firma</th> <th data-bbox="1228 1332 1394 1411">Katalognr.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="574 1411 778 1489">CD4 (APC-H7)</td> <td data-bbox="778 1411 928 1489">SK3</td> <td data-bbox="928 1411 1061 1489">IgG1</td> <td data-bbox="1061 1411 1228 1489">BD</td> <td data-bbox="1228 1411 1394 1489">641398</td> </tr> <tr> <td data-bbox="574 1489 778 1568">CD8 (V500)</td> <td data-bbox="778 1489 928 1568">RPA-T8</td> <td data-bbox="928 1489 1061 1568">IgG1</td> <td data-bbox="1061 1489 1228 1568">BD</td> <td data-bbox="1228 1489 1394 1568">560787</td> </tr> <tr> <td data-bbox="574 1568 778 1646">CD25 (V450)</td> <td data-bbox="778 1568 928 1646">M-A251</td> <td data-bbox="928 1568 1061 1646">IgG1</td> <td data-bbox="1061 1568 1228 1646">BD</td> <td data-bbox="1228 1568 1394 1646">561257</td> </tr> <tr> <td data-bbox="574 1646 778 1724">CD28 (PerCP-Cy5.5)</td> <td data-bbox="778 1646 928 1724">L293</td> <td data-bbox="928 1646 1061 1724">IgG1</td> <td data-bbox="1061 1646 1228 1724">BD</td> <td data-bbox="1228 1646 1394 1724">337181</td> </tr> <tr> <td data-bbox="574 1724 778 1803">CD39 (APC)</td> <td data-bbox="778 1724 928 1803">TU66</td> <td data-bbox="928 1724 1061 1803">IgG2b</td> <td data-bbox="1061 1724 1228 1803">BD</td> <td data-bbox="1228 1724 1394 1803">560239</td> </tr> <tr> <td data-bbox="574 1803 778 1865">CD45RO (PE-Cy7)</td> <td data-bbox="778 1803 928 1865">UCHL-1</td> <td data-bbox="928 1803 1061 1865">IgG2a</td> <td data-bbox="1061 1803 1228 1865">BD</td> <td data-bbox="1228 1803 1394 1865">337168</td> </tr> </tbody> </table>				AK (Fluorochrom)	Klon	Ig-Klasse	Firma	Katalognr.	CD4 (APC-H7)	SK3	IgG1	BD	641398	CD8 (V500)	RPA-T8	IgG1	BD	560787	CD25 (V450)	M-A251	IgG1	BD	561257	CD28 (PerCP-Cy5.5)	L293	IgG1	BD	337181	CD39 (APC)	TU66	IgG2b	BD	560239	CD45RO (PE-Cy7)	UCHL-1	IgG2a	BD	337168
AK (Fluorochrom)	Klon	Ig-Klasse	Firma	Katalognr.																																			
CD4 (APC-H7)	SK3	IgG1	BD	641398																																			
CD8 (V500)	RPA-T8	IgG1	BD	560787																																			
CD25 (V450)	M-A251	IgG1	BD	561257																																			
CD28 (PerCP-Cy5.5)	L293	IgG1	BD	337181																																			
CD39 (APC)	TU66	IgG2b	BD	560239																																			
CD45RO (PE-Cy7)	UCHL-1	IgG2a	BD	337168																																			

	SOP - Zellkultur Klinik für Urologie und Kinderurologie	Seite 3 v. 4
Datum: 01.05.2011	Standardarbeitsanweisung zur Isolierung von Nierenzellen aus Frischgewebe mittels Vortex©	Version: 1

!

	CD62L (PE)	DREG-56	IgG1	BD	560966
	CD127 (FITC)	eBioRDR5	IgG1	eBioscience	11-1278
	CD272 (PE)	J168-540	IgG1	BD	558485
	CD279 (PD-1 APC)	MIH4	IgG1	BD	558694

4. Methodendurchführung	Benötigte Zeit für einen Probenansatz (Gewebe): 180 min <ul style="list-style-type: none"> - Intraoperative Biopsie (Tumor- und Normalgewebe): 20 min - Manuelle Zerkleinerung von 0,2 g Frischgewebe: 5 min - Vortex©: 10 min - Zellfärbung und -zählung: 30 min - Inkubation mit Antikörpern: 100 min - Messung FACS-Durchflusszytometrie: 15 min
--------------------------------	--

4.1. Vorbereitung:	Aufklärung des Patienten, Unterschrift der Einverständniserklärung
---------------------------	--

4.2. Durchführung:	Vortex©: <ul style="list-style-type: none"> - perioperativ Tumor- und Normalgewebeentnahme nach Nephrektomie/Nierenteilresektion - Probe unverzüglich in RPMI Basalmedium auf Eis lagern - unter sterilen Kautelen 1g Gewebe in einer Petrischale ohne Medium manuell mit Skalpell zerkleinern (ca. 1mm Kantenlänge) - 0,2 g Tumor pro MiniLys©-Röhrchen überführen und 1 ml PBS-EDTA 0,02% hinzufügen - Vortex: 1. Probe 20 sek – 2. Probe 40 sek – 3. Probe 60 sek - Inhalt der Röhrchen durch 40 µm Strainer in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführen - Strainer mit 4 ml PBS-EDAT 0,02% auswaschen - 3 min bei 1100 U/min zentrifugieren - Überstand absaugen - In 4 ml PBS-EDTA aufnehmen Zellzählung: <ul style="list-style-type: none"> - 90 µl PBS-EDTA 0,02% und 10 µl jeder Probe in Reaktionsgefäß mit Deckel überführen, vorsichtig vortexen - Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer CAVE: falls nicht möglich, dann weitere Verdünnung wie folgt: 10 µl der 100 µl mit weiteren 90 µl PBS-EDTA 0,02% verdünnen, vorsichtig vortexen
---------------------------	---

	SOP - Zellkultur Klinik für Urologie und Kinderurologie	Seite 4 v. 4
Datum: 01.05.2011	Standardarbeitsanweisung zur Isolierung von Nierenzellen aus Frischgewebe mittels Vortex©	Version: 1

!

<p style="text-align: center;">Tryphanblau-Vitalfärbung:</p> <ul style="list-style-type: none"> - zu 10 µl des Zellsuspensats 10 µl Tryphanblau hinzugeben und resuspendieren (nicht vortexen!) - Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer <p style="text-align: center;">Antikörperzusatz:</p> <ul style="list-style-type: none"> - benötigtes Zellsuspensat-Volumen (mind. 1 mio vitale Zellen) in FACS Tubes überführen - FACS-Tubes 3 min bei 1100 U/min zentrifugieren - Überstand absaugen - 100 µl PBS-EDTA 0,02% hinzufügen - Antikörpermischung vorbereiten und hinzugeben <p>P1 CD4, CD8, CD25, CD127, CD39, CD28, CD62L, CD45RO P2 CD4, CD8, CD25, CD127, CD272, CD279 M CD4, CD8, CD25, CD127</p> <ul style="list-style-type: none"> - 30 min bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubieren - Zugabe von 2 ml Lysing-Solution - vorsichtig vortexen - 10 min bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubieren - 7 min bei 1300 rpm zentrifugieren - Überstand absaugen - 2 ml FACS Puffer hinzugeben und vortexen - 7 min bei 1300 rpm zentrifugieren - Überstand absaugen - Pellet vortexen - in 200 µl PFA 1% aufnehmen und resuspendieren - bis zur Messung bei 4-8°C lagern <p>Abschließend: Probenmessung mittels Durchflusszytometrie mithilfe der FACS-Diva© Software</p>	
5. Dokumentation:	<p>Beschriftung der Proben nach folgendem Schema:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Tumor: Kürzel Name_RCC_V1 bis V3 - Niere: Kürzel Name_Niere_V1 bis V3 - Kontrolle: Kürzel Name_RCC oder Niere_V1 bis V3_unstained

6.4. Isolierung von Nierenzellen aus Frischgewebe mittels gentleMACS®

	SOP - Zellkultur Klinik für Urologie und Kinderurologie	Seite 1 v. 4
Datum: 01.05.2011	Standardarbeitsanweisung zur Isolierung von Nierenzellen aus Frischgewebe mittels gentleMACS®	Version: 1

!

Arbeitsanweisung SOP Standard Operating Procedure	
Titel:	Isolierung von Nierenzellen aus Frischgewebe mittels gentleMACS®
Diese SOP gilt ab:	01.05.2011
Diese SOP ersetzt die Fassung vom:	1. Fassung
Zielsetzung:	Allgemeine Arbeitsanweisung (SOP) für das Isolieren von Nierenzellen aus Frischgewebe
Verantwortlich für die Ausführung:	Martin Janssen
Änderungshinweise:	keine
Datum / Unterschrift	
Verfasst:	<p>..... Fiona Crossey</p>
Überprüft:	<p>..... Dr. med. M. Janssen</p>
Verteiler:	AG Janssen
1. Ziel der Methode:	Isolierung von Nierenzellen aus Frischgewebe
2. Prinzip der Methode:	Mechanisch-enzymatischer Aufschluss des Frischgewebes



SOP - Zellkultur
Klinik für Urologie und Kinderurologie

Seite 2 v. 4

Datum:
01.05.2011

Standardarbeitsanweisung zur Isolierung von Nierenzellen
aus Frischgewebe mittels gentleMACS[®]

Version: 1

!

3. Materialien und Geräte

3.1. Geräte und Hilfsmittel:

- 2 x Skalpell (B. Braun Fig. 10)
- Cell Strainer, 40 µm
- FACS-Röhrchen
- gentleMACS[®]-Gerät
- gentleMACS[®]-Röhrchen (C Tubes)
- Neubauer Zählkammer mit Deckglas
- Pinzette
- Pipettierhilfen
- Reaktionsgefäße mit Deckel (1,5 ml)
- sterile Pasteurpipetten lang (ungestopft), kurz (gestopft)
- sterile Petrischalen
- sterile Pipetten
- Vortex-Gerät
- Zentrifuge
- Zentrifugenröhrchen 15ml
- Zentrifugenröhrchen 50ml

3.2. Messgeräte:

- Mikroskop
- Messwaage (micro scales)
- FACS Canto II[®] (BD, Heidelberg)

3.3. Reagenzien:

- Collagenase IA, 100U/ml
- Transportmedium RPMI Basal (= RPMI-1640 (Sigma, R8758) + 2% Penicillin-Streptomycin (Sigma, P4333))
- PBS-EDTA 0,02%
- Trypanblau stock (0,4%)
(Trypanblau ready-to-use = 1Teil Stock + 9Teile PBS)
- Lysing-Solution
- FACS-Puffer
- PFA 1%

AK (Fluorochrom)	Klon	Ig-Klasse	Firma	Katalognr.
CD4 (APC-H7)	SK3	IgG1	BD	641398
CD8 (V500)	RPA-T8	IgG1	BD	560787
CD25 (V450)	M-A251	IgG1	BD	561257
CD28 (PerCP-Cy5.5)	L293	IgG1	BD	337181
CD39 (APC)	TU66	IgG2b	BD	560239
CD45RO (PE-Cy7)	UCHL-1	IgG2a	BD	337168

	SOP - Zellkultur Klinik für Urologie und Kinderurologie	Seite 3 v. 4
Datum: 01.05.2011	Standardarbeitsanweisung zur Isolierung von Nierenzellen aus Frischgewebe mittels gentleMACS®	Version: 1

!

	CD62L (PE)	DREG-56	IgG1	BD	560966
	CD127 (FITC)	eBioRDR5	IgG1	eBioscience	11-1278
	CD272 (PE)	J168-540	IgG1	BD	558485
	CD279 (PD-1 APC)	MIH4	IgG1	BD	558694

4. Methodendurchführung	Benötigte Zeit für einen Probenansatz (Gewebe): 255 min <ul style="list-style-type: none"> - Intraoperative Biopsie (Tumor- und Normalgewebe): 20 min - Manuelle Zerkleinerung von 0,2 g Frischgewebe: 5 min - gentleMACS®: 85 min - Zellfärbung und -zählung: 30 min - Inkubation mit Antikörpern: 100 min - Messung FACS-Durchflusszytometrie: 15 min
--------------------------------	--

4.1. Vorbereitung:	Aufklärung des Patienten, Unterschrift der Einverständniserklärung
---------------------------	--

4.2. Durchführung:	gentleMACS®: <ul style="list-style-type: none"> - perioperativ Tumor- und Normalgewebeentnahme nach Nephrektomie/Nierenteilresektion - Probe unverzüglich in RPMI Basalmedium auf Eis lagern - unter sterilen Kautelen 0,2 g Gewebe in einer Petrischale ohne Medium manuell mit Skalpell zerkleinern (ca. 1mm Kantenlänge) - 0,2 g Tumor pro gentleMACS®-Röhrchen überführen und 5 ml Collagenase IA hinzufügen - gentleMACS®: Programm h_Tumor_01 - Inkubation bei 37°C 30 min auf MACS®-Roller - gentleMACS®: Programm h_Tumor_02.01 - Inkubation bei 37°C 30 min auf MACS®-Roller - gentleMACS®: Programm h_Tumor_03.01 - gentleMACS®-Röhrchen 2 min bei 600 rpm zentrifugieren, Überstand belassen - 10ml Transportmedium RPMI Basal hinzugeben und vortexen - mit 10 ml Pipette mehrfach resuspendieren - durch 40 µm Strainer in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführen und Strainer mit 2 x 5 ml Transportmedium durchspülen - 3 min bei 1100 U/min zentrifugieren - Überstand absaugen - In 10 ml FACS-Puffer aufnehmen Zellzählung: <ul style="list-style-type: none"> - 90 µl PBS-EDTA 0,02% und 10 µl jeder Probe in Reaktionsgefäß mit Deckel überführen, vorsichtig vortexen - Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer
---------------------------	---

	SOP - Zellkultur Klinik für Urologie und Kinderurologie	Seite 4 v. 4
Datum: 01.05.2011	Standardarbeitsanweisung zur Isolierung von Nierenzellen aus Frischgewebe mittels gentleMACS®	Version: 1

!

<p>CAVE: falls nicht möglich, dann weitere Verdünnung wie folgt: 10 µl der 100 µl mit weiteren 90 µl PBS-EDTA 0,02% verdünnen, vorsichtig vortexen</p> <p>Tryphanblau-Vitalfärbung:</p> <ul style="list-style-type: none"> - zu 10 µl des Zellsuspensats 10 µl Tryphanblau hinzugeben und resuspendieren (nicht vortexen!) - Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer <p>Antikörperzusatz:</p> <ul style="list-style-type: none"> - benötigtes Zellsuspensat-Volumen (mind. 1 mio vitale Zellen) in FACS Tubes überführen - FACS-Tubes 3 min bei 1100 U/min zentrifugieren - Überstand absaugen - 100 µl PBS-EDTA 0,02% hinzufügen - Antikörpermischung vorbereiten und hinzugeben <p>P1 CD4, CD8, CD25, CD127, CD39, CD28, CD62L, CD45RO P2 CD4, CD8, CD25, CD127, CD272, CD279 M CD4, CD8, CD25, CD127</p> <ul style="list-style-type: none"> - 30 min bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubieren - Zugabe von 2 ml Lysing-Solution - vorsichtig vortexen - 10 min bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubieren - 7 min bei 1300 rpm zentrifugieren - Überstand absaugen - 2 ml FACS Puffer hinzugeben und vortexen - 7 min bei 1300 rpm zentrifugieren - Überstand absaugen - Pellet vortexen - in 200 µl PFA 1% aufnehmen und resuspendieren - bis zur Messung bei 4-8°C lagern <p>Abschließend: Probenmessung mittels Durchflusszytometrie mithilfe der FACS-Diva® Software</p>	
5. Dokumentation:	Beschriftung der Proben nach folgendem Schema: <ul style="list-style-type: none"> - Tumor: Kürzel Name_RCC_xx - Niere: Kürzel Name_Niere_xx - Kontrolle: Kürzel Name_RCC oder Niere_xx_unstained

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Histologische Subtypen des Nierenzellkarzinoms	16
Abbildung 2 Exemplarische Fotodokumentation	32
Abbildung 3 Kollagenase-Protokoll	33
Abbildung 4 gentleMACS®-Protokoll	35
Abbildung 5 Antikörperfärbung	38
Abbildung 6 Exemplarisches Gating der T-Zell-Subpopulationen	40
Abbildung 7 Vitaler Zellanteil aller vier Protokolle im Vergleich	43
Abbildung 8 Vitaler Zellanteil und T-Zell-Subpopulationen nach MiniLys®-Protokoll.....	44
Abbildung 9 T-Zell-Populationen (Kollagenase vs MiniLys® a-20-Sek.)	45
Abbildung 10 Direkter Vergleich der T-Zell-Populationen bei sechs Probanden (Kollagenase vs MiniLys® a-20 Sek.)	46
Abbildung 11 Prozentualer Anteil vitaler Zellen (Kollagenase vs MiniLys® a-20 Sek.).....	47
Abbildung 12 T-Zell-Subpopulationen der Vortex®-Proben V1-V3	48
Abbildung 13 Vitaler Zellanteil und T-Zellpopulationen (MiniLys® a-20 Sek. vs Vortex® V1)	49
Abbildung 14 Vergleich der T-Zell-Subpopulationen nach enzymatischer, enzymatisch-mechanischer und mechanischer Methode	51
Abbildung 15 Die mittlere Fluoreszenzintensität im Vergleich	53
Abbildung 16 Patientenkollektiv nach TNM-Stadien	54
Abbildung 17 Probenmenge und Zeitaufwand im Vergleich.....	55

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Hereditäre Nierenzellkarzinome	17
Tabelle 2 Grading nach Fuhrmann	18
Tabelle 3 Übersicht über die TNM-Klassifikationen des Nierenzellkarzinoms	19
Tabelle 4 Nachsorgeschema aus den aktuellen EAU-Guidelines 2018	22
Tabelle 5 Systemtherapieoptionen gemäß Risikoprofil	24
Tabelle 6 Neuerungen der Systemtherapieoptionen	25
Tabelle 7 Antikörper zur durchflusszytometrischen Analyse	30
Tabelle 8 Charakteristika des Patientenkollektivs	41
Tabelle 9 Übersicht über Operationstechnik mit Tumorstadium und Histologie	42
Tabelle 10 Übersicht Median_%_vital_cells der einzelnen Aufschlussverfahren.....	42
Tabelle 11 Median und Interquartilsabstand der vitalen Zellpopulation	44
Tabelle 12 Charakteristika der Tumorproben mit Histologie und vitalem Zellanteil	47
Tabelle 13 Charakteristika der Tumorproben mit vitalem Zellanteil im Vortex©-Protokoll	49
Tabelle 14 Median und Interquartilsabstand im Überblick.....	50

9. Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
ARCD	Acquired renal cystic disease
ATP	Adenosin-Triphosphat
BMI	Body Mass Index
BTLA	B- and T-lymphocyte attenuator
CAIX	carbonic anhydrase isozyme IX
CAP	chronisch abszendierende Pyelonephritis
CC	klarzellig
CD	Cluster of Differentiation
CKD	chronic kidney disease
cm	Zentimeter
CT	Computertomografie
CTLA	cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein
DB	Ductus Bellini
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EAU	European Association of Urology
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Epithelial growth factor
ESRD	end stadium renal disease
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
FOXP3	Forkhead-Box-Protein P3
g	Gramm, Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
gM	GentleMacs [®]
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
IARC	International Agency for Research on Cancer
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kb	Kilobytes
Koll	Kollagenase
LDH	Laktatdehydrogenase
LEI	Leiomyom
LK	Lymphknoten
LPN	laparoskopische partielle Nephrektomie
LRN	laparoskopische radikale Nephrektomie
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
min	Minuten
mio	Millionen
ML	MiniLys [®]
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ³	Kubikmillimeter
MSKCC	Memorial Sloan-Kettering Cancer Center
mTOR	mammalian target of Rapamycin
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
n	Probandenanzahl
NOS	Unklassifizierte Nierenzellkarzinome

NSS	Nephron Sparing Surgery
NTPDase	nucleoside triphosphate diphosphohydrolase
NZK	Nierenzellkarzinom
ONK	Onkozytom
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PD	Programmed cell death protein
PDGF	platelet derived growth factor
PFA	Plättchenfunktionanalyser
PP	papillär
py	Pack-years
RCC	Renal Cell Carcinoma
rpm	rounds per minute
Sek	Sekunden
SOP	Standard Operating Procedure
SRM	small renal mass
T _{reg}	regulatorische T-Zellen
TCE	Trichlorethylen
TGF	tumorgrowth factor
TIL	tumorinfiltrierende Lymphozyten
TNF	Tumornekrosefaktor
U	Units
US	Ultraschall
USA	United States of America
V	Vortex©
VEGF	vascular endothelial growth factor
VHL-Gen	Von Hippel-Lindau-Gen
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentrales Nervensystem
°C	Grad Celsius

10. Literaturverzeichnis

1. Abuzakouk, M., C. Feighery and C. O'Farrelly (1996). "Collagenase and Dispace enzymes disrupt lymphocyte surface molecules." J Immunol Methods **194**: 211-216.
2. Algaba, F., H. Akaza, A. López-Beltrán, G. Martignoni, H. Moch, R. Montironi and V. Reuter (2011). "Current Pathology Keys of Renal Cell Carcinoma." European Urology **60**(4): 634-643.
3. Amato, R. J. (2000). "Chemotherapy for renal cell carcinoma." Semin Oncol **27**(2): 177-186.
4. Attig, S., J. Hennenlotter, G. Pawelec, G. Klein, S. D. Koch, H. Pircher, S. Feyerabend, D. Wernet, A. Stenzl, H. G. Rammensee and C. Gouttefangeas (2009). "Simultaneous infiltration of polyfunctional effector and suppressor T cells into renal cell carcinomas." Cancer Res **69**(21): 8412-8419.
5. Autengruber, A., M. Gereke, G. Hansen, C. Hennig and D. Bruder (2012). "Impact of enzymatic tissue disintegration on the level of surface molecule expression and immune cell function." Eur J Microbiol Immunol (Bp) **2**(2): 112-120.
6. Baldan, V., R. Griffiths, R. E. Hawkins and D. E. Gilham (2015). "Efficient and reproducible generation of tumour-infiltrating lymphocytes for renal cell carcinoma." Br J Cancer **112**(9): 1510-1518.
7. Barocas, D. A., S. M. Rohan, J. Kao, R. D. Gurevich, J. J. Del Pizzo, E. D. Vaughan, Jr., M. Akhtar, Y. T. Chen and D. S. Scherr (2006). "Diagnosis of renal tumors on needle biopsy specimens by histological and molecular analysis." J Urol **176**(5): 1957-1962.
8. Becker, F., F. C. Roos, M. Janssen, W. Brenner, C. Hampel, S. Siemer, J. W. Thuroff and M. Stockle (2011). "Short-term functional and oncologic outcomes of nephron-sparing surgery for renal tumours ≥ 7 cm." Eur Urol **59**(6): 931-937.
9. Bekema, H. J., S. MacLennan, M. Imamura, T. B. Lam, F. Stewart, N. Scott, G. MacLennan, S. McClinton, T. R. Griffiths, A. Skolarikos, S. J. MacLennan, R. Sylvester, B. Ljungberg and J. N'Dow (2013). "Systematic review of adrenalectomy and lymph node dissection in locally advanced renal cell carcinoma." Eur Urol **64**(5): 799-810.
10. Berg, E. L., L. M. McEvoy, C. Berlin, R. F. Bargatze and E. C. Butcher (1993). "L-Selectin-mediated lymphocyte rolling on MADCAM-1." Nature **366**: 695-698.
11. Borsellino, G., M. Kleinewietfeld, D. Di Mitri, A. Sternjak, A. Diamantini, R. Giometto, S. Hopner, D. Centonze, G. Bernardi, M. L. Dell'Acqua, P. M. Rossini, L. Battistini, O. Rotzschke and K. Falk (2007). "Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3⁺ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression." Blood **110**(4): 1225-1232.
12. Breda, A., E. G. Treat, L. Haft-Candell, J. T. Leppert, J. D. Harper, J. Said, S. Raman, R. B. Smith, A. S. Beldegrun and P. G. Schulam (2010). "Comparison of accuracy of 14-, 18- and 20-G needles in ex-vivo renal mass biopsy: a prospective, blinded study." BJU International **105**(7): 940-945.
13. Brierley, J. D., M. K. Gospodarowicz and C. Wittekind (2017). "TNM Classification of malignant tumours UICC."
14. Brunkow, M., E. Jeffery, K. Hjerrild, B. Paepers, L. Clark, S.-A. Yasayko, J. E. Wilkinson, D. Galas, S. F. Ziegler and F. Ramsdell (2001). "Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse." Nature **27**: 68-73.
15. Capogrosso, P., U. Capitanio, G. La Croce, A. Nini, A. Salonia, F. Montorsi and R. Bertini (2016). "Follow-up After Treatment for Renal Cell Carcinoma: The Evidence Beyond the Guidelines." Eur Urol Focus **1**(3): 272-281.
16. Chae, E. J., J. K. Kim, S. H. Kim, S. J. Bae and K. S. Cho (2005). "Renal cell carcinoma: analysis of postoperative recurrence patterns." Radiology **234**(1): 189-196.

17. Chen, D. Y. T. and R. G. Uzzo (2009). "Optimal management of localized renal cell carcinoma: Surgery, Ablation or Active Surveillance." J Natl Compr Canc Netw **7**: 635-643.
18. Chen, Z., X. Chen, Y. Xu, P. Xiong, M. Fang, Z. Tan, F. Gong and F. Zheng (2014). "Collagenase digestion down-regulates the density of CD27 on lymphocytes." Journal of Immunological Methods **413**: 57-61.
19. Choueiri, T. K., B. Escudier, T. Powles, N. M. Tannir, P. N. Mainwaring, B. I. Rini, H. J. Hammers, F. Donskov, B. J. Roth, K. Peltola, J. L. Lee, D. Y. C. Heng, M. Schmidinger, N. Agarwal, C. N. Sternberg, D. F. McDermott, D. T. Aftab, C. Hessel, C. Scheffold, G. Schwab, T. E. Hutson, S. Pal and R. J. Motzer (2016). "Cabozantinib versus everolimus in advanced renal cell carcinoma (METEOR): final results from a randomised, open-label, phase 3 trial." The Lancet Oncology **17**(7): 917-927.
20. Choueiri, T. K. and R. J. Motzer (2017). "Systemic Therapy for Metastatic Renal-Cell Carcinoma." N Engl J Med **376**(4): 354-366.
21. Chow, W. H. and S. S. Devesa (2008). "Contemporary epidemiology of renal cell cancer." Cancer J **14**(5): 288-301.
22. Chow, W. H., L. M. Dong and S. S. Devesa (2010). "Epidemiology and risk factors for kidney cancer." Nat Rev Urol **7**(5): 245-257.
23. Coppin, C., L. L., F. Porzsolt and T. Wilt (2008). "Targeted therapy for advanced renal cell carcinoma " Cochrane Database Syst Rev. **16**.
24. Crossey, F., S. Marx, S. Hölter, K. Schmitt, R. M. Bohle, T. Schmidt, M. Stöckle, U. Sester, M. Sester and M. W. W. Janssen (2018). "Robust method for the isolation of tumor infiltrating lymphocytes with a high vital cell yield from small samples of renal cell carcinoma by a new collagenase-free mechanical procedure." Urologic Oncology **36**(9): 402.e401-402.e410.
25. Curiel, T. J. (2007). "Tregs and rethinking cancer immunotherapy." J Clin Invest **117**(5): 1167-1174.
26. Denton, M. D., C. C. Magee, C. Ovworie, S. Mauiyyedi, M. Pascual, R. B. Colvin, A. B. Cosimi and N. Tolkoff-Rubin (2002). "Prevalence of renal cell carcinoma in patients with ESRD pre-transplantation: a pathologic analysis." Kidney Int **61**(6): 2201-2209.
27. Diederichsen, A. C. P., J. Zeuthen, P. B. Christensen and T. Kristensen (1999). "Characterisation of Tumour Infiltrating Lymphocytes and Correlations with Immunological Surface Molecules in Colorectal Cancer." Eur J Cancer **35**: 721-726.
28. Dillmann, R., P. Schiltz, C. DePriest, N. Barth, L. Beutel, C. de Leon, A. O'Connor and S. Nayak (2004). "Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Interleukin-2: Dose and Schedules of Administration in the Treatment of Metastatic Cancer." Cancer Biother Radiopharm **19**: 730-737.
29. Dudley, M. E., J. R. Wunderlich, T. E. Shelton, J. Even and S. A. Rosenberg (2003). "Generation of Tumor-Infiltrating Lymphocyte Cultures for Use in Adoptive Transfer Therapy for Melanoma Patients." J Immunother **26**: 332-342.
30. Dudley, M. E., J. R. Wunderlich, J. C. Yang, R. M. Sherry, S. L. Topalian, N. P. Restifo, R. E. Royal, U. Kammula, D. E. White, S. A. Mavroukakis, L. J. Rogers, G. J. Gracia, S. A. Jones, D. P. Mangiameli, M. M. Pelletier, J. Gea-Banacloche, M. R. Robinson, D. M. Berman, A. C. Filie, A. Abati and S. A. Rosenberg (2005). "Adoptive Cell Transfer Therapy Following Non-Myeloablative but Lymphodepleting Chemotherapy for the Treatment of Patients With Refractory Metastatic Melanoma." J Clin Oncol **23**: 2346-2357.
31. Eble, J. N., G. Sauter, J. I. Epstein and I. A. Sesterhenn (2004). "WHO Classification of Tumours - Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs." IARC Press.
32. Eggener, S. (2010). "TNM staging for renal cell carcinoma: time for a new method." Eur Urol **58**(4): 517-519; discussion 519-521.

33. Ehdai, B., H. Furberg, E. C. Zabor, A. A. Hakimi and P. Russo (2014). "Comprehensive assessment of the impact of cigarette smoking on survival of clear cell kidney cancer." J Urol **191**(3): 597-602.
34. Escudier, B., T. Eisen, W. Stadler, C. Szczylik, S. Oudard, M. Siebels, S. Negrier, C. C., E. Solska, A. Desai, F. Rolland, T. Demkow, T. Hutson, M. Gore, S. Freeman, B. Schwartz, M. Shan, R. Simantiv and R. Bukowski (2007). "Sorafenib in Advanced Clear-Cell Renal-Cell-Carcinoma." N Engl J Med **356**: 125-134.
35. Facciabene, A., G. T. Motz and G. Coukos (2012). "T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis." Cancer Res **72**(9): 2162-2171.
36. Ferlay, J., E. Steliarova-Foucher, J. Lortet-Tieulent, S. Rosso, J. W. Coebergh, H. Comber, D. Forman and F. Bray (2013). "Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012." Eur J Cancer **49**(6): 1374-1403.
37. Fernando, A., S. Fowler, T. O'Brien and S. British Association of Urological (2016). "Nephron-sparing surgery across a nation - outcomes from the British Association of Urological Surgeons 2012 national partial nephrectomy audit." BJU Int **117**(6): 874-882.
38. Figlin, R. A., J. A. Thompson, R. M. Bukowski, N. J. Vogelzang, A. C. Novick, P. Lange, G. D. Steinberg and A. S. Belldegrun (1999). "Multicenter, Randomized, Phase III Trial of CD8+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Combination With Recombinant Interleukin-2 in Metastatic Renal Cell Carcinoma." J Clin Oncol **17**: 2521-2529.
39. Fontenot, J. D., M. A. Gavin and A. Y. Rudensky (2003). "Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells." Nat Immunol **4**(4): 330-336.
40. Fuhrmann, S. A., L. C. Lasky and C. Limas (1982). "Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma." Am J Surg Pathol **6**(7).
41. Geissler, K., P. Fornara, C. Lautenschlager, H. J. Holzhausen, B. Seliger and D. Riemann (2015). "Immune signature of tumor infiltrating immune cells in renal cancer." Oncoimmunology **4**(1): e985082.
42. Gershon, R. K., P. Cohen, R. Hencin and S. A. Liebhaber (1972). "Suppressor T Cells." J Immunol **108**(8): 586-590.
43. Gigante, M., Y. Neuzillet, J. J. Patard, X. Tillou, R. Thuret, J. Branchereau, M. O. Timsit, N. Terrier, J. M. Boutin, F. Sallusto, G. Karam, B. Barrou, D. Chevallier, C. R. Mazzola, V. Delaporte, A. Doeffler, F. Kleinclauss, L. Badet, d. U. members of the Comite de Cancerologie de l'Association Francaise and d. U. Comite de Transplantation de l'Association Francaise (2012). "Renal cell carcinoma (RCC) arising in native kidneys of dialyzed and transplant patients: are they different entities?" BJU Int **110**(11 Pt B): E570-573.
44. Goldfarb, D. A. (1998). "Nephron-sparing surgery and renal transplantation in patients with renal cell carcinoma and von Hippel-Lindau disease." Journal of Internal Medicine **243**.
45. Grange, C., J. Letourneau, M. A. Forget, J. Godin-Ethier, J. Martin, M. Liberman, M. Latour, H. Widmer, J. B. Lattouf, C. A. Piccirillo, J. F. Cailhier and R. Lapointe (2011). "Phenotypic characterization and functional analysis of human tumor immune infiltration after mechanical and enzymatic disaggregation." J Immunol Methods **372**(1-2): 119-126.
46. Guha, N., D. Loomis, Y. Grosse, B. Lauby-Secretan, F. E. Ghissassi, V. Bouvard, L. Benbrahim-Tallaa, R. Baan, H. Mattock and K. Straif (2012). "Carcinogenicity of trichloroethylene, tetrachloroethylene, some other chlorinated solvents, and their metabolites." The Lancet Oncology **13**(12): 1192-1193.
47. Holt, P. G., A. Degebrodt, T. Venaille, C. O'Leary, K. Krska, J. Flexman, H. Farrell, G. Shellam, P. Young, J. Penhale, T. Robertson and J. M. Papadimitriou (1985). "Preparation of interstitial lung cells by enzymatic digestion of tissue slices: preliminary characterization by morphology and performance in functional assays." Immunology **54**: 139-147.

48. Holt, P. G., B. W. S. Robinson, M. Reid, U. R. Kees, A. Warton, V. H. Dawson, A. Rose, M. Schon-Hegrad and J. M. Papadimitriou (1986). "Extraction of immune and inflammatory cells from human lung parenchyma: evaluation of an enzymatic digestion procedure." Clin Exp Immunol **66**: 188-200.
49. Hori, S., T. Nomura and S. Sakaguchi (2003). "Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3." Science **299**: 1057-1061.
50. Howlader N, N. A., Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). (2018). "SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016." National Cancer Institute. Bethesda, MD.
51. Hudes, G., M. Carducci, P. Tomczak, J. Dutcher, R. Figlin, A. Kapoor, S. E., J. Sosman, D. McDermott, I. Bodrogi, Z. Kovacevic, V. Lesovoy, I. G. H. Schmidt-Wolf, O. Barbarash, E. Gokmen, T. O'Toole, S. Lustgarten, L. Moore and R. J. Motzer (2007). "Temsirrolimus, Interferon Alfa or Both for Advanced Renal-Cell Carcinoma." N Engl J Med **356**: 2271-2281.
52. Hurst, F. P., R. M. Jindal, J. J. Fletcher, V. Dharnidharka, G. Gorman, B. Lechner, R. Nee, L. Y. Agodoa and K. C. Abbott (2011). "Incidence, predictors and associated outcomes of renal cell carcinoma in long-term dialysis patients." Urology **77**(6): 1271-1276.
53. Janssen, M. W. W., J. Linxweiler, S. Terwey, S. Rugge, C. H. Ohlmann, F. Becker, C. Thomas, A. Neisius, J. W. Thuroff, S. Siemer, M. Stockle and F. C. Roos (2018). "Survival outcomes in patients with large (≥ 7 cm) clear cell renal cell carcinomas treated with nephron-sparing surgery versus radical nephrectomy: Results of a multicenter cohort with long-term follow-up." PLoS One **13**(5): e0196427.
54. Jemal, A., F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward and D. Forman (2011). "Global cancer statistics." CA Cancer J Clin **61**(2): 69-90.
55. Jewett, M. A., K. Mattar, J. Basiuk, C. G. Morash, S. E. Pautler, D. R. Siemens, S. Tanguay, R. A. Rendon, M. E. Gleave, D. E. Drachenberg, R. Chow, H. Chung, J. L. Chin, N. E. Fleshner, A. J. Evans, B. L. Gallie, M. A. Haider, J. R. Kachura, G. Kurban, K. Fernandes and A. Finelli (2011). "Active surveillance of small renal masses: progression patterns of early stage kidney cancer." Eur Urol **60**(1): 39-44.
56. Kirkali Z, M. P. (2011). "Kidney Cancer." EAU-ICUD.
57. Ko, J. J., W. Xie, N. Kroeger, J.-I. Lee, B. I. Rini, J. J. Knox, G. A. Bjarnason, S. Srinivas, S. K. Pal, T. Yuasa, M. Smoragiewicz, F. Donskov, R. Kanesvaran, L. Wood, D. S. Ernst, N. Agarwal, U. N. Vaishampayan, S.-y. Rha, T. K. Choueiri and D. Y. C. Heng (2015). "The International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium model as a prognostic tool in patients with metastatic renal cell carcinoma previously treated with first-line targeted therapy: a population-based study." The Lancet Oncology **16**(3): 293-300.
58. Kovacs G, A. M., Beckwith B, Bugert P et al (1997). "The Heidelberg Classification of renal cell tumours." Journal of Pathology **183**: 131-133.
59. Kunkle, D. A., B. L. Egleston and R. G. Uzzo (2008). "Excise, ablate or observe: the small renal mass dilemma--a meta-analysis and review." J Urol **179**(4): 1227-1233; discussion 1233-1224.
60. Lane, B. R., C. M. Tobert and C. B. Riedinger (2012). "Growth kinetics and active surveillance for small renal masses." Curr Opin Urol **22**(5): 353-359.
61. Liotta, F., M. Gacci, F. Frosali, V. Querci, G. Vittori, A. Lapini, V. Santarlasci, S. Serni, L. Cosmi, L. Maggi, R. Angeli, B. Mazzinghi, P. Romagnani, E. Maggi, M. Carini, S. Romagnani and F. Annunziato (2011). "Frequency of regulatory T cells in peripheral blood and in tumour-infiltrating lymphocytes correlates with poor prognosis in renal cell carcinoma." BJU Int **107**(9): 1500-1506.
62. Liu, W., A. L. Putnam, Z. Xu-Yu, G. L. Szot, M. R. Lee, S. Zhu, P. A. Gottlieb, P. Kapranov, T. R. Gingeras, B. Fazekas de St Groth, C. Clayberger, D. M. Soper, S. F. Ziegler and J. A. Bluestone (2006). "CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells." J Exp Med **203**(7): 1701-1711.

63. Liyanage, U. K., T. T. Moore, H.-G. Joo, T. Yoshiyuki, V. Herrmann, G. Doherty, A. D. Jeffrey, S. Strasberg, T. J. Eberlein, P. S. Goedegebuure and D. Linehan (2002). "Prevalence of Regulatory T Cells Is Increased in Peripheral Blood and Tumor Microenvironment of Patients with Pancreas or Breast Adenocarcinoma." J Immunol **169**: 2756-2761.
64. Ljungberg, B., L. Albiges, K. Bensalah, A. Bex, R. H. Giles, M. Hora, M. A. Kuczyk, T. Lam, L. Marconi, A. S. Merseburger, T. Powles, M. Staehler and A. Volpe (2018). "EAU Guidelines on Renal Cell Carcinoma."
65. Ljungberg, B., K. Bensalah, A. Bex, S. Canfield, S. Dabestani, F. Hofmann, M. Hora, M. A. Kuczyk, T. Lam, L. Marconi, A. S. Merseburger, P. F. A. Mulders, M. Staehler and A. Volpe (2013). "Guidelines on Renal Cell Carcinoma." European Association of Urology.
66. Ljungberg, B., K. Bensalah, A. Bex, S. Canfield, M. Hora, M. A. Kuczyk, T. Lam, A. S. Merseburger, T. Powles, M. Staehler and A. Volpe (2016). "Guidelines on Renal Cell Carcinoma."
67. Ljungberg, B., S. C. Campbell, H. Y. Choi, D. Jacqmin, J. E. Lee, S. Weikert and L. A. Kiemeny (2011). "Corrigendum to "The Epidemiology of Renal Cell Carcinoma" [Eur Urol 2011;60:615–21]." European Urology **60**(6): 1317.
68. MacLennan, S., M. Imamura, M. C. Lapitan, M. I. Omar, T. B. Lam, A. M. Hilvano-Cabungcal, P. Royle, F. Stewart, G. MacLennan, S. J. MacLennan, P. Dahm, S. E. Canfield, S. McClinton, T. R. Griffiths, B. Ljungberg, J. N'Dow, U. S. R. R. Group and E. A. U. R. C. G. Panel (2012). "Systematic review of perioperative and quality-of-life outcomes following surgical management of localised renal cancer." Eur Urol **62**(6): 1097-1117.
69. Mandapathil, M., S. Lang, E. Gorelik and T. L. Whiteside (2009). "Isolation of functional human regulatory T cells (Treg) from the peripheral blood based on the CD39 expression." J Immunol Methods **346**(1-2): 55-63.
70. Markel, G., T. Cohen-Sinai, M. J. Besser, K. Oved, O. Itzhaki, R. Seidman, A. J. Treves, E. Fridman, Y. Keisari, Z. Dotan, J. Ramon and J. Schachter (2009). "Preclinical Evaluation of Adoptive Cell Therapy for Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma." Anticancer Res **29**: 145-154.
71. Mason, R. J., M. Abdolell, G. Trottier, C. Pringle, J. G. Lawen, D. G. Bell, M. A. Jewett, L. Klotz and R. A. Rendon (2011). "Growth kinetics of renal masses: analysis of a prospective cohort of patients undergoing active surveillance." Eur Urol **59**(5): 863-867.
72. May, M., S. Brookman-Amisshah, S. Pflanz, J. Roigas, B. Hoschke and F. Kendel (2009). "Pre-operative renal arterial embolisation does not provide survival benefit in patients with radical nephrectomy for renal cell carcinoma." Br J Radiol **82**(981): 724-731.
73. Mazza, C., B. Escudier and L. Albiges (2017). "Nivolumab in renal cell carcinoma: latest evidence and clinical potential." Therapeutic advances in medical oncology **9**: 171-181.
74. McDermott, D., C. Drake, M. Sznol, T. Choueiri, J. Powderly and D. Smith (2015). "Survival, Durable Response, and Long-Term Safety in Patients With Previously Treated Advanced Renal Cell Carcinoma Receiving Nivolumab." Journal of Clinical Oncology **33**: 2013-2020.
75. McHugh, R., M. Whitters, C. A. Piccirillo, D. A. Young, E. Shevach, M. Collins and M. Byrne (2002). "CD4+CD25+ Immunoregulatory T Cells: Gene Expression Analysis Reveals a Functional Role for the Glucocorticoid-Induced TNF Receptor." Immunity **16**: 311-323.
76. Moch, H., A. L. Cubilla, P. A. Humphrey, V. E. Reuter and T. M. Ulbright (2016). "The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours." Eur Urol **70**(1): 93-105.
77. Motzer, R., M. Mazumdar, J. Bacik, W. Berg, A. Amsterdam and J. Ferrara (1999). "Survival and Prognostic Stratification of 670 Patients With Advanced Renal Cell Carcinoma." J Clin Oncol **17**(8): 2530-2540.

78. Motzer, R. J., B. Escudier, S. Oudard, T. E. Hutson, C. Porta, S. Bracarda, V. Grünwald, J. A. Thompson, R. A. Figlin, N. Hollaender, G. Urbanowitz, W. J. Berg, A. Kay, D. Lebwohl and A. Ravaud (2008). "Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial." The Lancet **372**(9637): 449-456.
79. Motzer, R. J., T. E. Hutson, H. Glen, M. D. Michaelson, A. Molina, T. Eisen, J. Jassem, J. Zolnieriek, J. P. Maroto, B. Mellado, B. Melichar, J. Tomasek, A. Kremer, H.-J. Kim, K. Wood, C. Dutcus and J. Larkin (2015). "Lenvatinib, everolimus, and the combination in patients with metastatic renal cell carcinoma: a randomised, phase 2, open-label, multicentre trial." The Lancet Oncology **16**(15): 1473-1482.
80. Motzer, R. J., T. E. Hutson, P. Tomczak, D. Michaelson, R. Bukowski, O. Rixe, S. Oudard, S. Negrier, C. Szczylik, S. T. Kim, I. Chen, P. Bycott, C. M. Baum and R. A. Figlin (2007). "Sunitinib versus Interferon Alfa in Metastatic Renal-Cell Carcinoma." N Engl J Med **356**: 115-124.
81. Nishiyama, K., T. Shirahama, A. Yoshimura, T. Sumizawa, T. Furukawa, M. Ichikawa-Haraguchi, S. Akiyama and Y. Ohi (1993). "Expression of the Multidrug Transporter, P-Glycoprotein, in Renal and Transitional Cell Carcinomas." Cancer **71**(11).
82. Novelli, M., P. Savoia, I. Cambieri, R. Ponti, A. Comessatti, F. Lisa and M. G. Bernengo (2000). "Collagenase digestion and mechanical disaggregation as a method to extract and immunophenotype tumour lymphocytes in cutaneous T- cell lymphomas." Clin Exp Dermatol **25**: 423-431.
83. Ohno, Y., J. Nakashima, Y. Nakagami, N. Satake, T. Gondo, M. Otori, T. Hatano and M. Tachibana (2013). "Sex and the clinical value of body mass index in patients with clear cell renal cell carcinoma." Br J Cancer **109**(7): 1899-1903.
84. Onkologie, L. (2017). "Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms (S3)."
85. Parashar, B., K. C. Patro, M. Smith, S. Arora, D. Nori and A. G. Wernicke (2014). "Role of radiation therapy for renal tumors." Semin Intervent Radiol **31**(1): 86-90.
86. Parton, M., M. Gore and T. Eisen (2006). "Role of cytokine therapy in 2006 and beyond for metastatic renal cell cancer." J Clin Oncol **24**(35): 5584-5592.
87. Poston, C. D., G. S. Jaffe, I. A. Lubensky, D. Solomon, B. Zbar, W. M. Linehan and M. M. Walther (1995). "Characterization of the renal pathology of a familial form of renal cell carcinoma associated with von Hippel-Lindau disease: clinical and molecular genetic implications." J Urol **153**(1): 22-26.
88. Presser, D., U. Sester, J. Mohrbach, M. Janssen, H. Kohler and M. Sester (2009). "Differential kinetics of effector and regulatory T cells in patients on calcineurin inhibitor-based drug regimens." Kidney Int **76**(5): 557-566.
89. Quatromoni, J. G., S. Singhal, P. Bhojnagarwala, W. W. Hancock, S. M. Albelda and E. Eruslanov (2015). "An optimized disaggregation method for human lung tumors that preserves the phenotype and function of the immune cells." J Leukoc Biol **97**(1): 201-209.
90. Renehan, A. G., M. Tyson, M. Egger, R. F. Heller and M. Zwahlen (2008). "Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies." The Lancet **371**(9612): 569-578.
91. Rini, B. I., B. Escudier, P. Tomczak, A. Kaprin, C. Szczylik, T. E. Hutson, M. D. Michaelson, V. A. Gorbunova, M. E. Gore, I. G. Rusakov, S. Negrier, Y.-C. Ou, D. Castellano, H. Y. Lim, H. Uemura, J. Tarazi, D. Cella, C. Chen, B. Rosbrook, S. Kim and R. J. Motzer (2011). "Comparative effectiveness of axitinib versus sorafenib in advanced renal cell carcinoma (AXIS): a randomised phase 3 trial." The Lancet **378**(9807): 1931-1939.
92. Rini, B. I., S. Halabi, J. E. Rosenberg, W. M. Stadler, D. A. Vaena, L. Archer, J. N. Atkins, J. Picus, P. Czaykowski, J. Dutcher and E. J. Small (2010). "Phase III trial of bevacizumab plus interferon alfa versus interferon alfa monotherapy in patients

- with metastatic renal cell carcinoma: final results of CALGB 90206." J Clin Oncol **28**(13): 2137-2143.
93. Robert Koch-Institut, G. (2013). "Krebs in Deutschland: Niere - C64."
 94. Robert Koch-Institut, G. (2015). "Krebs in Deutschland 2011/2012." **10**.
 95. Robson, S. C., J. Seigny and H. Zimmermann (2006). "The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance." Purinergic Signal **2**(2): 409-430.
 96. Roos, F. C. and J. W. Thuroff (2011). "Kidney cancer: treatment of clinically localized renal tumors in the elderly." Nat Rev Urol **8**(11): 595-596.
 97. Rosenberg, S. (1995). "The development of new cancer therapies based on the molecular identification of cancer regression antigens." Cancer J Sci Am **1**: 90-100.
 98. Rosenberg, S. A. and M. E. Dudley (2004). "Cancer regression in patients with metastatic melanoma after the transfer of autologous antitumor lymphocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **101 Suppl 2**: 14639-14645.
 99. Ruitenbergh, J. J., C. Boyce, R. Hingorani, A. Putnam and S. A. Ghanekar (2011). "Rapid assessment of in vitro expanded human regulatory T cell function." J Immunol Methods **372**(1-2): 95-106.
 100. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh and M. Toda (1995). "Immunologic Self-Tolerance Maintained by Activated T Cells Expressing IL-2 Receptor α -Chains CD25." The Journal of Immunology **155**: 1151-1164.
 101. Seifter, S., P. M. Gallop, L. Klein and E. Meilman (1959). "Studies on Collagen. II. Properties of purified collagenase and its inhibition." J Biol. Chem. **234**: 285-293.
 102. Sell, K., P. Barth, R. Moll, M. Thomas, N. Zimmer, E. Oplesch, M. Gudo, M. Schrader, R. Hofmann and A. J. Schrader (2012). "Localization of FOXP3-positive cells in renal cell carcinoma." Tumour Biol. **33**(2): 507-513.
 103. Shang, B., Y. Liu, S. J. Jiang and Y. Liu (2015). "Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis." Sci Rep **5**: 15179.
 104. Shimizu, J., S. Yamazaki and S. Sakaguchi (1999). "Induction of Tumor Immunity by Removing CD25+CD4+ T Cells: A Common Basis Between Tumor Immunity and Autoimmunity." J Immunol **163**(5211-5218).
 105. Siddiqui, S. A., X. Frigola, S. Bonne-Annee, M. Mercader, S. M. Kuntz, A. E. Krambeck, S. Sengupta, H. Dong, J. C. Cheville, C. M. Lohse, C. J. Krco, W. S. Webster, B. C. Leibovich, M. L. Blute, K. L. Knutson and E. D. Kwon (2007). "Tumor-infiltrating Foxp3-CD4+CD25+ T cells predict poor survival in renal cell carcinoma." Clin Cancer Res **13**(7): 2075-2081.
 106. Simmons, M. N., C. J. Weight and I. S. Gill (2009). "Laparoscopic radical versus partial nephrectomy for tumors >4 cm: intermediate-term oncologic and functional outcomes." Urology **73**(5): 1077-1082.
 107. Srigley, J. R., B. Delahunt, J. N. Eble, L. Egevad, J. I. Epstein, D. Grignon, O. Hes, H. Moch, R. Montironi, S. K. Tickoo, M. Zhou and P. Argani (2013). "The International Society of Urological Pathology (ISUP) Vancouver Classification of Renal Neoplasia." Am J Surg Pathol **37**: 1469-1489.
 108. Steitz, J., J. Brück, J. Lenz, J. Knop and T. Tüting (2001). "Depletion of CD25+CD4+ T Cells and Treatment with Tyrosine-related Protein 2-transduced Dendritic Cells Enhance the Interferon alpha-induced, CD8+ T-Cell-dependent Immune Defense of B16 Melanoma." Cancer Res **61**: 8643-8646.
 109. Sternberg, C. N., I. D. Davis, J. Mardiak, C. Szczylik, E. Lee, J. Wagstaff, C. H. Barrios, P. Salman, O. A. Gladkov, A. Kavina, J. J. Zarba, M. Chen, L. McCann, L. Pandite, D. F. Roychowdhury and R. E. Hawkins (2010). "Pazopanib in locally advanced or metastatic renal cell carcinoma: results of a randomized phase III trial." J Clin Oncol **28**(6): 1061-1068.
 110. Stohr, C. G., K. Amann and A. Hartmann (2013). "Histopathology of renal cell carcinoma." Urologe A **52**(7): 942-948.

111. Suttmuller, R., L. M. Van Duivenvoorde, A. Van Elsas, T. N. M. Schumacher, M. E. Wildenberg, J. P. Allison, R. E. M. Toes, R. Offringa and C. J. M. Melief (2001). "Synergism of Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Antigen 4 Blockade and Depletion of CD25+ Regulatory T Cells in Antitumor Therapy Reveals Alternative Pathways for Suppression of Autoreactive Cytotoxic T Lymphocyte Responses." J Exp Med **194**: 823-832.
112. Theis, R. P., S. M. Dolwick Grieb, D. Burr, T. Siddiqui and N. R. Asal (2008). "Smoking, environmental tobacco smoke, and risk of renal cell cancer: a population-based case-control study." BMC Cancer **8**: 387.
113. Thoma, C. R., I. J. Frew, C. R. Hoerner, M. Montani, H. Moch and W. Krek (2007). "pVHL and GSK3 β are components of a primary cilium-maintenance signalling network." Nature Cell Biology **9**(5): 588-595.
114. Thompson, R. H., T. Atwell, G. Schmit, C. M. Lohse, A. N. Kurup, A. Weisbrod, S. P. Psutka, S. B. Stewart, M. R. Callstrom, J. C. Cheville, S. A. Boorjian and B. C. Leibovich (2014). "Comparison of Partial Nephrectomy and Percutaneous Ablation for cT1 Renal Masses." Eur Urol.
115. Thornton, A. and E. Shevach (1998). "CD4+CD25+ Immunoregulatory T Cells Suppress Polyclonal T Cell Activation In Vitro by Inhibiting Interleukin 2 Production." J Exp Med **188**: 287-296.
116. Topalian, S., F. Hodi, J. Brahmer, S. Gettinger, D. Smith, D. McDermott and e. al. (2012). "Safety, Activity and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer." The New England Journal of Medicine **366**: 2443-2454.
117. Valmori, D., A. Merlo, N. E. Souleimanian, C. S. Hesdorffer and M. Ayyoub (2005). "A peripheral circulating compartment of natural naive CD4 Tregs." J Clin Invest **115**(7): 1953-1962.
118. Van Damme, N., D. Baeten, M. De Vos, P. Demetter, D. Elewaut, H. Mielants, G. Verbruggen, C. Cuvelier, E. M. Veys and F. De Keyser (1999). "Chemical agents and enzymes used for the extraction of gut lymphocytes influence cytometric detection of T cell surface markers." J Immunol Methods **236**: 27-35.
119. Van Damme, N., D. Baeten, M. De Vos, P. Demetter, D. Elewaut, H. Mielants, G. Verbruggen, C. Cuvelier, E. M. Veys and F. De Keyser (2000). "Chemical agents and enzymes used for the extraction of gut lymphocytes influence flow cytometric detection of T cell surface markers." J Immunol Methods **236**: 27-35.
120. Van Poppel, H., F. Becker, J. A. Cadeddu, I. S. Gill, G. Janetschek, M. A. Jewett, M. P. Laguna, M. Marberger, F. Montorsi, T. J. Polascik, O. Ukimura and G. Zhu (2011). "Treatment of localised renal cell carcinoma." Eur Urol **60**(4): 662-672.
121. Volpe, A. (2016). "The role of active surveillance of small renal masses." Int J Surg **36**(Pt C): 518-524.
122. Volpe, A., A. Finelli, I. S. Gill, M. A. Jewett, G. Martignoni, T. J. Polascik, M. Remzi and R. G. Uzzo (2012). "Rationale for percutaneous biopsy and histologic characterisation of renal tumours." Eur Urol **62**(3): 491-504.
123. Volpe, A., J. R. Kachura, W. R. Geddie, A. J. Evans, A. Gharajeh, A. Saravanan and M. A. Jewett (2007). "Techniques, safety and accuracy of sampling of renal tumors by fine needle aspiration and core biopsy." J Urol **178**(2): 379-386.
124. Vos, J. A., J. H. Simurdak, B. J. Davis, J. B. Myers and M. D. Brissette (2003). "Vortex disaggregation for flow cytometry allows direct histologic correlation: a novel approach for small biopsies and inaspirable bone marrows." Cytometry B Clin Cytom **52**(1): 20-31.
125. Weikert, S., H. Boeing, T. Pischon, C. Weikert, A. Olsen, A. Tjonneland, K. Overvad, N. Becker, J. Linseisen, A. Trichopoulou, T. Mountokalakis, D. Trichopoulos, S. Sieri, D. Palli, P. Vineis, S. Panico, P. H. Peeters, H. B. Bueno-de-Mesquita, W. M. Verschuren, B. Ljungberg, G. Hallmans, G. Berglund, C. A. Gonzalez, M. Dorransoro, A. Barricarte, M. J. Tormo, N. Allen, A. Roddam, S. Bingham, K. T. Khaw, S. Rinaldi, P. Ferrari, T. Norat and E. Riboli (2008). "Blood pressure and risk of renal cell carcinoma in the European prospective investigation into cancer and nutrition." Am J Epidemiol **167**(4): 438-446.

126. Wolf, A. M., D. Wolf, M. Steurer, G. Gastl, E. Gunsilius and B. Grubeck-Loebenstein (2003). "Increase of Regulatory T Cells in the Peripheral Blood of Cancer Patients." Clin Cancer Res **9**: 606-612.
127. Woo, E. Y., C. S. Chu, T. J. Goletz, K. Schlienger, H. Yeh, G. Coukos, S. C. Rubin, R. Kaiser and C. H. June (2001). "Regulatory CD4+CD25+ T Cells in Tumors from Patients with Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer and Late-Stage Ovarian Cancer." Cancer Res **61**: 4766-4772.
128. Wunderlich, H., W. Hindermann, A. Mustafa, O. Reichelt, K. Junker and J. Schubert (2005). "The Accuracy of 250 Fine Needle Biopsies of Renal Tumors." The Journal of Urology **174**(1): 44-46.
129. Zhang, T., J. Xie, S. Arai, L. Wang, X. Shi, N. Shi and e. al. (2016). "The efficacy and safety of anti-PD-1:PD-L1 antibodies for treatment of advanced or refractory cancers: a meta-analysis." Oncotarget **7**: 73068-73079.
130. Znaor, A., J. Lortet-Tieulent, M. Laversanne, A. Jemal and F. Bray (2015). "International variations and trends in renal cell carcinoma incidence and mortality." Eur Urol **67**(3): 519-530.

11. Publikationen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden publiziert unter:

F. Crossey, S. Marx, S. Hölters, K. Schmitt, R.M. Bohle, T. Schmidt, M. Stöckle, U. Sester, M. Sester, M.W.W. Janssen (2018). *Robust method for isolation of tumor infiltrating lymphocytes with a high vital cell yield from small samples of renal cell carcinoma by a new collagenase-free mechanical procedure*. UrolOncol. 2018 Sep; 36(9): 402.e1-402.e10.

12. Danksagung

Ich möchte mich vor allem bei Herrn Dr. med. Martin Janssen für die Themastellung, die hervorragende Betreuung insbesondere im Rahmen der zeitintensiven Laborphase und die trotz der räumlichen Entfernung fortbestehende Diskussions- und Hilfsbereitschaft bedanken.

Ebenso möchte ich Herrn Professor Dr. Michael Stöckle für die tatkräftige Unterstützung bei der Vermittlung des Themas danken, welches mir einen Einblick in die biomedizinische Grundlagenforschung ermöglichte.

Abschließend gilt mein Dank meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meiner Großmutter, die mir mein Studium ermöglicht und mich stets unterstützt und motiviert haben. Für sprachliche und inhaltliche Anregungen möchte ich meinem Onkel Professor Dr. Steffen Jung danken sowie meiner Schwester Nora für ihre geduldige Unterstützung beim Korrekturlesen und bei der Textverarbeitung.

13. Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.