

Aus Immunanalytik Gewebe-kontrollierte Immunocyten, Helmholtz-Zentrum München

Leiterin: Prof. Dr. rer. nat. Elfriede Nößner

# **Charakterisierung der T-Zellen im Kontakt mit ercDC in Nierenzellkarzinom**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

**Evangelos Kokolakis**

aus Heraklion

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Elfriede Nößner

Mitberichterstatter: Prof. Dr. M. Staehler  
apl. Prof. Dr. Peter Nelson

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 20.05.2021

*Meinen Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Das humane Immunsystem.....	1
1.1.1 Angeborenes und adaptives Immunsystem.....	1
1.2 Die T-Lymphozyten .....	2
1.2.1 T-Zell-Rezeptor.....	2
1.2.2 Antigenpräsentation und T-Zell-Aktivierung .....	2
1.2.3 T-Zell-Subpopulationen.....	3
1.3 Transkriptionsfaktoren der FOXO-Familie .....	4
1.3.1 Funktion der FOXO-Transkriptionsfaktoren in T-Zellen .....	4
1.4. Die dendritischen Zellen.....	6
1.4.1 Hauptpopulationen der dendritischen Zellen .....	6
1.4.2 Funktion der dendritischen Zellen .....	7
1.5 Makrophagen .....	8
1.5.1 Entwicklung .....	8
1.5.2 Plastizität, Polarisation und Funktion .....	8
1.6 V-set and immunoglobulin domain-containing protein 4.....	9
1.6.1 Struktur .....	9
1.6.2 Expression.....	10
1.6.3 Regulation der Expression von VSIG4.....	10
1.6.4 VSIG4 und Phagozytose .....	11
1.6.5 Immunsuppressive und antiinflammatorische Wirkung von VSIG4.....	11
1.6.6 VSIG4 und maligne Erkrankungen.....	13
1.7 Tumorimmunologie .....	14
1.7.1 Cancer Immunoediting.....	14
1.7.2 Das Tumormikromilieu.....	16
1.8 Das humane Nierenzellkarzinom.....	18
1.8.1 Epidemiologie und Ätiologie .....	18
1.8.2 Klassifikation .....	18
1.8.3 Klinik und Diagnostik.....	20
1.8.4 Behandlung .....	21
1.8.5 Immunzellinfiltrat in dem klarzelligem Nierenzellkarzinom.....	22
<b>2 Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>24</b>

<b>3 Material .....</b>	<b>25</b>
3.1 Geräte und Verbrauchsmaterial .....	25
3.2 Chemikalien und fertige Lösungen.....	25
3.3 Lösungen und Puffer .....	26
3.4 Antikörper für die Immunfluoreszenz .....	26
3.4.1 Primäre Antikörper .....	26
3.4.2 Sekundäre Antikörper .....	27
3.5 Software.....	27
3.6 Patientenmaterial .....	27
<b>4 Methoden.....</b>	<b>29</b>
4.1. Immunfluoreszenz und konfokale Mikroskopie.....	29
4.1.1 Prinzip .....	29
4.1.2 Durchführung der Immunfluoreszenzfärbungen.....	29
4.1.3 Bildaufnahme mit dem konfokalen Laserrastermikroskop und Auswertung .....	31
4.2 Statistische Analysen.....	31
4.2.1 Mann-Whitney-U-Test.....	31
4.2.2 Kruskal-Wallis-Test.....	32
4.2.3 Post-hoc-Test .....	32
<b>5 Ergebnisse .....</b>	<b>33</b>
5.1 Histologischer Nachweis von VSIG4 im Nierenzellkarzinom.....	33
5.2 Expression von VSIG4 auf CD209 <sup>+</sup> Zellen.....	34
5.2.1 Unterscheidung von VSIG4 <sup>+</sup> Zellpopulationen .....	37
5.2.2 Unterscheidung der CD209 <sup>+</sup> Zellpopulation hinsichtlich der VSIG4-Expression ....	41
5.3 Expression von FOXO1 in den T-Zellen im Nierenzellkarzinom.....	48
5.3.1 FOXO1-Expression in T-Zellen in Relation zu VSIG4 <sup>+</sup> Zellen .....	48
5.3.2 Lokalisation der FOXO1 <sup>+</sup> und FOXO1 <sup>-</sup> T-Zellen in Bezug auf das Gefäßsystem....	57
<b>6 Diskussion .....</b>	<b>67</b>
6.1 Histologischer Nachweis von VSIG4 im Nierenzellkarzinom.....	68
6.2 Expression von VSIG4 in CD209 <sup>+</sup> Zellen.....	69
6.3 FOXO1-Expression in T-Zellen im Kontakt mit VSIG4 .....	71
6.4 Lokalisation der FOXO1 <sup>+</sup> und FOXO1 <sup>-</sup> T-Zellen in Bezug auf das Gefäßsystem .....	74
<b>7 Zusammenfassung.....</b>	<b>77</b>
<b>8 Anhang .....</b>	<b>79</b>

8.1 Anzahl der VSIG4 <sup>+</sup> Zellen, der CD3 <sup>+</sup> Zellen, der CD3 <sup>+</sup> Zellen in Kontakt mit VSIG4 <sup>+</sup> Zellen und der CD3 <sup>+</sup> FOXO1 <sup>+</sup> Zellen in und ohne Kontakt mit VSIG4 <sup>+</sup> Zellen ermittelt aus der Immunfluoreszenzfärbung für VSIG4, FOXO1 und CD3 .....	79
8.2 Anzahl der CD3 <sup>+</sup> Zellen und der CD3 <sup>+</sup> FOXO1 <sup>-</sup> Zellen in den verschiedenen Kompartimenten ermittelt aus der Immunfluoreszenzfärbung für CD3, FOXO1 und CD31	80
8.3 Analyse der Tumorgewebe T105, T114 und T118 mittels Durchflusszytometrie .....	81
<b>9 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>82</b>
<b>10 Abkürzungen .....</b>	<b>97</b>
<b>11 Danksagung.....</b>	<b>100</b>
<b>Veröffentlichungen.....</b>	<b>101</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>102</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das humane Immunsystem

Das humane Immunsystem ist ein Netzwerk von Zellen und Molekülen zum Schutz des menschlichen Organismus vor Infektion (Delves und Roitt 2000). Seine Effektivität ist in seinen Eigenschaften begründet, körpereigen von körperfremd und harmlos körperfremd von gefährlich körperfremd zu unterscheiden, sowie sich an die ständigen Änderungen der Umwelt und des menschlichen Körpers zu adaptieren (Nicholson 2016).

### 1.1.1 Angeborenes und adaptives Immunsystem

Das Immunsystem besteht aus einem unspezifischen, angeborenen und einem spezifischen, adaptiven Abwehrsystem. Beide Systeme benutzen zelluläre und humorale Komponenten.

Zum angeborenen Immunsystem gehören physikalische Barrieren wie die Haut und chemische Barrieren wie der saure pH-Wert von Körperflüssigkeiten, z.B. der Magensäure. Die angeborene zelluläre Abwehr wird durch Granulozyten (Neutrophile, Eosinophile, Basophile), Makrophagen, dendritische Zellen (DC) und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) vermittelt. Ihr zentraler Abwehrmechanismus ist die Phagozytose, bei der die Pathogenen von den Immunzellen aufgenommen und anschließend abgebaut werden. Außerdem besteht die Möglichkeit der zytotoxischen Reaktionen, wo zytotoxisch wirkende Substanzen von den Immunzellen freigesetzt werden. Die angeborene humorale Abwehr besteht aus verschiedenen Proteinen, die entweder direkt die Pathogenen schädigen, wie das Lysozym und das Komplementsystem, oder andere Abwehrmechanismen aktivieren, wie die Akute-Phase-Proteine. Das angeborene Immunsystem hat kein immunologisches Gedächtnis. (Walzog und Fandrey 2010)

Zum adaptiven Immunsystem gehören die T- und die B-Lymphozyten. Die T-Lymphozyten unterteilen sich in  $CD8^+$  zytotoxische T-Zellen und  $CD4^+$  T-Helferzellen. Die B-Lymphozyten differenzieren sich nach ihrer Aktivierung zu Plasmazellen, die Antikörper produzieren. Die Antikörper können selbst Antigene neutralisieren, sowie auch ihre Phagozytose durch Immunzellen und ihre Lyse durch das Komplementsystem induzieren. Das adaptive Immunsystem verfügt über ein immunologisches Gedächtnis, das dafür sorgt, dass die Immunantwort bei nächstem Antigenkontakt stärker und schneller ist. (Walzog und Fandrey 2010)

Das angeborene und das adaptive Immunsystem werden häufig als zwei getrennte Arme der Immunabwehr beschrieben. Jedoch wirken sie zusammen und ihre Synergie ist entscheidend für eine vollständige, effektive Immunantwort. (Chaplin 2010)

## 1.2 Die T-Lymphozyten

### 1.2.1 T-Zell-Rezeptor

Die T-Lymphozyten erkennen Antigene mithilfe antigenspezifischer, transmembraner Rezeptoren, die T-Zell-Rezeptoren (TZR) heißen. Jede T-Zelle verfügt über TZR einer einzigen Spezifität. (Chaplin 2010)

Für die Erkennung der enormen Vielfalt der Antigene, mit denen der Organismus im Laufe des Lebens konfrontiert wird, ist deswegen eine ebenfalls enorme Anzahl von TZR notwendig. So werden in Menschen bis zu  $10^8$  unterschiedliche TZR produziert (Arstila et al. 1999). Diese hohe Anzahl wird mittels Rekombination der DNA-Segmente für die antigenbindenden Regionen des TZR und Einfügen von zusätzlichen Nukleotiden erreicht (Parkin und Cohen 2001). So entsteht die Nukleotidsequenz, die den TZR kodiert und die auch nach T-Zell-Aktivierung und -Teilung unverändert bleibt (Delves und Roitt 2000).

Der TZR hat zwei Formen. Die häufigste Form ist ein Heterodimer aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette. Ca. 90-95% der zirkulierenden T-Lymphozyten exprimieren diesen  $\alpha\beta$  TZR. Die restlichen T-Zellen besitzen einen TZR, der ein Heterodimer aus einer  $\gamma$ - und einer  $\delta$ -Kette ist. (Chaplin 2010)

Der TZR bildet zusammen mit den CD3 Proteinen den TZR-CD3-Komplex. Die CD3 Proteine vermitteln die intrazelluläre Signaltransduktion zur T-Zell-Aktivierung bei Antigenkontakt. Der CD3-Komplex besteht aus jeweils einer transmembranen CD3 $\gamma$ - und CD3 $\delta$ -Kette, aus zwei transmembranen CD3 $\epsilon$ -Ketten und aus einem überwiegend intrazytoplasmatischen Homodimer aus zwei CD3 $\zeta$ -Ketten. (Chaplin 2010)

### 1.2.2 Antigenpräsentation und T-Zell-Aktivierung

Der TZR bindet Peptide mit einer linearen Abfolge von Aminosäuren, die bei MHC-I Präsentation meistens aus acht oder neun Aminosäuren bestehen, sowie auch längere Peptide bei MHC-II Präsentation. Der TZR kann die Antigenepitope nur zusammen mit einem Zelloberflächenprotein erkennen, welches Haupthistokompatibilitätskomplex-Protein (*major histocompatibility complex* oder MHC) heißt. Aus diesen Gründen sind die intrazelluläre Prozessierung von Antigenen und die anschließende Präsentation der daraus entstandenen Peptide auf MHC-Molekülen für die Antigenerkennung durch die T-Lymphozyten notwendig. (Parkin und Cohen 2001)

Die Interaktion zwischen dem TZR und dem Antigen/MHC-Komplex ist für die Aktivierung von naiven T-Zellen nicht ausreichend. Dafür ist ein weiteres, kostimulatorisches Signal notwendig (Chaplin 2010). Ohne gleichzeitige Kostimulation führt die Antigenerkennung durch den TZR zu Anergie der T-Zelle (Chaplin 2010). Die anergen T-Zellen sind lebende Zellen, die sich in einem hyporeaktiven Zustand befinden (Schwartz 2003). In diesem Zustand erzeugt die Auseinandersetzung der T-Zellen mit Antigenen keine Immunreaktion (Sharpe und Freeman 2002).

Kostimulatorische Signale können von unterschiedlichen Molekülen vermittelt werden (Chen und Flies 2013). Besondere Bedeutung beim Erstkontakt mit dem Antigen/MHC-Komplex



haben aber die Mitglieder der CD28- und B7-Familie, die zur Immunglobulin-Superfamilie gehören (Sharpe und Freeman 2002). Die meisten Mitglieder der CD28-Familie interagieren primär mit Mitgliedern der B7-Familie: dabei handelt es sich im Wesentlichen um Rezeptor-Ligand-Paare (Chen und Flies 2013). Von entscheidender Bedeutung für die Aktivierung der T-Zellen ist die Kostimulation vermittelt durch die Interaktion zwischen dem Rezeptor CD28, der auf den T-Zellen exprimiert wird, und seinen Liganden B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) auf der Oberfläche von reifen APZ (Chen und Flies 2013). Wenn sowohl das TZR-Signal als auch das kostimulatorische Signal vorhanden sind, induziert dann CD3 eine intrazelluläre Signalkaskade, die zur Aktivierung von Genen führt, die die Proliferation und die Differenzierung der T-Lymphozyten regulieren (Chaplin 2010). Die klonale Proliferation der antigenspezifischen T-Zellen beim ersten Kontakt mit einem Antigen generiert nicht nur Effektor-T-Zellen, sondern auch T-Gedächtniszellen (Delves und Roitt 2000). Die T-Gedächtniszellen gewährleisten, dass die Immunantwort bei erneutem Kontakt mit demselben Antigen schneller und effektiver ist.

Nach der Beseitigung der Gefahr für den Organismus müssen diese Aktivierungskaskaden herunterreguliert werden, damit überschießende Immunantworten und autoimmune Reaktionen vermieden werden. Ein wichtiger Mechanismus für die Herunterregulation der T-Zell-Aktivierung ist, genauso wie bei ihrer Hochregulation, die Interaktion zwischen Rezeptor-Ligand-Paaren der B7- und CD28-Familie. Die transmembranen Liganden der B7-Familie PD-L1 (B7-H1) und PD-L2 (B7-DC) werden auf APZ und auf Zellen in unterschiedlichen Geweben exprimiert. Sie vermitteln durch Bindung an ihren CD28-Familie-Rezeptor PD-1 (CD279) auf der T-Zell-Oberfläche ein inhibitorisches Signal. Auch B7-1 und B7-2 können durch Bindung an den Rezeptor CTLA-4 (CD152) auf der Oberfläche der T-Zellen hemmend wirken. (Schildberg et al. 2016)

### 1.2.3 T-Zell-Subpopulationen

Die Hauptpopulationen der T-Zellen werden durch die Korezeptoren CD4 und CD8 definiert. Die  $\alpha\beta$  TZR<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen haben als T-Helferzellen (T<sub>H</sub>-Zellen) eine Helferfunktion in der Immunantwort. Nach ihrer Aktivierung differenzieren sie sich unter dem Einfluss von Zytokinen zu T<sub>H</sub>1-, T<sub>H</sub>2- oder T<sub>H</sub>17-Zellen (Chaplin 2010). Jede Subgruppe produziert unterschiedliche Zytokine, die ihre Funktionen bestimmen. Die T<sub>H</sub>1-Zellen induzieren die Aktivierung von Makrophagen, NK-Zellen und T-Zellen (Bonilla und Oettgen 2010). Die T<sub>H</sub>2-Zellen induzieren die Produktion von Antikörpern, sie können aber auch Hypersensitivitätsreaktionen fördern (Bonilla und Oettgen 2010). Die T<sub>H</sub>17-Zellen sind wichtig für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten im Rahmen der Immunabwehr gegen extrazelluläre Bakterien und spielen auch eine bedeutende Rolle bei vielen Autoimmunerkrankungen (Chaplin 2010). Eine Fraktion der zirkulierenden  $\alpha\beta$  TZR<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die Foxp3<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen (Treg), übt eine wichtige immunregulatorische Wirkung durch die Unterdrückung der Immunantworten aus (Fontenot et al. 2003; Chaplin 2010).

Die  $\alpha\beta$  TZR<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind zytotoxische T-Lymphozyten (CTL). Sie erkennen Antigene auf infizierten Zellen oder auf Tumorzellen und induzieren deren Apoptose. (Bonilla und Oettgen 2010)

Die  $\gamma\delta$  T-Zellen sind  $CD3^+CD4^-CD8^-$  (Chaplin 2010). Sie erkennen keine Antigene auf MHC-Komplexen sondern Antigene präsentiert auf den nicht-klassischen MHC-Molekülen der CD1-Familie (Bonilla und Oettgen 2010).

### 1.3 Transkriptionsfaktoren der FOXO-Familie

Die evolutionär konservierten Forkhead-Box-O (FOXO)-Transkriptionsfaktoren gehören zur Familie der Forkhead-Proteine, die durch die Forkhead-DNA-bindende Domäne charakterisiert werden (Luo und Li 2018). In Säugetieren besteht die FOXO-Familie aus vier Proteinen: FOXO1, FOXO3, FOXO4 und FOXO6 (Wang et al. 2009). FOXO1, -3 und -4 werden breit exprimiert, ihr Expressionsmuster unterscheidet sich jedoch zwischen den verschiedenen Gewebearten (Hedrick et al. 2012). FOXO1 wird am stärksten in T-Zellen, B-Zellen und in den Ovarien exprimiert (Kerdiles et al. 2009). FOXO3 wird stark in myeloischen Zellen und in Lymphozyten exprimiert (Luo und Li 2018). Die FOXO4-Expression ist schwach und zeigt keine großen Unterschiede zwischen den verschiedenen Geweben (Hedrick et al. 2012). FOXO6 wird stark im Hirngewebe exprimiert (Jacobs et al. 2003).

Die Aktivität der FOXO-Proteine wird sehr genau mittels posttranslationaler Modifikationen, primär mittels Phosphorylierung und Acetylierung, geregelt, die die subzelluläre Lokalisation und die Menge von FOXO ändern. Ein Hauptmechanismus der FOXO-Regulation ist die Phosphorylierung durch AKT, auch Proteinkinase B genannt, nach Stimulation der Zelle mit Wachstumsfaktoren, Insulin oder Zytokinen. Die Phosphorylierung durch AKT führt zur Bindung von 14-3-3 Proteinen an den FOXO-Transkriptionsfaktoren. Diese werden danach aus dem Zellkern ins Zytoplasma transportiert und so inaktiviert. Dieser inaktive Zustand ist reversibel. FOXO-Proteine können aber nach ihrem Kernexport auch ubiquitiniert und im Proteasom degradiert werden. Zusätzlich zu AKT gibt es auch andere Kinasen, die die FOXO-Proteine inaktivieren, wie beispielsweise die SGK (Englisch: *serum and glucocorticoid-regulated kinase*), die ERK (Englisch: *Extracellular signal-Regulated Kinase*) und die IKK (I $\kappa$ B-Kinase). Auf der anderen Seite phosphorylieren die durch oxidativen Stress aktivierten JNK (Englisch: *C-Jun N-terminal kinase*) und Mst1-Kinase (Englisch: *mammalian Ste20-like kinase 1*) die FOXO-Proteine, die dann aktiviert und in den Zellkern transportiert werden (siehe Abbildung 1.3). (Coomans de Brachène und Demoulin 2016; Luo und Li 2018)

#### 1.3.1 Funktion der FOXO-Transkriptionsfaktoren in T-Zellen

Die FOXO-Proteine regulieren eine Vielfalt an Prozessen wie Zellmetabolismus, Organentwicklung, DNA-Reparatur, Alterungsprozesse, Zellzyklusprogression und Apoptose (Hedrick et al. 2012; Luo und Li 2018).



**Abbildung 1.3. Regulation der Aktivität der FOXO-Transkriptionsfaktoren.**

Die Phosphorylierung der FOXO-Proteine durch AKT nach Stimulierung der Zelle mit Wachstumsfaktoren induziert die Bindung von 14-3-3 Proteinen an FOXO und den anschließenden Transport des Komplexes aus dem Zellkern ins Zytoplasma. Im Gegensatz dazu induziert die FOXO-Phosphorylierung durch die stressinduzierten JNK und Mst1-Kinasen die nukleäre Translokation und Aktivierung der FOXO-Proteine, auch bei gleichzeitiger Phosphorylierung durch AKT. (Angelehnt an: Ouyang und Li 2011)

Die FOXO-Transkriptionsfaktoren sind negative Regulatoren der Zellproliferation. Sie reprimieren die Aktivität von Zyklin D1 und Zyklin D2 (Schmidt et al. 2002). Zudem induzieren sie die Expression von spezifischen Zell-Zyklus-Inhibitoren wie p21 und p27<sup>KIP1</sup> und regulieren so negativ die Zellzyklusprogression (Dijkers et al. 2000; Medema et al. 2000; Keizer et al. 2010). Wenn notwendig, gewährleisten die FOXO-Proteine die Gewebemöostase durch die Induktion von programmiertem Zelltod (Lam et al. 2013).

Die FOXO-Transkriptionsfaktoren regulieren zudem hoch spezialisierte T-Zell-Aktivitäten (Luo und Li 2018). FOXO1 ist entscheidend für die Kontrolle vom „Homing“ der T-Zellen durch die Regulation der Expression von Molekülen wie CCR7 und L-Selektin (Kerdiles et al. 2009). Außerdem ist FOXO1 unverzichtbar für das Überleben der naiven T-Zellen durch die Induktion der Expression des IL-7-Rezeptors (Kerdiles et al. 2009; Ouyang et al. 2009). IL-7 reguliert das Überleben und die homöostatische Proliferation der T-Zellen (Ouyang und Li 2011). Weiterhin unterdrückt FOXO1 die Generierung von T<sub>H</sub>17-Zellen (Lainé et al. 2015). In CD8<sup>+</sup> T-Zellen wird FOXO1 nach dem Kontakt mit Antigenen durch die TZR/PI3K/AKT-Achse phosphoryliert und inaktiviert, was die FOXO1-induzierte Hemmung des Transkriptionsfaktors T-bet aufhebt und so die Differenzierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Effektorzellen fördert (Rao et al. 2012). FOXO1 ist durch die Induktion der Expression von Eomes und Tcf7 notwendig für die Generierung von CD8<sup>+</sup> Gedächtniszellen (Rao et al. 2012; Hess Michelini et al. 2013). FOXO1 ist ebenfalls Transkriptionsfaktor von PD-1 (Staron et al. 2014). In „erschöpften“ (Englisch: *exhausted*) T-Zellen im Rahmen einer chronischen viralen Infektion ist FOXO1 notwendig für die Aufrechterhaltung der PD-1-Expression und fördert das Überleben der T-Zellen, während PD-1 zur FOXO1-Aktivierung mittels Hemmung der PI3K/AKT-Achse beiträgt (Staron et al. 2014). So wird dieses positive Feedback zwischen FOXO1 und PD-1 von den T-Zellen ausgenutzt, um ihre Homöostase während der ständigen

Antigenstimulation zu unterstützen (Luo und Li 2018). Ob dies auch für die tumorinfiltrierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen gilt, die häufig funktionell ähnlich mit den erschöpften CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind, ist unklar. FOXO1 und FOXO3 kontrollieren auch die Generierung von Treg durch die Induktion der Expression von FOXP3 (Kerdiles et al. 2010; Ouyang et al. 2010). Zudem reguliert FOXO1 die Funktion von Treg (Kerdiles et al. 2010; Ouyang et al. 2012). Es induziert beispielweise die Expression von CTLA-4, das zur immunsuppressiven Funktion von Treg beiträgt (Kerdiles et al. 2010).

Obwohl bisher viele Anstrengungen unternommen worden sind, um zu verdeutlichen, wie die FOXO-Transkriptionsfaktoren die T-Zell-Reaktionen bei Infektion und Autoimmunität regulieren, ist die Rolle der FOXO-Proteine in der antitumoralen Immunität weniger klar (Luo und Li 2018). In Mäusen zeigten die Treg in den nicht-lymphatischen Geweben im Vergleich zu den Treg in den sekundären lymphatischen Organen eine verminderte FOXO1-Aktivität, die zur Herunterregulation der Expression von Genen führte, die das „Homing“ der Treg in den lymphatischen Organen fördern, wie beispielweise das Gen *Ccr7* (Luo et al. 2016). In Mausmodellen zeigten die tumorinfiltrierenden Treg mehr phosphoryliertes, inaktives FOXO1 (Luo et al. 2016). Die Aktivierung von FOXO1 führte zum Austritt der tumorinfiltrierenden Treg aus dem Tumorgewebe, zur Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen und schließlich zu verlangsamtem Wachstum der Tumoren ohne das Auftreten von Autoimmunreaktionen (Luo et al. 2016). Ob und wie die durch FOXO regulierten Programme in den konventionellen, nicht regulatorischen T-Zellen zur Tumorummuntherapie benutzt werden können, ist noch enigmatisch (Luo und Li 2018). Theoretisch könnte die Manipulation der FOXO1-Aktivität die Infiltration von Tumoren durch die T-Zellen fördern oder auch die PD-1-Achse zu Gunsten der Immuntherapie modulieren (Luo und Li 2018).

## **1.4. Die dendritischen Zellen**

### **1.4.1 Hauptpopulationen der dendritischen Zellen**

Die dendritischen Zellen (DC) gehören zum Mononukleär-phagozytären System (Clark et al. 2019). Die DC sind sehr heterogen und werden in vier Hauptpopulationen unterteilt: in plasmazytoide DC (pDC), in myeloide/klassische/konventionelle DC (cDC), in Monozyten-abgeleitete DC (moDC) und in Langerhans-Zellen (Devi und Anandasabapathy 2017).

Die pDC sind CD303<sup>+</sup>CD304<sup>+</sup>CD123<sup>+</sup> (Collin et al. 2013; Wculek et al. 2019). Sie sind auf die Produktion von Typ-I- und Typ-III-Interferonen bei akuter und chronischer viraler Infektion spezialisiert (Wculek et al. 2019).

Die cDC unterteilen sich in zwei Subpopulationen: in die CD141<sup>+</sup> cDC1 und in die CD1c<sup>+</sup> cDC2. Sie sind im Blut und im lymphatischen Gewebe, sowie auch als migratorische DC im peripheren Gewebe lokalisiert. Die cDC1 sind auf die Kreuzpräsentation von Antigenen intrazellulärer Pathogene und Tumoren an CD8<sup>+</sup> T-Zellen spezialisiert. Außerdem induzieren sie T<sub>H</sub>1-Immunreaktionen. Die cDC2 können eine Vielfalt von Immunreaktionen induzieren, ihre Funktion ist vom Kontext und von der spezifischen cDC2-Subpopulation abhängig. Sie produzieren hohe Mengen von IL-12 und aktivieren CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten mittels Antigenkruzpräsentation. (Wculek et al. 2019).

Die moDC entstehen aus Monozyten im Rahmen von Inflammation (Segura et al. 2013; Segura und Amigorena 2013). Sie sind CD14<sup>+</sup>CD209<sup>+</sup> (Wculek et al. 2019). CD209/DC-SIGN wird in der Peripherie auf unreifen DC, aber auch auf Makrophagenpopulationen wie Mikroglia, den interstitiellen Makrophagen und den tumorinfiltrierenden Makrophagen exprimiert (Garcia-Vallejo und van Kooyk 2015). Die CD14<sup>+</sup> DC werden auch interstitielle DC genannt (Collin et al. 2013). In Menschen sind die moDC in vielen inflammatorischen Erkrankungen und auch in malignem Aszites nachgewiesen (Segura und Amigorena 2013). Sie sind ebenfalls in gesunden menschlichen Geweben lokalisiert. Dazu zählen der Darm (Watchmaker et al. 2014) und die Lunge (Baharom et al. 2016). Ihre Funktion ist vor allem in vitro erforscht und ist stimulations- und signalabhängig (Wculek et al. 2019).

Die Langerin/CD207<sup>+</sup> Langerhans-Zellen sind die antigenpräsentierenden DC der Epidermis. Die Langerhans-Zellen können sich unabhängig vom Knochenmark selbst erneuern (Collin und Bigley 2018).

Da es keinen Marker gibt, der für sich alleine die humanen DC auszeichnet, ist ihre Definition und ihre Unterscheidung von Monozyten und Makrophagen schwer und nur mittels Markerkombination annäherungsweise möglich (Noessner et al. 2011). Auch auf Ebene der Funktion ist keine eindeutige Abgrenzung möglich, denn die DC können Makrophagenfunktionen aufweisen und vice versa (Weisheit et al. 2015).

#### **1.4.2 Funktion der dendritischen Zellen**

Die DC spielen eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der Immunhomöostase im Organismus durch Regulation der Immunantwort und der Selbsttoleranz (Devi und Anandasabapathy 2017). Sie besitzen sowohl immunogene als auch tolerogene Funktionen und steuern die T-Zell-Immunität und die T-Zell-Toleranz (Waisman et al. 2017). Das Ergebnis der Interaktion zwischen den DC und den T-Zellen wird von der Reife der DC, ihrer Subpopulation, dem Zytokinmilieu und der Lokalisation des Gewebes bestimmt (Waisman et al. 2017).

Die DC sind „professionelle“ antigenpräsentierende Zellen des Immunsystems. Die DC können Antigene sowohl über die MHC-Klasse-I- und die MHC-Klasse-II-Präsentation als auch über die Kreuzpräsentation präsentieren (Heath et al. 2004).

Die naïven oder unreifen DC sind wenig immunogen. Wenn diese Zellen mittels ihrer „*pattern recognition receptors*“ (PRRs), wie beispielweise Toll-like-Rezeptoren, „*Pathogen-assoziierte molekulare Muster*“ (PAMPs), die von Pathogenen freigesetzt werden, oder „*danger-associated molecular patterns*“ (DAMPs), die von geschädigten oder toten Zellen freigesetzt werden, erkennen, dann differenzieren sie sich zu reifen DC. Die reifen DC zeigen eine hochregulierte Expression von MHC-Molekülen und kostimulatorischen Molekülen der B7-Familie wie B7-1 und B7-2, sowie auch eine hochregulierte Expression von Chemokinrezeptoren wie CCR7. Dies erlaubt ihre Migration in die Lymphknoten, wo sie die von ihnen aufgenommenen und verarbeiteten Antigene an antigenspezifische T-Zellen präsentieren. Die T-Zellen werden dadurch aktiviert und proliferieren. Für die erfolgreiche Aktivierung der T-Zellen durch DC sind drei Signale notwendig: die Antigenpräsentation auf MHC-Molekülen, die Kostimulation der T-Zellen mit Molekülen wie CD40, CD80, CD86 und

Zytokine wie IL-2, IL-1 $\beta$ , IL-6, die von den DC oder auch von Zellen der Umgebung sezerniert werden. (Devi und Anandasabapathy 2017)

Die tolerogenen DC sind meistens entweder naive Zellen oder Zellen, die mittels anderer Mechanismen aktiviert aber trotzdem resistent gegenüber ihrer funktionellen Reifung sind (Devi und Anandasabapathy 2017). Sie induzieren die Anergie oder die Apoptose von T-Zellen, die von den DC präsentierte Selbstantigene erkennen (Devi und Anandasabapathy 2017). Ein Mechanismus, der zur Anergie der T-Zellen beiträgt, ist die Expression von PD-L1 auf den DC (Selenko-Gebauer et al. 2003). Weiterhin sind DC in der Lage, die Expansion von immunsuppressiven Treg zu induzieren (Cools et al. 2007). Durch diese Mechanismen vermitteln die DC sowohl zentrale als auch periphere Selbsttoleranz (Devi und Anandasabapathy 2017). Das Konzept, dass die reifen DC ausschließlich immunogen und die naiven DC ausschließlich tolerogen sind, ist aber wahrscheinlich eine Vereinfachung: naive DC können unter Umständen Immunreaktionen induzieren und reife DC können tolerogen sein (Reis e Sousa 2006).

## **1.5 Makrophagen**

### **1.5.1 Entwicklung**

Die Makrophagen sind Leukozyten, die zu dem mononukleär-phagozytären System gehören (Guilliams et al. 2018). Seit der Definition des mononukleär-phagozytären Systems am Ende der 1960er-Jahre und für viele Jahrzehnte danach wurde behauptet, dass alle Makrophagen aus im Blut zirkulierenden Monozyten entstehen (Davies und Taylor 2015). Die Monozyten sind zirkulierende Blutzellen, die in Menschen ca. 10% der peripheren Leukozyten ausmachen (Guilliams et al. 2018). Es gibt drei Hauptsubpopulationen von Monozyten im Menschen: die „klassischen“ CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten, die 80-90% aller Monozyten ausmachen, die „intermediären“ CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten und die „nicht-klassischen“ CD14<sup>Low</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten (Guilliams et al. 2018). Die zirkulierenden Monozyten gelangen aus dem Blut in das periphere Gewebe, wo sie sich zu geweberesidenten Makrophagen oder zu DC differenzieren (Gordon und Taylor 2005). In den letzten Jahren wurde jedoch gezeigt, dass die meisten geweberesidenten Makrophagen aus primitiven Makrophagen des Dottersacks entstehen und sich selbst unabhängig von Monozyten erneuern können (Schulz et al. 2012; Yona et al. 2013). Trotzdem können auch diese Makrophagen von aus Monozyten stammenden Makrophagen ersetzt werden, beispielweise nach Inflammation oder im Alter (Epelman et al. 2014; Molawi et al. 2014). Makrophagen sind in allen Geweben des menschlichen Organismus nachzuweisen (Mosser und Edwards 2008).

### **1.5.2 Plastizität, Polarisation und Funktion**

Die Makrophagen weisen multiple Funktionen auf. Bei einer Infektion gelangen sie in den Entzündungsort und hemmen die Verbreitung der Pathogene (Shapouri-Moghaddam et al. 2018). Mittels ihrer Toll-like-Rezeptoren erkennen sie PAMPs und DAMPs und phagozytieren anschließend Pathogene, Zelldebris, infizierte und apoptotische Zellen oder produzieren

reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species/ROS*), die zytotoxisch sind (Shapouri-Moghaddam et al. 2018). Weiterhin können sie auf ihren MHC-Molekülen Antigene an die T-Zellen präsentieren und sie dadurch aktivieren (Shapouri-Moghaddam et al. 2018). Sie produzieren unterschiedliche Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  und spielen eine wichtige Rolle bei der Progression von vielen inflammatorischen Erkrankungen wie Atherosklerose und Krebs (Shapouri-Moghaddam et al. 2018). Zudem tragen sie essenziell zur Resolution der Entzündungen und zur Gewebeheilung bei (Mantovani et al. 2013).

Die Polarisation von Makrophagen ist der Prozess, bei dem sie einen bestimmten Phänotyp und eine funktionelle Reaktion auf Reize aus ihrer Umgebung annehmen (Shapouri-Moghaddam et al. 2018). Die funktionelle Plastizität befähigt sie, sich unterschiedlichen physiologischen Bedingungen anzupassen (Quail und Joyce 2013). In diesem phänotypischen Kontinuum werden zwei Extreme unterschieden: die M1-Polarisierung und die M2-Polarisierung (Mosser und Edwards 2008).

Die klassisch aktivierten M1 Makrophagen werden durch T<sub>H</sub>1-Zytokine oder durch die Erkennung bakterieller Lipopolysaccharide induziert. Sie sind inflammatorisch und produzieren hohe Mengen von proinflammatorischen Zytokinen. Sie beteiligen sich an der Eliminierung von Pathogenen durch die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und sind wichtige Effektorzellen der Immunabwehr gegen intrazelluläre Pathogene. So haben die M1 Makrophagen antimikrobielle und antitumorale Wirkung, sie verursachen eine ROS-induzierte Gewebeschädigung und beeinträchtigen die Geweberegeneration und die Wundheilung. Als Schutz vor übermäßiger Gewebeschädigung wird die chronische Inflammation durch regulatorische Mechanismen inhibiert, die von der antiinflammatorischen Funktion der M2 Makrophagen induziert werden. Die alternativ aktivierten M2 Makrophagen werden von T<sub>H</sub>2-Zytokinen induziert. Sie produzieren antiinflammatorische Zytokine, sie sind effektive Phagozyten aber keine effektiven antigenpräsentierenden Zellen. Sie fördern die Gewebereparatur und die Wundheilung aber auch die Angiogenese und die Tumorprogression. (Shapouri-Moghaddam et al. 2018)

Außerdem sind die Makrophagen an der Organentwicklung sowie auch an dem physiologischen, homöostatischen Geweberemodelling im Fetus und für bestimmte Gewebe auch in Erwachsenen beteiligt (Mantovani et al. 2013). So beinhalten die Funktionen der Makrophagen das Remodelling der extrazellulären Matrix, die epitheliale Proliferation, die Entwicklung und die Organisation der Vaskulatur und das Gestalten der Gewebeorganisation (Mantovani et al. 2013). Sie spielen so eine Rolle bei der Entwicklung der Knochen, der Brustdrüsen und des Nervensystems (Pollard 2009).

## **1.6 V-set and immunoglobulin domain-containing protein 4**

### **1.6.1 Struktur**

*V-set and immunoglobulin domain-containing protein 4* (VSIG4), auch *complement receptor immunoglobulin* (CRIg) oder Z39Ig genannt, ist ein Protein, welches zur B7-Familie gehört (Vogt et al. 2006). Das humane VSIG4-Gen wurde zum ersten Mal in 2000 beschrieben (Langnaese et al. 2000). Es kommt in zwei Varianten vor. Die lange Variante, auch huCRIg(L)

genannt, enthält eine variable (IgV) und eine konstante (IgC<sub>2</sub>) Immunglobulin-Domäne, während die kurze Variante huCRIg(S) nur eine IgV-Domäne enthält (Helmy et al. 2006). Die IgV-Domäne spielt eine entscheidende Rolle bei der Bindung von Komplementfaktoren und bei der Vermittlung von Phagozytose, während die Funktion der IgC<sub>2</sub>-Domäne unklar bleibt (He et al. 2008). Das VSIG4-Protein verfügt über eine intrazelluläre cAMP/cGMP-abhängige-Proteinkinase-Phosphorylierungsstelle und eine Proteinkinase-C-Phosphorylierungsstelle (Langnaese et al. 2000). Wie diese Phosphorylierungsstellen die Funktion von VSIG4 beeinflussen, ist noch nicht geklärt (Small et al. 2016).

### **1.6.2 Expression**

Die mRNA des VSIG4-Gens wird in Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, DC, aber nicht in Lymphozyten, und in vielen Geweben exprimiert (Ahn et al. 2002; Vogt et al. 2006; Guo et al. 2010). Dazu zählt die Leber, wo die Expression am stärksten ist, aber auch die Milz, das Herz, die Lunge, die Nebenniere, die Synovialmembran, die Plazenta und das Gehirn (Walker 2002; Vogt et al. 2006; Kammula et al. 2012). Das VSIG4-Protein wurde jedoch ausschließlich auf in vitro zu Makrophagen differenzierten Monozyten, sowie auch auf Gewebsmakrophagen nachgewiesen (Helmy et al. 2006; Vogt et al. 2006; Gorgani et al. 2011). Zu letzteren gehören die Kupffer-Zellen, die 80-90 % der Gewebsmakrophagen des menschlichen Körpers ausmachen, die Makrophagen der Nebenniere, die Alveolarmakrophagen, die Hofbauer-Zellen, die Synovialmakrophagen, die Makrophagen in atherosklerotischen Plaques und die Makrophagen im Dickdarm (Helmy et al. 2006; Lee et al. 2006; Tanaka et al. 2012; van Lookeren Campagne und Verschoor 2018). Auf aktivierten Gewebsmakrophagen, neutrophilen Granulozyten und DC konnte das VSIG4-Protein nicht nachgewiesen werden (Helmy et al. 2006; Vogt et al. 2006; Guo et al. 2010). Die im Vergleich zur breiten Expression der VSIG4-mRNA eingeschränkte Expression des VSIG4-Proteins ist kein neues Muster in der B7-Familie, da auch die mRNA des PD-L1 in vielen Geweben gefunden wird, während das PD-L1-Protein vorwiegend auf den APZ exprimiert wird (Vogt et al. 2006).

### **1.6.3 Regulation der Expression von VSIG4**

Die Expression von VSIG4 in Makrophagen wird durch inflammatorische Substanzen auf der Transkriptionsebene reguliert (Gorgani et al. 2011). Arachidonsäure, eine mehrfach ungesättigte  $\omega$ 6-Fettsäure mit proinflammatorischer Wirkung, verminderte die Expression von VSIG4 in Makrophagen sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteinebene in vitro, während Dexamethason, eine steroidale antiinflammatorische Substanz, die Expression in diesen Zellen erhöhte (Gorgani et al. 2011). Die Wirkung dieser Substanzen auf die Expression von VSIG4 wird durch die Proteinkinase Ca und unabhängig von den Kinasen p38, ERK1/ERK2 und PI3 vermittelt (Gorgani et al. 2011; Ma et al. 2015).

Die Expression von VSIG4 in Makrophagen wird auch von zahlreichen Zytokinen beeinflusst. Die T<sub>H</sub>2-Zytokine IL-4 und IL-13 regulieren die VSIG4-Expression auf mRNA- und Proteinebene herunter (Munawara et al. 2017). IL-6 und IL-1 $\beta$ , die zu den Pyrogenen gehören, stimulieren die VSIG4-Expression auf mRNA- und Proteinebene, während TNF, obwohl ebenfalls ein Pyrogen, hemmend wirkt (Munawara et al. 2017). Das proinflammatorische IFN-



$\gamma$  inhibiert die VSIG4-Expression in vitro und in den Lebermakrophagen von Patienten mit chronischer Hepatitis-B auch in vivo (Guo et al. 2010; Munawara et al. 2017). Das immunsuppressive IL-10 reguliert die VSIG4-Expression hoch (Munawara et al. 2017). M-CSF, GM-CSF und LT- $\alpha$  stimulieren die VSIG4-Expression, TGF-B1 unterdrückt sie (Munawara et al. 2017). Die Regulation der Expression von VSIG4 durch Zytokine kann auch die Erklärung dafür sein, wieso die VSIG4<sup>+</sup> Makrophagen am Ort einer Entzündung vermindert sind (Vogt et al. 2006; Munawara et al. 2017). So kann VSIG4 ein wichtiger Mechanismus sein, durch den die Zytokine ihre regulatorische Wirkung auf die Abwehr von Infektion und Inflammation ausüben und Immuntherapien, wie die anti-TNF $\alpha$ -Therapie bei der rheumatoiden Arthritis, ihre antiinflammatorischen Effekte bewirken (Munawara et al. 2017) (siehe auch 1.6.5).

#### **1.6.4 VSIG4 und Phagozytose**

VSIG4 ist ein Komplementrezeptor und bindet die Faktoren C3b, iC3b und C3c des Komplementsystems (Helmy et al. 2006; Wiesmann et al. 2006). Dadurch vermittelt es die Phagozytose von C3b- und iC3b-opsonisierten Partikeln durch Makrophagen (Helmy et al. 2006). Seine Expression auf den Kupffer-Zellen ist notwendig für die effektive Phagozytose von intra- und extrazellulären Bakterien (Helmy et al. 2006), sowie auch von C3-opsonisierten Adenoviren (He et al. 2013). Die Kupffer-Zellen sind die erste Makrophagenpopulation, die im Kontakt mit den Bakterien und den Toxinen des Blutes aus dem Darm kommt (Bilzer et al. 2006). Aus diesem Grund spielt VSIG4 eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr in den frühen Stadien der Infektion (Helmy et al. 2006). Während die durch den Komplementrezeptor CR3 vermittelte Phagozytose eine systemische inflammatorische Reaktion mit einhergehender Toxizität induziert, fehlt diese generalisierte Immunreaktion bei der VSIG4-induzierten Phagozytose (van Lookeren Campagne et al. 2007).

VSIG4 ist auch von entscheidender Bedeutung für die Phagozytose durch andere Makrophagen. Die Herunter- bzw. Hochregulation seiner Expression in Makrophagen in vitro führte jeweils zu Verminderung bzw. Erhöhung der Phagozytose von Komplement-opsonisierten Pathogenen (Gorgani et al. 2011). In der Aszitesflüssigkeit von Patienten mit Leberzirrhose waren die CR1g<sup>high</sup> Makrophagen effektiver in der Phagozytose von E. coli-Bakterien (Irvine et al. 2016). Außerdem waren sie mit einer besseren Leberfunktion und einer besseren Prognose assoziiert (Irvine et al. 2016).

#### **1.6.5 Immunsuppressive und antiinflammatorische Wirkung von VSIG4**

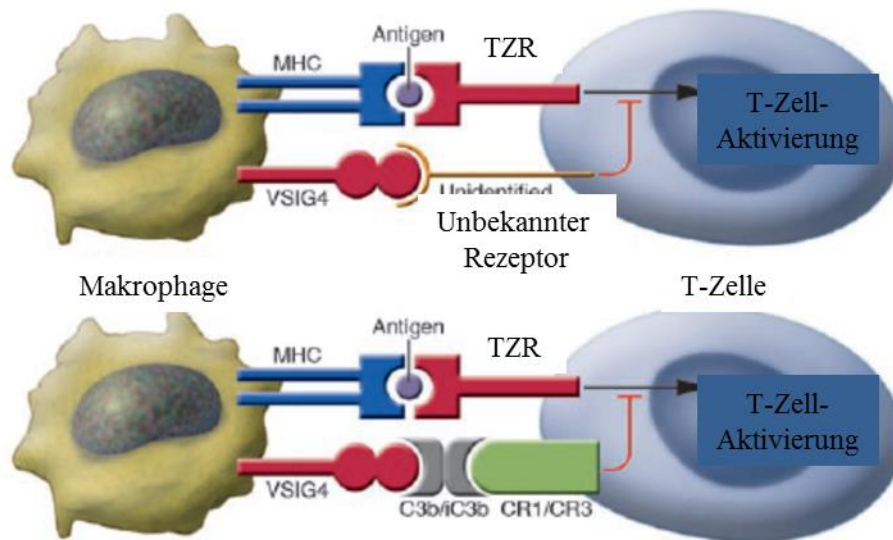
Neben seiner antiinfektiösen Wirkung weist VSIG4 gleichzeitig auch immunsuppressive und antiinflammatorische Funktionen auf. So unterscheidet es sich von seinen B7-Familie-Homologen, die entweder aktivierend oder inhibitorisch auf die Immunzellen wirken (Xu et al. 2015). VSIG4 inhibiert durch Hemmung der C3- und C5-Konvertasen den alternativen Aktivierungsweg des Komplementsystems (Katschke et al. 2007). Der Mannose-bindende Lektin- und klassische Aktivierungsweg des Komplementsystems werden nicht beeinflusst (Katschke et al. 2007). Dadurch ist VSIG4 eine potenzielle Therapiemöglichkeit für Erkrankungen, bei denen der alternative Aktivierungsweg des Komplementsystems eine

bedeutende Rolle spielt, wie die rheumatoide Arthritis, die Lupus-Nephritis, das Antiphospholipid-Syndrom und die altersbedingte Makuladegeneration (Thurman und Holers 2006; Katschke et al. 2007).

Außerdem korreliert bei einigen inflammatorischen Erkrankungen die VSIG4-Expression mit der Aktivität der entzündlichen Reaktion (Small et al. 2016). In Patienten mit chronischer Hepatitis-B-Infektion war die VSIG4-Expression auf den Lebermakrophagen vermindert (Guo et al. 2010). Trotzdem wurde eine positive Korrelation zwischen der VSIG4-Expression und dem Hepatitis-B-Viruslast im Blut beobachtet (Guo et al. 2010). So kann VSIG4 ein möglicher Inhibitor der Immunabwehr gegen die Hepatitis-B-Infektion sein und so zur Entstehung der chronischen Erkrankung beitragen (Guo et al. 2010). In einem Mausmodell von renaler Inflammation zeigten die VSIG4<sup>+/+</sup> Mäusen eine verminderte renale Infiltration von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu VSIG4<sup>-/-</sup> Mäusen (Li et al. 2014). Bei Patienten mit Autoimmunhepatitis war die verminderte VSIG4-Expression mit einer stärkeren Leberschädigung assoziiert (Jung et al. 2012).

Weiterhin ist VSIG4 ein Inhibitor der Proliferation und der Aktivierung der T-Zellen (Vogt et al. 2006). VSIG4 inhibiert die T-Zell-Proliferation mindestens so stark wie PD-L1 und PD-L2 (Vogt et al. 2006). Der genaue Mechanismus dieser Hemmung bleibt unklar. Es wurden zwei Hypothesen aufgestellt. Die eine besagt, dass VSIG4 an einen bislang unbekanntem Rezeptor auf der T-Zell-Oberfläche bindet und dadurch ein negatives Signal induziert (Zang und Allison 2006). Der anderen Hypothese nach binden VSIG4 auf der Zelloberfläche von Makrophagen und CR1/CR3 auf der T-Zell-Oberfläche dieselben C3b- oder iC3b-Moleküle und so kommt es zur Hemmung der T-Zell-Aktivierung (Zang und Allison 2006) (siehe Abbildung 1.6.5). In diesem Zusammenhang, und da VSIG4 auf den aktivierten Gewebemakrophagen nicht exprimiert und auf DC und den Makrophagen in den lymphatischen Organen nur schwach exprimiert wird, kann es eine wichtige, immunregulatorische Rolle bei der Unterdrückung der T-Zell-Aktivierung in gesundem Gewebe spielen (Vogt et al. 2006). In der Leber spielt das auf den Kupffer-Zellen exprimierte VSIG4 eine wichtige Rolle bei der Induktion und Aufrechterhaltung von T-Zell-Toleranz (Jung et al. 2012). VSIG4 führte zur verminderten Produktion proinflammatorischer Zytokine und zum Zellzyklus-Arrest in der Phase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> durch Herunterregulation der G<sub>1</sub>-spezifischen Kinasen Cdk2, Cdk4, Cdk6 und Hochregulation von p27<sup>KIP1</sup> (Jung et al. 2012). Jedoch werden die T-Zellen nicht apoptotisch (Jung et al. 2012). VSIG4 spielt auch eine Rolle bei der Regulation der Antikörperproduktion. Das auf den Makrophagen exprimierte VSIG4 hemmt die Aktivierung und die Differenzierung der T-Helferzellen und dadurch auch den T-Zell-abhängigen Antikörperklassenwechsel (Jung et al. 2015).

Es gibt Hinweise, dass von DC exprimiertes VSIG4 ebenfalls eine antiinflammatorische und immunregulatorische Wirkung besitzt. Humane DC, die mit VSIG4-rekombinanten Adenoviren transduziert wurden, inhibierten in vitro die Proliferation von allogenen T-Zellen. Gleichzeitig nahm die Expression von Aktivierungsmarkern auf den T-Zellen und die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen ab. (Xu et al. 2010)



**Abbildung 1.6.5. Hypothesen zum VSIG4-Wirkungsmechanismus als T-Zell-Inhibitor.**

VSIG4 bindet an einen bislang unbekanntem Rezeptor auf der T-Zell-Oberfläche und reguliert dadurch die TZR-induzierten Signalkaskaden herunter. Eine andere Hypothese ist, dass VSIG4 auf den Makrophagen und CR1/CR3 auf den T-Zellen dieselben C3b-/iC3b-Moleküle binden. So entsteht ein Signal, das die T-Zellen inhibiert. (Angelehnt an: Zang und Allison 2006)

### 1.6.6 VSIG4 und maligne Erkrankungen

Die Immunantwort auf maligne Erkrankungen basiert zum größten Teil auf T-Lymphozyten, die spezifisch für Tumorantigene sind (Chen und Mellman 2017). VSIG4, aufgrund seiner inhibitorischen Wirkung auf die T-Zellen, kann somit zur Verhinderung der Immundestruktion von Tumoren beitragen.

Es gibt tatsächlich Hinweise, dass VSIG4 in der Pathogenese einiger Tumorarten eine Rolle spielt. Patientenproben von nichtkleinzelligem Lungenkarzinom wurden massiv von VSIG4<sup>+</sup> Makrophagen infiltriert. Das VSIG4-Protein wurde immunhistochemisch auf der Oberfläche und im Zytoplasma dieser Zellen, aber nicht im Zellkern nachgewiesen (Liao et al. 2014). In einem Mausmodell von Lungenkarzinom förderten die VSIG4<sup>+</sup> Makrophagen das Tumorwachstum (Liao et al. 2014). Weiterhin ist VSIG4 in einigen Tumoren hochreguliert und mit einer schlechteren Prognose assoziiert, wie bei den WHO-Grad-III- und -IV-Gliomen (Xu et al. 2015), beim multiplen Myelom (Roh et al. 2017), beim Ovarialkarzinom (Byun et al. 2017) und bei bestimmten Formen des Kolonkarzinoms (Menyhart et al. 2019). Bei Patienten mit Prostatakarzinom, die über 60 Jahre alt waren, war die VSIG4-Expression ebenfalls erhöht und korrelierte positiv mit höheren Raten von biochemischem Rezidiv (Bianchi-Frias et al. 2019).

Als ein weiterer Mechanismus, der die tumorwachstumsfördernde Funktion von VSIG4 erklären kann, gilt die Beobachtung einer gesteigerten Komplementsystemaktivierung in Tumoren und eine daraus folgende vermehrte Ablagerung von Komplementfaktoren wie C3b auf der Zellmembran von Tumorzellen. Diese Komplementfaktoren fördern die tumorassoziierte Angiogenese (Reis et al. 2018). Da VSIG4 in vielen Tumoren vermehrt exprimiert wird, kann es über die Bindung von C3b, iC3b und C3c zu einer vermehrten Ablagerung dieser

Komplementfaktoren auf den Tumorzellen beitragen und so die Neovaskularisation der Tumoren fördern (Xu et al. 2015).

Zudem ist die hohe Expression von VSIG4 für die effektive epithelial-mesenchymale Transition (EMT) von renalen Tubuluszellen, die in vitro durch Transfektion mit dem Gen für das *latent membrane protein 1* (LMP1) des Epstein-Barr-Virus induziert wurde, notwendig (Kim et al. 2017). Das vom Genom des Epstein-Barr-Virus kodierte LMP1 induziert EMT in Tumoren und anderen Erkrankungen (Kim et al. 2017). EMT fördert gleichzeitig die Tumormetastasierung und gilt als ein Programm von entscheidender Bedeutung für die Immunevasion von Tumoren (Mitra et al. 2015). So kann VSIG4 auch bei der EMT von Tumorzellen eine wichtige Rolle spielen und dadurch die Tumorprogression begünstigen.

Trotz der vielfältigen Mechanismen, über welche VSIG4 die Tumorentstehung und -progression begünstigen kann, gibt es auch Hinweise für gegensätzliche Aktivitäten, z.B. im hepatozellulären Karzinom (HCC). Die VSIG4-Expression im HCC ist herunterreguliert (Zhu et al. 2018). Zudem verbessert eine hohe VSIG4-Expression das Gesamtüberleben und das krankheitsfreie Intervall, aber ausschließlich bei den Hepatitis-B-positiven HCC-Patienten (Zhu et al. 2018). Die Prognose der anderen Patienten wird nicht beeinflusst (Zhu et al. 2018). Der Mechanismus, der dieser Wirkung von VSIG4 als potentieller Tumorsuppressor in Hepatitis-B-assoziiertem HCC unterliegt, bleibt unklar (Zhu et al. 2018).

## **1.7 Tumorummunologie**

### **1.7.1 Cancer Immunoediting**

In 1957 postulierten Macfarlane Burnet und Lewis Thomas die Theorie der Immunüberwachung von Tumoren, auf Englisch *cancer immunosurveillance* genannt (Dunn et al. 2002). Diese Theorie besagte, dass Tumorzellen aufgrund der Expression von Antigenen eine effektive Immunreaktion induzieren, die zur Regression des Tumors vor seiner klinischen Manifestation führen kann (Dunn et al. 2002). Die Hypothese von Burnet und Thomas wurde vor allem nach 1990 von mehreren Studien bestätigt, die zuerst in Mausmodellen und folgend in Krebspatienten zeigten, dass das Immunsystem in der Lage ist, Tumoren zu erkennen und zu zerstören (Dunn et al. 2002; Finn 2012). Die gegen den Tumor gerichteten Immunreaktionen basieren tatsächlich auf der Erkennung von Tumorantigenen (Finn 2012). Diese Antigene sind meistens, aber nicht immer, tumorspezifisch (Coulie et al. 2014). Die Tumorantigene werden von DC im Tumorgewebe aufgenommen oder gelangen durch die Lymphgefäße in die Lymphknoten, wo sie von den dort ansässigen DC aufgenommen werden (Palucka und Coussens 2016). Anschließend werden sie entweder im Tumorgewebe oder in den Lymphknoten auf MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Komplexen an naive T-Zellen präsentiert (Palucka und Coussens 2016). Die naiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen differenzieren sich unter geeigneter Ko- und Zytokinstimulation zu zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL), die die Tumorzellen angreifen und als die wichtigsten Antitumor-Effektorzellen gelten (Palucka und Coussens 2016). Die naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen differenzieren sich zu T<sub>H</sub>-Zellen oder zu FoxP3<sup>+</sup> Treg (Palucka und Coussens 2016).

Trotz der Immunüberwachung entwickeln sich klinisch manifeste Tumoren auch bei immunkompetenten Individuen, so dass maligne Erkrankungen eine der weltweit führenden Todesursachen sind. Die Erklärung dafür ist, dass die Tumorzellen dem Angriff des Immunsystems entkommen können. Zu diesem Zweck benutzen sie zwei unterschiedliche Strategien. Erstens können sie der Immunerkennung entgehen, beispielweise durch Herunterregulation ihrer MHC-Moleküle (Gonzalez et al. 2018). Dies kann durch die NK-Zellen teilweise kompensiert werden, die MHC-Klasse-I-negative Zellen zerstören und eine bekannte antitumorale Funktion aufweisen (Iannello et al. 2016). Zweitens induzieren die Tumorzellen durch unterschiedliche Mechanismen ein immunsuppressives Tumormilieu (Gonzalez et al. 2018). Ein solcher Mechanismus ist die Aktivierung von negativen immunregulatorischen Signalen, die von inhibitorischen Immuncheckpoints wie PD-1 vermittelt werden. Neoplastische Zellen in vielen Tumoren exprimieren PD-L1, das durch Bindung an PD-1 die Effektorfunktionen der T-Zellen inhibiert (Chen und Mellman 2017). Die PD-1/PD-L1 Achse ist von großer Bedeutung für die Hemmung einer effektiven Immunantwort gegen Tumoren (Chen und Mellman 2017). Ein weiterer Mechanismus, der zur Immunsuppression beiträgt, ist die Sekretion bestimmter Zytokine wie TGF $\beta$ , IL-4, -13, -8 und -10 von Zellen des Tumormikromilieus, die zur Rekrutierung von immunsuppressiven Treg und M2 Makrophagen führen (Palucka und Coussens 2016). Diese beiden Mechanismen zur Induktion eines immunsuppressiven Tumormilieus sind nicht tumorspezifisch, sondern sie sind auch entscheidend für die physiologische Herunterregulation der T-Zellen und Einschränkung ihrer zytotoxischen Wirkung bei Infektion und anhaltender Inflammation. So wurde es klar, dass die Tumoren in der Lage sind, physiologische Mechanismen der T-Zell-Suppression zu ihren Gunsten zu benutzen (Speiser et al. 2016).

Diese duale Interaktion zwischen Tumor und Immunsystem spiegelt sich im Begriff des *cancer immunoediting* wider. Das cancer immunoediting beschreibt die Wirkung des Immunsystems auf Tumoren, die nicht nur hemmend sondern auch fördernd für die Tumorentwicklung und -progression sein kann. Der Prozess von cancer immunoediting besteht aus 3 Phasen: *Elimination*, *Equilibrium* und *Escape*, die als die drei *E's* von cancer immunoediting bezeichnet werden. Während der Phase der Elimination, die das Konzept der Immunüberwachung umfasst, arbeiten das angeborene und das adaptive Immunsystem zusammen, um Tumorzellen zu erkennen und sie zu eliminieren bevor der Tumor klinisch nachweisbar wird. Haben Tumoren diese erste Phase überlebt, dann tritt die Equilibriumphase auf. In diesem dynamischen Prozess übt das Immunsystem Druck auf die Tumoren aus, so dass ihr Wachstum verlangsamt wird. Während die stark immunogenen malignen Zellen weiterhin eliminiert werden, führt dieser ständige Druck in Kombination mit der zunehmenden genetischen Instabilität der Tumorzellen zur Selektion von Tumorsubklonen mit geringer Immunogenität, die der Immunerkennung und -destruktion entgehen können. So handelt es sich dabei um eine Phase der darwinistischen Selektion, die die Immunogenität der Tumoren modifiziert und zu ihrem Immunescape führen kann. Es ist wahrscheinlich, dass das Equilibrium die Phase von cancer immunoediting ist, die am längsten, auch über mehrere Jahre, dauert. In der folgenden Phase von Escape wachsen die modifizierten Tumoren unkontrolliert und werden klinisch nachweisbar. (Dunn et al. 2002; O'Donnell et al. 2019)

Die Fähigkeit, der Immundestruktion zu entkommen, wurde als eine neue wichtige Eigenschaft der Tumoren (Englisch: *emerging hallmark of cancer*) beschrieben. Sie kann zusammen mit

den sechs etablierten wichtigsten Eigenschaften der Tumoren (Englisch: *hallmarks of cancer*) das Überleben, die Proliferation und Dissemination der Tumorzellen ermöglichen. (Hanahan und Weinberg 2011)

### **1.7.2 Das Tumormikromilieu**

Das Tumormikromilieu spielt eine zentrale Rolle bei der Tumorinitiation, -progression und -metastasierung. Es beinhaltet unterschiedliche Zelltypen, wie Endothelzellen, Fibroblasten und Immunzellen sowie auch extrazelluläre Komponente wie Zytokine und extrazelluläre Matrix, die die Tumorzellen umgeben. (Wu und Dai 2017)

Die Infiltration durch Immunzellen ist eine gemeinsame Eigenschaft der menschlichen Tumoren (Pagès et al. 2010). Während die Tumorprogression zu chronischer Inflammation führt, kann auch die Inflammation selbst die neoplastische Transformation von Zellen als Folge haben (Gonzalez et al. 2018). Beispielweise haben Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ein deutlich erhöhtes Risiko für kolorektales Karzinom, die Infektion mit humanen Papillomviren ist für eine große Zahl von malignen Erkrankungen verantwortlich. 16,1% aller Krebsfälle, die in 2008 diagnostiziert wurden, hatten Infektionen als Ursache (Martel et al. 2012). Die tumorassoziierte Inflammation trägt zur genetischen Instabilität von Tumorzellen bei, zur Induktion von Tumorzellproliferation und von anti-apoptotischen Signalwegen, sie führt zur Stimulierung von Angiogenese und schließlich zur Tumordissemination (Hanahan und Weinberg 2011). So gehört die Inflammation zu den Charakteristika der Tumoren, die die Ausbildung ihrer wichtigsten Eigenschaften ermöglichen (Hanahan und Weinberg 2011). Auf der anderen Seite ist ein hoher Anteil an tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) bei vielen soliden Tumoren mit einer besseren Prognose assoziiert (Barnes und Amir 2017), wie beispielweise bei kolorektalem Karzinom (Galon et al. 2006), bei Ovarialkarzinom (Hwang et al. 2012) und bei einigen Formen des Mammakarzinoms (Salgado et al. 2015). In den meisten Tumoren sind die Immuninfiltrate jedoch heterogen und beinhalten Zelltypen mit unterschiedlichen Funktionen, auch solchen die die Tumorprogression fördern (Barnes und Amir 2017; Gonzalez et al. 2018).

Die Makrophagen stellen die größte Population von Immunzellen in humanen Tumoren dar (Mantovani et al. 2013; Gonzalez et al. 2018). Die M1 Makrophagen haben eine antitumorale Wirkung. Während der Tumorinitiation weisen die tumor-assoziierten Makrophagen (TAM) oft eine M1-Polarisierung auf und spielen eine relevante Rolle in der Eliminierung von Tumorzellen (Shapouri-Moghaddam et al. 2018). Entwickelt sich der Tumor weiter, induziert das Tumormikromilieu eine M2-Polarisierung der TAM, die mit einer pro-tumorigenen Wirkung assoziiert ist (Shapouri-Moghaddam et al. 2018). Die TAM haben im Allgemeinen einen M2-Phänotyp (Biswas und Mantovani 2010). Sie fördern die Tumorprogression durch unterschiedliche Mechanismen, wie durch die Induktion der Tumorzellproliferation und der Angiogenese, sowie auch durch das Remodelling der extrazellulären Matrix mittels Expression von Matrix-Metalloproteasen (Mantovani et al. 2013). Zudem exprimieren sie wenig MHC-Klasse-II-Komplexe und verfügen über verminderte antitumorale Aktivität (Mantovani et al. 2013). Weiterhin können sie die antitumorale Immunität supprimieren, beispielweise durch Expression von PD-L1 (Kuang et al. 2009). Ein hoher Anteil an TAM ist bei vielen Tumoren

mit einer schlechteren Prognose und mit reduziertem Gesamtüberleben assoziiert (Zhang et al. 2012).

Die T-Lymphozyten sind die zweitgrößte Population von Immunzellen in humanen Tumoren (Gonzalez et al. 2018). Während die CD8<sup>+</sup> T-Zellen und die T<sub>H</sub>1-Zellen als Antitumor-Zellen gelten, sind die Treg und die T<sub>H</sub>2-Zellen primär tumorfördernd (Quail und Joyce 2013).

Eine weitere wichtige Population von Immunzellen im Tumormikromilieu sind die DC. Tumordinfiltration von reifen DC führt zur Induktion einer antitumoralen Immunreaktion (Tran Janco et al. 2015). Die Tumorzellen und das Tumormikromilieu benutzen jedoch unterschiedliche Strategien, um die normale Funktion der tumorinfiltrierenden DC (TIDC) zu inhibieren (Tran Janco et al. 2015). Beispielweise induzieren sie die Expression von PD-1 auf den TIDC, was die Sekretion von immunstimulatorischen Zytokinen und die Expression von kostimulatorischen Molekülen auf den TIDC vermindert (Krempski et al. 2011). Zudem kann das Tumormikromilieu durch die Sekretion von Zytokinen die Reifung der DC inhibieren (Michielsen et al. 2011). So zeigen die TIDC häufig einen unreifen Phänotyp bzw. sie sind „paralysiert“ (Tran Janco et al. 2015). Sie neigen zu einer eingeschränkten Fähigkeit, Antigene zu präsentieren (Stoitzner et al. 2008). Weiterhin hemmen die unreifen oder paralysierten TIDC die Effektorzellen der angeborenen und der adaptiven Immunantwort durch eine Vielfalt von Mechanismen, wie durch Signale der PD-1/PD-L1-Achse (Curiel et al. 2003) oder auch indirekt durch die Induktion von Treg (Dumitriu et al. 2009; Conrad et al. 2012). Jedoch ist die komplexe Rolle der TIDC bei der Tumorprogression im Vergleich zu anderen Immunzellen des Tumormikromilieus deutlich weniger erforscht (Gonzalez et al. 2018).

Eine weitere Zellpopulation im Tumormikromilieu, die tumorfördernd wirkt, sind die myeloiden Suppressorzellen. Die myeloiden Suppressorzellen sind immunsuppressive Progenitorzellen von DC, Makrophagen und Granulozyten. In Tumoren besteht ihre Hauptfunktion darin, die Immunüberwachung durch Beeinträchtigung der T-Zell-Aktivierung, der Antigenpräsentation und der Polarisierung von Immunzellen zu behindern. (Quail und Joyce 2013)

Aber nicht nur die Immunzellen können die Aktivität der T-Zellen im Tumormikromilieu inhibieren. Auch die Tumervaskulatur selbst stellt eine wichtige Barriere für die T-Zellen dar, die als tumor-endotheliale Barriere bezeichnet wird (Lanitis et al. 2015). Erstens können die Endothelzellen in Tumoren die Expression von Adhäsionsmolekülen herunterregulieren, die notwendig sind für die Extravasation von Leukozyten (Lanitis et al. 2015). So sind die T-Zellen gar nicht in der Lage, das Tumorbett zu erreichen. Gleichzeitig begünstigen die Endothelzellen die Akkumulation von Treg in den Tumoren (Shetty et al. 2011). Zudem können sie die T-Lymphozyten inhibieren mittels Expression von PD-L1 und PD-L2 (Rodig et al. 2003) oder durch Sekretion von Molekülen wie IL-6 oder IL-10 (Mulligan und Young 2010) oder sie können ihren Zelltod durch die Expression von FasL induzieren (Motz et al. 2014).

## 1.8 Das humane Nierenzellkarzinom

### 1.8.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das humane Nierenzellkarzinom (Englisch: *renal cell carcinoma/RCC*) ist eine der häufigsten Krebserkrankungen. Es macht ca. 3% aller nicht-hämatopoetischen soliden Krebserkrankungen und 90% aller malignen Erkrankungen der Niere aus. Seine Inzidenz ist in der westlichen Welt am höchsten und zeigt in den letzten zwei Jahrzehnten sowohl weltweit als auch in Europa einen jährlichen Anstieg von 2%. Trotzdem hat sich die Mortalität vom Nierenzellkarzinom seit 1990 in vielen Ländern, einschließlich Deutschland, vermindert. So gab es in Europa in 2018 ca. 99200 neue RCC-Fälle und ca. 39100 RCC-Todesfälle. Männer erkranken häufiger als Frauen (1,5:1), während der Häufigkeitsgipfel zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr liegt. (Ljungberg et al. 2019)

Rauchen, Adipositas und arterielle Hypertonie gelten als Risikofaktoren für das Nierenzellkarzinom (Tahbaz et al. 2018). Jedoch weisen die meisten Patienten keine identifizierbaren Risikofaktoren auf und die Mechanismen, durch die die Risikofaktoren zur Pathogenese der Erkrankung beitragen, bleiben unklar (Rini et al. 2009).

In 2-3% der Fälle ist das Nierenzellkarzinom hereditär (Rini et al. 2009). Es gibt viele autosomal dominante Syndrome, die die Entwicklung von Nierenzellkarzinom begünstigen (Rini et al. 2009). Erwähnenswert ist das von-Hippel-Lindau-Syndrom (VHL-Syndrom), bei dem beide Allele des VHL-Tumorsuppressorgens defekt sind (Rini et al. 2009). Der Verlust des VHL-Tumorsuppressors führt zur Stabilisierung des Hypoxie-induzierten Faktors (HIF), der dann als Transkriptionsfaktor Gene aktiviert, die an der Vermittlung der Zellreaktionen auf Hypoxie teilnehmen (Jonasch et al. 2014). So werden Gene aktiviert, die die Angiogenese durch hochregulierte VEGF-Expression und die Zellmigration fördern (Jonasch et al. 2014).

### 1.8.2 Klassifikation

Das vom Tubulusepithel ausgehendes Nierenzellkarzinom wird inzwischen nicht als eine einheitliche Erkrankung betrachtet, sondern es beinhaltet viele unterschiedliche Tumortypen, die von verschiedenen Teilen der Nephrone ausgehen und über unterschiedliche genetische, histologische und zum Teil klinische Eigenschaften verfügen (Rini et al. 2009). Das klarzellige Nierenzellkarzinom (ccRCC) ist die häufigste (80-90%) Form (Ljungberg et al. 2019). Bei 60-90% der Patienten mit sporadischem klarzelligem Nierenzellkarzinom wird eine VHL-Mutation oder -Verlust identifiziert (Jonasch et al. 2014). Weitere Formen sind das papilläre Nierenzellkarzinom (pRCC: 10-15%), das in Typ 1 und Typ 2 unterteilt wird, und das chromophobe Nierenzellkarzinom (4-5%) (Ljungberg et al. 2019). Im Vergleich zum papillären und chromophoben Nierenzellkarzinom ist das klarzellige Nierenzellkarzinom aggressiver und zeigt insgesamt eine schlechtere Prognose (Volpe und Patard 2010). Ca. 10% der Tumoren der Niere sind keine Nierenzellkarzinome (Ljungberg et al. 2019). Dabei handelt es sich um seltene und heterogene Tumorerkrankungen, wie beispielweise das renale medulläre Karzinom und das Ductus-Bellini-Karzinom (Ljungberg et al. 2019).



Zur klinischen Stadieneinteilung der Nierenzellkarzinome wird die TNM-Klassifikation (8. Version, 2017) benutzt. Das TNM-Stadium und der histologische Grad stellen wichtige prognostische Faktoren des Nierenzellkarzinoms dar (Volpe und Patard 2010; Ljungberg et al. 2019). Die TNM-Klassifikation, die Stadieneinteilung und das histopathologische Grading des Nierenzellkarzinoms sind in der Tabelle 1.8.1 aufgeführt. Für die pathologische Klassifikation (pTNM) des Nierenzellkarzinoms entsprechen die pT- und pN-Kategorien den T- und N-Kategorien (Gospodarowicz und Mason 2017). pM0 und pMX sind keine anwendbaren Kategorien (Brierley et al. 2017).

**Tabelle 1.8.1 TNM-Klassifikation des Nierenzellkarzinoms nach den Richtlinien der *Union for International Cancer Control (UICC)* (Brierley et al. 2017; Gospodarowicz und Mason 2017).**

<b>T: Primärtumor</b>	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
T1	Tumor 7 cm oder weniger in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere
T1a	Tumor 4 cm oder weniger in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere
T1b	Tumor mehr als 4 cm, aber nicht mehr als 7 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere
T2	Tumor mehr als 7 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere
T2a	Tumor mehr als 7 cm, aber nicht mehr als 10 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere
T2b	Tumor mehr als 10 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere
T3	Tumor breitet sich in größere Venen aus oder infiltriert direkt perirenale Gewebe, jedoch nicht in ipsilaterale Nebenniere und nicht über die Gerota-Faszie hinaus
T3a	Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in die Nierenvene oder ihre segmentalen Äste oder Tumor infiltriert das Nierenbeckenkelchsystem oder Tumor infiltriert das perirenale und/oder peripelvine Fettgewebe, aber nicht über die Gerota-Faszie hinaus
T3b	Tumor mit Ausbreitung in die Vena cava unterhalb des Zwerchfells
T3c	Tumor mit Ausbreitung in die Vena cava oberhalb des Zwerchfells oder mit Infiltration der Wand der Vena cava
T4	Tumor infiltriert über die Gerota-Faszie hinaus (eingeschlossen die kontinuierliche Ausbreitung in die ipsilaterale Nebenniere)
<b>N: Regionäre Lymphknoten (hilär, abdominal paraaortal und parakaval)</b>	
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase(n) in regionärem Lymphknoten
<b>M: Fernmetastasen</b>	
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
pM1	Fernmetastasen mikroskopisch bestätigt
<b>Stadien</b>	
Stadium I	T1 N0 M0

Stadium II	T2	N0	M0
Stadium III	T3	N0	M0
	T1, T2, T3	N1	M0
Stadium IV	T4	Jedes N	M0
	Jedes T	Jedes N	M1
<b>Histopathologisches Grading</b>			
GX	Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden		
G1	Gut differenziert		
G2	Mäßig differenziert		
G3	Schlecht differenziert		
G4	Undifferenziert		

Das Fehlen oder Vorhandensein von Residualtumor (Resttumor) nach Behandlung wird durch die R-Klassifikation beschrieben (Brierley et al. 2017). Die R-Klassifikation spiegelt die Effekte der Therapie wider und beeinflusst das weitere therapeutische Vorgehen (Brierley et al. 2017). Die R-Klassifikation ist in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

**Tabelle 1.8.2 R-Klassifikation von Tumoren nach den Richtlinien der Union for International Cancer Control (UICC) (Brierley et al. 2017).**

<b>R-Klassifikation</b>	
RX	Vorhandensein von Residualtumor kann nicht beurteilt werden
R0	Kein Residualtumor
R1	Mikroskopischer Residualtumor
R2	Makroskopischer Residualtumor

### 1.8.3 Klinik und Diagnostik

Die Nierenzellkarzinome bleiben bei vielen Patienten bis zu fortgeschrittenen Stadien asymptomatisch (Ljungberg et al. 2019). Die klassische klinische Trias bestehend aus Flankenschmerzen, Makrohämaturie und palpablem Oberbauchtumor ist heutzutage selten und mit fortgeschrittener Erkrankung sowie auch mit schlechter Prognose assoziiert (Ljungberg et al. 2019). Bei ca. 30% der symptomatischen Patienten treten paraneoplastische Syndrome auf (Ljungberg et al. 2019). Beispiele dafür sind Hyperkalzämie durch die Produktion von Parathormon-ähnlichen Peptiden und Erythrozytose durch die Produktion von Erythropoetin (Rini et al. 2009). Die bunte klinische Manifestation der paraneoplastischen Syndrome hat zur Charakterisierung des Nierenzellkarzinoms als „Tumor des Internisten“ beigetragen (Rini et al. 2009). Bei Metastasen können Symptome wie Knochenschmerzen oder Verschlechterung des Allgemeinzustandes auftreten (Ljungberg et al. 2019).

Mehr als 60% der Nierenzellkarzinome fallen zuerst als Zufallsbefunde im Rahmen von Bildgebung des Abdomens, wie Ultraschall oder CT, auf (Ljungberg et al. 2019). Diese bildgebenden Verfahren dienen zusammen mit MRT der weiteren Charakterisierung von renalen Raumforderungen (Ljungberg et al. 2019). Nierenbiopsien erlauben eine effektivere Planung der Behandlung von tumorsuspekten renalen Raumforderungen und werden deswegen zunehmend benutzt (Ljungberg et al. 2019). Die frühere Annahme, dass sie zur Tumorzellverschleppung führen können, wird heute nicht akzeptiert (Volpe et al. 2012).

## 1.8.4 Behandlung

Die Behandlung des Nierenzellkarzinoms hat sich in den letzten Jahrzehnten enorm geändert. Fortschritte in der chirurgischen und interventionellen Behandlung des Primärtumors und die Einführung neuer medikamentöser Therapien, die auf einem besseren Verständnis der molekularen und genetischen Pathogenese der Erkrankung basieren, haben die Prognose des Nierenzellkarzinoms deutlich verbessert. (Jonasch et al. 2014)

Ungefähr 75% der Patienten mit Nierenzellkarzinom haben zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eine lokal begrenzte Erkrankung (Jonasch et al. 2014). Für diese Patienten stellt die chirurgische Entfernung des Tumors eine kurative Therapie dar (Ljungberg et al. 2019). Bei den Stadien T1a und T1b wird die organerhaltende partielle Nierenteilresektion empfohlen, während ab dem Stadium T2 die radikale Nephrektomie empfohlen wird (Ljungberg et al. 2019). Beide Operationsverfahren können offen, laparoskopisch oder Roboter-assistiert durchgeführt werden, aber nur bei der radikalen Nephrektomie wird ein laparoskopisches Vorgehen, falls möglich, empfohlen (Ljungberg et al. 2019). Eine Lymphadenektomie ist bei Patienten mit klinisch vergrößerten Lymphknoten indiziert (Ljungberg et al. 2019). Bei älteren, multimorbiden Patienten mit großem Operationsrisiko sind ablativ Verfahren, wie die Radiofrequenzablation und die Kryotherapie, oder auch eine aktive Überwachung (Englisch: *active surveillance*) bei kleinen Tumoren möglich (Ljungberg et al. 2019).

Ein Drittel der Patienten entwickeln nach initialer Behandlung eines lokalisierten Tumors ein metastatisches Nierenzellkarzinom (Merza und Bilusic 2017). 25% der Patienten leiden bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung unter einer fortgeschrittenen, nicht mehr kurativ behandelbaren Erkrankung (Merza und Bilusic 2017). Die meisten Patienten mit metastatischem Nierenzellkarzinom benötigen eine systemische Therapie (Ljungberg et al. 2019). Jedoch sind die zytotoxische Chemotherapie und die Bestrahlung nicht effektiv bei Nierenzellkarzinom (Curtis et al. 2016). Deswegen werden andere Therapieansätze benutzt. Bis 2006 waren Immuntherapien mit Aldesleukin (Interleukin-2) und Interferon- $\alpha$ , häufig in Kombination mit zytoreduktiver Nephrektomie (radikale Nephrektomie bei metastatischem Nierenzellkarzinom), die Behandlung der ersten Wahl (Rini et al. 2009; Ljungberg et al. 2019). Die Behandlung mit Interleukin-2 war sehr toxisch (4% behandlungsassoziierte Mortalität), sie führte aber zu einer dauerhaften, kompletten Remission bei 7-8% der Patienten (Rini et al. 2009; Merza und Bilusic 2017). In 2006 wurden die zielgerichteten Therapeutika eingeführt und so kam die sogenannte Zytokinära zum Ende. In Europa zugelassene zielgerichtete Therapeutika zur Behandlung des metastatischen Nierenzellkarzinoms sind die Tyrosinkinase-Inhibitoren Sunitinib, Pazopanib, Axitinib, Tivozanib, die Multikinaseinhibitoren Sorafenib und Cabozantinib, die mTOR-Inhibitoren Everolimus und Temsirolimus sowie auch der VEGF-Inhibitor Bevacizumab in Kombination mit Interferon- $\alpha$  (Ljungberg et al. 2019). Die zielgerichtete Therapie hat das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben der Patienten verbessert, sie führt aber in der Regel zu keiner dauerhaften kompletten Remission (Curtis et al. 2016). Deswegen wird es versucht, neue Therapien für das metastatische Nierenzellkarzinom zu entwickeln. Der CTLA-4-Inhibitor Ipilimumab und der PD-1-Inhibitor Nivolumab werden in Europa sogar als Erstlinientherapie für Patienten mit ungünstigen prognostischen Faktoren eingesetzt (Ljungberg et al. 2019). Andere Therapiekonzepte, die in

Studien getestet werden, beinhalten die Kombination von Medikamenten unterschiedlicher Klassen, wie beispielweise Immuncheckpointinhibitoren plus VEGF-Inhibitoren, oder Impfungen mit DC (AGS-003) und synthetischen Tumorantigenen (IMA901) zur Induktion einer antitumoralen Immunantwort (Bedke et al. 2018). Die Rolle der chirurgischen Behandlung und der optimale Zeitpunkt ihrer Durchführung in der neuen Ära der Immuntherapie bleiben unklar (Ljungberg et al. 2019). Sowohl zytoreduktive Nephrektomie als auch chirurgische Metastasenentfernung können für bestimmte Patienten hilfreich sein (Ljungberg et al. 2019).

Während die vorhergenannten systemischen Therapien für das metastatische klarzellige Nierenzellkarzinom effektiv sind, sind die metastatischen nichtklarzelligen Nierenzellkarzinome meistens resistent dagegen. Da aber bisher nur wenige klinische Studien die Wirkung von systemischen Therapien auf die metastatischen nichtklarzelligen Nierenzellkarzinome erforscht haben, werden für ihre Behandlung in der Regel die gleichen Substanzen wie bei dem klarzelligen Nierenzellkarzinom benutzt. (Barata und Rini 2017)

### **1.8.5 Immuzellinfiltrat in dem klarzelligen Nierenzellkarzinom**

Das Nierenzellkarzinom ist ein immunogener Tumor. Dafür spricht die hohe Rate von Spontanremissionen im Vergleich zu anderen Tumoren, die auch bei Patienten mit Metastasen auftreten können (Merza und Bilusic 2017). Außerdem zeigt das Nierenzellkarzinom ein gutes Ansprechen auf Immuntherapie. Diese Eigenschaften zusammen mit der ausgeprägten Infiltration des Nierenzellkarzinoms von Immunzellen weisen darauf hin, dass das Nierenzellkarzinom ein immunsensitiver Tumor ist (Geissler et al. 2015). Trotzdem werden die Nierenzellkarzinome vom Immunsystem generell nicht abgestoßen. Zudem sind die Ergebnisse der Studien über die Rolle des Immuzellinfiltrates im klarzelligen Nierenzellkarzinom zum Teil widersprüchlich (Barnes und Amir 2017). Es wurde jedoch in vielen Studien gezeigt, dass tumorinfiltrierende Immunzellen im klarzelligen Nierenzellkarzinom mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind. Das gilt für PD-1<sup>+</sup> Lymphozyten (Kang et al. 2013), für Treg (Liotta et al. 2011; Kang et al. 2013), für CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Bromwich et al. 2003), für CD13<sup>+</sup> und CD69<sup>+</sup> T-Zellen (Geissler et al. 2015), aber auch für Immuzellinfiltrate unabhängig von dem spezifischen Zelltyp (Webster et al. 2006).

Das Immuzellinfiltrat in klarzelligen Nierenzellkarzinomen besteht aus verschiedenen Zellpopulationen wie T-Lymphozyten, NK-Zellen, Makrophagen und DC. Die meisten dieser DC sind CD209<sup>+</sup>, nämlich interstitielle unreife DC, und exprimieren gleichzeitig den Makrophagenmarker CD14 (Figel et al. 2011). So stellen die CD209<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> DC einen Subtyp von DC dar, der im Nierenzellkarzinom angereichert ist, und deswegen heißen sie ercDC (Englisch: *enriched-in-renal-carcinoma dendritic cells*). Der ercDC-Phänotyp konnte in vitro durch die von Tumoren sezernierenden Faktoren IL-8, IL-6 und VEGF, die auch im Nierenzellkarzinom stark exprimiert sind, induziert werden. Die ercDC exprimieren weitere DC-Marker wie MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Komplexe und können Antigene in vitro effektiv kreuzpräsentieren. In situ stehen die ercDC häufig im Kontakt mit T-Zellen. Trotzdem konnte im Gegensatz zu den myeloiden Suppressorzellen oder den TAM eine direkte Hemmung der T-Zellen bisher nicht nachgewiesen werden. Die ercDC induzieren in vitro keine Hemmung der zytotoxischen Wirkung oder der Zytokinsekretion der T-Zellen und

induzieren weder in vivo noch in vitro eine CD3 $\epsilon$ - oder CD3 $\zeta$ -Herunterregulation, T-Zell-Apoptose, oder eine Treg-Differenzierung (Figel et al. 2011). Jedoch zeigen sie andere Eigenschaften, die zum Immunescape des Nierenzellkarzinoms beitragen können. Sie produzieren das Enzym Matrix-Metalloprotease 9 (MMP-9). Weiterhin benutzen sie in vitro die Interaktion (*Crosstalk*) mit T-Zellen, um Milieuveränderungen zu induzieren, die die Tumorzellproliferation fördern, z.B. durch vermehrte Sekretion von TNF- $\alpha$ , bzw. die Rekrutierung von antitumoralen T<sub>H</sub>1-Lymphozyten hemmen durch reduzierte Sekretion der Chemokinen CXCL10 und CCL5. Im Nierenzellkarzinom ist tatsächlich eine hohe Anzahl an tumorinfiltrierenden CD209<sup>+</sup> DC mit einem fortgeschrittenen TNM-Stadium mit schlechter Prognose und mit einer verminderten Tumorerinfiltration durch T<sub>H</sub>1-Lymphozyten assoziiert (Figel et al. 2011; Noessner et al. 2012).

Die CD8<sup>+</sup> TIL im Nierenzellkarzinom reagieren nicht auf CD3-Stimulation und zeigen verminderte zytotoxische Aktivität und keine Sekretion von IFN- $\gamma$  (Prinz et al. 2012). Verantwortlich dafür sind Defizite in der Aktivierung von Signalmolekülen distal des TZR, die durch das Tumormikromilieu verursacht sind, weil sie in CD8<sup>+</sup> T-Zellen außerhalb des Tumors nicht vorkommen. Vermindert ist die Aktivierung der Signalmoleküle ERK, JNK und AKT. Diese molekulare Signatur ist ähnlich mit der von anergen CD4<sup>+</sup> T-Zellen, sie wurde aber nicht in „erschöpften“ (Englisch: *exhausted*) CD8<sup>+</sup> T-Zellen in chronischen viralen Infektionen beobachtet, obwohl die letzteren den CD8<sup>+</sup> TIL funktionell ähneln (Noessner et al. 2012; Prinz et al. 2012). Zusätzlich zu einer persistierenden Antigenpräsentation können auch andere Mechanismen zur anergen Signatur von TIL beitragen. Beispielsweise kann die verminderte Aktivierung von AKT zur verminderten Inaktivierung von FOXO1 führen, welches der Transkriptionsfaktor von p27<sup>KIP1</sup> ist. Dies könnte eine Erklärung für die beobachteten hohen Mengen von p27<sup>KIP1</sup> in den CD8<sup>+</sup> TIL in Nierenzellkarzinom sein. Zudem wird in den CD8<sup>+</sup> TIL die Diacylglycerol-Kinase  $\alpha$  (DGK- $\alpha$ ) verstärkt exprimiert. Die Diacylglycerol-Kinasen sind physiologische Inhibitoren der TZR-Signaltransduktion (Prinz et al. 2012). Tatsächlich korreliert die hochregulierte DGK- $\alpha$ -Expression in den CD8<sup>+</sup> TIL in Nierenzellkarzinom mit einer verminderten ERK-Aktivierung, während DGK- $\alpha$ -Inhibitoren zu stärker ERK-Aktivierung und besser zytotoxischer Aktivität der CD8<sup>+</sup> TIL führen (Prinz et al. 2012). Trotzdem ist die Anwendung von DGK-Inhibitoren in der Behandlung von Nierenzellkarzinom, zum Beispiel in Kombination mit Immuncheckpointinhibitoren, immer noch ein theoretisches Konzept (Noessner 2017). IL-2, welches anerge CD4<sup>+</sup> T-Zellen reaktivieren kann, vermindert die DGK- $\alpha$ -Expression in CD8<sup>+</sup> TIL in vitro, es führt zu einer verstärkten Aktivierung von AKT und ERK, zu vermindertem Niveau vom p27<sup>KIP1</sup> sowie auch zu erhöhtem Niveau von Zyklin E1, was entscheidend für die Reaktivierung von anergen T-Zellen ist. Die mit IL-2 behandelten CD8<sup>+</sup> TIL zeigten ebenfalls eine verstärkte zytotoxische Reaktion bei CD3-Stimulation. Dies kann einer der Wirkmechanismen von IL-2 in der Behandlung von Nierenzellkarzinom sein (Noessner et al. 2012; Prinz et al. 2012).

So wurde gezeigt, dass das Tumormikromilieu Änderungen in der Differenzierung von DC und Anergie von CD8<sup>+</sup> T-Zellen induziert, die Immunescape-Mechanismen des klarzelligen Nierenzellkarzinoms darstellen (Noessner et al. 2012). Aus diesem Grund sind sie auch mögliche Ziele von pharmakologischen Interventionen, die die antitumorale Immunreaktion fördern und die Effektivität der Immuntherapie in RCC optimieren können.

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Das Nierenzellkarzinom ist ein immunogener Tumor, der stark von Immunzellen infiltriert wird. Trotzdem können die tumorinfiltrierenden Immunzellen in den allermeisten Fällen die Tumorprogression nicht verhindern. Jedoch zeigt das gute Ansprechen des Nierenzellkarzinoms auf Immuntherapien, dass die Modulation des Immunsystems zur Induktion einer effektiven antitumoralen Immunantwort ein vielversprechender Behandlungsansatz für das Nierenzellkarzinom ist.

Bisherige Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass die im klarzelligen Nierenzellkarzinom angereicherten CD209<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> ercDC zum Immunescape der Erkrankung beitragen (Figel et al. 2011; Noessner et al. 2012). In situ stehen die ercDC häufig im Kontakt mit T-Zellen (Figel et al. 2011). Weiterhin zeigten Transkriptionsanalysen, dass ercDC VSIG4 auf mRNA-Ebene stark exprimieren (Brech 2015). VSIG4 kann die T-Zell-Antwort und die T-Zell-Proliferation über Zellzyklusarrest inhibieren (Vogt et al. 2006; Jung et al. 2012). So entstand die erste Hypothese dieser Arbeit, dass ercDC über VSIG4 ihre Immunescape-Effekte ausführen. In diesem Fall könnte VSIG4 ein potenzielles Ziel neuer Therapien für das Nierenzellkarzinom sein. Jedoch wurde bisher nicht erforscht, ob das VSIG4-Protein im Nierenzellkarzinom exprimiert wird. In dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob VSIG4 auf Proteinebene im klarzelligen Nierenzellkarzinom nachzuweisen ist und auf welchen Zellen es exprimiert wird. Dazu wurden Nierenzellkarzinomgewebeschnitte mittels Immunfluoreszenzfärbungen untersucht mit der Fragestellung, ob ercDC das VSIG4-Protein exprimieren. Parallel zur Analyse des VSIG4-Proteins wurde mittels Immunfluoreszenz die Expression von FOXO1 in den T-Zellen im klarzelligen Nierenzellkarzinom untersucht. FOXO1 ist der Transkriptionsfaktor des Zellzyklus-Arrest-assoziierten Proteins p27<sup>KIP1</sup> (Dijkers et al. 2000; Medema et al. 2000), das in den nierenzellkarzinominfiltrierenden T-Zellen stark exprimiert wird (Prinz et al. 2012). Bei den Analysen lag der Schwerpunkt besonders auf den T-Zellen, die im Kontakt mit VSIG4<sup>+</sup> Zellen standen, mit der Fragestellung, ob dieser Kontakt die FOXO1-Expression in den T-Zellen induziert und so zum Zellzyklus-Arrest der T-Zellen führt. Zudem wurde in bisherigen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass die T-Zellen im Nierenzellkarzinom in ihrer Mehrzahl extravasiiert sind und dass die extravasiierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Gegensatz zu den intravaskulären CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine verminderte Expression des zytotoxischen Proteins Perforin aufweisen (Masouris 2016). So wurde die zweite Hypothese dieser Arbeit formuliert, dass die verminderte zytotoxische Ausstattung der extravasiierten T-Zellen auf die Expression von FOXO1 in diesen Zellen zurückgeführt werden könnte, während die intravaskulären T-Zellen durch fehlende FOXO1-Expression und folgend durch bessere zytotoxische Ausstattung charakterisiert wären. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde die FOXO1-Expression in den T-Zellen hinsichtlich der Lokalisation der Zellen in Bezug auf das Gefäßsystem in situ mittels Immunfluoreszenz analysiert. In allen Färbungen wurden als Vergleich zu den Tumoren tumorfreie Gewebe aus der gleichen tumorbefallenen Niere, sowie Gewebe aus einer Niere mit ausgeprägter chronisch-vernarbender interstitieller Entzündung des Nierenparenchyms untersucht, um tumorbedingte Unterschiede zu identifizieren.

## 3 Material

### 3.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Name	Hersteller
Deckgläschen	IDL, Nidderau
Einmalplastikpipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml und 25 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Eppendorfcentrifuge (Galaxy) Ministar	Eppendorf, Hamburg
Laserscanning System TCS SP5	Leica Microsystems, Wetzlar
Leica Jung CM3000 Kryostat	Leica Biosystems, Nussloch
Magnetrührer IKA Color	Hytrel
Messbecher (100 ml, 800 ml)	Duran, Mainz
Milli-Q®-Reinwasserherstellungssystem	Merck Millipore, Billerica, USA
Nagellack	Rival de Loup, Berlin
Pipetten 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Eppendorf/Gilson
Prolong® Gold antifade mountant	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Reagenzröhrchen (15 ml, 50 ml)	BD, Heidelberg
Reaktionsgefäße (0,5/1,5/2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Schüttelgerät	Heidolph Instruments, Schwabach
Sterilbank, Laminar Flow	BDK, Sonnenbrühl-Genkingen
Superfrost® Plus Objektträger	Fisher Scientific, Schwerte
Vortexer	Heidolph Instruments, Schwabach

### 3.2 Chemikalien und fertige Lösungen

Name	Hersteller
1 N Salzsäure	Merck, Darmstadt
4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Aqua ad iniectabilia Braun	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Fixogum	Science Services, München
Immersionsöl Typ F	Leica Microsystems, Wetzlar
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt

Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)

### 3.3 Lösungen und Puffer

Name	Hersteller
Paraformaldehydlösung 2%	2% (w/v) PFA in PBS
Paraformaldehydlösung 4%	4% (w/v) PFA in PBS
Antikörperverdünnungslösung	1% BSA/0,3% Triton X-100 in PBS
Blockierungslösung	1% BSA/0,3% Triton X-100 in PBS
DAPI-Stocklösung	5 mg DAPI/ml in Aqua ad iniectabilia
DAPI-Gebrauchslösung	150 µg/ml DAPI (3 µl Stocklösung) 2x SSC-Puffer (10 ml) zu Aqua ad iniectabilia (90 ml)
20x SSC-Puffer	0,3 M Natriumcitrat 2x H <sub>2</sub> O (8,82 g) 3 M Natriumchlorid (17,83 g) zu Aqua ad iniectabilia (100 ml) → pH-Wert 7,0 (mit 1 N Salzsäure)

### 3.4 Antikörper für die Immunfluoreszenz

#### 3.4.1 Primäre Antikörper

Spezifität	Spezies/Isotyp	Klon	Hersteller	Verdünnung
CD209/DC-SIGN	Maus IgG2a	DC28	Santa Cruz Biotechnology	1:50
CD3ε	Maus IgG1	UCHT1	BD Biosciences	1:500
CD3ε	Ratte IgG1	CD3-12	AbD Serotec	1:100
CD31/PECAM-1	Maus IgG1	JC70A	Dako	1:300
CD45	Kaninchen IgG	EP322Y	Epitomics	1:400
FOXO1	Kaninchen IgG	C29H4	Cell Signaling Technology	1:70
VSIG4	Ziege IgG	polyklonal	R&D Systems	1:10



### 3.4.2 Sekundäre Antikörper

Spezifität	Spezies	Fluoreszenz	Hersteller	Verdünnung
Kaninchen	Ziege	AlexaFluor A488	Invitrogen	1:500
Kaninchen	Esel	Rhodamine Red-X	Jackson Immunoresearch	1:300
Maus IgG	Esel	AlexaFluor A647	Jackson Immunoresearch	1:100
Ratte IgG	Ziege	Rhodamine Red-X	Jackson Immunoresearch	1:100
Ziege	Esel	AlexaFluor A488	Invitrogen	1:500
Maus IgG	Ratte	Cy5	Jackson Immunoresearch	1:100

### 3.5 Software

Name	Hersteller
Citavi 6.3	Swiss Academic Software, Wädenswil, Schweiz
Graphpad Prism 8.3, Version für Windows	Graphpad Software, San Diego, USA
ImageJ	National Institutes of Health, Bethesda, USA
LAS AF Lite	Leica Microsystems, Wetzlar
Microsoft Office 2010	Microsoft, Redmond, USA

### 3.6 Patientenmaterial

Die in dieser Arbeit untersuchten Nierengewebe wurden von der Urologischen Klinik Dr. Castringius in Planegg zur Verfügung gestellt. Die Gewebeentnahme und -untersuchung erfolgte nach Aufklärung und Einwilligung der Patienten. Eine Unbedenklichkeitserklärung der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München lag vor. Bei den Nierengeweben handelte es sich um Nierenzellkarzinome vom klarzelligen Typ (T90, T105, T114, T118) aus onkologisch unbehandelten Patienten und um Gewebe aus einer Niere mit chronisch-vernarbender interstitieller Entzündung des Nierenparenchyms (G120). Von drei aus den insgesamt vier untersuchten tumorbefallenen Nieren (T105, T114, T118) wurde zusätzlich Gewebe erhalten, das von Pathologen als tumorfrei identifiziert wurde (NN105, NN114, NN118). Die Gewebe von den frisch operierten Patienten wurden nach Entnahme schockgefroren und bei -86°C aufbewahrt. Die Patientendaten und die histopathologischen Merkmale der Tumoren sind in der Tabelle 3.6.1 aufgeführt.

**Tabelle 3.6.1 Patientendaten und histopathologische Merkmale der Präparate**

<b>Patient-ID<sup>1</sup></b>	<b>Patient-ID<sup>1</sup> Tumorfrees Gewebe der tumortragenden Niere</b>	<b>TNM-Stadium, Histopathologisches Grading und R-Klassifikation<sup>2</sup></b>
T90	----	pT1a pNx G2 R0
T105	NN105	pT3a pNx G3 R0
T114	NN114	pT3c pN0 G2 R1
T118	NN118	Mind. pT3b pN0 G3 R1
G120	----	----

<sup>1</sup>Patienten-Identifikationsnummer. Dabei handelt es sich um Arbeitsgruppe-interne Kodierung.

<sup>2</sup>Klassifikation der Tumoren nach den Richtlinien der Union for International Cancer Control (UICC). Siehe auch Tabellen 1.8.1 und 1.8.2.

## **4 Methoden**

### **4.1. Immunfluoreszenz und konfokale Mikroskopie**

#### **4.1.1 Prinzip**

Die Immunfluoreszenz ist eine Analysemethode aus dem Bereich der Immunhistochemie. Bei der Immunfluoreszenz werden Strukturen mithilfe von Antikörpern markiert und durch Fluoreszenzfarbstoffe, die auch Fluorochrome genannt werden, mikroskopisch sichtbar gemacht. Die Immunfluoreszenztechnik kommt als direkte oder indirekte Immunfluoreszenz zum Einsatz. Bei der direkten Immunfluoreszenz ist der für die untersuchende Struktur spezifische Antikörper mit dem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Bei der indirekten Immunfluoreszenz, die in dieser Arbeit verwendet wurde, ist der Antikörper, der die untersuchende Struktur spezifisch erkennt, nicht mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. An diesen unmarkierten primären Antikörper bindet dann ein sekundärer Antikörper, der mit dem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist.

Die Bildaufnahme in dieser Arbeit erfolgte mit einem konfokalen Laserrastermikroskop (Laserscanning System TCS SP5 von Leica Microsystems, Wetzlar). Das Mikroskop verfügte über zwei Helium-Neon-Laser (543 nm bzw. 633 nm), einen Diodenlaser (405 nm) und einen Argon-Krypton-Laser (488 nm). Anhand dieser Ausstattung war es möglich Fluoreszenzsignale von bis zu vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen gleichzeitig aufzunehmen. Bei der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie wird bei jeder Messung nur eine optische Ebene abgebildet, während Fluoreszenzsignale aus anderen optischen Ebenen ausgeblendet werden. Die Abbildungen einzelner optischer Ebenen können anschließend überlagert werden und so entsteht ein räumliches Bild, was die Untersuchung der Kollokalisierung von Markern ermöglicht.

#### **4.1.2 Durchführung der Immunfluoreszenzfärbungen**

Kryokonservierte Nierengewebe wurden zu 5 µm dicken Gefrierschnitten mit einem Kryostat (Leica Jung CM3000 Kryostat von Leica biosystems, Nussloch) geschnitten, auf Superfrost® Plus Objektträgern aufgetragen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Die Gewebeschnitte wurden 10 Minuten lang mit 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Dann wurden sie mit Fixogum (Fettstift) umrandet. Dadurch blieben die später aufgetragenen Antikörperlösungen auf der Gewebeprobe und liefen nicht ab. Dann wurden die Proben mit 1% BSA/0,3% Triton X-100 in PBS 60 Minuten lang blockiert. Nach Absaugen der Blockierungslösung wurden die primären Antikörper (siehe Kapitel 3.4.1) in vier Kombinationen aufgebracht: 1) Ziege-anti-human VSIG4 und Maus-anti-human CD31 (IgG1); 2) Ziege-anti-human VSIG4, Kaninchen-anti-human FOXO1 und Maus-anti-human CD3ε (IgG1); 3) Kaninchen-anti-human FOXO1, Ratte-anti-human CD3ε (IgG1) und Maus-anti-human CD31 (IgG1); 4) Ziege-anti-human VSIG4, Maus-anti-human CD209/DC-SIGN (IgG2a) und Kaninchen-anti-human CD45. Nach 60-minütiger Inkubation

mit den primären Antikörpern wurden die Schnitte dreimal mit PBS gewaschen und im Anschluss 40 Minuten lang mit den sekundären Antikörpern inkubiert. Die sekundären Antikörper (siehe Kapitel 3.4.2) wurden in vier Kombinationen entsprechend den Kombinationen der primären Antikörper aufgebracht: 1) Esel-anti-Ziege AlexaFluor A488 und Ratte-anti-Maus-IgG Cy5; 2) Esel-anti-Ziege AlexaFluor A488, Esel-anti-Kaninchen Rhodamine Red-X und Esel-anti-Maus-IgG AlexaFluor A647; 3) Ziege-anti-Kaninchen AlexaFluor A488, Ziege-anti-Ratte-IgG Rhodamine Red-X und Esel-anti-Maus-IgG AlexaFluor A647; 4) Esel-anti-Ziege AlexaFluor A488, Esel-anti-Maus-IgG AlexaFluor A647 und Esel-anti-Kaninchen Rhodamine Red-X. Die Färbungskombinationen sind in der Tabelle 4.1.2 aufgeführt. Alle ausgewählten sekundären Antikörper zeigten keine oder minimale Kreuzreaktivität untereinander und mit den primären Antikörpern. Das gilt nach Herstellerangaben auch für die sekundären Antikörper anti-Ratte-IgG Rhodamine Red-X und anti-Maus-IgG AlexaFluor A647, die in der dritten Kombination benutzt wurden und wegen der Ähnlichkeit zwischen Ratte und Maus eine relevante Kreuzreaktivität zeigen könnten. Als Verdünnungslösung für die primären und die sekundären Antikörper wurde 1% BSA/0,3% Triton X-100 in PBS benutzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit für die sekundären Antikörper und nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Schnitte mit 2% PFA 10 Minuten lang fixiert und anschließend erneut dreimal mit PBS gewaschen. Dann wurden die Präparate in eine Küvette mit DAPI-Lösung zur Anfärbung der Zellkerne 2 Minuten lang gestellt und nach dreimaligem Waschen mit PBS mit dem Eindeckmittel Prolong<sup>®</sup> Gold eingedeckt, was dem Schutz der Fluoreszenzfarbstoffe vor Verblässung diente. Im Anschluss wurde ein Deckglas auf den Objektträgern aufgesetzt und die Präparate wurden mit Nagellack versiegelt. Sie wurden bis zu ihrer Auswertung am konfokalen Mikroskop im Dunkeln bei -20°C aufbewahrt.

**Tabelle 4.1.2 Färbungskombinationen für die Immunfluoreszenz**

<b>Primäre Antikörper</b>	<b>Sekundäre Antikörper</b>
VSIG4 Ziege-anti-human	Esel-anti-Ziege AlexaFluor A488
CD31 Maus-anti-human IgG1	Ratte-anti-Maus-IgG Cy5
VSIG4 Ziege-anti-human	Esel-anti-Ziege AlexaFluor A488
FOXO1 Kaninchen -anti-human	Esel-anti-Kaninchen Rhodamine Red-X
CD3ε Maus-anti-human IgG1	Esel-anti-Maus-IgG AlexaFluor A647
FOXO1 Kaninchen-anti-human	Ziege-anti-Kaninchen AlexaFluor A488
CD3ε Ratte-anti-human IgG1	Ziege-anti-Ratte-IgG Rhodamine Red-X
CD31 Maus-anti-human IgG1	Esel-anti-Maus-IgG AlexaFluor A647
VSIG4 Ziege-anti-human	Esel-anti-Ziege AlexaFluor A488
CD209/DC-SIGN Maus-anti-human IgG2a	Esel-anti-Maus-IgG AlexaFluor A647
CD45 Kaninchen-anti-human	Esel-anti-Kaninchen Rhodamine Red-X

### **4.1.3 Bildaufnahme mit dem konfokalen Laserrastermikroskop und Auswertung**

Die Bildaufnahme erfolgte mit dem konfokalen Laserrastermikroskop „Laserscanning System TCS SP5“ mit dem Objektiv HCX PL APO CS 40.0 x 1.30 OIL UV (Ölimmersion, 400fache Vergrößerung). Die Detektion der Emissionen der Fluoreszenzfarbstoffe erfolgte über getrennte PMT- oder HyD-Einheiten. Der Wellenlängenbereich der Aufnahme Fenster war den Emissionskurven der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe angepasst und so wurde das Überstrahlen einer Fluoreszenz in jeweils andere Fluoreszenzkanäle ausgeblendet. Zusätzlich wurden die vier verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe bei jeder optischen Schnittebene im sequentiellen Modus aufgenommen. Um die räumliche Ausdehnung der abgebildeten Strukturen zu erfassen, wurden jeweils mehrere optische Schnittebenen in der z-Achse (z-Stacks; Abstand zwischen den Ebenen: 0,71 µm) aufgenommen. Die Fluoreszenzen der einzelnen Fluorochrome wurden in der Bildbearbeitung durch ausgewählte Farben dargestellt. Liegen zwei Strukturen, die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert wurden, im gleichen Zellkompartiment oder räumlich eng nebeneinander, kommt es zur Überlagerung der für die Darstellung verwendeten Farbsignale. Dieses Phänomen heißt Kolokalisation. Die Kolokalisation wird durch die Färbung der Struktur in der Mischfarbe der jeweiligen Farben sichtbar. Die intrazelluläre Lokalisation von FOXO1 in den T-Zellen wurde durch die Überlagerung der Histogramme der Fluoreszenzfarbstoffe für FOXO1, DAPI und CD3 mittels der Software LAS AF Lite (Leica Microsystems, Wetzlar) untersucht. Die Bearbeitung der in dieser Arbeit gezeigten Bilder erfolgte nur durch Veränderungen des Kontrasts und/oder der Helligkeit des gesamten Bildes mittels der Softwares LAS AF Lite (Leica Microsystems, Wetzlar) und ImageJ (NIH, Bethesda, USA). Pro Gewebeschnitt wurden 10 nicht-überlappende Gesichtsfelder ausgewertet.

## **4.2 Statistische Analysen**

Alle statistischen Analysen in dieser Arbeit wurden mit der Software Graphpad Prism 8.3, Version für Windows (Graphpad Software, San Diego, USA) durchgeführt. Bei allen statistischen Tests wurde ein Signifikanzniveau von 5% verwendet ( $\alpha=0,05$ ).

### **4.2.1 Mann-Whitney-U-Test**

Der Mann-Whitney-U-Test, auch Wilcoxon-Rangsummentest genannt, ist ein nichtparametrischer statistischer Test für den Vergleich der zentralen Tendenz zwei unabhängiger Stichproben. Er prüft die Nullhypothese, dass die zwei Stichproben aus Populationen mit identischem Medianwert stammen. Unterscheiden sich die zwei Stichproben signifikant, ist davon auszugehen, dass sich die Mediane der zugrunde liegenden Populationen unterscheiden. Der Mann-Whitney-U-Test ist ein Rangsummentest: die Prüfgrößen werden nicht aus den Messwerten berechnet, sondern aus deren Rangzahlen. Eine Normalverteilung der Daten wird bei dem Mann-Whitney-U-Test nicht vorausgesetzt. Die abhängige Variable muss mindestens ordinalskaliert sein. Der Mann-Whitney-U-Test ist auch für die statistische Analyse kleiner Stichproben geeignet.

### **4.2.2 Kruskal-Wallis-Test**

Der Kruskal-Wallis-Test, auch H-Test genannt, ist ein nichtparametrischer statistischer Test für den Vergleich von mehr als zwei unabhängigen Stichproben. Mit diesem Test wird im Rahmen einer Varianzanalyse (Englisch: *analysis of variance* oder *ANOVA*) untersucht, ob sich die zentralen Tendenzen der Stichproben signifikant unterscheiden. Der Kruskal-Wallis-Test prüft die Nullhypothese, dass die Stichproben aus Populationen mit identischen Medianwerten stammen. Wird der Kruskal-Wallis-Test signifikant, ist davon auszugehen, dass sich mindestens zwei Medianwerte unterscheiden. Der Kruskal-Wallis-Test ist ein Rangsummentest. Eine Normalverteilung der Daten wird nicht vorausgesetzt. Die abhängige Variable muss mindestens ordinalskaliert sein. Er ist auch für die statistische Analyse kleiner Stichproben geeignet. So ähnelt der Kruskal-Wallis-Test dem Mann-Whitney-U-Test mit dem Unterschied, dass er für den Vergleich von mehr als zwei unabhängigen Gruppen verwendet wird.

### **4.2.3 Post-hoc-Test**

Mit dem Kruskal-Wallis-Test kann es nur festgestellt werden, ob sich die zentralen Tendenzen der Stichproben signifikant unterscheiden. Der Test vermittelt jedoch nicht, welche zentralen Tendenzen sich von den anderen signifikant unterscheiden. Dazu werden Post-hoc-Tests angewendet, die die untersuchten Gruppen paarweise vergleichen und anschließend angeben, welche Gruppen sich von den anderen signifikant unterscheiden. Ein solcher Test ist der Mehrfachvergleiche-Test nach Dunn, auch Bonferroni-Korrektur genannt. Er führt paarweise Vergleiche zwischen Gruppenmittelwerten aus. Das beobachtete Signifikanzniveau wird an Mehrfachvergleiche angepasst.

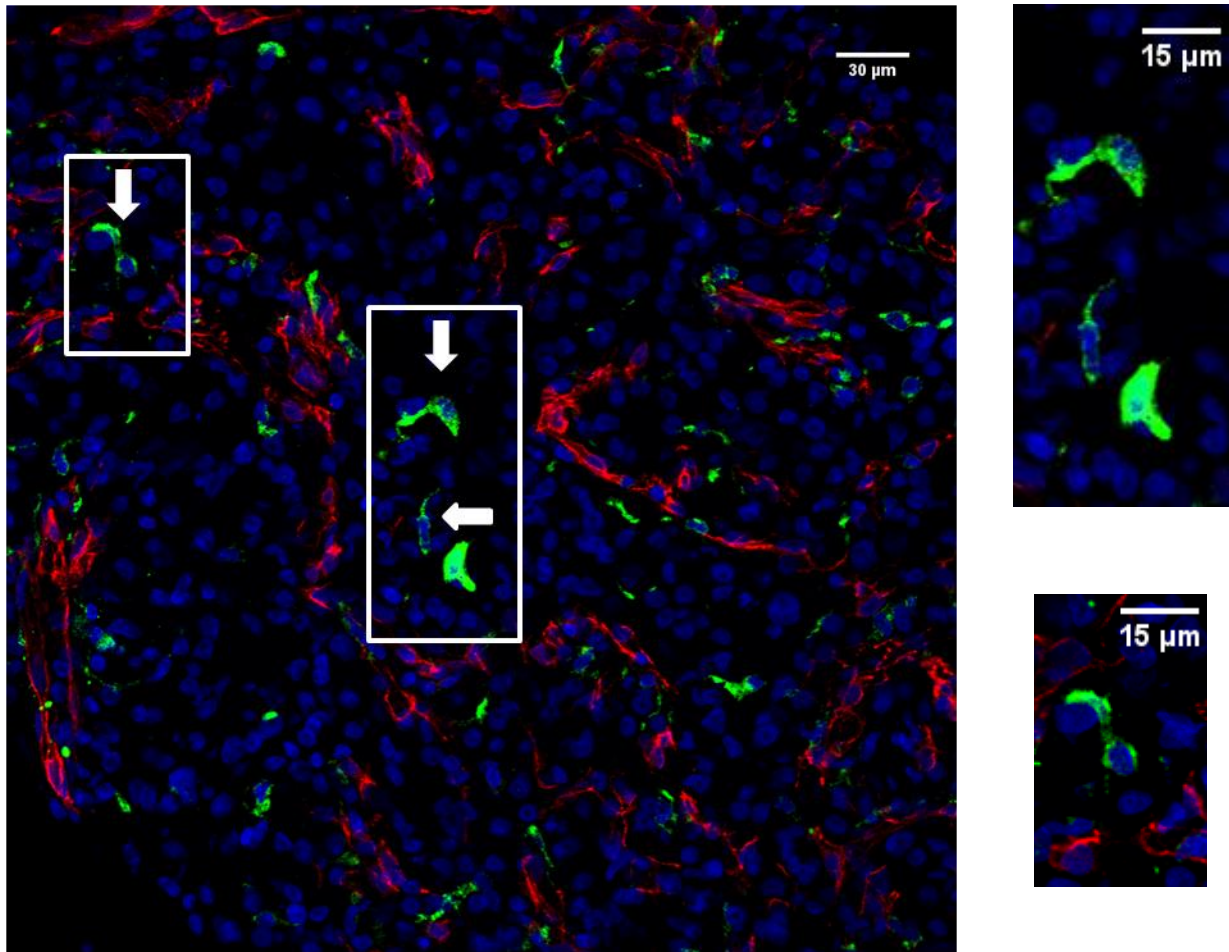
## 5 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde zuerst die VSIG4-Proteinexpression im Nierenzellkarzinom in situ analysiert. Nach der Etablierung der Immunfluoreszenzfärbung für VSIG4 und dem Nachweis von VSIG4<sup>+</sup> Zellen im Nierenzellkarzinom wurden Nierenzellkarzinomgewebe auf Expression von VSIG4, ercDC-Marker (CD209) und Leukozyten-Marker (CD45) untersucht, mit der Fragestellung, ob die ercDC VSIG4 auf Proteinebene exprimieren. Anschließend wurde die FOXO1-Expression in den T-Zellen im Nierenzellkarzinom hinsichtlich der Lokalisation der T-Zellen in Bezug auf die VSIG4<sup>+</sup> Zellen untersucht mit der Fragestellung, ob der VSIG4-T-Zell-Kontakt die FOXO1-Expression in den T-Zellen induzieren kann. Zudem wurden die FOXO1<sup>+</sup> T-Zellen hinsichtlich ihrer Lokalisation in Relation zum Gefäßsystem analysiert, um zu untersuchen, ob die in Voruntersuchungen beschriebene verminderte zytotoxische Ausstattung der extravasierten T-Zellen im Nierenzellkarzinom mit der Expression von FOXO1 assoziiert ist. In allen Färbungen wurden als Vergleich zu den Tumoren tumorfreie Gewebe aus der gleichen tumorbefallenen Niere, sowie Gewebe aus einer Niere mit ausgeprägter chronisch-vernarbender interstitieller Entzündung des Nierenparenchyms untersucht, um tumorbedingte Unterschiede zu identifizieren.

### 5.1 Histologischer Nachweis von VSIG4 im Nierenzellkarzinom

In Transkriptionsanalysen unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass die CD209<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> ercDC VSIG4 auf mRNA-Ebene stark exprimieren (Brech 2015). Jedoch wurde bisher nicht erforscht, ob das VSIG4-Protein im Nierenzellkarzinom exprimiert wird. Daher wollten wir in einem ersten Schritt untersuchen, ob VSIG4 auf Proteinebene im Nierenzellkarzinom nachzuweisen ist. Dazu wurde zuerst ein Immunfluoreszenz-Protokoll zur Färbung von VSIG4 im Kryogewebe etabliert (siehe Kapitel 4.1.2). Der verwendete Antikörper gegen VSIG4 ist im Rahmen des Forschungsprojektes „The Human Protein Atlas“ für Immunhistochemiefärbungen orthogonal validiert (The Human Protein Atlas). Mit Immunfluoreszenzdoppelfärbung des Tumors T90 mit Antikörpern gegen VSIG4 und CD31/PECAM-1, das auf Endothelzellen exprimiert wird und als ihr Marker gilt, wurden VSIG4<sup>+</sup> Zellen und Endothelzellen nachgewiesen und auch die Lokalisation der VSIG4<sup>+</sup> Zellen bestimmt. Die VSIG4<sup>+</sup> Zellen besaßen häufig Zellfortsätze und ähnelten so morphologisch den DC (Abbildung 5.1, Pfeile). VSIG4 war an der Plasmamembran und im Zytoplasma der Zellen lokalisiert. VSIG4<sup>+</sup> Zellen waren nicht in den Gefäßlumen oder an den Gefäßwänden (perivaskulär) lokalisiert. Die CD31<sup>+</sup> Endothelzellen waren VSIG4<sup>-</sup>. Die Abbildung 5.1 zeigt ein exemplarisches Gesichtsfeld bei 400facher Vergrößerung, auch Hauptgesichtsfeld (Englisch: *high-power field*) oder HPF genannt.

## VSIG4 CD31 DAPI



### Abbildung 5.1. Immunfluoreszenzfärbung von Nierenzellkarzinomgewebe für VSIG4 und CD31.

Der Tumor T90 wurde mit Antikörpern gegen VSIG4 und CD31 gefärbt. VSIG4 ist in grün, CD31 ist in rot und Zellkerne, mit DAPI gefärbt, sind in blau dargestellt. Das Bild ist eine Überlagerung aus 5 z-Ebenen (Abstand zwischen den z-Ebenen: 0,71 µm). Die zwei weißen Rechtecke markieren die Bereiche, die in den Bildern rechts in Vergrößerung dargestellt sind. Die Pfeile zeigen exemplarisch drei VSIG4<sup>+</sup> Zellen, die durch die Ausbildung von Zellfortsätzen den dendritischen Zellen morphologisch ähneln. Zudem stehen die markierten VSIG4<sup>+</sup> Zellen in engem Kontakt mit anderen Zellen, deren Kerne mit DAPI in unmittelbarer Nähe der Zellfortsätze dargestellt sind. Die CD31<sup>+</sup> Endothelzellen sind VSIG4<sup>-</sup> (ausschließlich rot und nicht grün gefärbt, keine Kolo-kalisation von VSIG4 und CD31).

## 5.2 Expression von VSIG4 auf CD209<sup>+</sup> Zellen

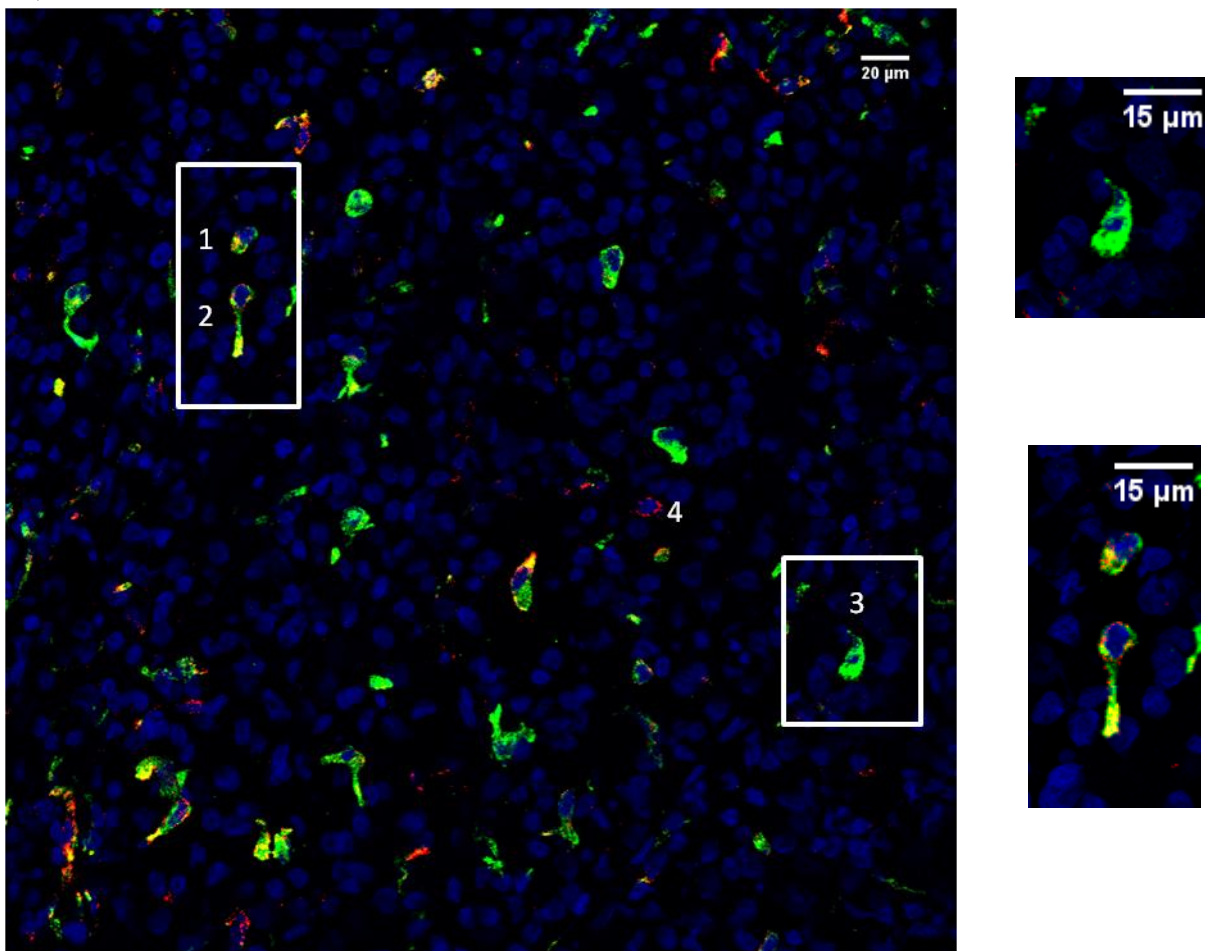
Nachdem das VSIG4-Protein auf Zellen in Nierenzellkarzinomgewebe nachgewiesen wurde, wurde die VSIG4-Proteinexpression auf ercDC untersucht. Dazu wurden Nierenzellkarzinome (T90, T105, T114, T118), tumorfreie Gewebe aus der tumortragenden Niere der Patienten (NN105, NN114, NN118) und Gewebe aus einer Niere mit chronisch-vernarbender interstitieller Entzündung des Nierenparenchyms (G120) mit einer Dreifachfärbung für VSIG4, CD209/DC-SIGN und CD45 gefärbt. Die ercDC sind als CD209<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> Zellen definiert (Figel et al. 2011). Da die meisten CD209<sup>+</sup> Zellen im Nierenzellkarzinom ercDC sind (Figel et al. 2011), wurde CD209 in dieser Arbeit als Marker für die ercDC verwendet. Eine Immunfluoreszenzfärbung für CD14 konnte im Kryogewebe nicht etabliert werden, weil keine



brauchbare Färbung mit Antikörpern gegen CD14 erzielt wurde. Stattdessen wurde ein Antikörper gegen CD45 angewendet. CD45, auch allgemeines Leukozytenantigen (Englisch: *leucocyte common antigen*) genannt, wird auf der Oberfläche aller kernhaltigen hämatopoetischen Zellen und ihrer Vorläuferzellen exprimiert (Rheinländer et al. 2018). Folgend sind alle Leukozyten CD45<sup>+</sup>, während die Erythrozyten und die Thrombozyten keine CD45-Expression aufweisen (Rheinländer et al. 2018). So konnten die VSIG4<sup>+</sup>CD209<sup>-</sup> Zellen mittels CD45 weiter untersucht werden und als Leukozyten (CD45<sup>+</sup>) oder als Zellen mit nicht-leukozytärem Ursprung (CD45<sup>-</sup>) identifiziert werden. Dies sollte einen weiteren Hinweis geben, auf welchen Zellen VSIG4 exprimiert wird.

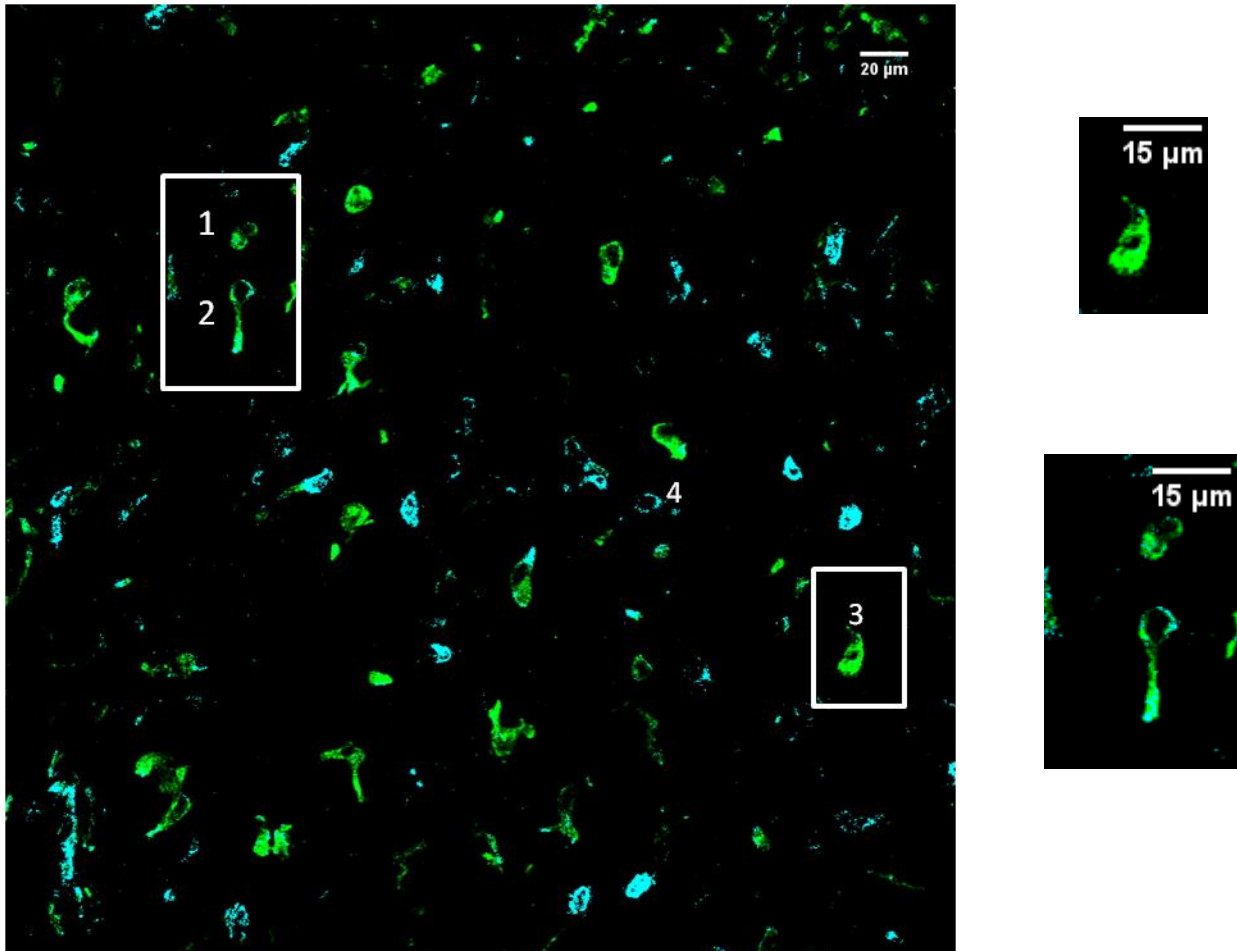
In den Präparaten wurden VSIG4<sup>+</sup>CD209<sup>+</sup>CD45<sup>-/+</sup> Zellen (VSIG4<sup>+</sup> ercDC), VSIG4<sup>+</sup>CD209<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup> Zellen (VSIG4<sup>+</sup> Zellen, die keine ercDC sind), VSIG4<sup>+</sup>CD209<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup> Zellen (VSIG4<sup>+</sup> Zellen, die keine ercDC und keine Leukozyten sind, weil CD45<sup>-</sup>) und CD209<sup>+</sup>VSIG4<sup>-</sup>CD45<sup>-/+</sup> Zellen (VSIG4<sup>-</sup> ercDC) nachgewiesen. Obwohl CD209 auf hämatopoetischen Zellen exprimiert wird (siehe Kapitel 1.4.1), waren in den Präparaten nicht nur CD209<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> Zellen, sondern auch CD209<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> Zellen zu sehen. Das wird dadurch erklärt, dass CD45 auf Leukozyten unterschiedlich stark exprimiert werden kann, beispielweise in verschiedenen Zellentwicklungsstadien (Stelzer et al. 1993). Die Immunhistologie ist ein nicht sehr sensitives Nachweisverfahren, so dass schwach positive Zellen nicht angefärbt werden. Aus diesem Grund können die in der Immunfluoreszenz CD45<sup>-</sup> Zellen Leukozyten mit sehr schwachem CD45 sein. Die Abbildung 5.2.1 zeigt eine exemplarische Bildaufnahme der Immunfluoreszenzfärbung.

A) VSIG4 CD209 DAPI



B)

VSIG4 CD45



**Abbildung 5.2.1. Immunfluoreszenzfärbung von Nierenzellkarzinomgewebe für VSIG4, CD209 und CD45.**

Die Bilder stammen aus dem Tumor T90. In A) und B) wird das gleiche HPF dargestellt. In A) werden die Fluoreszenzkanäle für VSIG4 (grün), CD209 (rot) und DAPI (blau) gezeigt, der Fluoreszenzkanal für CD45 ist ausgeblendet. In B) werden die Fluoreszenzkanäle für VSIG4 (grün) und CD45 (cyan) gezeigt, die Fluoreszenzkanäle für CD209 und DAPI sind ausgeblendet. Die Bilder sind durch Überlagerung von 4 z-Ebenen (Abstand zwischen den z-Ebenen: 0,71 µm) entstanden. Die weißen Rechtecke geben die Areale an, die in den Bildern rechts vergrößert dargestellt sind. Markiert sind zwei VSIG4<sup>+</sup>CD209<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> Zellen (1 und 2: grün+rot+cyan), eine VSIG4<sup>+</sup>CD209<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup> Zelle (3: grün+cyan) und eine VSIG4<sup>-</sup>CD209<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> Zelle (4: rot+cyan).

Pro Gewebe wurden 10 nicht-überlappende HPFs ausgewertet. Die Zellpopulationen (VSIG4<sup>+</sup>CD209<sup>+</sup>CD45<sup>-/+</sup>, VSIG4<sup>+</sup>CD209<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>, VSIG4<sup>+</sup>CD209<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup>, CD209<sup>+</sup>VSIG4<sup>-</sup>CD45<sup>-/+</sup>) wurden in den Geweben T90, T105, T114, T118, NN105, NN114 und NN118 quantitativ analysiert. Für G120 erfolgte eine qualitative Analyse, weil eine Auszählung der Zellen wegen der massiven Zellinfiltration nicht möglich war (Abbildung 5.2.4). Für jedes HPF wurde die Anzahl der VSIG4<sup>+</sup>CD209<sup>+</sup> ercDC, der VSIG4<sup>+</sup>CD209<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup> Zellen und der VSIG4<sup>+</sup>CD209<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup> Zellen bestimmt und folgend der prozentuale Anteil der jeweiligen Zellpopulation in der VSIG4<sup>+</sup> Zellpopulation berechnet. Zudem wurde für jedes HPF die Anzahl der VSIG4<sup>-</sup>CD209<sup>+</sup> Zellen bestimmt und folgend der prozentuale Anteil der VSIG4<sup>-</sup>CD209<sup>+</sup> Zellen und der VSIG4<sup>-</sup>CD209<sup>+</sup> Zellen in der CD209<sup>+</sup> Zellpopulation

berechnet. Aus den absoluten Zellzahlen für jedes HPF wurde der Median pro HPF für die jeweilige Zellpopulation in allen Geweben berechnet. Aus den Prozentwerten für jedes HPF wurde der Mittelwert der entsprechenden Prozentanteile in allen Geweben ermittelt. Daraus wurde anschließend der gemeinsame Mittelwert der Prozentsätze der Zellpopulationen für alle Tumorgewebe und für alle tumorfreien Gewebe berechnet.

### **5.2.1 Unterscheidung von VSIG4<sup>+</sup> Zellpopulationen**

Die Auszählung der VSIG4<sup>+</sup> Zellpopulationen ist in Tabellen 5.2.1 und 5.2.2 und in der Abbildung 5.2.2 graphisch dargestellt. Die Auszählung ergab, dass die Mehrheit der VSIG4<sup>+</sup> Zellen auch CD209<sup>+</sup> waren, sowohl in den meisten Tumorgeweben (Mittelwert für alle Tumorgewebe: 67,4%, Spannweite: 39% - 90,8%) als auch in allen tumorfreien Geweben (Mittelwert für alle tumorfreien Gewebe: 84,1%, Spannweite: 79,3% - 89,7%). Eine Ausnahme dabei stellte das Tumorgewebe T118 dar, wo die meisten VSIG4<sup>+</sup> Zellen CD209<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup> waren (Mittelwert: 57,6%). In allen quantitativ analysierten Tumoren exprimierten die meisten VSIG4<sup>+</sup>CD209<sup>-</sup> Zellen CD45 und wurden somit als Leukozyten identifiziert. Nur ein kleiner Anteil der VSIG4<sup>+</sup> Zellen war CD209<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup> und daher möglicherweise keine Leukozyten. In den tumorfreien Geweben gab es keine VSIG4<sup>+</sup>CD209<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup> Zellen. Verglich man die Tumorgewebe mit den tumorfreien Geweben der gleichen Patienten, so zeigte sich, dass die prozentualen Anteile der VSIG4<sup>+</sup>CD209<sup>+</sup> Zellen in der VSIG4<sup>+</sup> Zellpopulation in den Tumorgeweben niedriger waren, was darauf zurückzuführen ist, dass im Tumor auch ein großer Anteil an VSIG4<sup>+</sup>CD209<sup>-</sup> Zellen vorkam. Vermutlich handelt es sich dabei um VSIG4<sup>+</sup> Makrophagen. Jedoch war die absolute Anzahl (Median pro HPF) der VSIG4<sup>+</sup>CD209<sup>+</sup> und der VSIG4<sup>+</sup>CD209<sup>-</sup> Zellen in den Tumorgeweben höher.

Gewebe		% VSIG4 <sup>+</sup> CD209 <sup>+</sup> (Spannweite)	p- Wert	% VSIG4 <sup>+</sup> CD209 <sup>-</sup> CD45 <sup>+</sup> (Spannweite)	p- Wert	% VSIG4 <sup>+</sup> CD209 <sup>-</sup> CD45 <sup>-</sup> (Spannweite)	p- Wert
T90		90,8 (83,8-97,7)		9 (2,3-16,2)		0,2 (0-2)	
T105		54,1 (38-72,4)	< 0,0001	44,1 (23,7-62)	< 0,0001	1,8 (0-4)	0,003
	NN105	83,3 (66,7-96,2)		16,7 (3,8-33,3)		0,0 (0)	
T114		85,6 (67,7-97,4)	0,3	11,7 (2,6-29)	0,9	2,7 (0-5,6)	0,01
	NN114	89,7 (78,6-95,3)		10,3 (5-21,4)		0,0 (0)	
T118		39 (27,5-55,6)	< 0,0001	57,6 (44,2-72,4)	< 0,0001	3,4 (0-11,8)	0,003
	NN118	79,3 (57,9-92,3)		20,7 (7,7-42,1)		0,0 (0)	
RCC		67,4 (39-90,8)	0,8	30,6 (9-57,6)	0,8	2 (0,2-3,4)	0,06
	NN	84,1 (79,3-89,7)		15,9 (10,3-20,7)		0,0 (0)	

**Tabelle 5.2.1. Prozentuale Zusammensetzung der VSIG4<sup>+</sup> Zellpopulation in Nierenzellkarzinomen und tumorfreien Geweben.**

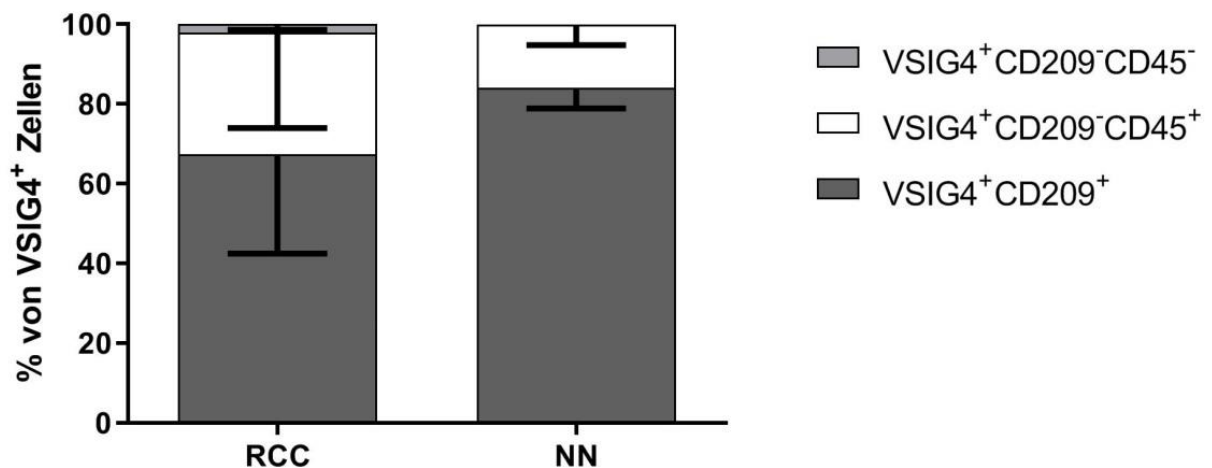
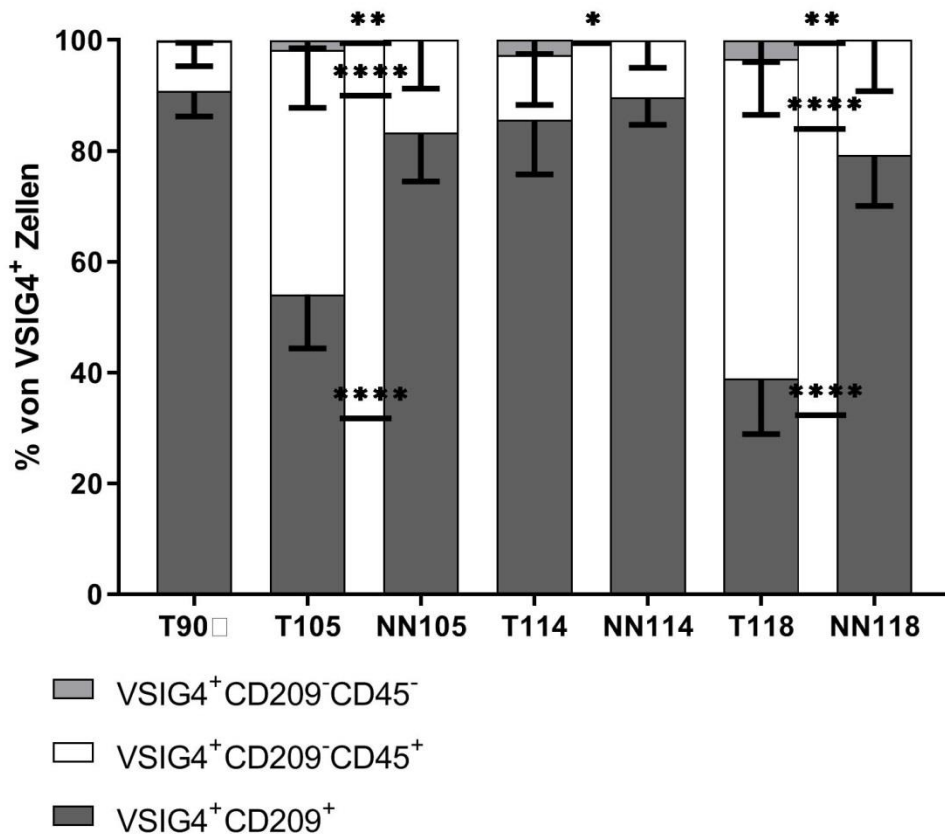
Pro HPF wurde die Anzahl der VSIG4<sup>+</sup>CD209<sup>+</sup> Zellen, der VSIG4<sup>+</sup>CD209<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup> Zellen und der VSIG4<sup>+</sup>CD209<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup> Zellen bestimmt. Anschließend wurde in jedem HPF der prozentuale Anteil dieser drei Zellpopulationen in der VSIG4<sup>+</sup> Zellpopulation ermittelt. Es wurden für jedes Gewebe n=10 HPFs ausgewertet. Daraus wurde der Mittelwert der prozentualen Anteile für jedes Gewebe berechnet und in die Tabelle eingetragen. Aus den Werten der einzelnen Gewebe wurde der Mittelwert der prozentualen Anteile für alle Tumoren und für alle tumorfreien Gewebe bestimmt und ebenfalls in die Tabelle (RCC bzw. NN) eingetragen. Für die statistischen Analysen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

Gewebe		VSIG4 <sup>+</sup> CD209 <sup>+</sup> /HPF (Spannweite)	p- Wert	VSIG4 <sup>+</sup> CD209 <sup>-</sup> CD45 <sup>+</sup> /HPF (Spannweite)	p- Wert	VSIG4 <sup>+</sup> CD209 <sup>-</sup> CD45 <sup>-</sup> /HPF (Spannweite)	p- Wert
T90		35 (31-58)		3,5 (1-6)		0,0 (0-1)	
T105		54 (26-68)	0,0001	45 (18-71)	< 0,0001	2 (0-3)	0,003
	NN105	24,5 (12-29)		5,5 (1-7)		0,0 (0)	
T114		37,5 (21-75)	0,005	3,5 (2-13)	0,1	1 (0-3)	0,01
	NN114	21 (15-41)		2 (1-9)		0,0 (0)	
T118		19 (13-33)	0,2	27 (20-50)	< 0,0001	1 (0-6)	0,003
	NN118	15,5 (11-24)		4 (2-8)		0,0 (0)	
RCC		36,25 (19-54)	0,2	15,25 (3,5-45)	0,5	1 (0-2)	0,1
	NN	21 (15,5-24,5)		4 (2-5,5)		0,0 (0)	

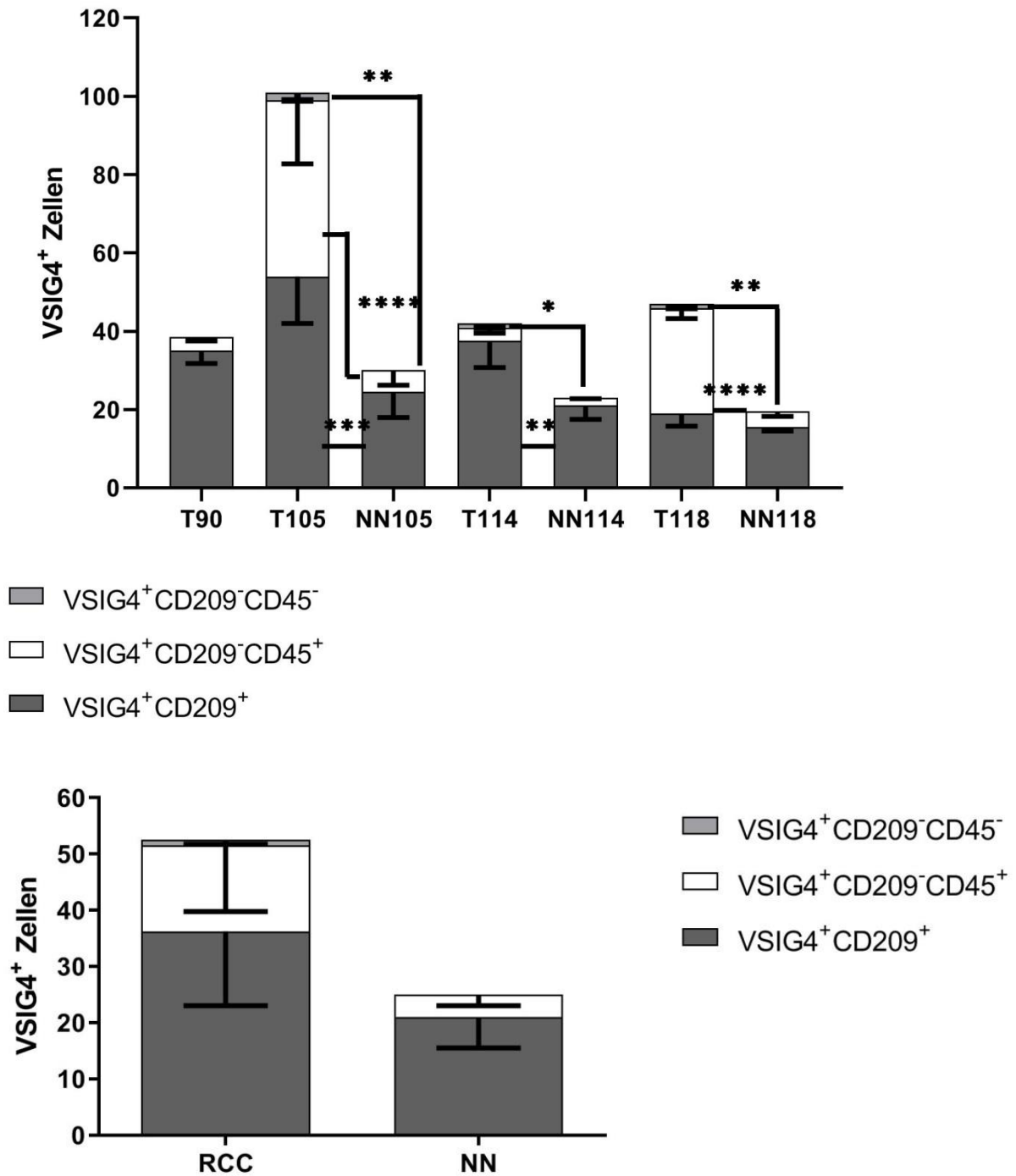
**Tabelle 5.2.2. Absolute Anzahl der VSIG4<sup>+</sup> Subpopulationen in Nierenzellkarzinomen und tumorfreien Geweben.**

Pro HPF wurde die Anzahl der VSIG4<sup>+</sup>CD209<sup>+</sup> Zellen, der VSIG4<sup>+</sup>CD209<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup> Zellen und der VSIG4<sup>+</sup>CD209<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup> Zellen bestimmt. Es wurden für jedes Gewebe n=10 HPFs ausgewertet. Daraus wurde der Median pro HPF der jeweiligen Zellpopulation für jedes Gewebe berechnet und in die Tabelle eingetragen. Aus den Werten der einzelnen Gewebe wurde der Median pro HPF der jeweiligen Zellpopulation für alle Tumoren und für alle tumorfreien Gewebe bestimmt und ebenfalls in die Tabelle (RCC bzw. NN) eingetragen. Für die statistischen Analysen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

A)



B)



**Abbildung 5.2.2. VSIG4<sup>+</sup> Subpopulationen in Nierenzellkarzinomen und tumorfreien Geweben.**

A) Prozentualer Anteil der VSIG4<sup>+</sup> Subpopulationen in der VSIG4<sup>+</sup> Zellpopulation. Pro HPF wurde die Anzahl der VSIG4<sup>+</sup>CD209<sup>+</sup> Zellen, der VSIG4<sup>+</sup>CD209<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup> Zellen und der VSIG4<sup>+</sup>CD209<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup> Zellen bestimmt. Anschließend wurde in jedem HPF der prozentuale Anteil dieser drei Zellpopulationen in der VSIG4<sup>+</sup> Zellpopulation ermittelt. Es wurden für jedes Gewebe n=10 HPFs ausgewertet. Daraus wurde der Mittelwert der prozentualen Anteile für jedes Gewebe berechnet und auf der y-Achse des ersten Diagramms dargestellt. Aus den Werten der einzelnen Gewebe wurde der Mittelwert der prozentualen Anteile für alle Tumoren und für alle tumorfreien Gewebe bestimmt und auf der y-Achse des zweiten Diagramms dargestellt. Die Balken sind die graphische Darstellung der

Standardabweichung. Für die statistischen Analysen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Die p-Werte sind bei signifikantem Unterschied der jeweiligen Zellpopulation zwischen Tumorgeweben und tumorfreien Geweben angegeben. \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\*\* p<0,0001. **B)** Absolute Anzahl (Median pro HPF) der VSIG4<sup>+</sup> Subpopulationen. Pro HPF wurde die Anzahl der VSIG4<sup>+</sup>CD209<sup>+</sup> Zellen, der VSIG4<sup>+</sup>CD209<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup> Zellen und der VSIG4<sup>+</sup>CD209<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup> Zellen bestimmt. Es wurden für jedes Gewebe n=10 HPFs ausgewertet. Daraus wurde der Median pro HPF der jeweiligen Zellpopulation für jedes Gewebe berechnet und auf der y-Achse des ersten Diagramms dargestellt. Aus den Werten der einzelnen Gewebe wurde der Median pro HPF der jeweiligen Zellpopulation für alle Tumoren und für alle tumorfreien Gewebe bestimmt und auf der y-Achse des zweiten Diagramms dargestellt. Die Balken sind die graphische Darstellung des Interquartilsabstandes. Für die statistischen Analysen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Die p-Werte sind bei signifikantem Unterschied der jeweiligen Zellpopulation zwischen Tumorgeweben und tumorfreien Geweben angegeben. \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001.

## 5.2.2 Unterscheidung der CD209<sup>+</sup> Zellpopulation hinsichtlich der VSIG4-Expression

In den Tumorgeweben (Mittelwert: 91,3%, Spannweite: 85,1% - 95,8%) und in den tumorfreien Geweben (Mittelwert: 94,6%, Spannweite: 93,1% - 95,5%) waren die meisten CD209<sup>+</sup> Zellen positiv für VSIG4. So war der prozentuale Anteil der CD209<sup>+</sup>VSIG4<sup>+</sup> Zellen in der CD209<sup>+</sup> Zellpopulation in den Tumorgeweben und in den tumorfreien Geweben ähnlich. Die absolute Anzahl (Median pro HPF) der CD209<sup>+</sup>VSIG4<sup>+</sup> und der CD209<sup>+</sup>VSIG4<sup>-</sup> Zellen war jedoch in den Tumoren höher. Die prozentualen Anteile und die absoluten Anzahlen (Median pro HPF) der CD209<sup>+</sup> Zellsubpopulationen in allen quantitativ analysierten Geweben sind in den Tabellen 5.2.3 und 5.2.4 aufgeführt und in der Abbildung 5.2.3 graphisch dargestellt.

Gewebe		% CD209 <sup>+</sup> VSIG4 <sup>+</sup> (Spannweite)	p-Wert	% CD209 <sup>+</sup> VSIG4 <sup>-</sup> (Spannweite)	p-Wert
T90		85,1 (73,1-97,1)		14,9 (2,9-26,9)	
T105		93,2 (90,6-96,4)	0,7	6,8 (3,6-9,4)	0,7
	NN105	93,1 (82,4-100)		6,9 (0-17,6)	
T114		95,8 (91,4-100)	0,6	4,2 (0-8,6)	0,6
	NN114	95,5 (89,1-100)		4,5 (0-10,9)	
T118		91,2 (82,6-100)	0,1	8,8 (0-17,4)	0,1
	NN118	95,2 (83,3-100)		4,8 (0-16,7)	
RCC		91,3 (85,1-95,8)	0,6	8,7 (4,2-14,9)	0,6
	NN	94,6 (93,1-95,5)		5,4 (4,5-6,9)	

**Tabelle 5.2.3. Prozentualer Anteil der VSIG4<sup>+</sup> Subpopulation in der CD209<sup>+</sup> Zellpopulation in Nierenzellkarzinomen und tumorfreien Geweben.**

Pro HPF wurde die Anzahl der CD209<sup>+</sup>VSIG4<sup>+</sup> Zellen und der CD209<sup>+</sup>VSIG4<sup>-</sup> Zellen bestimmt. Anschließend wurde in jedem HPF der prozentuale Anteil dieser zwei Zellpopulationen in der CD209<sup>+</sup> Zellpopulation ermittelt. Es wurden für jedes Gewebe n=10 HPFs ausgewertet. Daraus wurde der Mittelwert der prozentualen Anteile für jedes Gewebe berechnet und in die Tabelle eingetragen. Aus den Werten der einzelnen Gewebe wurde der Mittelwert der prozentualen Anteile für alle Tumoren und für alle tumorfreien Gewebe bestimmt und ebenfalls in die Tabelle (RCC bzw. NN) eingetragen. Für die statistischen Analysen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

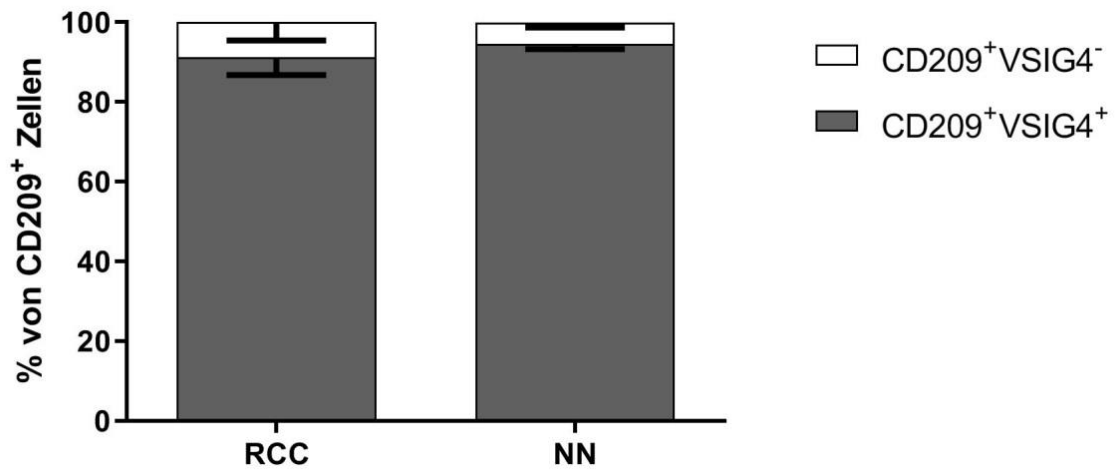
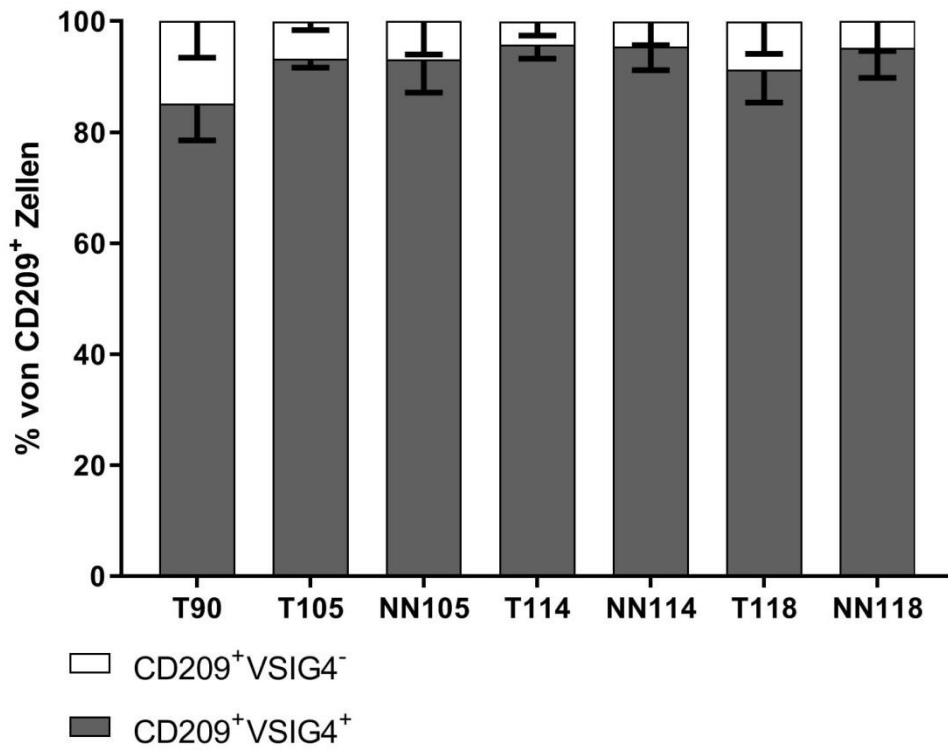
Gewebe		CD209 <sup>+</sup> VSIG4 <sup>+</sup> /HPF (Spannweite)	p-Wert	CD209 <sup>+</sup> VSIG4 <sup>-</sup> /HPF (Spannweite)	p-Wert
T90		35 (31-58)		6,5 (1-14)	
T105		54 (26-68)	0,0001	4 (2-6)	0,01
	NN105	24,5 (12-29)		1,5 (0-6)	
T114		37,5 (21-75)	0,005	2 (0-3)	0,3
	NN114	21 (15-41)		1 (0-5)	
T118		19 (13-33)	0,2	2 (0-4)	0,07
	NN118	15,5 (11-24)		1 (0-3)	
RCC		36,25 (19-54)	0,2	3 (2-6,5)	0,03
	NN	21 (15,5-24,5)		1 (1-1,5)	

**Tabelle 5.2.4. Absolute Anzahl der CD209<sup>+</sup> Subpopulationen in Nierenzellkarzinomen und tumorfreien Geweben.**

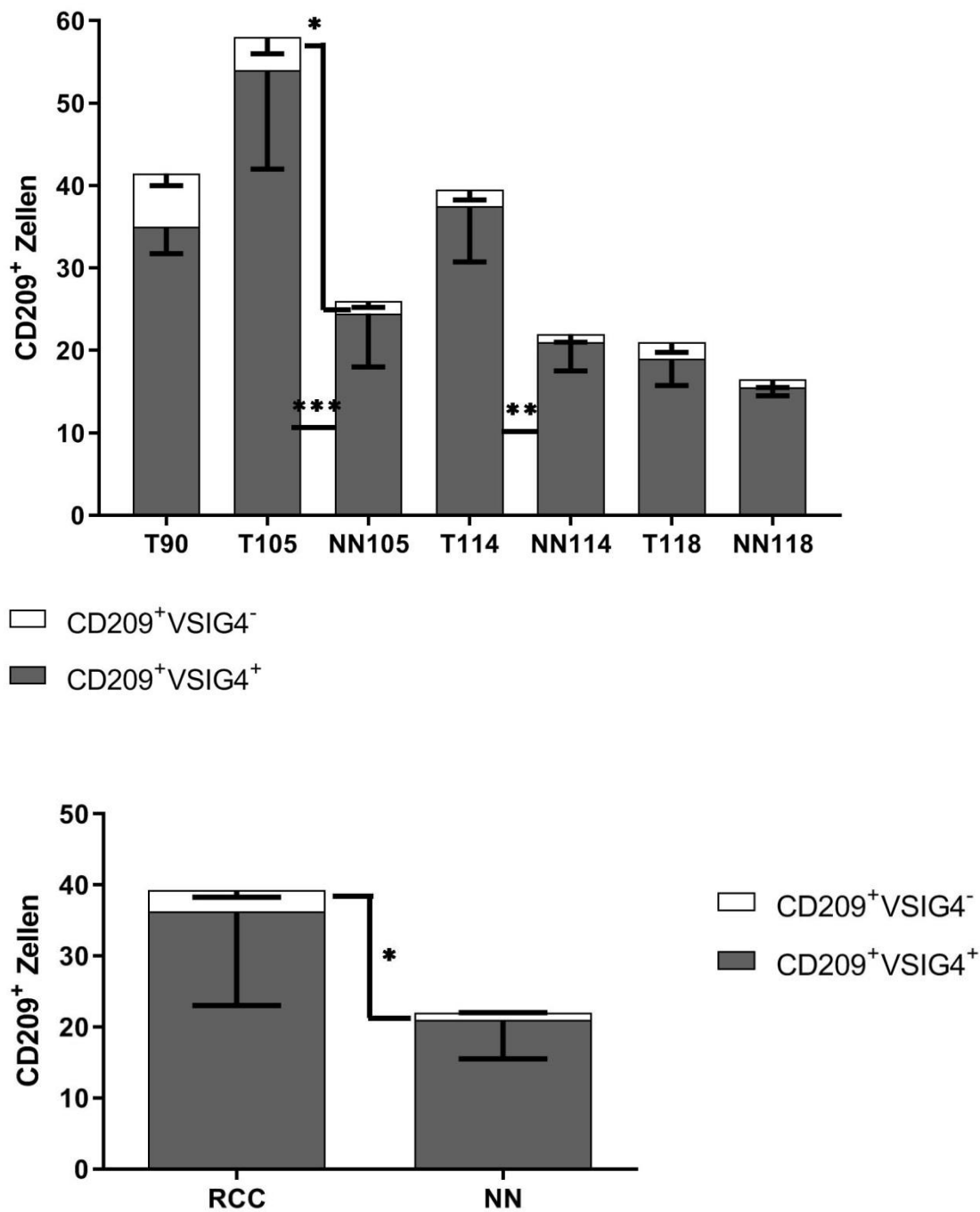
Pro HPF wurde die Anzahl der CD209<sup>+</sup>VSIG4<sup>+</sup> Zellen und der CD209<sup>+</sup>VSIG4<sup>-</sup> Zellen bestimmt. Es wurden für jedes Gewebe n=10 HPFs ausgewertet. Daraus wurde der Median pro HPF der jeweiligen Zellpopulation für jedes Gewebe berechnet und in die Tabelle eingetragen. Aus den Werten der einzelnen Gewebe wurde der Median pro HPF der jeweiligen Zellpopulation für alle Tumoren und für alle tumorfreien Gewebe bestimmt und ebenfalls in die Tabelle (RCC bzw. NN) eingetragen. Für die statistischen Analysen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet.



A)



B)



**Abbildung 5.2.3. CD209<sup>+</sup> Subpopulationen basierend auf der VSIG4-Expression in Nierenzellkarzinomen und tumorfreien Geweben.**

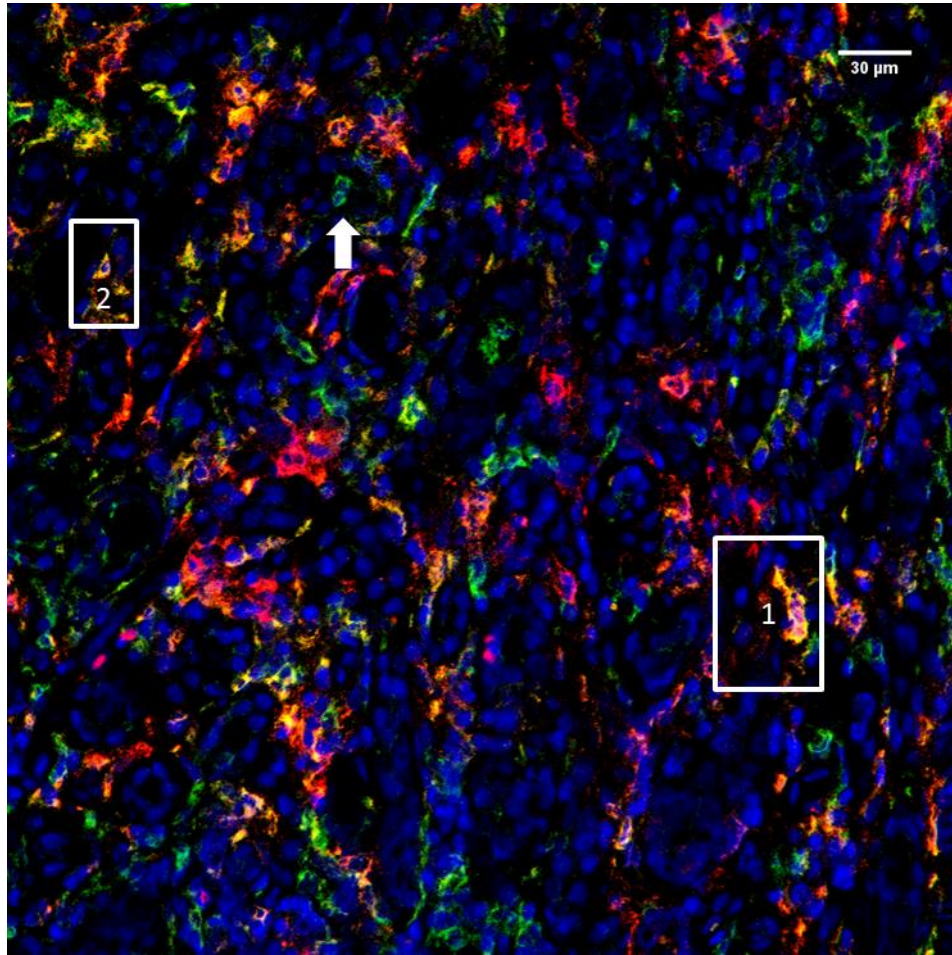
A) Prozentualer Anteil der CD209<sup>+</sup> Subpopulationen in der CD209<sup>+</sup> Zellpopulation. Pro HPF wurde die Anzahl der CD209<sup>+</sup>VSIG4<sup>+</sup> Zellen und der CD209<sup>+</sup>VSIG4<sup>-</sup> Zellen bestimmt. Anschließend wurde in jedem HPF der prozentuale Anteil der zwei Zellpopulationen in der CD209<sup>+</sup> Zellpopulation ermittelt. Es wurden für jedes Gewebe n=10 HPFs ausgewertet. Daraus wurde der Mittelwert der prozentualen Anteile für jedes Gewebe berechnet und auf der y-Achse des ersten Diagramms dargestellt. Aus den Werten der einzelnen Gewebe wurde der Mittelwert der prozentualen Anteile für alle Tumoren und für alle tumorfreien Gewebe bestimmt und auf der y-Achse des zweiten Diagramms dargestellt. Die Balken sind die graphische Darstellung der Standardabweichung. Für die statistischen Analysen wurde der

Mann-Whitney-U-Test verwendet. Die Zellpopulationen unterscheiden sich nicht signifikant zwischen Tumorgewebe und tumorfreien Geweben. **B)** Absolute Anzahl (Median pro HPF) der CD209<sup>+</sup> Subpopulationen. Pro HPF wurde die Anzahl der CD209<sup>+</sup>VSIG4<sup>+</sup> Zellen und der CD209<sup>+</sup>VSIG4<sup>-</sup> Zellen bestimmt. Es wurden für jedes Gewebe n=10 HPFs ausgewertet. Daraus wurde der Median pro HPF der jeweiligen Zellpopulation für jedes Gewebe berechnet und auf der y-Achse des ersten Diagramms dargestellt. Aus den Werten der einzelnen Gewebe wurde der Median pro HPF der jeweiligen Zellpopulation für alle Tumoren und für alle tumorfreien Gewebe bestimmt und auf der y-Achse des zweiten Diagramms dargestellt. Die Balken sind die graphische Darstellung des Interquartilsabstandes. Für die statistischen Analysen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Die p-Werte sind bei signifikantem Unterschied der jeweiligen Zellpopulation zwischen Tumorgewebe und tumorfreien Geweben angegeben. \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001.

Das Gewebe G120 wurde durch eine große Anzahl von VSIG4<sup>+</sup>, CD209<sup>+</sup> und CD45<sup>+</sup> Zellen charakterisiert. Hier wurde die Subpopulationsverteilung nur beschreibend ermittelt. Die Abbildung 5.2.4 zeigt zwei exemplarische HPFs des Gewebes G120. Die meisten CD209<sup>+</sup> Zellen waren auch VSIG4<sup>+</sup> und viele VSIG4<sup>+</sup> Zellen waren CD209<sup>+</sup> (grün+rot). Innerhalb der VSIG4<sup>+</sup>CD209<sup>-</sup> Zellpopulation (grün ohne rot) waren die meisten Zellen CD45<sup>+</sup> (cyan), während es auch vereinzelte VSIG4<sup>+</sup>CD209<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup> Zellen gab. Die Mehrzahl der VSIG4<sup>+</sup> Zellen, der CD209<sup>+</sup> Zellen und der CD45<sup>+</sup> Zellen waren im Tubulointerstitium lokalisiert (Abbildung 5.2.4, A und B). In den Glomeruli befanden sich vereinzelte VSIG4<sup>+</sup>CD209<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> Zellen (grün+rot+cyan) und wenige CD45<sup>+</sup> Zellen (Abbildung 5.2.4, C und D).

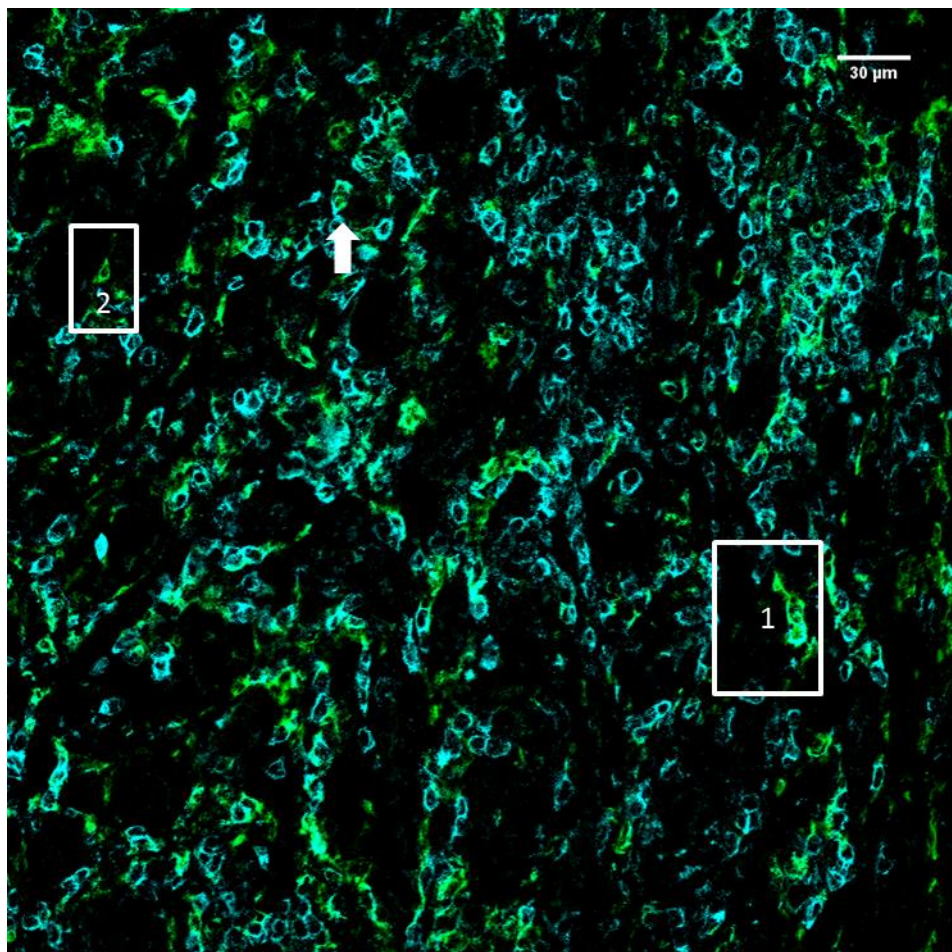
A)

VSIG4 CD209 DAPI



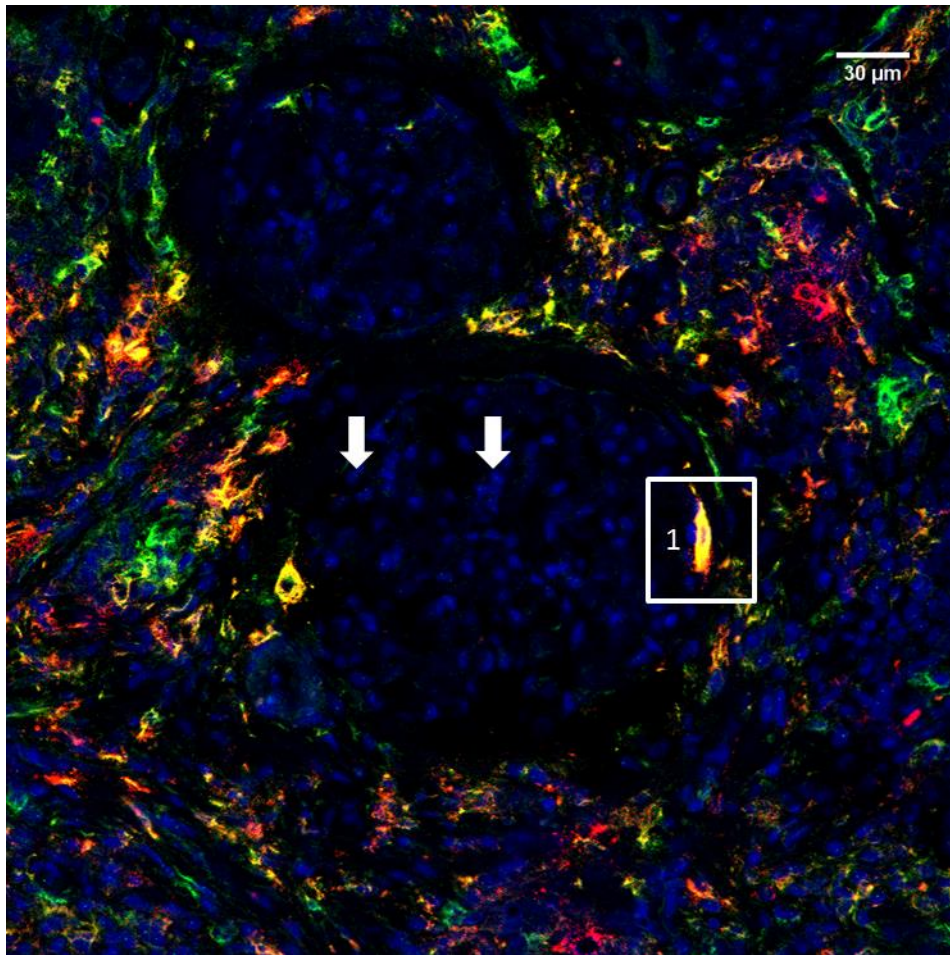
B)

VSIG4 CD45



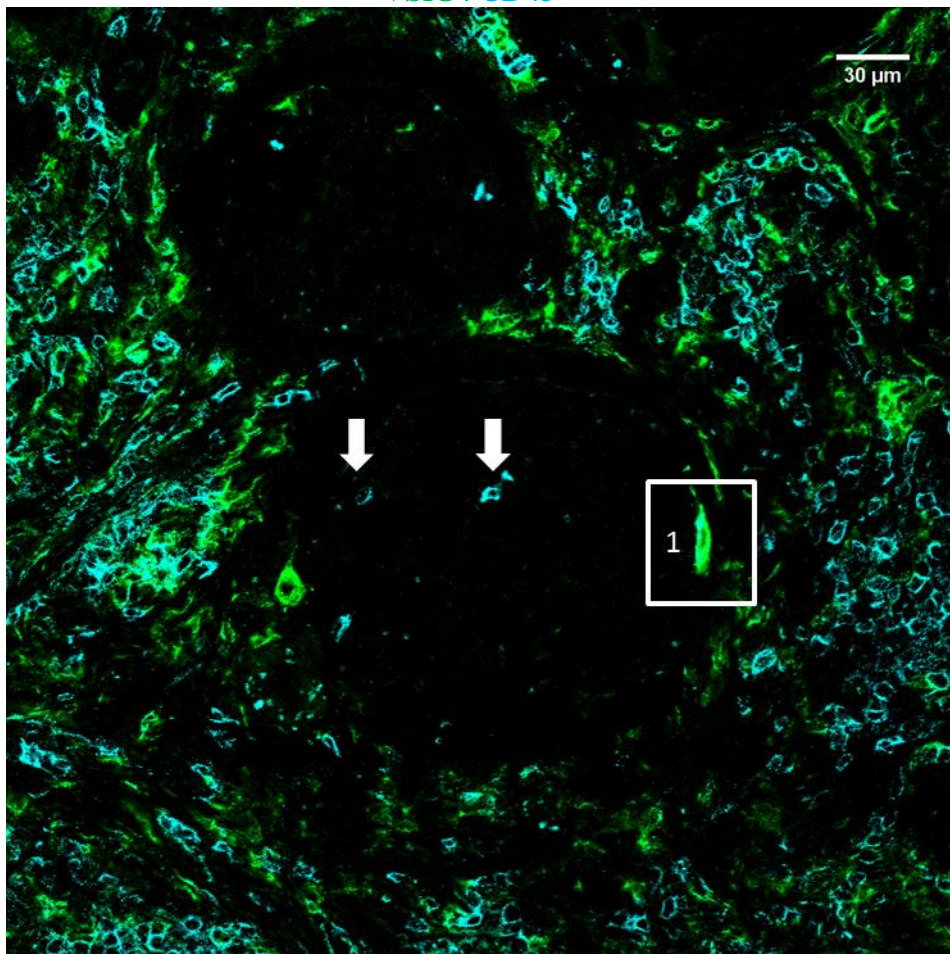
C)

VSIG4 CD209 DAPI



D)

VSIG4 CD45



#### **Abbildung 5.2.4. Immunfluoreszenzfärbung des Gewebes G120 für VSIG4, CD209 und CD45.**

Abbildung vom Tubulointerstitium (A und B) und von zwei Glomeruli (C und D). Die Bilder A) und B) sowie C) und D) zeigen das gleiche HPF. Sie sind jeweils eine Überlagerung aus 6 z-Ebenen (A und B) bzw. aus 4 z-Ebenen (C und D). Der Abstand zwischen den z-Ebenen beträgt 0,71  $\mu\text{m}$ . In A) und C) werden die Fluoreszenzkanäle für VSIG4 (grün), CD209 (rot) und DAPI (blau) gezeigt, der Fluoreszenzkanal für CD45 ist ausgeblendet. In B) und D) werden die Fluoreszenzkanäle für VSIG4 (grün) und CD45 (cyan) gezeigt, die Fluoreszenzkanäle für CD209 und DAPI sind ausgeblendet. In A) und B) sind zwei VSIG4<sup>+</sup>CD209<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> Zellen (Pfeil, grün+cyan), mehrere VSIG4<sup>+</sup>CD209<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> Zellen (1, grün+rot+cyan) und eine VSIG4<sup>+</sup>CD209<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> Zelle (2, grün+rot) markiert. In C) und D) sind zwei VSIG4<sup>+</sup>CD209<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> Zellen (Pfeile, cyan) und eine VSIG4<sup>+</sup>CD209<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> Zelle (1, grün+rot+cyan) in einem Glomerulus markiert.

### **5.3 Expression von FOXO1 in den T-Zellen im Nierenzellkarzinom**

Unsere Arbeitsgruppe hat gezeigt, dass die nierenzellkarzinominfiltrierenden T-Zellen eine verminderte Aktivierung von AKT aufweisen, die in T-Zellen außerhalb des Tumors nicht nachzuweisen ist und zur verminderten zytotoxischen Aktivität der CD8<sup>+</sup> TIL in Nierenzellkarzinom beiträgt (Prinz et al. 2012). Da eine AKT-Aktivierung zu vermindertem Niveau des Zellzyklus-Arrest-assoziierten Proteins p27<sup>KIP1</sup> und zur verbesserten zytotoxischen Aktivität der CD8<sup>+</sup> TIL in vitro führt, postulieren wir, dass ein hohes Niveau von p27<sup>KIP1</sup> möglicherweise zur anergen Signatur (siehe Kapitel 1.8.5) der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Nierenzellkarzinom beiträgt (Prinz et al. 2012). Der Transkriptionsfaktor von p27<sup>KIP1</sup> ist das Protein FOXO1 (Dijkers et al. 2000; Medema et al. 2000), das bei inaktivem AKT im Zellkern lokalisiert und aktiv ist (siehe Kapitel 1.3). Diese Informationen lassen eine wichtige Rolle der FOXO-Proteine und speziell des aktiven, im Zellkern lokalisierten FOXO1 für die beeinträchtigte antitumorale Aktivität der tumorinfiltrierenden T-Zellen in Nierenzellkarzinom vermuten.

#### **5.3.1 FOXO1-Expression in T-Zellen in Relation zu VSIG4<sup>+</sup> Zellen**

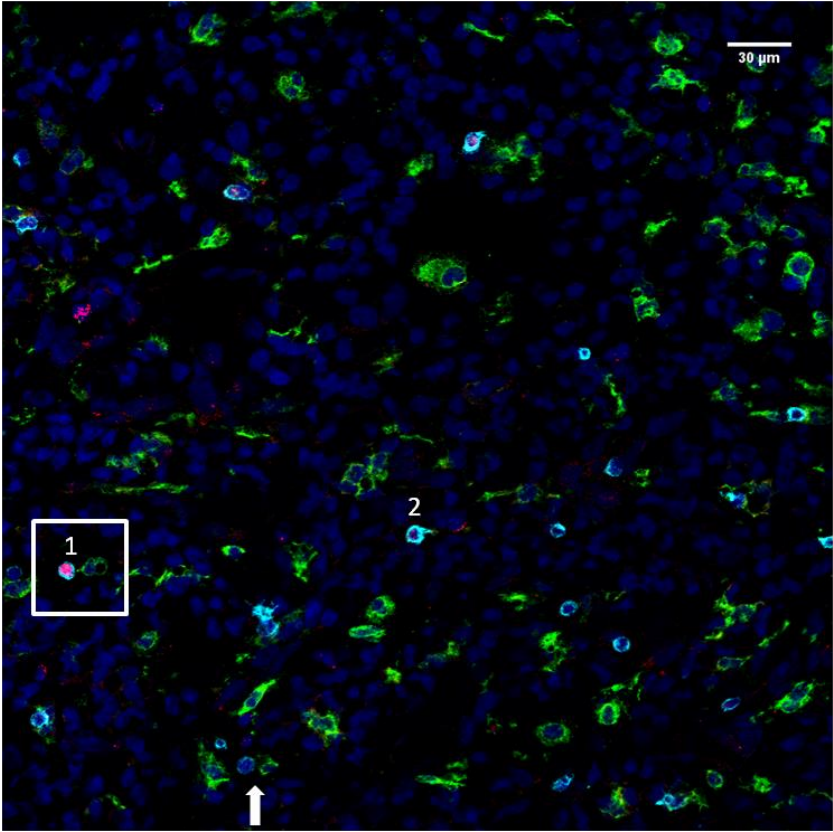
Unsere Arbeitsgruppe hat gezeigt, dass die CD209<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> ercDC im Nierenzellkarzinom mit einem schlechteren Überleben assoziiert sind und in situ häufig in engem Kontakt mit T-Zellen stehen (Figel et al. 2011). Weiterhin sind die meisten CD209<sup>+</sup> Zellen in Nierenzellkarzinom ercDC (Figel et al. 2011) und die meisten CD209<sup>+</sup> Zellen in den in dieser Arbeit untersuchten Tumoren waren VSIG4<sup>+</sup> (siehe Kapitel 5.2). So wurde die Hypothese formuliert, dass die VSIG4<sup>+</sup> ercDC durch den Kontakt mit T-Zellen im klarzelligen Nierenzellkarzinom die Expression von FOXO1 in den T-Zellen induzieren und so durch die Induktion von Zellzyklus-Arrest inhibierend auf die T-Zellen wirken. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden die Gewebe T90, T105, T114, T118, NN105, NN114, NN118 und G120 mit Antikörpern gegen VSIG4, FOXO1 und CD3 gefärbt und mittels Immunfluoreszenz untersucht. Es wurde geprüft, ob T-Zellen, die in Kontakt mit VSIG4<sup>+</sup> ercDC sind, häufiger FOXO1<sup>+</sup> sind als T-Zellen, die nicht in Kontakt mit VSIG4<sup>+</sup> ercDC sind.

Die Abbildung 5.3.1.1 zeigt ein exemplarisches HPF. Es gab viele Kontakte zwischen VSIG4<sup>+</sup> Zellen (grün) und T-Zellen (cyan) (eingerahmt und mit 1 gekennzeichnet, Vergrößerung in B

dargestellt). Mit 2 ist eine T-Zelle markiert, die keinen Kontakt zu VSIG4<sup>+</sup> Zellen hat. Einige T-Zellen, die im Kontakt mit VSIG4<sup>+</sup> Zellen standen, waren FOXO1<sup>+</sup> (rot) (vergrößerter Ausschnitt in B), während andere T-Zellen FOXO1<sup>-</sup> (gekennzeichnet mit Pfeil) waren. Vereinzelt waren auch CD3<sup>+</sup> Zellen VSIG4<sup>+</sup> sowohl in den Nierenzellkarzinomgeweben als auch in den tumorfreien Geweben. Um zu untersuchen, ob das FOXO1-Protein in den FOXO1<sup>+</sup> T-Zellen im Zytoplasma oder im Zellkern lokalisiert war, wurde eine optische z-Ebene ausgewählt und die Histogramme der Fluoreszenzfarbstoffe für CD3, FOXO1 und DAPI (Zellkernfärbung, dunkelblau) mittels der Software LAS AF Lite (Leica Microsystems, Wetzlar) aufeinander gelegt (Abbildung B). Die Fluoreszenz der FOXO1-Färbung überlagerte nicht mit der CD3-Färbung, welche eine Zelloberflächenfärbung ist. Vielmehr war das FOXO1-Histogramm zwischen den beiden Gipfeln des CD3-Histogramms gelegen und überlappte mit der DAPI DNA-Färbung. Somit kann man beurteilen, dass FOXO1 im Zellkern lokalisiert war, was auf ein aktives Protein hinweist.

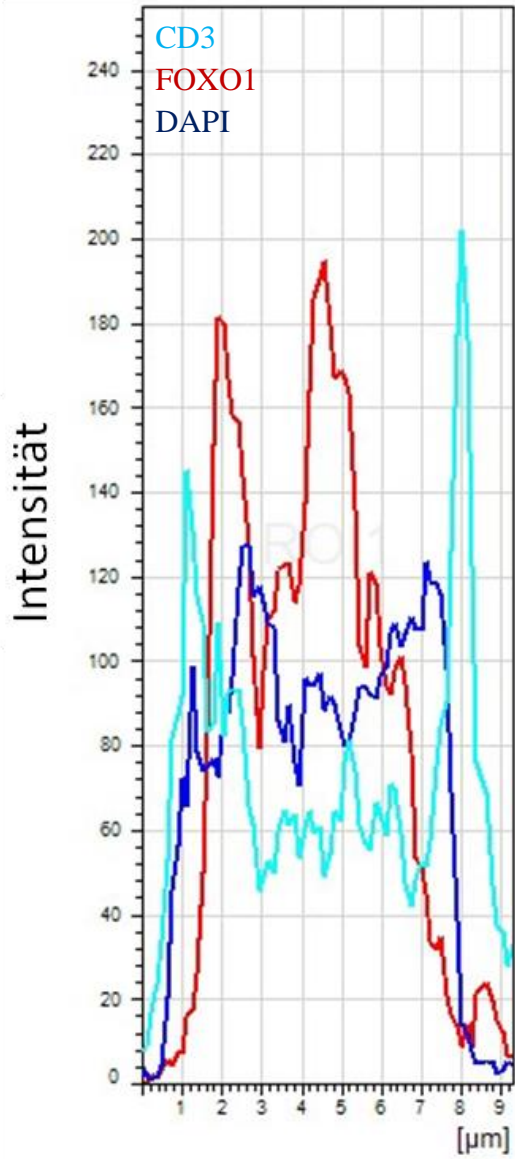
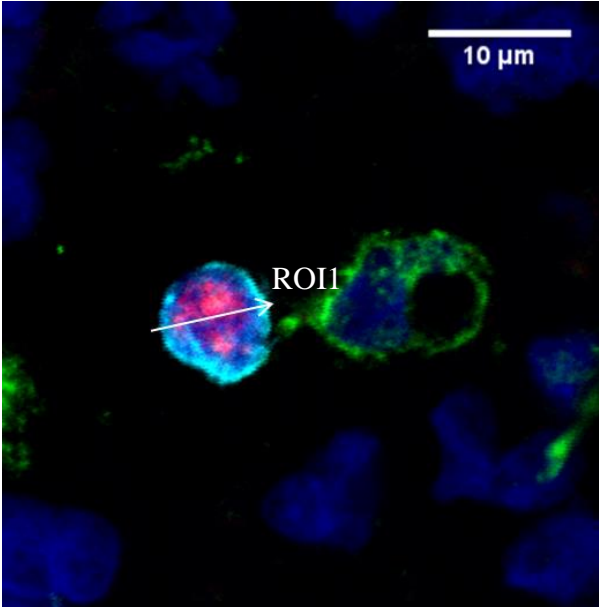
A)

VSIG4 FOXO1 CD3 DAPI



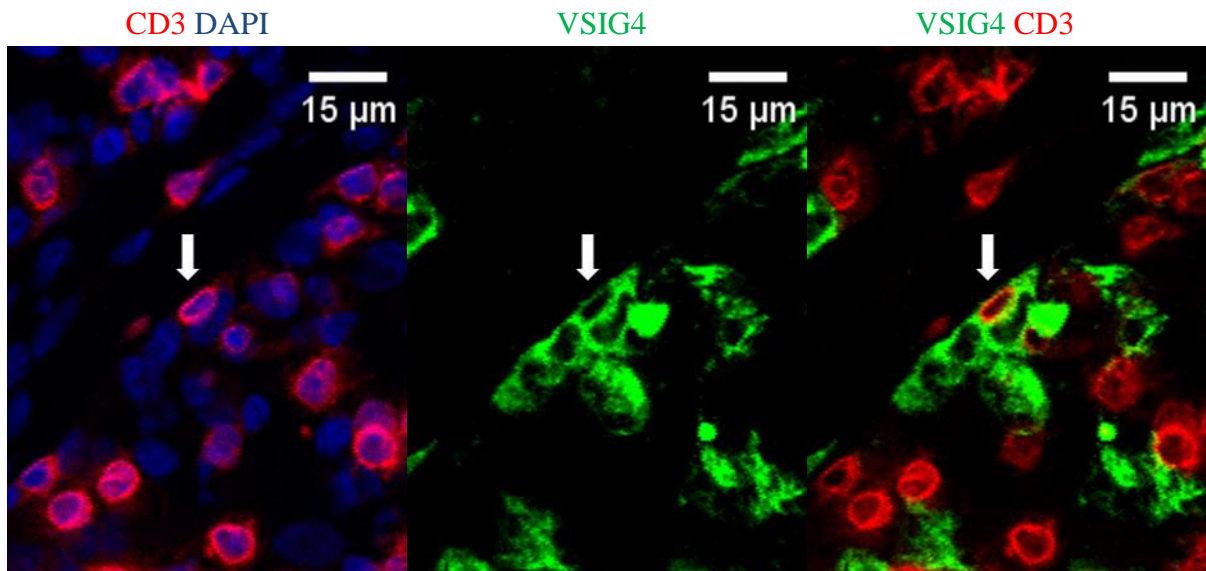
B)

VSIG4 FOXO1 CD3 DAPI





C)



**Abbildung 5.3.1.1. Immunfluoreszenzfärbung vom Nierenzellkarzinomgewebe für VSIG4, FOXO1 und CD3.**

**A)** Bildaufnahme der Immunfluoreszenzfärbung für VSIG4, FOXO1 und CD3. Das Bild stammt aus dem Tumor T114 und ist eine Überlagerung von 3 z-Ebenen (Abstand zwischen den z-Ebenen: 0,71 µm). VSIG4 ist in grün, FOXO1 ist in rot, CD3 ist in cyan und DAPI (Zellkernfärbung) ist in blau dargestellt. Markiert sind eine  $CD3^+FOXO1^+$  Zelle die in Kontakt mit einer  $VSIG4^+$  Zelle ist (1), eine  $CD3^+FOXO1^+$  Zelle ohne Kontakt mit  $VSIG4^+$  Zellen (2) und eine  $CD3^+FOXO1^-$  Zelle in Kontakt mit einer  $VSIG4^+$  Zelle (Pfeil). **B)** Vergrößerung der mit dem weißen Rechteck markierten Region des Bildes im Teil A) der Abbildung. Kontakt zwischen einer  $CD3^+FOXO1^+$  Zelle und einer  $VSIG4^+$  Zelle. VSIG4 ist in grün, FOXO1 ist in rot, CD3 ist in cyan und DAPI ist in blau dargestellt. Der Pfeil stellt den „Bereich von Interesse“ (*region of interest, ROI*) dar, entlang dessen in Richtung des Pfeils die Intensität der Fluoreszenzkanäle für CD3, FOXO1 und DAPI in einer optischen Ebene gemessen wird. Im Diagramm rechts sind die Intensitäten der drei Fluoreszenzkanäle in dieser optischen Ebene jeweils als Histogramme dargestellt und aufeinander gelegt. Die Überlappung der Histogramme für FOXO1 und DAPI, aber nicht für CD3, zeigt, dass FOXO1 zusammen mit DAPI im Zellkern lokalisiert ist. **C)** Bildaufnahme einer  $CD3^+VSIG4^+$  Zelle. Das Bild stammt aus dem Tumor T105 und ist eine Überlagerung aus 3 z-Ebenen (Abstand zwischen den z-Ebenen: 0,71 µm). VSIG4 ist in grün, CD3 ist in rot und DAPI ist in blau dargestellt. Markiert mit einem Pfeil ist eine  $CD3^+VSIG4^+$  Zelle.

Pro Gewebe wurden 10 nicht-überlappende HPFs ausgewertet. Die Zellpopulationen und die Kontakte zwischen  $VSIG4^+$  Zellen und T-Zellen wurden in den Geweben T90, T105, T114, T118, NN105, NN114 und NN118 quantitativ analysiert. Für G120 erfolgte eine qualitative Analyse, weil eine Auszählung der Zellen wegen der massiven Zellinfiltration nicht möglich war (Abbildung 5.3.1.3). Für jedes HPF wurde die Anzahl der  $VSIG4^+$  Zellen, der  $CD3^+$  Zellen, der  $CD3^+$  Zellen in und ohne Kontakt mit  $VSIG4^+$  Zellen, der  $CD3^+FOXO1^+$  Zellen und der  $CD3^+FOXO1^+$  Zellen in und ohne Kontakt mit  $VSIG4^+$  Zellen bestimmt. Daraus wurde für jedes HPF der prozentuale Anteil der Zellen mit  $VSIG4$ -Kontakt in der  $CD3^+FOXO1^+$  Zellpopulation und der Zellen ohne  $VSIG4$ -Kontakt in der  $CD3^+FOXO1^+$  Zellpopulation berechnet. Außerdem wurde für jedes HPF der prozentuale Anteil der  $FOXO1^+$  Zellen in den T-Zellen mit  $VSIG4$ -Kontakt und der prozentuale Anteil der  $FOXO1^+$  Zellen in den T-Zellen ohne  $VSIG4$ -Kontakt berechnet. Aus diesen Werten wurde dann der Median der Prozentanteile für das jeweilige Gewebe ermittelt. Daraus wurde anschließend der gemeinsame

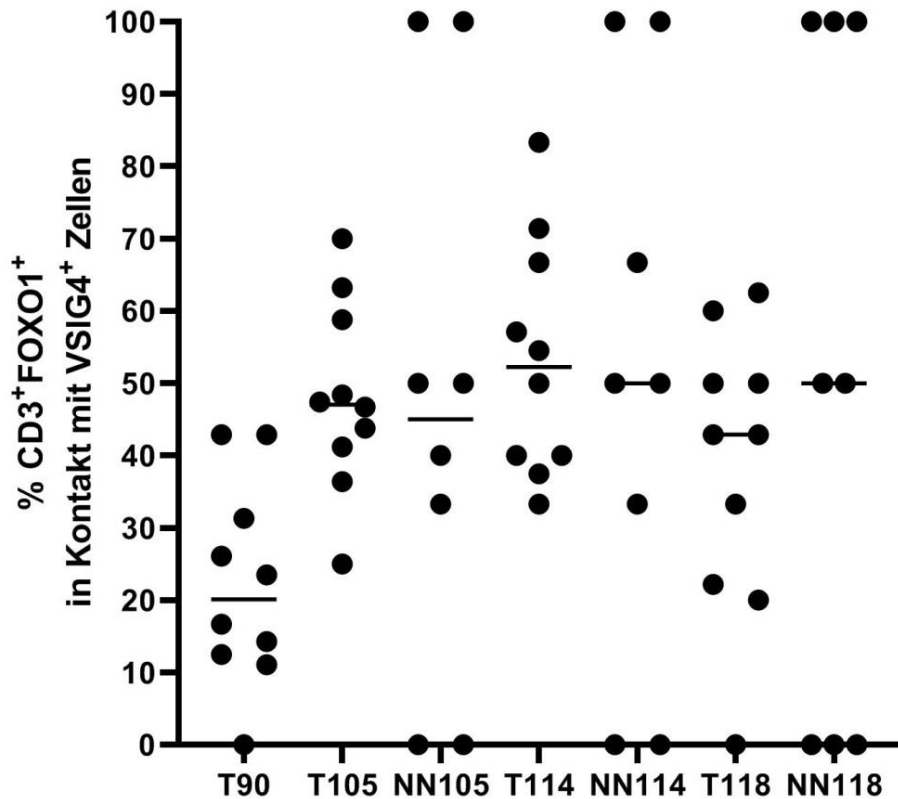
Median für alle Tumorgewebe und der gemeinsame Median für alle tumorfreien Gewebe berechnet.

Die Auszählung der Zellen ergab, dass 29,4% Prozent der tumorinfiltrierenden T-Zellen (Median, Spannweite: 11,8% - 41,4%) FOXO1<sup>+</sup> waren. Der Prozentsatz der FOXO1<sup>+</sup> T-Zellen war in den tumorfreien Geweben niedriger (Median: 12%, Spannweite: 5,8% - 16,8%) (siehe Tabelle 5.3.1.1). In den meisten Tumoren und in allen tumorfreien Geweben, wo die entsprechenden Prozentwerte jedoch niedriger waren, wurden die FOXO1<sup>+</sup> T-Zellen gleichermaßen häufig in Kontakt mit VSIG4<sup>+</sup> Zellen gefunden als ohne Kontakt mit VSIG4<sup>+</sup> Zellen (siehe Tabelle 5.3.1.1 und Abbildung 5.3.2.1). Eine Ausnahme war der Tumor T90, der sich in einem früheren Tumorstadium als die anderen Tumoren befand.

Gewebe		% der FOXO1 <sup>+</sup> Zellen in der CD3 <sup>+</sup> Zellpopulation (Spannweite)	p-Wert	% der Zellen mit VSIG4-Kontakt in der CD3 <sup>+</sup> FOXO1 <sup>+</sup> Zellpopulation (Spannweite)	p-Wert	% der Zellen ohne VSIG4-Kontakt in der CD3 <sup>+</sup> FOXO1 <sup>+</sup> Zellpopulation (Spannweite)	p-Wert
T90		30,4 (9,8-41)		20,1 (0-42,9)		79,9 (57,1-100)	
T105		11,8 (7,4-26,1)	0,8	47 (25-70)	0,8	53 (30-75)	0,8
	NN105	12 (0-25)		45 (0-100)		55 (0-100)	
T114		41,4 (15,4-53,6)	0,0003	52,3 (33,3-83,3)	0,8	47,7 (16,7-66,7)	0,8
	NN114	5,8 (0-42,9)		50 (0-100)		50 (0-100)	
T118		28,4 (13,9-52,6)	0,009	42,9 (0-62,5)	0,6	57,1 (37,5-100)	0,6
	NN118	16,8 (0-33,3)		50 (0-100)		50 (0-100)	
RCC		29,4 (11,8-41,4)	0,2	44,9 (20,1-52,3)	0,54	55,1 (47,7-79,9)	0,54
	NN	12 (5,8-16,8)		50 (45-50)		50 (50-55)	

**Tabelle 5.3.1.1. Prozentualer Anteil der FOXO1<sup>+</sup> Zellen in der CD3<sup>+</sup> Zellpopulation, der Zellen mit VSIG4-Kontakt in der CD3<sup>+</sup>FOXO1<sup>+</sup> Zellpopulation und der Zellen ohne VSIG4-Kontakt in der CD3<sup>+</sup>FOXO1<sup>+</sup> Zellpopulation.**

Pro HPF wurde die Anzahl der CD3<sup>+</sup> Zellen, der CD3<sup>+</sup>FOXO1<sup>+</sup> Zellen, der CD3<sup>+</sup>FOXO1<sup>+</sup> Zellen in Kontakt mit VSIG4<sup>+</sup> Zellen und der CD3<sup>+</sup>FOXO1<sup>+</sup> Zellen ohne Kontakt mit VSIG4<sup>+</sup> Zellen bestimmt. Anschließend wurde für jedes HPF der prozentuale Anteil der FOXO1<sup>+</sup> Zellen in der CD3<sup>+</sup> Zellpopulation, der Zellen mit VSIG4-Kontakt in der CD3<sup>+</sup>FOXO1<sup>+</sup> Zellpopulation und der Zellen ohne VSIG4-Kontakt in der CD3<sup>+</sup>FOXO1<sup>+</sup> Zellpopulation ermittelt. Es wurden für jedes Gewebe n=10 HPFs ausgewertet. Daraus wurde der Median der prozentualen Anteile für jedes Gewebe berechnet und in die Tabelle eingetragen. Aus diesen Werten wurde der Median der prozentualen Anteile für alle Tumoren und der Median der prozentualen Anteile für alle tumorfreien Gewebe bestimmt und ebenfalls in die Tabelle (RCC bzw. NN) eingetragen. Für die statistischen Analysen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet.



**Abbildung 5.3.1.2. Prozentualer Anteil der Zellen mit VSIG4-Kontakt in der CD3<sup>+</sup>FOXO1<sup>+</sup> Zellpopulation in Nierenzellkarzinomen und tumorfreien Geweben.**

Pro HPF wurde die Anzahl der CD3<sup>+</sup>FOXO1<sup>+</sup> Zellen und der CD3<sup>+</sup>FOXO1<sup>+</sup> Zellen in Kontakt mit VSIG4<sup>+</sup> Zellen bestimmt. Anschließend wurde für jedes HPF der prozentuale Anteil der Zellen mit VSIG4-Kontakt in der CD3<sup>+</sup>FOXO1<sup>+</sup> Zellpopulation ermittelt und auf der y-Achse dargestellt. Es wurden für jedes Gewebe n=10 HPFs ausgewertet. Jedes Symbol entspricht einem HPF. Die Linien sind die graphische Darstellung des Medians der prozentualen Anteile aus den dargestellten HPFs des jeweiligen Gewebes. Die Unterschiede zwischen Tumoren und tumorfreien Geweben sind nicht signifikant (siehe Tabelle 5.3.1.1). Für die statistischen Analysen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

In der Tabelle 5.3.1.2 sind die Prozentanteile der FOXO1<sup>+</sup> Zellen in den T-Zellen in Kontakt und in den T-Zellen ohne Kontakt mit VSIG4<sup>+</sup> Zellen aufgeführt. Im Anhang (Kapitel 8.1) ist weiterhin die absolute Anzahl (Median pro HPF) der VSIG4<sup>+</sup> Zellen, der CD3<sup>+</sup> Zellen, der CD3<sup>+</sup> Zellen mit VSIG4-Kontakt und der CD3<sup>+</sup>FOXO1<sup>+</sup> Zellen mit und ohne VSIG4-Kontakt aufgeführt.

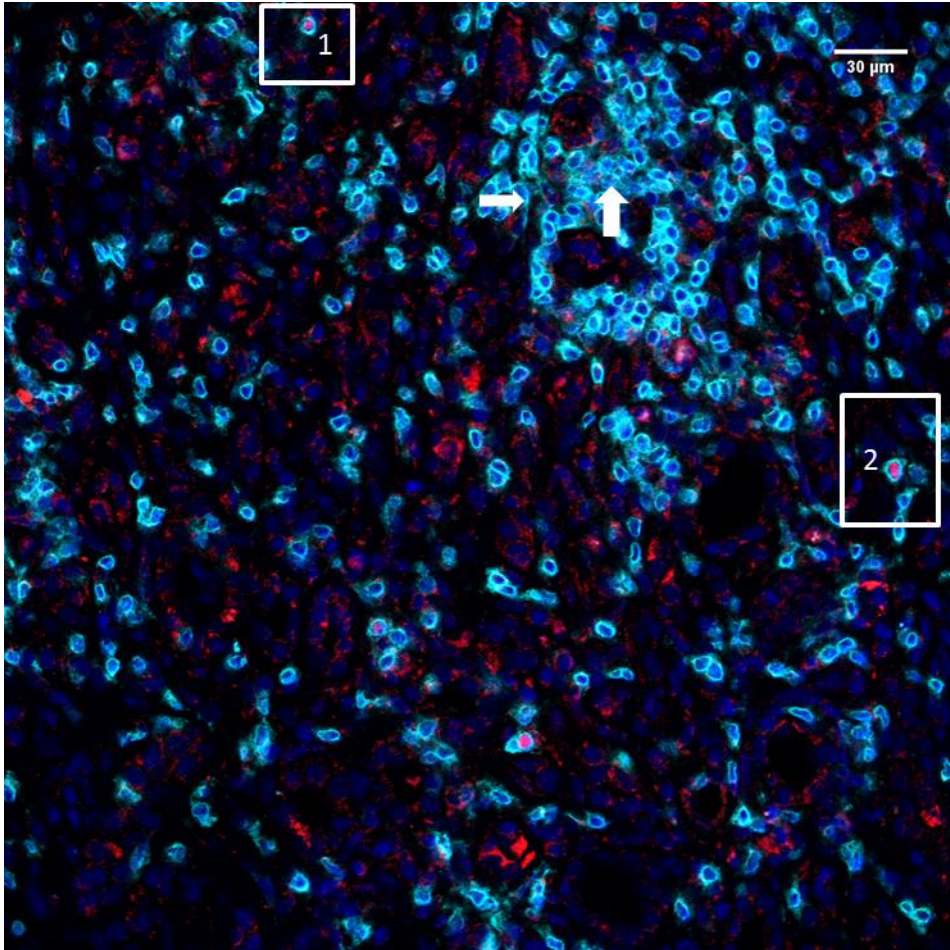
Gewebe		% der FOXO1 <sup>+</sup> Zellen in den CD3 <sup>+</sup> Zellen mit VSIG4-Kontakt (Spannweite)	p-Wert	% der FOXO1 <sup>+</sup> Zellen in den CD3 <sup>+</sup> Zellen ohne VSIG4-Kontakt (Spannweite)	p-Wert
T90		24,4 (0-66,7)		30,1 (11,3-46,7)	
T105		16,5 (7,1-45,5)	0,2	9 (2,4-18,6)	0,6
	NN105	13 (0-50)		7,9 (0-23,1)	
T114		48,1 (30-66,7)	<0,0001	29,2 (7,1-57,1)	0,002
	NN114	9,1 (0-40)		3,7 (0-44,4)	
T118		32,9 (0-66,7)	0,047	27 (11,1-62,5)	0,006
	NN118	7,1 (0-60)		6,3 (0-40)	
RCC		28,7 (16,5-48,1)	0,06	28,1 (9-30,1)	0,06
	NN	9,1 (7,1-13)		6,3 (3,7-7,9)	

**Tabelle 5.3.1.2. Prozentualer Anteil der FOXO1<sup>+</sup> Zellen in den CD3<sup>+</sup> Zellen mit und ohne VSIG4-Kontakt.**

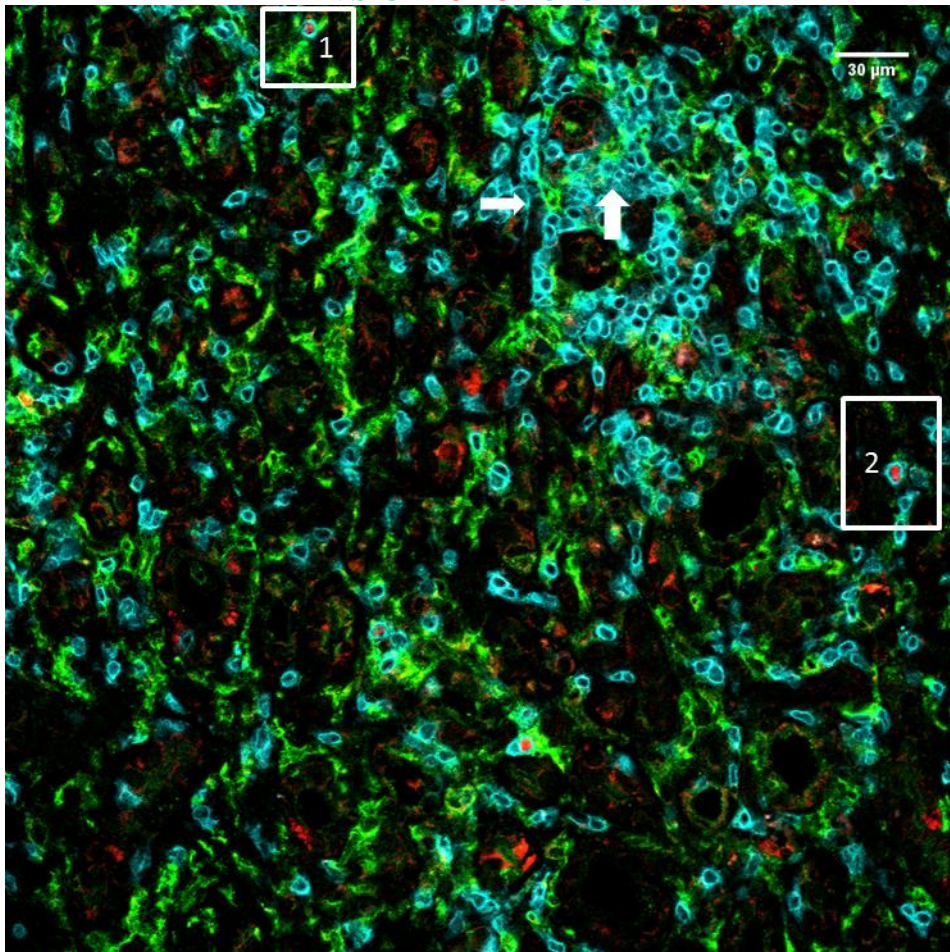
Pro HPF wurde die Anzahl der CD3<sup>+</sup> Zellen in Kontakt und ohne Kontakt mit VSIG4<sup>+</sup> Zellen, sowie auch die Anzahl der CD3<sup>+</sup>FOXO1<sup>+</sup> Zellen in Kontakt und ohne Kontakt mit VSIG4<sup>+</sup> Zellen bestimmt. Anschließend wurde für jedes HPF der prozentuale Anteil der FOXO1<sup>+</sup> Zellen in den CD3<sup>+</sup> Zellen mit VSIG4-Kontakt und in den CD3<sup>+</sup> Zellen ohne VSIG4-Kontakt ermittelt. Es wurden für jedes Gewebe n=10 HPFs ausgewertet. Daraus wurde der Median der prozentualen Anteile für jedes Gewebe berechnet und in die Tabelle eingetragen. Aus diesen Werten wurde der Median der prozentualen Anteile für alle Tumoren und der Median der prozentualen Anteile für alle tumorfreien Gewebe bestimmt und ebenfalls in die Tabelle (RCC bzw. NN) eingetragen. Für die statistischen Analysen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

Das Gewebe G120 kennzeichnete sich durch eine starke Infiltration mit VSIG4<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup> Zellen. Die Abbildung 5.3.1.3 zeigt zwei exemplarische HPFs von G120 für die Färbung. Die VSIG4<sup>+</sup> Zellen wurden häufig von Ansammlungen von CD3<sup>+</sup> Zellen umgeben (Abbildung 5.3.1.3, A und B, Pfeile). Es gab viele Kontakte zwischen CD3<sup>+</sup> und VSIG4<sup>+</sup> Zellen. In Relation zur großen Anzahl von CD3<sup>+</sup> Zellen war der Prozentsatz von FOXO1<sup>+</sup> T-Zellen klein. Die FOXO1<sup>+</sup> T-Zellen waren häufig in Kontakt mit VSIG4<sup>+</sup> Zellen (gekennzeichnet mit 1 in A und B). Die Mehrzahl der VSIG4<sup>+</sup> Zellen und der CD3<sup>+</sup> Zellen waren im Tubulointerstitium lokalisiert (Abbildung 5.3.1.3, A und B). In den Glomeruli befanden sich wenige CD3<sup>+</sup> Zellen und keine von diesen waren FOXO1<sup>+</sup> (Abbildung 5.3.1.3, C und D, Pfeile).

A) CD3 FOXO1 DAPI

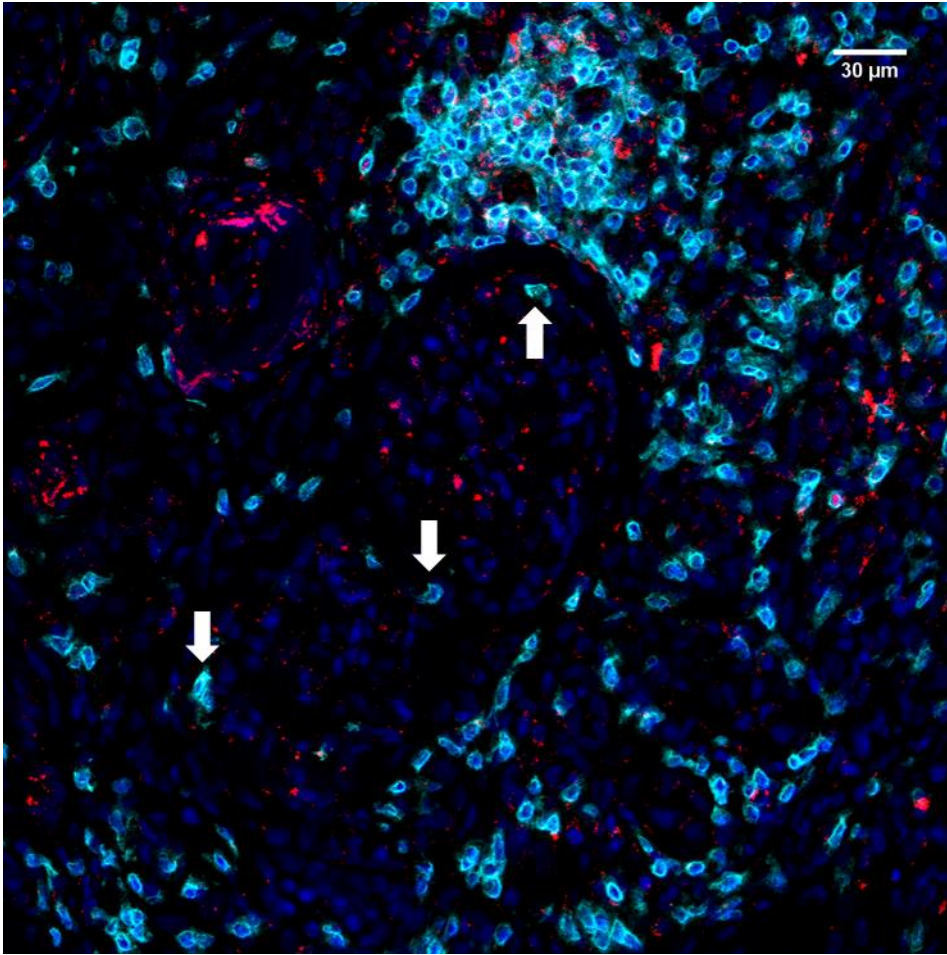


B) VSIG4 FOXO1 CD3



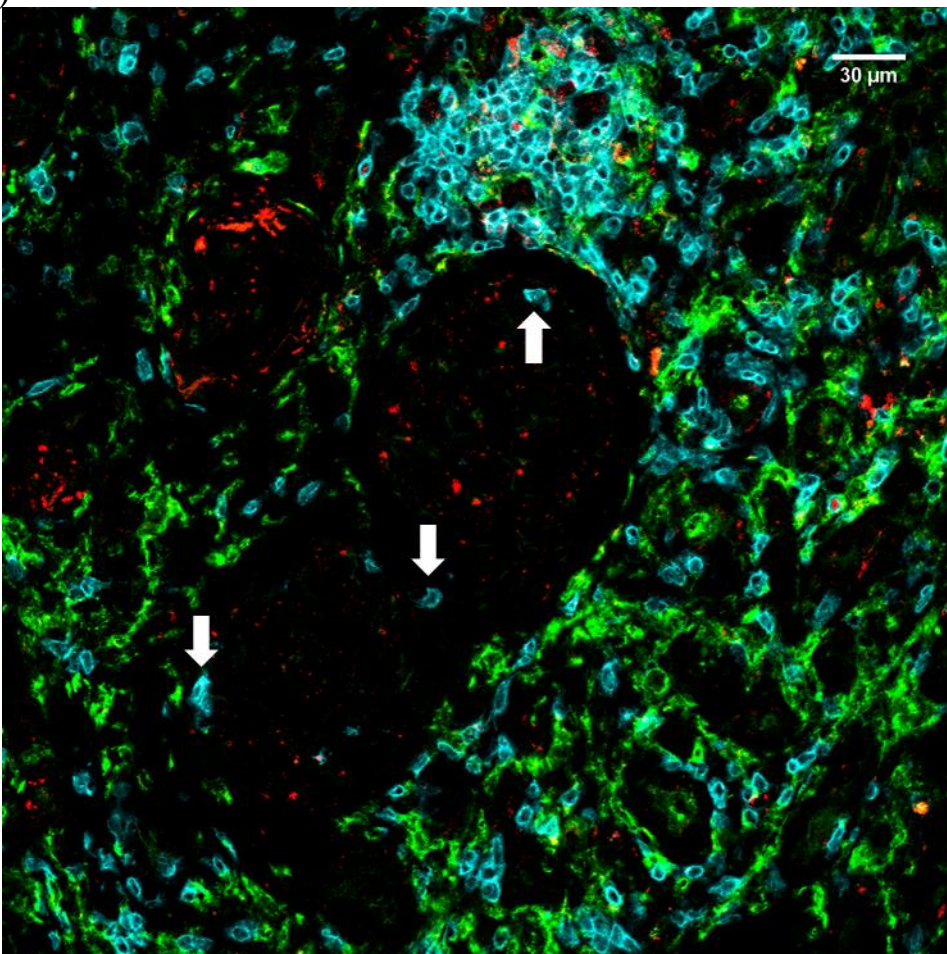
C)

CD3 FOXO1 DAPI



D)

VSIG4 FOXO1 CD3



### **Abbildung 5.3.1.3 Immunfluoreszenzfärbung des Gewebes G120 für VSIG4, FOXO1 und CD3.**

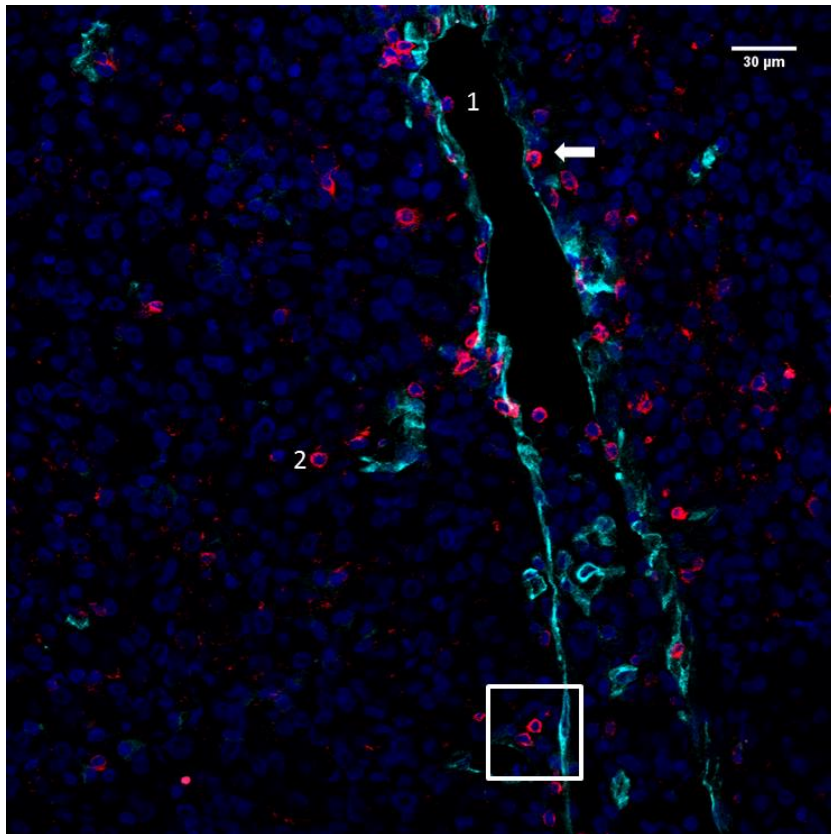
Abbildung vom Tubulointerstitium (A und B) und von zwei Glomeruli (C und D). Die Bilder A) und B) sowie C) und D) zeigen das gleiche HPF. Sie sind jeweils eine Überlagerung aus 4 z-Ebenen (A und B) bzw. aus 5 z-Ebenen (C und D). Der Abstand zwischen den z-Ebenen beträgt 0,71  $\mu\text{m}$ . In A) und C) werden die Fluoreszenzkanäle für CD3 (cyan), FOXO1 (rot) und DAPI (blau) gezeigt, der Fluoreszenzkanal für VSIG4 ist ausgeblendet. In B) und D) werden die Fluoreszenzkanäle für VSIG4 (grün), FOXO1 (rot) und CD3 (cyan) gezeigt, der Fluoreszenzkanal für DAPI ist ausgeblendet. In A) und B) ist eine CD3<sup>+</sup>FOXO1<sup>+</sup> Zelle in Kontakt mit einer VSIG4<sup>+</sup> Zelle (1) und eine CD3<sup>+</sup>FOXO1<sup>+</sup> Zelle ohne Kontakt mit VSIG4<sup>+</sup> Zellen (2) markiert. Die Pfeile zeigen Ansammlungen von CD3<sup>+</sup> Zellen um VSIG4<sup>+</sup> Zellen. In C) und D) sind drei CD3<sup>+</sup>FOXO1<sup>-</sup> Zellen (Pfeile) in den Glomeruli markiert.

## **5.3.2 Lokalisation der FOXO1<sup>+</sup> und FOXO1<sup>-</sup> T-Zellen in Bezug auf das Gefäßsystem**

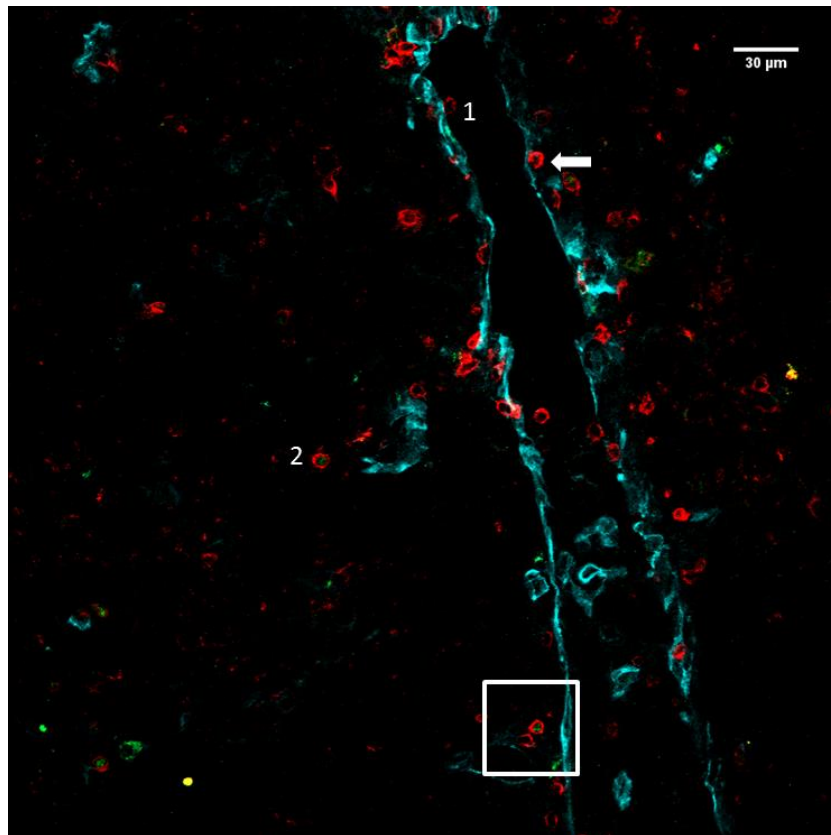
Unsere Arbeitsgruppe hat gezeigt, dass die T-Zellen im Nierenzellkarzinom in ihrer Mehrzahl extravasiiert sind (Masouris 2016). Die extravasiierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen waren in der Mehrzahl negativ für das zytotoxische Protein Perforin während die wenigen intravaskulären CD8<sup>+</sup> T-Zellen Perforin<sup>+</sup> waren (Masouris 2016). FOXO1 inhibiert die Expression des Transkriptionsfaktors T-bet und induziert die Expression von PD-1 (Rao et al. 2012; Staron et al. 2014). So wurde die Hypothese formuliert, ob die verminderte zytotoxische Ausstattung der extravasiierten T-Zellen auf die Expression von FOXO1 in diesen Zellen zurückgeführt werden könnte, während die intravaskulären T-Zellen durch fehlende FOXO1-Expression und folgend durch bessere zytotoxische Ausstattung charakterisiert wären. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden die Gewebe T90, T105, T114, T118, NN105, NN114, NN118 und G120 mit Antikörpern gegen CD3, FOXO1 und CD31 gefärbt. Die Abbildung 5.3.2.1 zeigt ein exemplarisches HPF. Die T-Zellen wurden entsprechend ihrer Lokalisation zur Vaskulatur in drei Kategorien eingeteilt: intravaskulär, perivaskulär und parenchymatös. Die intravaskulären T-Zellen waren innerhalb des Gefäßlumens lokalisiert (Abbildung 5.3.2.1, Zelle 1). Die extravasiierten T-Zellen wurden entweder als perivaskulär oder als parenchymatös charakterisiert. Die perivaskulären T-Zellen lagen tumoral am Gefäß an (Abbildung 5.3.2.1, Pfeil), während die parenchymatösen T-Zellen sich von den Gefäßen entfernt im Gewebeparenchym befanden (Abbildung 5.3.2.1, Zelle 2). Um zu untersuchen, ob das FOXO1-Protein in den FOXO1<sup>+</sup> T-Zellen im Zytoplasma oder im Zellkern lokalisiert war, also aktiv oder inaktiv war, wurde eine optische Ebene ausgewählt und die Histogramme der Fluoreszenzfarbstoffe für CD3, FOXO1 und DAPI mittels der Software LAS AF Lite (Leica Microsystems, Wetzlar) aufeinander gelegt. Die FOXO1-Fluoreszenz überlappte mit der Fluoreszenz der DNA-Färbung DAPI. Somit konnte gezeigt werden, dass FOXO1 im Zellkern lokalisiert war, was auf ein aktives Protein hinweist. Abbildung 5.3.2.1 zeigt ein Beispiel der Histogramme für die drei Fluoreszenzfarbstoffe.

A)

CD3 CD31 DAPI



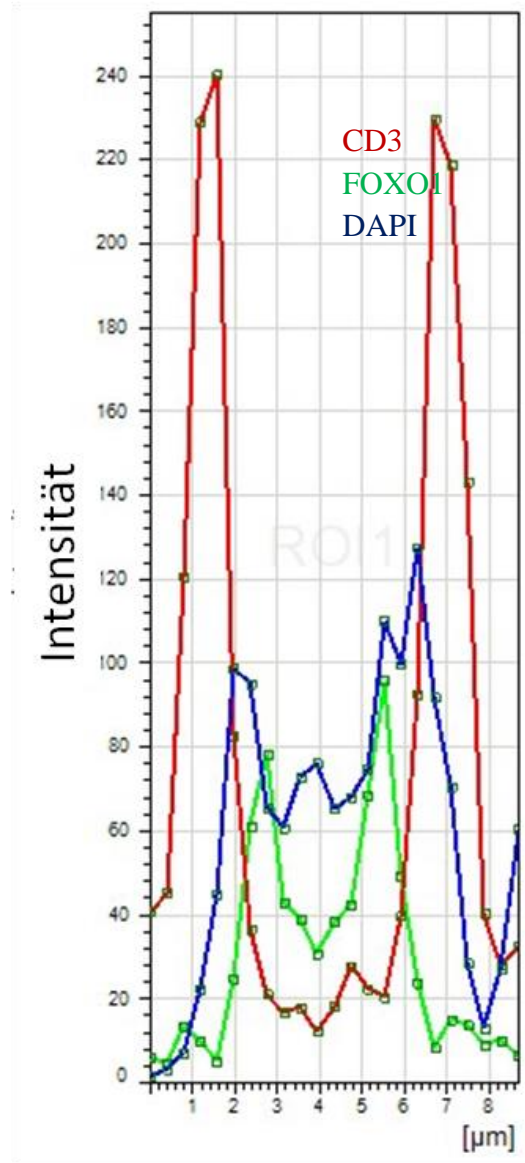
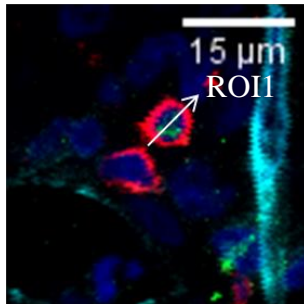
FOXO1 CD3 CD31





B)

CD3 FOXO1 CD31 DAPI



**Abbildung 5.3.2.1. Immunfluoreszenzfärbung vom Nierenzellkarzinomgewebe für CD3, FOXO1 und CD31.**

**A)** Bildaufnahmen der Immunfluoreszenzfärbung für FOXO1, CD3 und CD31. Beide Bilder zeigen das gleiche HPF. Im oberen Bild werden die Fluoreszenzkanäle für CD3 (rot), CD31 (cyan) und DAPI (blau) gezeigt, der Fluoreszenzkanal für FOXO1 ist ausgeblendet. Im unteren Bild werden die Fluoreszenzkanäle für CD3 (rot), FOXO1 (grün) und CD31 (cyan) gezeigt, der Fluoreszenzkanal für DAPI ist ausgeblendet. Das Bild stammt aus dem Tumor T105 und ist eine Überlagerung von 5 z-Ebenen (Abstand zwischen den z-Ebenen: 0,71  $\mu\text{m}$ ). Markiert sind eine intravaskuläre FOXO1<sup>-</sup> T-Zelle (1), eine perivaskuläre FOXO1<sup>-</sup> T-Zelle (Pfeil) und eine parenchymatöse FOXO1<sup>+</sup> T-Zelle (2).

**B)** Vergrößerung des in A) eingerahmten Bildausschnittes, welches eine CD3<sup>+</sup>FOXO1<sup>+</sup> Zelle zeigt. CD3 ist in rot, FOXO1 ist in grün, CD31 ist in cyan und DAPI ist in blau dargestellt. Der Pfeil stellt den „Bereich von Interesse“ (*region of interest, ROI*) dar, entlang dessen in Richtung des Pfeils die Intensität der Fluoreszenzkanäle für CD3, FOXO1 und DAPI in einer optischen Ebene gemessen wird. Im Diagramm rechts sind die Intensitäten der drei Fluoreszenzkanäle in dieser optischen Ebene jeweils als Histogramme dargestellt und aufeinander gelegt. Die Überlappung der Histogramme für FOXO1 und DAPI, aber nicht für CD3, zeigt, dass FOXO1 zusammen mit DAPI im Zellkern lokalisiert ist.

Pro Gewebe wurden 10 nicht-überlappende HPFs ausgewertet. Die CD3<sup>+</sup>FOXO1<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup>FOXO1<sup>-</sup> Zellen in jedem der drei Kompartimente (intravaskulär, perivaskulär, parenchymatös) wurden in den Geweben T90, T105, T114, T118, NN105, NN114 und NN118

quantitativ analysiert. Für G120 erfolgte eine qualitative Analyse, weil eine Auszählung der Zellen wegen der massiven Zellinfiltration nicht möglich war (Abbildung 5.3.2.3). Für jedes HPF wurde die Anzahl der CD3<sup>+</sup>FOXO1<sup>+</sup> Zellen und der CD3<sup>+</sup>FOXO1<sup>-</sup> Zellen in jedem Kompartiment bestimmt. Folgend wurde in jedem Kompartiment der prozentuale Anteil der FOXO1<sup>+</sup> Zellen und der FOXO1<sup>-</sup> Zellen in der CD3<sup>+</sup> Zellpopulation des jeweiligen Kompartimentes berechnet. Aus diesen Werten wurde der Median der Prozentanteile der zwei Zellpopulationen in jedem Kompartiment für das jeweilige Gewebe ermittelt. Daraus wurde anschließend der gemeinsame Median für alle Tumorgewebe und der gemeinsame Median für alle tumorfreien Gewebe berechnet.

Die Auszählung der Zellen ergab, dass die meisten T-Zellen in den Tumorgeweben perivaskulär (Median: 48%, Spannweite: 47,3% - 71,6%) oder parenchymatös (Median: 44,9%, Spannweite: 25,4% - 51,1%) lokalisiert waren. Intravaskulär befand sich ein kleiner Anteil der T-Zellen (Median: 1,9%, Spannweite: 1,3% - 9,2%). Die Auswertung der tumorfreien Gewebe ergab ähnliche Ergebnisse: auch da befanden sich die meisten T-Zellen perivaskulär (Median: 67,9%, Spannweite: 61,5% - 71,4%) und parenchymatös (Median: 24,7%, Spannweite: 19,9% - 25,4%). Die intravaskulären T-Zellen waren weniger (Median: 3,5%, Spannweite: 3,1% - 12,1%).

Weiterhin war die Mehrzahl der T-Zellen in den Nierenzellkarzinomen FOXO1<sup>-</sup>. Dies war der Fall in jedem der drei Kompartimente: sowohl intravaskulär (Median: 87,5%, Spannweite: 50% - 100%), als auch perivaskulär (Median: 71,1%, Spannweite: 37,9% - 80,9%) und parenchymatös (Median: 68,3%, Spannweite: 44,8% - 76,7%). Jedoch war der prozentuale Anteil der FOXO1<sup>-</sup> Zellen in den CD3<sup>+</sup> Zellen in jedem untersuchten Tumor intravaskulär am höchsten, während der prozentuale Anteil der FOXO1<sup>+</sup> Zellen in den CD3<sup>+</sup> Zellen in jedem untersuchten Tumor perivaskulär und parenchymatös höher war als intravaskulär. Die Anteile der CD3<sup>+</sup>FOXO1<sup>+</sup> Zellen perivaskulär und parenchymatös waren ähnlich.

In den tumorfreien Geweben waren ebenfalls die meisten CD3<sup>+</sup> Zellen FOXO1<sup>-</sup>, sowohl in dem intravaskulären Kompartiment (Median: 100%, Spannweite: 75% - 100%) wie auch in dem perivaskulären Kompartiment (Median: 86,5%, Spannweite: 77,1% - 100%) und dem parenchymatösen Kompartiment (Median: 100%, Spannweite: 88,2% - 100%).

Verglich man die Tumoren mit den tumorfreien Geweben, war der prozentuale Anteil der FOXO1<sup>+</sup> Zellen in den CD3<sup>+</sup> Zellen in jedem Kompartiment des jeweiligen Tumorgewebes höher als im entsprechenden tumorfreien Gewebe. Die absoluten Anzahlen der CD3<sup>+</sup>FOXO1<sup>+</sup> Zellen in jedem Kompartiment waren in den Tumoren in den allermeisten Fällen höher. In der Tabelle 5.3.2.1 sind die absoluten Anzahlen (Summe aus 10 HPFs) der CD3<sup>+</sup>FOXO1<sup>+</sup> Zellen in jedem Kompartiment für alle quantitativ analysierten Nierenzellkarzinome und tumorfreien Gewebe aufgeführt. In der Tabelle 5.3.2.2 sind die prozentualen Anteile der CD3<sup>+</sup>FOXO1<sup>+</sup> Zellen in den drei Kompartimenten in den Nierenzellkarzinomen und in den tumorfreien Geweben aufgeführt. In der Abbildung 5.3.2.2 sind die prozentualen Anteile der FOXO1<sup>+</sup> Zellen in den CD3<sup>+</sup> Zellen des jeweiligen Kompartiments in den Nierenzellkarzinomen und in den tumorfreien Geweben graphisch dargestellt. Im Anhang (Kapitel 8.2) sind die absoluten Anzahlen (Summe aus 10 HPFs) der CD3<sup>+</sup> Zellen und der CD3<sup>+</sup>FOXO1<sup>-</sup> Zellen in den verschiedenen Kompartimenten für alle quantitativ analysierten Gewebe aufgeführt.

Gewebe		CD3 <sup>+</sup> FOXO1 <sup>+</sup> Zellen aus 10 HPF (Spannweite der absoluten Zellanzahl pro HPF)		
		Intravaskulär	Perivaskulär	Parenchymatös
T90		2 (0-1)	80 (2-17)	41 (0-15)
T105		4 (0-1)	172 (9-26)	209 (9-32)
	NN105	1 (0-1)	25 (0-5)	8 (0-3)
T114		8 (0-2)	38 (0-9)	37 (1-10)
	NN114	3 (0-1)	6 (0-2)	2 (0-1)
T118		5 (0-2)	116 (6-25)	96 (2-15)
	NN118	7 (0-3)	18 (0-4)	8 (0-2)

**Tabelle 5.3.2.1. Absolute Anzahlen der CD3<sup>+</sup>FOXO1<sup>+</sup> Zellen in den verschiedenen Kompartimenten in Nierenzellkarzinomen und tumorfreien Geweben.**

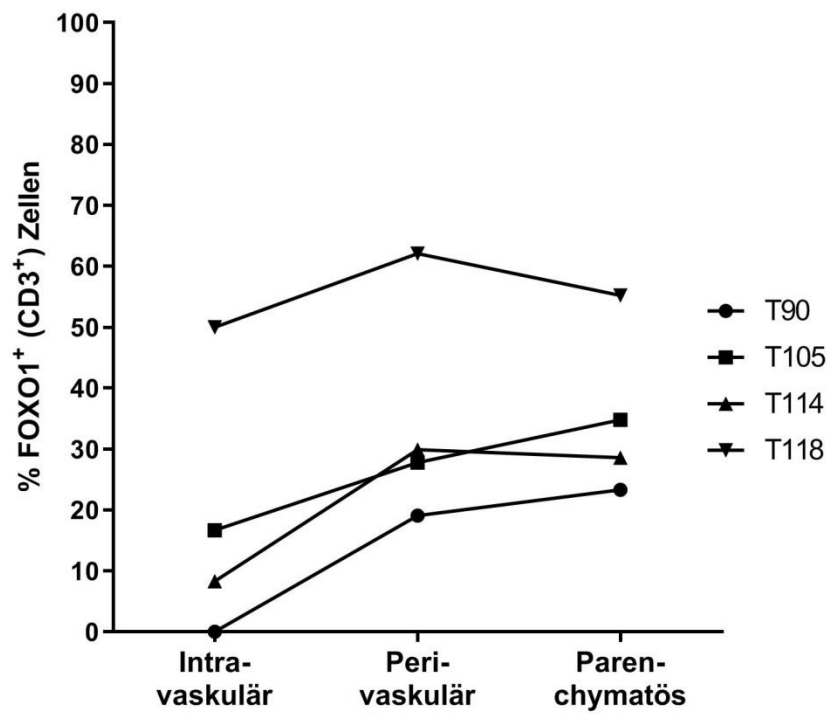
Pro HPF wurde die Anzahl der CD3<sup>+</sup>FOXO1<sup>+</sup> Zellen in jedem Kompartiment ermittelt. Anschließend wurden für jedes Kompartiment die Anzahlen der CD3<sup>+</sup>FOXO1<sup>+</sup> Zellen aus 10 HPFs des Gewebes addiert und die Summen wurden in die Tabelle eingetragen.

Gewebe		% der FOXO1 <sup>+</sup> Zellen in den CD3 <sup>+</sup> Zellen des jeweiligen Kompartiments (Spannweite)		
		Intravaskulär	Perivaskulär	Parenchymatös
T90		0,0 (0-100)	19,1 (7,4-31,8)	23,3 (0-35)
T105		16,7 (0-100)	27,8 (18,8-66,7)	34,8 (17,4-63,3)
	NN105	0,0 (0-50)	22,9 (0-33,3)	0,0 (0-33,3)
T114		8,3 (0-100)	29,9 (0-57,1)	28,6 (14,3-35,3)
	NN114	0,0 (0-100)	0,0 (0-8,3)	0,0 (0-33,3)
T118		50,0 (0-100)	62,1 (29,6-100)	55,2 (22,2-83,3)
	NN118	25 (0-100)	13,5 (0-37,5)	11,8 (0-50)
RCC		12,5 (0-50)	28,9 (19,1-62,1)	31,7 (23,3-55,2)
	NN	0,0 (0-25)	13,5 (0-22,9)	0,0 (0-11,8)

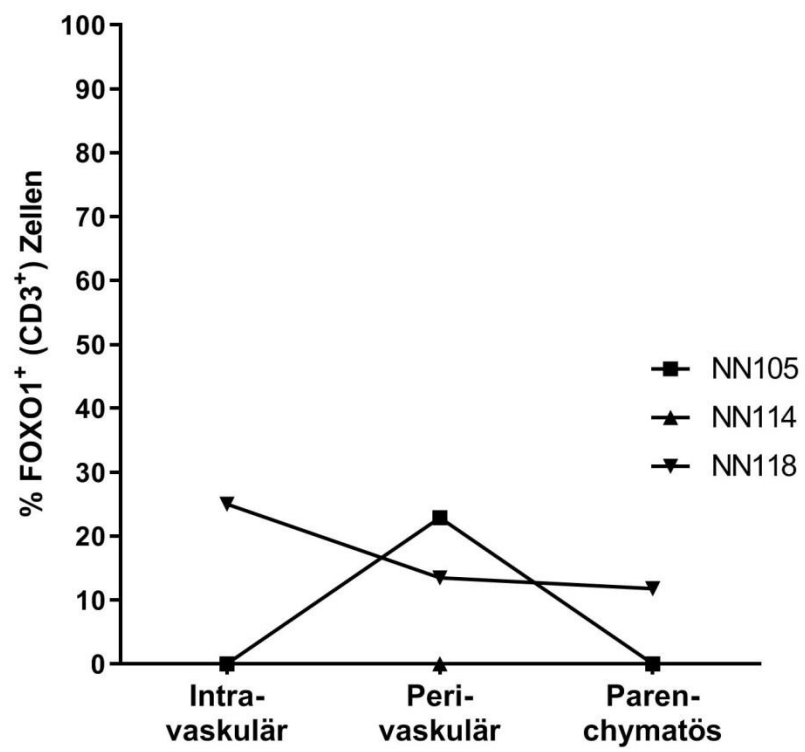
**Tabelle 5.3.2.2. Prozentualer Anteil der FOXO1<sup>+</sup> Zellen in den CD3<sup>+</sup> Zellen des jeweiligen Kompartiments in Nierenzellkarzinomen und tumorfreien Geweben.**

Pro HPF wurde die Anzahl der CD3<sup>+</sup> Zellen und der CD3<sup>+</sup>FOXO1<sup>+</sup> Zellen in jedem Kompartiment ermittelt. Anschließend wurde der prozentuale Anteil der FOXO1<sup>+</sup> Zellen in den CD3<sup>+</sup> Zellen des jeweiligen Kompartiments in jedem HPF ermittelt. Es wurden für jedes Gewebe n=10 HPFs ausgewertet. Daraus wurde der Median der prozentualen Anteile in jedem Kompartiment für jedes Gewebe berechnet und in die Tabelle eingetragen. Aus den Werten der einzelnen Gewebe wurde der Median der prozentualen Anteile für alle Tumoren und für alle tumorfreien Gewebe bestimmt und ebenfalls in die Tabelle (RCC bzw. NN) eingetragen.

A)



B)



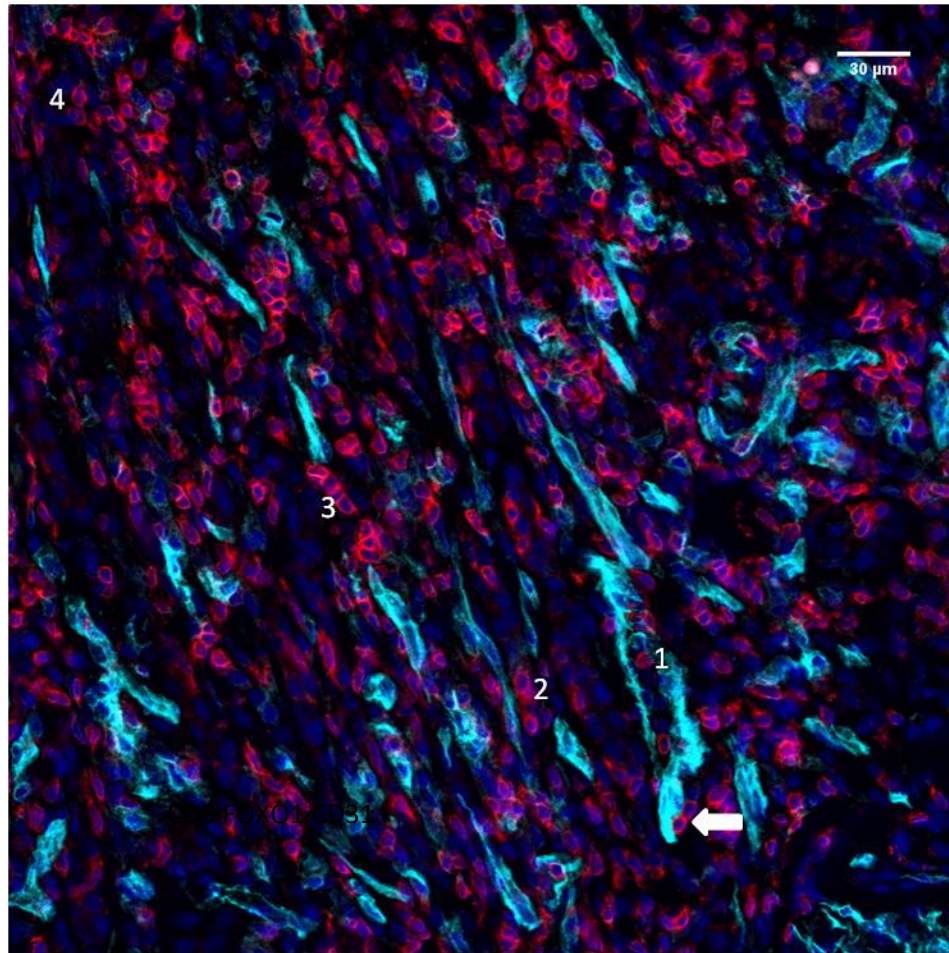
**Abbildung 5.3.2.2. Prozentualer Anteil der FOXO1<sup>+</sup> Zellen in den CD3<sup>+</sup> Zellen des jeweiligen Kompartiments in Nierenzellkarzinomen (A) und tumorfreien Geweben (B).**

Pro HPF wurde in jedem der drei Kompartimente die Anzahl der CD3<sup>+</sup> Zellen und der CD3<sup>+</sup>FOXO1<sup>+</sup> Zellen bestimmt. Daraus wurde der prozentuale Anteil der FOXO1<sup>+</sup> Zellen in den CD3<sup>+</sup> Zellen jedes Kompartiments ermittelt. Es wurden für jedes Gewebe n=10 HPFs ausgewertet. Aus diesen Werten wurde anschließend der Median der prozentualen Anteile für jedes Gewebe berechnet und in der y-Achse dargestellt. Eine Gruppe von drei Symbolen, die durch eine Linie verbunden sind, gehört zum selben Patienten. Für die statistischen Analysen wurde der Kruskal-Wallis-Test in Kombination mit dem Mehrfachvergleiche-Test nach Dunn verwendet. Die Unterschiede zwischen den prozentualen Anteilen der Kompartimente sind sowohl für die Tumorgewebe als auch für die tumorfreien Gewebe nicht statistisch signifikant.

Das Nierengewebe G120 wurde durch eine große Anzahl von CD3<sup>+</sup> Zellen infiltriert. Die Abbildung 5.3.2.3 zeigt zwei exemplarische HPFs von G120 für die Färbung. Die Mehrzahl der CD3<sup>+</sup> Zellen waren extravasiert, nur wenige T-Zellen befanden sich intravaskulär. Die meisten intravaskulären T-Zellen waren FOXO1<sup>-</sup>. Die CD3<sup>+</sup>FOXO1<sup>+</sup> Zellen waren überwiegend perivaskulär und parenchymatös lokalisiert. Im Vergleich zur großen Anzahl von T-Zellen war jedoch der Prozentanteil der CD3<sup>+</sup>FOXO1<sup>+</sup> Zellen niedrig. Die Mehrzahl der CD3<sup>+</sup> Zellen waren im Tubulointerstitium lokalisiert (Abbildung 5.3.2.3, A und B). In den Glomeruli befanden sich wenige CD3<sup>+</sup> Zellen und keine von diesen waren FOXO1<sup>+</sup> (Abbildung 5.3.2.3, C und D).

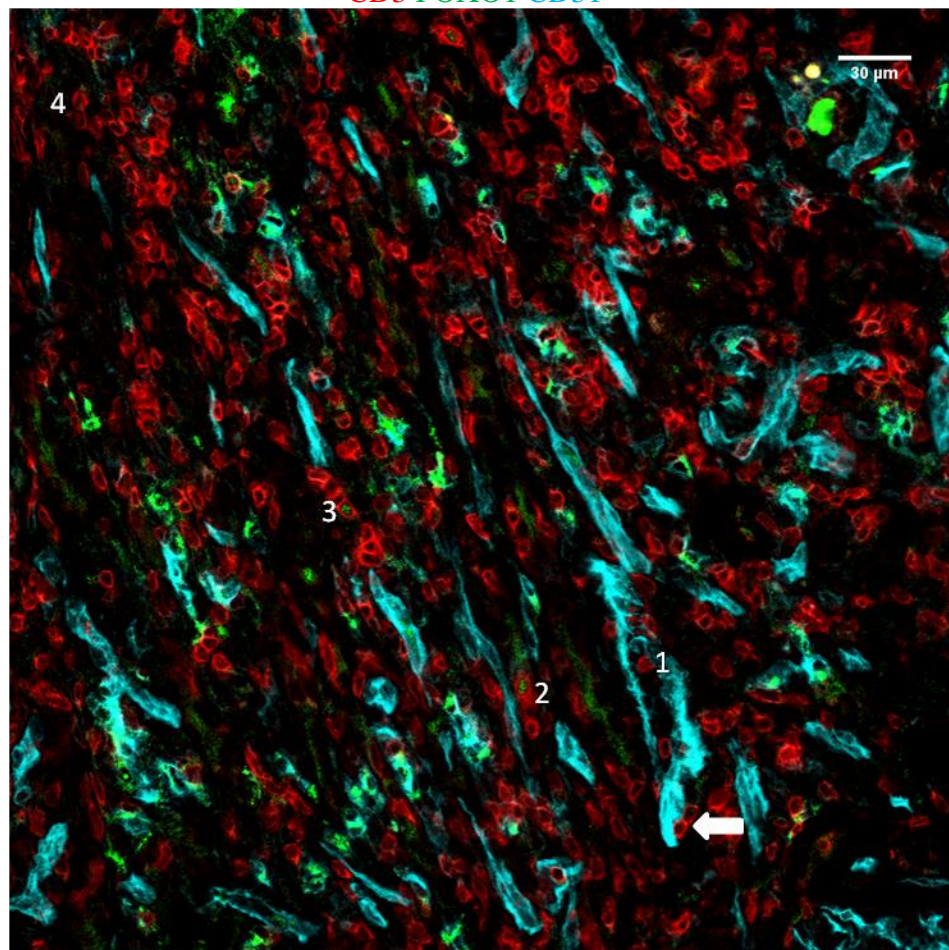
A)

CD3 CD31 DAPI



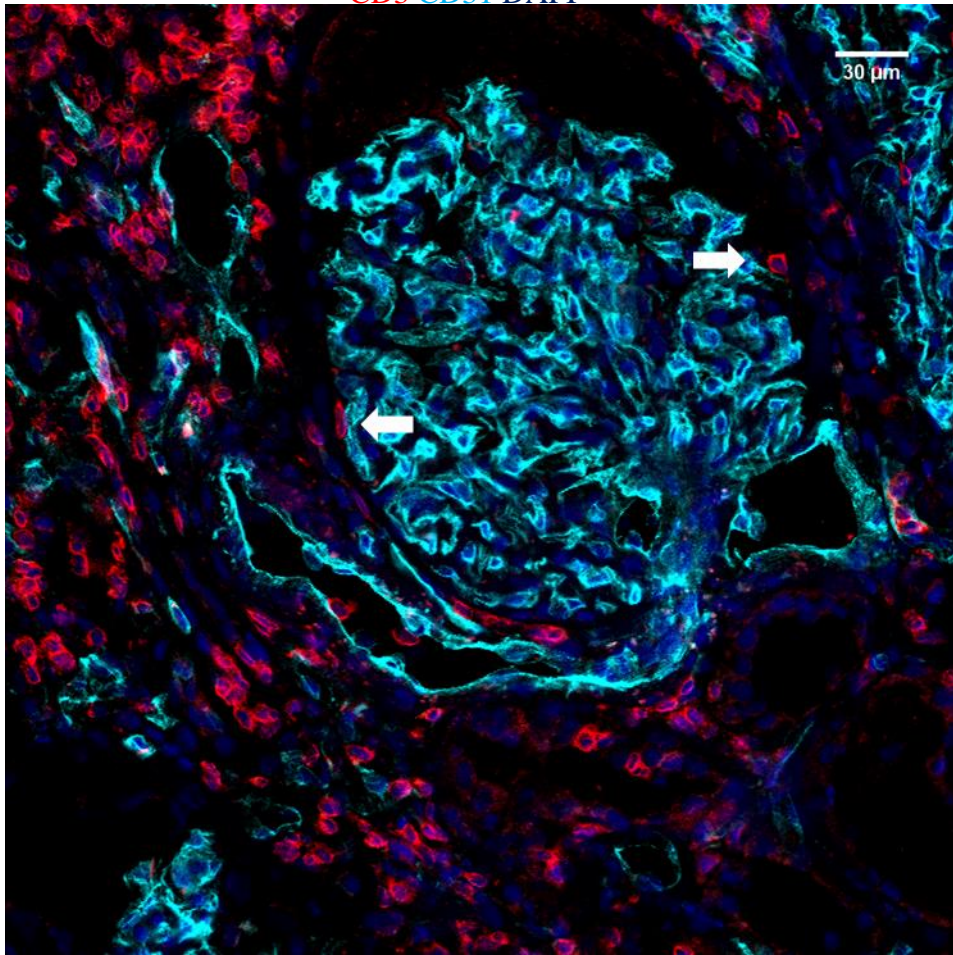
B)

CD3 FOXO1 CD31



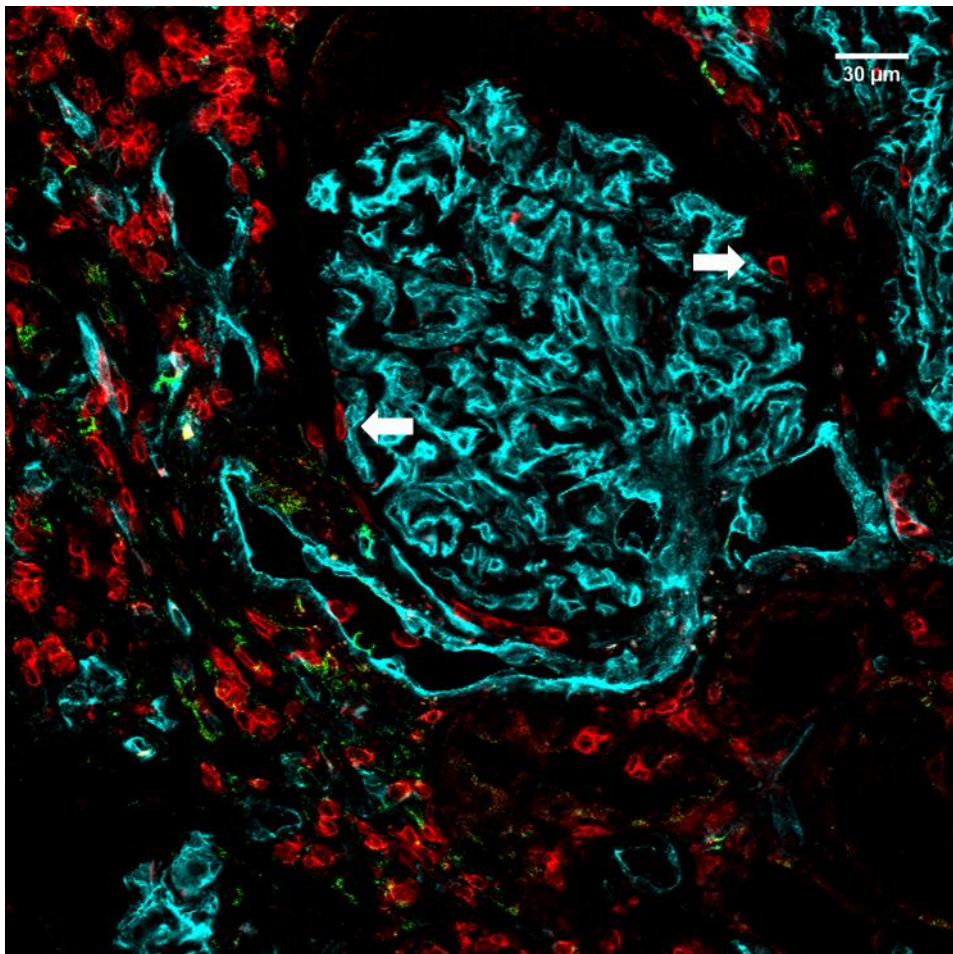
C)

CD3 CD31 DAPI



D)

CD3 FOXO1 CD31



### **Abbildung 5.3.2.3. Immunfluoreszenzfärbung des Gewebes G120 für CD3, FOXO1 und CD31.**

Abbildung vom Tubulointerstitium (A und B) und von einem Glomerulus (C und D). Die Bilder A) und B) sowie C) und D) zeigen das gleiche HPF. Sie sind jeweils eine Überlagerung aus 6 z-Ebenen (A und B) bzw. aus 4 z-Ebenen (C und D). Der Abstand zwischen den z-Ebenen beträgt 0,71  $\mu\text{m}$ . In A) und C) werden die Fluoreszenzkanäle für CD3 (rot), CD31 (cyan) und DAPI (blau) gezeigt, der Fluoreszenzkanal für FOXO1 ist ausgeblendet. In B) und D) werden die Fluoreszenzkanäle für CD3 (rot), FOXO1 (grün) und CD31 (cyan) gezeigt, der Fluoreszenzkanal für DAPI ist ausgeblendet. In A) und B) sind eine intravaskuläre FOXO1<sup>-</sup> T-Zelle (1), eine perivaskuläre FOXO1<sup>+</sup> T-Zelle (2), zwei perivaskuläre FOXO1<sup>-</sup> T-Zellen (Pfeil), eine parenchymatöse FOXO1<sup>+</sup> T-Zelle (3) sowie auch parenchymatöse FOXO1<sup>-</sup> T-Zellen (4) markiert. In C) und D) sind zwei perivaskuläre FOXO1<sup>-</sup> T-Zellen (Pfeile) im Glomerulus markiert.



## 6 Diskussion

Das Nierenzellkarzinom ist als ein immunogener Tumor beschrieben, in welchem man regelmäßig ein T-Zellinfiltrat nachweisen kann. Trotzdem können die tumorinfiltrierenden Immunzellen in den allermeisten Fällen die Progression der Erkrankung nicht verhindern. Paradoxe Weise sind Immunzellinfiltrate im klarzelligen Nierenzellkarzinom, im Gegensatz zu vielen anderen soliden Tumoren, mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Webster et al. 2006), was wiederum auf die eingeschränkte Fähigkeit der Immunzellen hinweist, das Tumorwachstum zu kontrollieren (Figel et al. 2011).

Die in den letzten Jahren neu zugelassenen Therapien, wie der PD-1-Inhibitor Nivolumab, weisen eine akzeptable Toxizität auf und haben das Gesamtüberleben von Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom signifikant verbessert (Merza und Bilusic 2017). Obwohl das Nierenzellkarzinom gutes Ansprechen auf Immuntherapien zeigt, sind dauerhafte, komplette Remissionen der fortgeschrittenen Erkrankung unter den aktuell vorhandenen Behandlungsansätzen selten (Merza und Bilusic 2017). Aus diesem Grund ist die Entwicklung neuer Therapien für das Nierenzellkarzinom immer noch notwendig.

Das Protein der B7-Familie *V-set and immunoglobulin domain-containing protein 4* (VSIG4), auch *complement receptor immunoglobulin* (CR1g) oder Z39Ig genannt, stellt ein potenzielles Ziel solcher Therapien dar. Publierte Daten legen nahe, dass VSIG4 neben seiner antiinfektiösen Wirkung als Komplementrezeptor (Helmy et al. 2006; He et al. 2013) auch die Proliferation und die Aktivierung der T-Zellen mindestens so stark wie PD-L1 und PD-L2 inhibieren kann (Vogt et al. 2006). Der genaue Mechanismus dieser Hemmung bleibt jedoch unklar. VSIG4 ist in einigen Tumoren hochreguliert und mit einer schlechteren Prognose assoziiert, wie beispielsweise bei den WHO-Grad-III- und -IV-Gliomen (Xu et al. 2015), bei dem multiplen Myelom (Roh et al. 2017), beim Ovarialkarzinom (Byun et al. 2017) und bei bestimmten Formen des Kolonkarzinoms (Menyhart et al. 2019). Ob VSIG4 auch eine Rolle bei der Entstehung und dem Wachstum des Nierenzellkarzinoms spielt, wurde bisher nicht erforscht.

Bisherige Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass die im klarzelligen Nierenzellkarzinom angereicherten CD209<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> ercDC, die zum Immunescape des klarzelligen Nierenzellkarzinoms beitragen und mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind (Figel et al. 2011; Noessner et al. 2012), VSIG4 auf mRNA-Ebene stark exprimieren (Brech 2015). So wurde die in dieser Arbeit untersuchte Hypothese formuliert, dass ercDC ihre Immunescape-Effekte über VSIG4 ausführen könnten. Es wurde postuliert, dass VSIG4<sup>+</sup> ercDC im klarzelligen Nierenzellkarzinom über den Kontakt mit T-Zellen die Expression von FOXO1 in den T-Zellen induzieren und so zum Zellzyklus-Arrest der T-Zellen führen. FOXO1 ist der Transkriptionsfaktor des Zellzyklus-Arrest-assoziierten Proteins p27<sup>KIP1</sup> (Dijkers et al. 2000; Medema et al. 2000), das in den nierenzellkarzinominfiltrierenden T-Zellen stark exprimiert wird (Prinz et al. 2012). Dass VSIG4 in vitro die Hochregulation von p27<sup>KIP1</sup> in den T-Zellen und ihren Zellzyklus-Arrest induzieren kann, wurde bereits gezeigt (Jung et al. 2012).

## 6.1 Histologischer Nachweis von VSIG4 im Nierenzellkarzinom

Um diesen Hypothesen nachzugehen wurde als Erstes geprüft, ob VSIG4 auf Proteinebene im Nierenzellkarzinom vorhanden ist. Dazu wurde ein Immunfluoreszenz-Protokoll zur Untersuchung der Expression des VSIG4-Proteins im Kryogewebe etabliert. Der verwendete Antikörper gegen VSIG4 ist im Rahmen des Forschungsprojektes „The Human Protein Atlas“ für Immunhistochemiefärbungen orthogonal validiert (The Human Protein Atlas). Es wurde nämlich gezeigt, dass die mithilfe des in dieser Arbeit verwendeten Antikörpers in Immunhistochemiefärbungen nachgewiesene Expression des VSIG4-Proteins mit der VSIG4-RNA-Expression in 36 Geweben weitgehend übereinstimmt (The Human Protein Atlas). Dies weist darauf hin, dass der Antikörper gegen VSIG4 in Immunhistochemiefärbungen zuverlässig einzusetzen ist. Jedoch gibt es einige Unterschiede zwischen dem in dieser Arbeit angewendeten Protokoll und den histologischen Arbeitsmethoden bei dem Projekt „The Human Protein Atlas“. Beim „The Human Protein Atlas“ wurden fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebe verwendet und es musste dementsprechend die Hitze-induzierte Epitoprückgewinnung verwendet werden (The Human Protein Atlas). Die Gewebe in dieser Arbeit waren nur kryokonserviert, so musste es keine Epitoprückgewinnung angewendet werden. Aus diesem Grund sollten die mittels Immunfluoreszenz analysierten Gewebe auch noch mit anderen Methoden untersucht werden und die Ergebnisse sollten anschließend miteinander verglichen werden, um sicherzustellen, dass die etablierte VSIG4-Immunfluoreszenzfärbung die VSIG4<sup>+</sup> Zellpopulation in ihrer Gesamtheit erfassen kann. Eine Methode, die eine besonders detaillierte und sensitive Untersuchung auf Einzelzellebene erlaubt, ist die Durchflusszytometrie. So wurden die Tumorgewebe T105, T114 und T118 von unserer Arbeitsgruppe mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Messungen und ihre Auswertung wurden von Dr. rer. nat. Dorothee Brech durchgeführt und zur Verfügung gestellt. Mittels Durchflusszytometrie wurde gezeigt, dass die Mehrzahl der ercDC in diesen drei Tumoren VSIG4<sup>+</sup> sind, was im Einklang mit den Ergebnissen der Immunfluoreszenzuntersuchungen dieser Arbeit steht. Die ausführlichen Ergebnisse der Durchflusszytometriemessungen werden im Anhang (Kapitel 8.3) aufgeführt. Trotzdem bietet die Methode der Immunfluoreszenz von Gewebeschnitten einen erheblichen Vorteil gegenüber der Durchflusszytometrie an. Die Immunfluoreszenz erlaubt die in situ Analyse der Expression der untersuchten Marker im Gewebeverband, was bei der Durchflusszytometrie, wo Zellsuspensionen gefärbt werden, nicht möglich ist. So konnte in dieser Arbeit mittels Immunfluoreszenz die FOXO1-Expression in den T-Zellen im Kontakt mit VSIG4<sup>+</sup> Zellen und die Lokalisation der CD3<sup>+</sup>FOXO1<sup>+</sup> Zellen in Bezug auf das Gefäßsystem analysiert werden. Diese Untersuchungen können mittels Durchflusszytometrie nicht durchgeführt werden.

Mit der Immunfluoreszenzfärbung des klarzelliges Nierenzellkarzinoms wurde zum ersten Mal gezeigt, dass das VSIG4-Protein von Immunzellen im Nierenzellkarzinom exprimiert wird. Die Nierenzellkarzinomzellen exprimierten kein VSIG4. Die Expression des VSIG4-Proteins im humanen, gesunden Nierengewebe ist nicht beschrieben (Helmy et al. 2006; Vogt et al. 2006). Außerdem waren die Endothelzellen VSIG4<sup>-</sup>. Dies steht im Einklang mit dem bisher beschriebenen Expressionsmuster des VSIG4-Proteins, nach dem das VSIG4-Protein ausschließlich von in vitro zu Makrophagen differenzierten Monozyten und von Gewebsmakrophagen (Helmy et al. 2006; Vogt et al. 2006; Gorgani et al. 2011) aber nicht von

Endothelzellen (Guo et al. 2010; Liao et al. 2014) oder von Tumorzellen (Liao et al. 2014) exprimiert wird.

## 6.2 Expression von VSIG4 in CD209<sup>+</sup> Zellen

Bisherige Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass die ercDC VSIG4 auf mRNA-Ebene stark exprimieren (Brech 2015). Jedoch war bisher nicht erforscht, ob das VSIG4-Protein von den ercDC im Nierenzellkarzinom exprimiert wird. Um dies zu untersuchen, wurden Nierenzellkarzinomgewebe mit Antikörpern gegen VSIG4, CD209 und CD45 gefärbt. Außerdem wurden tumorfreie Gewebe aus der tumortragenden Niere der Patienten und Gewebe aus einer Niere mit chronisch-vernarbender interstitieller Entzündung des Nierenparenchyms mit der gleichen Dreifachfärbung gefärbt, um eventuelle tumorspezifische Unterschiede festzustellen.

Die Auszählung der Zellpopulationen der Tumorgewebe ergab, dass die Mehrzahl der VSIG4<sup>+</sup> Zellen (67,4%) CD209<sup>+</sup> war. Gleichzeitig exprimierten die meisten CD209<sup>+</sup> Zellen (91,3%) VSIG4. Die ercDC werden jedoch als CD209<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> Zellen definiert (Figel et al. 2011). CD209 wird aber nicht nur auf unreifen interstitiellen DC, sondern auch auf bestimmten Makrophagenpopulationen exprimiert (Garcia-Vallejo und van Kooyk 2015). So kann es nicht automatisch angenommen werden, dass die VSIG4<sup>+</sup>CD209<sup>+</sup> Zellen ercDC sind. Da aber die meisten CD209<sup>+</sup> Zellen im Nierenzellkarzinom ercDC sind (Figel et al. 2011), kann es abgeleitet werden, dass die meisten VSIG4<sup>+</sup>CD209<sup>+</sup> Zellen in den untersuchten Tumoren ercDC waren und folgend dass das VSIG4-Protein von den meisten ercDC exprimiert wurde. Dass die Mehrzahl der ercDC VSIG4<sup>+</sup> war, wurde für die Gewebe T105, T114 und T118 mittels Durchflusszytometrie bestätigt (siehe Kapitel 8.3). So wurde zum ersten Mal die Expression des VSIG4-Proteins auf ercDC nachgewiesen. Bisher wurde das VSIG4-Protein nur auf in vitro zu Makrophagen differenzierten Monozyten und auf Gewebsmakrophagen, aber nicht auf DC nachgewiesen (Helmy et al. 2006; Vogt et al. 2006; Guo et al. 2010). Hier muss jedoch erwähnt werden, dass die ercDC Ähnlichkeiten mit Makrophagen aufweisen. Obwohl die ercDC kardinale DC-Funktionen wie Antigenkruzpräsentation ausüben (Figel et al. 2011), exprimieren sie Makrophagenmarker (CD14) (Figel et al. 2011) und sind bei Transkriptionsanalysen in dem Kontinuum des mononukleär-phagozytären Systems eher auf der Seite der Makrophagen zu positionieren (Brech 2015). Bei den molekularen Mechanismen, die die Expression von VSIG4 in ercDC im klarzelligen Nierenzellkarzinom regulieren, kann das proinflammatorische Zytokin IL-6 eine wichtige Rolle spielen. IL-6 stimuliert in vitro die VSIG4-Expression in Makrophagen auf mRNA- und Proteinebene (Munawara et al. 2017). Gleichzeitig ist IL-6 zusammen mit IL-8 notwendig für die Induktion des ercDC-Phänotyps in vitro und wird stark im Nierenzellkarzinom exprimiert (Figel et al. 2011).

In der VSIG4<sup>+</sup>CD209<sup>-</sup> Zellpopulation waren die meisten Zellen CD45<sup>+</sup>. CD45 wird auf allen Leukozyten exprimiert (Rheinländer et al. 2018). So waren die meisten VSIG4<sup>+</sup> Zellen in den Tumorgeweben CD209<sup>+</sup> (67,4%) oder CD209<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup> (30,6%) und folgend Leukozyten. Die VSIG4<sup>+</sup>CD209<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup> Zellen können beispielweise Makrophagen sein, deren Population in der Durchflusszytometrie zum Teil VSIG4<sup>+</sup> war (siehe Kapitel 8.3) oder auch T-Zellen, die vereinzelt positiv für VSIG4 waren (siehe Kapitel 5.3.1). Weitere Forschung ist notwendig, um diese Zellen näher zu charakterisieren. Weiterhin ist die Identität der vereinzelt

VSIG4<sup>+</sup>CD209<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup> Zellen in den Tumorgeweben ebenfalls nicht klar. Das VSIG4-Protein wurde bisher ausschließlich auf Leukozyten nachgewiesen. Da aber CD45 in unterschiedlichen Zelllinien und auf Zellen innerhalb der gleichen Zelllinie unterschiedlich stark exprimiert werden kann (Stelzer et al. 1993), ist es nicht auszuschließen, dass es sich bei diesen Zellen um Leukozyten mit herunterreguliertem CD45 handelte, welche aufgrund der niedrigen Sensitivität der immunhistologischen Fluoreszenzfärbung nicht als CD45<sup>+</sup> detektiert werden konnten.

In den tumorfreien Geweben der tumortragenden Nieren war die Verteilung der VSIG4<sup>+</sup> und CD209<sup>+</sup> Subpopulationen der in den Tumoren ähnlich: die meisten VSIG4<sup>+</sup> Zellen (84,1%) waren CD209<sup>+</sup> und die meisten CD209<sup>+</sup> Zellen (94,6%) waren VSIG4<sup>+</sup>. In den tumorfreien Geweben gab es keine VSIG4<sup>+</sup>CD209<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup> Zellen. Im Gegensatz zu den Nierenzellkarzinomen sind die meisten CD209<sup>+</sup> Zellen in den tumorfreien Geweben CD14<sup>-</sup> und folgend keine eDC (Figel et al. 2011). So wird weitere Forschung benötigt, um die VSIG4<sup>+</sup> Zellen der tumorfreien Gewebe bestimmten Zellpopulationen einzuordnen.

Der Vergleich der Zellpopulationen in den Tumorgeweben und den tumorfreien Geweben zeigte, dass der prozentuale Anteil der CD209<sup>+</sup> Zellen in der VSIG4<sup>+</sup> Zellpopulation in den tumorfreien Geweben höher war. Weiterhin war der prozentuale Anteil der VSIG4<sup>+</sup> Zellen in der CD209<sup>+</sup> Zellpopulation in den Tumorgeweben und in den tumorfreien Geweben ähnlich. Jedoch war die absolute Anzahl der VSIG4<sup>+</sup>CD209<sup>+</sup> Zellen, der VSIG4<sup>+</sup>CD209<sup>-</sup>CD45<sup>+/-</sup> Zellen und der CD209<sup>+</sup>VSIG4<sup>-</sup> Zellen in den Tumorgeweben höher. So gab es mehr VSIG4<sup>+</sup> und CD209<sup>+</sup> Zellen in den Tumoren als in den tumorfreien Geweben. Dass die Nierenzellkarzinome mehr CD209<sup>+</sup> Zellen als die tumorfreien Gewebe der tumortragenden Nieren beinhalten, wird in der Literatur beschrieben (Figel et al. 2011). Als die Ergebnisse aus allen Tumorgeweben und aus allen tumorfreien Geweben zusammengefasst und miteinander verglichen wurden, waren die Unterschiede zwischen den Zellpopulationen nicht signifikant. Das kann daran liegen, dass eine kleine Anzahl von Proben untersucht wurde. Deshalb ist die Analyse von mehr Patientenproben notwendig, um eventuelle signifikante Unterschiede der untersuchten Zellpopulationen zu detektieren.

Der Unterschied in der Expression von VSIG4 zwischen Tumorgewebe und tumorfreiem Gewebe trifft auch auf andere Proteine der B7-Familie, zu welcher das VSIG4-Protein gehört, zu. Das PD-L1-Protein wird im Kolonkarzinomgewebe stärker exprimiert als im umgebenden tumorfreien Gewebe (Wu et al. 2019). Obwohl die den Tumor umgebenden tumorfreien Gewebe in Studien häufig als gesunde Kontrollproben benutzt werden, wurde in Transkriptionsanalysen gezeigt, dass sie sich von normalen, gesunden Geweben unterscheiden (Aran et al. 2017). Deswegen kann die Untersuchung der Expression des VSIG4-Proteins im normalen Nierengewebe, im Gegensatz zu dem hier untersuchten tumorfreien Gewebe der tumortragenden Niere, hilfreich sein, um weitere Einblicke in die biologische Funktion von VSIG4 zu gewinnen. Beispielsweise ist es möglich, dass das VSIG4-Protein im gesunden Nierengewebe nicht exprimiert wird aber im klarzelligen Nierenzellkarzinom hochreguliert wird, was für eine Rolle von VSIG4 bei dem Immunescape des Tumors sprechen würde. Ein ähnliches Expressionsmuster zeigt das PD-L1-Protein, das in einigen Tumorgeweben stark exprimiert wird, in gesunden Geweben außer Makrophagen aber nicht (Dong et al. 2002).

Zudem wurde Gewebe aus einer Niere mit chronisch-vernarbender interstitieller Entzündung des Nierenparenchyms stark von VSIG4<sup>+</sup> Zellen infiltriert. Viele davon waren auch CD209<sup>+</sup>. Die Mehrzahl der VSIG4<sup>+</sup> Zellen, der CD209<sup>+</sup> Zellen und der CD45<sup>+</sup> Zellen waren im

Tubulointerstitium lokalisiert. In den Glomeruli befanden sich vereinzelte VSIG4<sup>+</sup>CD209<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> Zellen und wenige VSIG4<sup>-</sup>CD209<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup> Zellen. Zu der VSIG4<sup>-</sup>CD209<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup> Zellpopulation gehören die CD3<sup>+</sup> T-Zellen, die in den Glomeruli der Niere mit der chronisch-vernarbenden interstitiellen Entzündung des Nierenparenchyms ebenfalls nachgewiesen wurden (siehe Abschnitt 5.3.1).

Die biologische Rolle dieser CD209<sup>+</sup> Zellen ist bisher nicht gut erforscht. Mit der Ausnahme der ercDC im klarzelligen Nierenzellkarzinom gibt es keine Information aus experimentellen Studien zur biologischen Rolle der DC in der humanen Niere (Noessner et al. 2011). Viele inflammatorische Nierenerkrankungen zeigen eine starke Infiltration mit CD209<sup>+</sup> Zellen. In Gewebeproben aus Nieren mit Glomerulonephritis (Lupus nephritis und nekrotisierende Glomerulonephritis) gibt es eine starke Infiltration mit CD209<sup>+</sup> Zellen, die im Tubulointerstitium und nicht in den Glomeruli lokalisiert sind (Seegerer et al. 2008). In Nierenbiopsien von Patienten mit ANCA-assoziierten Vaskulitiden werden CD209<sup>+</sup> Zellinfiltrate sowohl im tubulointerstitiellen Raum als auch in den Glomeruli nachgewiesen (Wilde et al. 2009). Im normalen Nierengewebe hingegen sind die CD209<sup>+</sup> Zellen im Tubulointerstitium der Nierenrinde lokalisiert (Woltman et al. 2007; Seegerer et al. 2008). CD209<sup>+</sup> Zellen sind in den Glomeruli der gesunden Niere nicht nachzuweisen (Seegerer et al. 2008). Im normalen Nierengewebe sind alle CD209<sup>+</sup> Zellen auch positiv für CD1c, welches ein Marker für myeloische DC ist (Woltman et al. 2007).

Die biologische Funktion der VSIG4<sup>+</sup> Zellen in dem in dieser Arbeit untersuchten inflammatorischen Nierengewebe ist ebenfalls unklar. Das VSIG4-Protein besitzt antiinflammatorische Wirkungen. Es kann durch Hemmung der C3- und C5-Konvertasen den alternativen Aktivierungsweg des Komplementsystems inhibieren (Katschke et al. 2007) und wirkt hemmend auf die Proliferation und Aktivierung der T-Zellen (Vogt et al. 2006). In einem Mausmodell von renaler Inflammation und tubulointerstitieller Fibrose zeigten die VSIG4<sup>+/+</sup> Mäusen eine verminderte renale Infiltration von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu VSIG4<sup>-/-</sup> Mäusen (Li et al. 2014). In einem Mausmodell von systemischem Lupus erythematodes verminderte die Behandlung mit einem VSIG4-Fusionprotein (CRIG-Fc) die Immunzellinfiltration der Nieren (Lieberman et al. 2015). Ob und durch welche Mechanismen VSIG4 antiinflammatorisch im Rahmen von inflammatorischen Erkrankungen der humanen Niere wirkt, muss weiter erforscht werden.

### **6.3 FOXO1-Expression in T-Zellen im Kontakt mit VSIG4**

Um die Hypothese zu prüfen, dass die VSIG4<sup>+</sup> ercDC durch den Kontakt mit T-Zellen im klarzelligen Nierenzellkarzinom die Expression von FOXO1 in den T-Zellen induzieren und so durch die Induktion von Zellzyklus-Arrest inhibierend auf die T-Zellen wirken, wurden Nierenzellkarzinomgewebe und tumorfremes Gewebe mit Antikörpern gegen VSIG4, FOXO1 und CD3 gefärbt.

Die Auszählung der Zellen ergab, dass eine Minderzahl der CD3<sup>+</sup> Zellen in den Tumorgeweben (29,4%) FOXO1<sup>+</sup> war. In den FOXO1<sup>+</sup> T-Zellen war FOXO1 in dem Zellkern lokalisiert, was auf ein aktives Protein hinweist. Ungefähr die Hälfte der CD3<sup>+</sup>FOXO1<sup>+</sup> Zellen in den Tumorgeweben (44,9%) war im Kontakt mit VSIG4<sup>+</sup> Zellen. Der Anteil der FOXO1<sup>+</sup> Zellen in den CD3<sup>+</sup> Zellen mit VSIG4-Kontakt (28,7%) war ungefähr gleich mit dem Anteil

der FOXO1<sup>+</sup> Zellen in den CD3<sup>+</sup> Zellen ohne VSIG4-Kontakt (28,1%). In den tumorfreien Geweben war der Anteil der FOXO1<sup>+</sup> Zellen in den T-Zellen niedriger (12%). Wie in den Tumorgeweben war in den tumorfreien Geweben die Hälfte der CD3<sup>+</sup>FOXO1<sup>+</sup> Zellen (50%) im Kontakt mit VSIG4<sup>+</sup> Zellen. Der Anteil der FOXO1<sup>+</sup> Zellen in den CD3<sup>+</sup> Zellen mit VSIG4-Kontakt (9,1%) und der Anteil der FOXO1<sup>+</sup> Zellen in den CD3<sup>+</sup> Zellen ohne VSIG4-Kontakt (6,3%) waren niedriger im Vergleich zu den Tumorgeweben. Weiterhin waren die Kontakte zwischen CD3<sup>+</sup> Zellen und VSIG4<sup>+</sup> Zellen in den tumorfreien Geweben (4,5/HPF) weniger als in den Tumoren (10,3/HPF). Als die Ergebnisse aus allen Tumorgeweben und aus allen tumorfreien Geweben zusammengefasst und miteinander verglichen wurden, waren die Unterschiede zwischen den Zellpopulationen nicht signifikant. Das kann daran liegen, dass eine kleine Anzahl von Proben untersucht wurde.

Folgend kann es nicht ausgeschlossen werden, dass die VSIG4<sup>+</sup> ercDC die Expression von FOXO1 in den T-Zellen im klarzelligen Nierenzellkarzinom induzieren. Beim Testen dieser Hypothese können auch andere Untersuchungsmethoden als die Immunfluoreszenz hilfreich sein. Ein Kontakt zwischen einer antigenpräsentierenden Zelle und einer T-Zelle dauert häufig eine Stunde oder länger (Grakoui et al. 1999; Friedl und Gunzer 2001). Durch diesen Kontakt werden molekulare Veränderungen in der T-Zelle induziert, die mehrere Stunden lang weiterbestehen (Malissen 1999). Entsprechend ist es wahrscheinlich, dass die durch einen Kontakt mit VSIG4<sup>+</sup> ercDC induzierte FOXO1-Expression auch nach dem Ende des Zellkontaktes in den T-Zellen nachweisbar ist. Dann wären diese T-Zellen im Rahmen dieser Arbeit den FOXO1<sup>+</sup> T-Zellen ohne VSIG4-Kontakt zugeordnet, obwohl VSIG4-T-Zell-Kontakte ursächlich für die FOXO1-Expression wären. Um diese Möglichkeit abzuklären, sollten Nierenzellkarzinomgewebe mittels Lebendgewebe-Mikroskopie untersucht werden. Obwohl die organspezifische Anatomie und Physiologie der Niere ihre Untersuchung mittels Intravitalmikroskopiemethoden erschweren, gab es in den letzten Jahren wichtige Fortschritte in Intravitalimaging-Technologien wie die Multiphotonmikroskopie, die die in vivo Untersuchung von Immunzellen in der Niere von Tieren ermöglicht haben (Finsterbusch et al. 2017).

Von großem Interesse ist auch der genaue Mechanismus der Interaktion zwischen VSIG4<sup>+</sup> Zellen und T-Zellen. Ein hemmender VSIG4-Rezeptor auf der Oberfläche der T-Zellen konnte bisher nicht identifiziert werden (Zang und Allison 2006). Eine weitere Hypothese besagt, dass VSIG4 auf VSIG4<sup>+</sup> Zellen und CR1/CR3 auf der T-Zell-Oberfläche dieselben C3b- oder iC3b-Moleküle binden und so ein Signal entsteht, dass die T-Zellen inhibiert (Zang und Allison 2006). Ob diese Hypothese stimmt und wie dieser Mechanismus zu FOXO1-Aktivierung führen kann, muss noch untersucht werden. In einem Mausmodell von Ischämie-Reperfusion-Verletzung der Niere führte die Applikation des Komplementinhibitors CRIg/FH zur verstärkten Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges in den Nierenzellen (Hu et al. 2018). Faktor H (FH) und CRIg inhibieren den alternativen Aktivierungsweg des Komplementsystems (Hu et al. 2018). Die Komplementaktivierung ist in der Pathogenese der Ischämie-Reperfusion-Verletzung der Niere beteiligt, so zeigte eine Behandlung mit dem Komplementinhibitor CRIg/FH nephroprotektive Effekte durch Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges in den Nierenzellen (Hu et al. 2018). Die Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges führt zum Transport des FOXO1-Proteins aus dem Zellkern ins Zytoplasma und so zu seiner Inaktivierung (Coomans de Brachène und Demoulin 2016). Die Beobachtungen

zur Wirkung von VSIG4 auf den PI3K/AKT-Signalweg stammen jedoch aus einem Mausmodell und beziehen sich nicht auf die Immunzellen, sondern auf die Nierenzellen. So bleibt unklar, ob und durch welchen Mechanismus VSIG4 die Expression von FOXO1 in T-Zellen im klarzelligen Nierenzellkarzinom induziert. Es ist zudem möglich, dass VSIG4 durch FOXO1-unabhängige Mechanismen die Progression des klarzelligen Nierenzellkarzinoms fördern kann. Ein solcher Mechanismus kann die Induktion der Expression der Matrix-Metalloprotease 9 (MMP-9) in den VSIG4<sup>+</sup> ercDC sein. Die Matrix-Metalloproteasen sind essenziell für Tumorentstehung und -wachstum. Besonders die Funktion der MMP-9 ist aufgrund der Beteiligung an etlichen Mechanismen der Tumorprogression wie Angiogenese, Zellwachstum, Metastasierung und Apoptoseregulation dabei maßgeblich (Kessenbrock et al. 2010). Das auf Makrophagen exprimierte VSIG4-Protein induzierte in vitro die Expression der MMP-9 in diesen Makrophagen (Lee et al. 2006). Die beschriebene Produktion hoher Mengen von MMP-9 von den ercDC (Figel et al. 2011) kann folgend durch VSIG4 induziert werden.

Falls der Kontakt mit VSIG4<sup>+</sup> ercDC nicht verantwortlich für die FOXO1-Expression in allen FOXO1<sup>+</sup> T-Zellen im klarzelligen Nierenzellkarzinom ist, entsteht die Frage, welche andere Faktoren die FOXO1-Expression in den T-Zellen induzieren. Ein möglicher Mechanismus ist die beobachtete hochregulierte DGK- $\alpha$ -Expression in den CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Nierenzellkarzinom, die als mögliche Ursache die ständige Antigenpräsentation an den TIL hat und möglicherweise zu der verminderten Aktivierung von AKT beiträgt (Prinz et al. 2012). Dieser Mechanismus alleine scheint jedoch nicht ausreichend zu sein, um die insuffiziente antitumorale Wirkung der T-Zellen im klarzelligen Nierenzellkarzinom zu erklären (Prinz et al. 2012). Weiterhin ist FOXO1 ein Transkriptionsfaktor von PD-1 (Staron et al. 2014). In „erschöpften“ (Englisch: *exhausted*) T-Zellen im Rahmen einer chronischen viralen Infektion ist FOXO1 notwendig für die Aufrechterhaltung der PD-1-Expression, während PD-1 zur FOXO1-Aktivierung mittels Hemmung der PI3K/AKT-Achse beiträgt (Staron et al. 2014). Ob dies auch für die tumorinfiltrierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen im viralen System sind, ist unklar. In vielen Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom wird jedoch PD-1 auf den TIL exprimiert und seine Expression ist in einigen Studien mit einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert (Hara et al. 2017; Ueda et al. 2018; Kahlmeyer et al. 2019). So ist es möglich, dass PD-1 mitverantwortlich für die FOXO1-Expression in den nierenzellkarzinominfiltrierenden T-Zellen ist und FOXO1 auch über die PD-1-Achse die Progression des klarzelligen Nierenzellkarzinoms fördert.

Ob die Expression von FOXO1 in den nierenzellkarzinominfiltrierenden T-Zellen ihre antitumorale Wirkung inhibiert, kann von den Ergebnissen dieser Arbeit nicht automatisch angenommen werden. In dieser Arbeit wurden keine Experimente durchgeführt, um die zytotoxische Wirkung oder die biologische Funktion der FOXO1<sup>+</sup> T-Zellen zu untersuchen. Weiterhin wurde von unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass Defizite in der Aktivierung von Signalmolekülen distal des TZR, wie beispielweise die fehlende AKT-Aktivierung, für die verminderte zytotoxische Aktivität der CD8<sup>+</sup> TIL im klarzelligen Nierenzellkarzinom mitverantwortlich sind (Prinz et al. 2012). Eine verminderte Aktivierung von AKT führt zur verminderten Inaktivierung von FOXO1 (Coomans de Brachène und Demoulin 2016). Zudem führt die in vitro Behandlung von CD8<sup>+</sup> TIL aus Nierenzellkarzinomgewebe mit IL-2 zu vermindertem Niveau vom p27<sup>KIP1</sup> und zu verstärkten zytotoxischen Reaktionen dieser Zellen

(Prinz et al. 2012). Diese Ergebnisse in Kombination mit dem in situ Nachweis von FOXO1 im Zellkern von TIL sprechen für eine hemmende Wirkung von FOXO1 auf die antitumorale Aktivität der T-Zellen im klarzelligen Nierenzellkarzinom. Allerdings wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, in welchen Subpopulationen der T-Zellen FOXO1 exprimiert wurde. Aufgrund der technischen Limitation, die eine Kombination von mehr als drei Markern nicht ermöglichte, wurde die Kombination von VSIG4 mit FOXO1 und CD3 gewählt und auf die Unterscheidung zwischen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen verzichtet. So kann ohne Weiteres nicht ausgeschlossen werden, dass die nachgewiesenen FOXO1<sup>+</sup> T-Zellen keine CD8<sup>+</sup> T-Zellen waren. Das kann von Bedeutung für die biologischen Effekte der FOXO1-Expression sein, weil verschiedene T-Zell-Subpopulationen unterschiedliche Wirkung auf die Tumorzellen haben. So sind die CD8<sup>+</sup> T-Zellen die wichtigsten anti-Tumor-Effektorzellen (Palucka und Coussens 2016), aber auch die CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>1-Zellen können antitumorale Effekte haben (Quail und Joyce 2013). Andere CD4<sup>+</sup> T-Zellen wie die FOXP3<sup>+</sup> Treg und die T<sub>H</sub>2-Zellen sind primär tumorfördernd (Quail und Joyce 2013). Weiterhin kontrolliert FOXO1 die Generierung von Treg durch die Induktion der Expression von FOXP3 (Kerdiles et al. 2010; Ouyang et al. 2010). Im klarzelligen Nierenzellkarzinom stellen die FOXP3<sup>+</sup> Zellen einen kleinen Anteil der T-Zellen dar (Siddiqui et al. 2007; Figel et al. 2011) und sind in situ selten im Kontakt mit ercDC (Figel et al. 2011). So ist es sehr wahrscheinlich, dass mindestens ein Teil der T-Zellen im Kontakt mit VSIG4<sup>+</sup> Zellen CD8<sup>+</sup> Antitumor-Zellen waren, die möglicherweise durch die Expression von FOXO1 inhibiert wurden.

Die Rolle der FOXO-Proteine in der antitumoralen Immunität bleibt weitgehend unklar (Luo und Li 2018). Diese Arbeit ist eine der ersten, die die Expression von FOXO-Transkriptionsfaktoren in tumorinfiltrierenden Immunzellen untersucht hat. Weitere Forschung ist nötig, um die Rolle der FOXO-Proteine in der Tumorummunologie zu beleuchten.

In dieser Färbung wurden außerdem sowohl in den Tumorgeweben als auch in den tumorfreen Geweben vereinzelte VSIG4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> Zellen nachgewiesen. Die Expression von VSIG4 auf T-Zellen im klarzelligen Nierenzellkarzinom wurde ebenfalls mittels Durchflusszytometrie bestätigt (siehe Kapitel 8.3). So wurde zum ersten Mal das VSIG4-Protein auf T-Zellen nachgewiesen. Bisherige Untersuchungen zeigten, dass das VSIG4-Protein auf T-Zellen aus dem Blut (Helmy et al. 2006; Vogt et al. 2006) und auf T-Zellen in der Leber von Patienten mit chronischer Hepatitis B nicht exprimiert wird (Guo et al. 2010). Es ist nicht klar, ob die VSIG4<sup>+</sup> T-Zellen ausschließlich in Tumorgeweben und peritumoralen tumorfreen Geweben zu finden sind, welche biologische Funktionen sie aufweisen oder wie die Expression von VSIG4 in den T-Zellen reguliert wird.

## **6.4 Lokalisation der FOXO1<sup>+</sup> und FOXO1<sup>-</sup> T-Zellen in Bezug auf das Gefäßsystem**

In Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass die T-Zellen im klarzelligen Nierenzellkarzinom in ihrer Mehrzahl extravasiiert sind (Masouris 2016). Die extravasiierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigten eine verminderte Ausstattung mit dem zytotoxischen Protein Perforin im Vergleich zu den intravaskulären CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Masouris 2016). Die verminderte zytotoxische Ausstattung der extravaskulär liegenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen scheint durch das Tumormilieu bedingt zu sein (Masouris 2016). So wurde die Hypothese formuliert, ob die



verminderte zytotoxische Ausstattung der extravasierten T-Zellen auf die Expression von FOXO1 in diesen Zellen zurückgeführt werden könnte, während die intravaskulären T-Zellen durch fehlende FOXO1-Expression und folgend durch bessere zytotoxische Ausstattung charakterisiert wären. Dies würde die FOXO1-Expression als einen inhibierenden Mechanismus der T-Zell-Aktivität im klarzelligen Nierenzellkarzinom bestätigen.

Um diese Hypothese zu prüfen, wurden Nierenzellkarzinomgewebe und tumorfreie Gewebe mit Antikörpern gegen CD3, FOXO1 und CD31 gefärbt. Die T-Zellen wurden entsprechend ihrer Lokalisation zur Vaskulatur in drei Kategorien eingeteilt: intravaskulär, perivaskulär und parenchymatös. Die Auszählung der Zellen ergab wie bereits vorher gezeigt, dass die meisten T-Zellen in den Tumorgeweben extravaskulär lokalisiert waren. In den tumorfreien Geweben befanden sich die meisten T-Zellen ebenfalls extravaskulär. In den Tumorgeweben und in den tumorfreien Geweben war die Mehrzahl der T-Zellen in jedem der drei Kompartimente FOXO1<sup>-</sup>. Nur in dem Tumor T118 waren die meisten T-Zellen sowohl perivaskulär als auch parenchymatös FOXO1<sup>+</sup>. Jedoch war der prozentuale Anteil der FOXO1<sup>-</sup> Zellen in den CD3<sup>+</sup> Zellen in jedem untersuchten Tumor intravaskulär am höchsten, während der prozentuale Anteil der FOXO1<sup>+</sup> Zellen in den CD3<sup>+</sup> Zellen perivaskulär und parenchymatös höher war als intravaskulär. Verglich man die Tumoren mit den tumorfreien Geweben, dann war der prozentuale Anteil der FOXO1<sup>+</sup> Zellen in den CD3<sup>+</sup> Zellen in jedem Kompartiment des jeweiligen Tumorgewebes höher als im entsprechenden tumorfreien Gewebe. Die absoluten Anzahlen der CD3<sup>+</sup>FOXO1<sup>+</sup> Zellen in jedem Kompartiment waren in den Tumoren in den allermeisten Fällen höher. Die Unterschiede zwischen den prozentualen Anteilen der Kompartimente waren sowohl für die Tumorgewebe als auch für die tumorfreien Gewebe nicht statistisch signifikant. Das kann daran liegen, dass eine kleine Anzahl von Proben untersucht wurde.

Folgend waren die CD3<sup>+</sup> Zellen häufiger FOXO1<sup>+</sup> in den Tumorgeweben als in den tumorfreien Geweben. Weiterhin waren die CD3<sup>+</sup> Zellen häufiger FOXO1<sup>+</sup> im perivaskulären und parenchymatösen Kompartiment als im intravaskulären Kompartiment. Diese Ergebnisse könnten die postulierte hemmende Wirkung von FOXO1 auf die T-Zellen im klarzelligen Nierenzellkarzinom bestätigen. Trotzdem ist die Untersuchung von mehr Patientenproben notwendig, um festzustellen, ob die Unterschiede der Zellpopulationen zwischen den Kompartimenten statistisch signifikant sind. Dass FOXO1 in den T-Zellen in den tumorfreien Geweben weniger exprimiert wurde als in den T-Zellen in den Nierenzellkarzinomen, war zu erwarten. Die Aktivierung von AKT, die zur Inaktivierung von FOXO1 führt, ist in den nierenzellkarzinominfiltrierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu den CD8<sup>+</sup> T-Zellen im peritumoralen tumorfreien Gewebe vermindert (Prinz et al. 2012). Dies spricht dafür, dass diese Veränderungen durch das Tumormikromilieu verursacht wurden. Eine Komponente des Tumormikromilieus, die für die Induktion der FOXO1-Expression in den extravasierten T-Zellen im Nierenzellkarzinom verantwortlich sein kann, sind die VSIG4<sup>+</sup> ercDC.

Wie vorher bei der Untersuchung von VSIG4, wurde bei der Färbungskombination mit FOXO1 und CD31 der CD3-Antikörper verwendet und somit ebenfalls nicht untersucht, ob es sich bei den FOXO1<sup>+</sup> T-Zellen um CD8<sup>+</sup> T-Zellen handelte. In dieser Arbeit waren ungefähr 30% der perivaskulären und der parenchymatösen T-Zellen in den Tumorgeweben FOXO1<sup>+</sup>. Ca. 55% der T-Zellen im klarzelligen Nierenzellkarzinom sind CD8<sup>+</sup> (Figel et al. 2011; Geissler et al. 2015). Zudem sind ca. 84% der CD8<sup>+</sup> T-Zellen im perivaskulären und

parenchymatösen Kompartiment im klarzelligem Nierenzellkarzinom negativ für Perforin, was für eine verminderte zytotoxische Aktivität dieser Zellen spricht (Masouris 2016). So scheint es mindestens plausibel, dass ein Teil der extravasierten CD8<sup>+</sup>Perforin<sup>-</sup> T-Zellen auch FOXO1<sup>+</sup> ist. Um dies sicherzustellen, sind jedoch weitere Experimente notwendig.

## 7 Zusammenfassung

Das Nierenzellkarzinom ist als ein immunogener Tumor beschrieben, der stark von Immunzellen infiltriert wird. Trotzdem können die tumorinfiltrierenden Immunzellen sein Wachstum nicht beherrschen. Das gute Ansprechen des Nierenzellkarzinoms auf Immuntherapien zeigt wiederum, dass die Modulation des Immunsystems zur Induktion einer effektiven antitumoralen Immunantwort ein vielversprechender Behandlungsansatz für das Nierenzellkarzinom ist.

Das Protein der B7-Familie *V-set and immunoglobulin domain-containing protein 4* (VSIG4), auch *complement receptor immunoglobulin* (CRIg) oder Z39Ig genannt, stellt ein potenzielles neues Ziel solcher Therapien dar. VSIG4 inhibiert die Proliferation und die Aktivierung der T-Zellen. Weiterhin exprimieren die im klarzelligen Nierenzellkarzinom angereicherten CD209<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> ercDC VSIG4 stark auf mRNA-Ebene. Die ercDC tragen zum Immunescape des klarzelligen Nierenzellkarzinoms bei und sind mit einer schlechteren Prognose assoziiert. So wurde die erste Hypothese dieser Arbeit formuliert, dass ercDC ihre Immunescape-Effekte über VSIG4 ausführen. Es wurde postuliert, dass die VSIG4<sup>+</sup> ercDC im klarzelligen Nierenzellkarzinom über den Kontakt mit T-Zellen die Expression von FOXO1 in den T-Zellen induzieren und so zum Zellzyklus-Arrest der T-Zellen führen. FOXO1 ist der Transkriptionsfaktor des Zellzyklus-Arrest-assoziierten Proteins p27<sup>KIP1</sup>, das in den nierenzellkarzinominfiltrierenden T-Zellen stark exprimiert wird.

Zudem zeigten die extravasierten T-Zellen im klarzelligen Nierenzellkarzinom im Gegensatz zu den intravaskulären T-Zellen eine verminderte Ausstattung mit dem zytotoxischen Protein Perforin. Folgend wurde die zweite Hypothese dieser Arbeit formuliert, dass die verminderte antitumorale Wirkung der extravasierten T-Zellen auf die Expression von FOXO1 in diesen Zellen zurückzuführen ist, welches die Bereitstellung des Perforins negativ beeinflusst. Die intravaskulären T-Zellen, welche Perforin enthalten, sollten dagegen durch fehlende FOXO1-Expression charakterisiert sein.

Um diese Hypothesen zu prüfen, wurde mittels Immunfluoreszenz und konfokaler Laserrastermikroskopie die Expression des VSIG4-Proteins im klarzelligen Nierenzellkarzinom analysiert. Weiterhin wurde mittels Immunfluoreszenz und konfokaler Laserrastermikroskopie die Expression des FOXO1-Proteins in den T-Zellen im klarzelligen Nierenzellkarzinom hinsichtlich der Lokalisation der T-Zellen in Bezug auf die VSIG4<sup>+</sup> Zellen und das Gefäßsystem untersucht. Diese Arbeit war eine der ersten, die die Expression von FOXO-Transkriptionsfaktoren in tumorinfiltrierenden Immunzellen untersucht hat.

Nach der Etablierung der Immunfluoreszenzfärbung für VSIG4 wurden zum ersten Mal VSIG4<sup>+</sup> Zellen im klarzelligen Nierenzellkarzinom nachgewiesen. Die weitere Untersuchung der Expression des VSIG4-Proteins zeigte, dass das VSIG4-Protein in den Nierenzellkarzinomgeweben fast ausschließlich auf Leukozyten exprimiert wurde. Die Endothelzellen waren negativ für VSIG4. Vereinzelt gab es VSIG4<sup>+</sup> T-Zellen. Die meisten VSIG4<sup>+</sup> Zellen waren jedoch positiv für den myeloischen Marker CD209 und die CD209<sup>+</sup> Zellen exprimierten in ihrer Mehrzahl VSIG4. Da die meisten CD209<sup>+</sup> Zellen im klarzelligen Nierenzellkarzinom ercDC sind, war die Mehrzahl der nachgewiesenen VSIG4<sup>+</sup>CD209<sup>+</sup> Zellen ercDC. So wurde zum ersten Mal die Expression des VSIG4-Proteins auf ercDC

nachgewiesen. In den tumorfreien Geweben der tumortragenden Nieren war die Anzahl der VSIG4<sup>+</sup> Zellen geringer als in den Tumorgeweben.

Die Untersuchung der Expression des FOXO1-Proteins in den T-Zellen im klarzelligen Nierenzellkarzinom hinsichtlich der Lokalisation der T-Zellen in Bezug auf die VSIG4<sup>+</sup> Zellen zeigte, dass eine Minderzahl der T-Zellen positiv für FOXO1 war. FOXO1 war im Zellkern lokalisiert, was auf ein aktives Protein hinweist. Die Mehrzahl der FOXO1<sup>+</sup> T-Zellen war nicht im Kontakt mit VSIG4<sup>+</sup> Zellen. Die T-Zellen im Kontakt mit VSIG4<sup>+</sup> Zellen und die T-Zellen ohne Kontakt mit VSIG4<sup>+</sup> Zellen exprimierten fast gleich häufig FOXO1. In den tumorfreien Geweben der tumortragenden Nieren war der Anteil der FOXO1<sup>+</sup> Zellen in der T-Zellpopulation niedriger als in den Tumorgeweben, während der Anteil der Zellen mit VSIG4-Kontakt in der FOXO1<sup>+</sup> T-Zellpopulation dem entsprechenden Anteil in den Tumorgeweben ungefähr gleich war. Folgend bleibt es unklar, ob die VSIG4<sup>+</sup> ercDC die Expression von FOXO1 in den T-Zellen in den Tumorgeweben induzierten.

Die Untersuchung der Expression des FOXO1-Proteins in den T-Zellen im klarzelligen Nierenzellkarzinom hinsichtlich der Lokalisation der T-Zellen in Bezug auf das Gefäßsystem zeigte, dass die Mehrzahl der T-Zellen sowohl intravaskulär als auch perivaskulär und parenchymatös FOXO1<sup>-</sup> war. In den FOXO1<sup>+</sup> T-Zellen war das FOXO1-Protein im Zellkern lokalisiert, was auf ein aktives Protein hinweist. Der prozentuale Anteil der FOXO1<sup>+</sup> Zellen in der T-Zellpopulation war perivaskulär und parenchymatös höher als intravaskulär. In den tumorfreien Geweben der tumortragenden Nieren war der prozentuale Anteil der FOXO1<sup>+</sup> Zellen in der T-Zellpopulation in allen drei Kompartimenten niedriger als in den Tumorgeweben. Diese Ergebnisse deuten auf ein vermehrtes Vorkommen von FOXO1 in T-Zellen des Nierenzellkarzinoms hin. FOXO1 könnte an der Inaktivierung der T-Zellen im Nierenzellkarzinom mitbeteiligt sein.

## 8 Anhang

### 8.1 Anzahl der VSIG4<sup>+</sup> Zellen, der CD3<sup>+</sup> Zellen, der CD3<sup>+</sup> Zellen in Kontakt mit VSIG4<sup>+</sup> Zellen und der CD3<sup>+</sup>FOXO1<sup>+</sup> Zellen in und ohne Kontakt mit VSIG4<sup>+</sup> Zellen ermittelt aus der Immunfluoreszenzfärbung für VSIG4, FOXO1 und CD3

Gewebe		VSIG4 <sup>+</sup> Zellen /HPF (Spannweite)	CD3 <sup>+</sup> Zellen /HPF (Spannweite)	CD3 <sup>+</sup> Zellen mit VSIG4-Kontakt /HPF (Spannweite)	CD3 <sup>+</sup> FOXO1 <sup>+</sup> Zellen mit VSIG4-Kontakt /HPF (Spannweite)	CD3 <sup>+</sup> FOXO1 <sup>+</sup> Zellen ohne VSIG4-Kontakt /HPF (Spannweite)
T90		34,5 (28-54)	48 (22-79)	9,5 (6-18)	2,5 (0-9)	9,5 (4-17)
T105		81 (49-124)	149,5 (54-238)	42,5 (14-72)	7,5 (1-30)	8,5 (3-32)
	NN105	25 (16-56)	11,5 (4-74)	4 (2-17)	1 (0-2)	1 (0-3)
T114		46 (29-57)	25 (7-34)	10 (2-13)	4,5 (1-6)	4 (1-12)
	NN114	23 (13-39)	19 (8-37)	4,5 (1-14)	1 (0-2)	1 (0-4)
T118		63,5 (34-91)	29 (12-51)	10,5 (3-15)	3 (0-6)	4,5 (2-8)
	NN118	21 (11-33)	10,5 (5-18)	4,5 (1-7)	0,5 (0-4)	0,5 (0-2)
RCC		54,75 (34,5-81)	38,5 (25-149,5)	10,25 (9,5-42,5)	3,75 (2,5-7,5)	6,5 (4-9,5)
	NN	23 (21-25)	11,5 (10,5-19)	4,5 (4-4,5)	1 (0,5-1)	1 (0,5-1)

**Tabelle 8.1.1. Absolute Anzahl (Median/HPF) der VSIG4<sup>+</sup> Zellen, der CD3<sup>+</sup> Zellen, der CD3<sup>+</sup> Zellen in Kontakt mit VSIG4<sup>+</sup> Zellen und der CD3<sup>+</sup>FOXO1<sup>+</sup> Zellen in und ohne Kontakt mit VSIG4<sup>+</sup> Zellen in Nierenzellkarzinomen und tumorfreien Geweben.**

Pro HPF wurde die Anzahl der VSIG4<sup>+</sup> Zellen, der CD3<sup>+</sup> Zellen, der CD3<sup>+</sup> Zellen in Kontakt mit VSIG4<sup>+</sup> Zellen, der CD3<sup>+</sup>FOXO1<sup>+</sup> Zellen in Kontakt mit VSIG4<sup>+</sup> Zellen und der CD3<sup>+</sup>FOXO1<sup>+</sup> Zellen ohne Kontakt mit VSIG4<sup>+</sup> Zellen ermittelt. Es wurden für jedes Gewebe n=10 HPFs ausgewertet. Daraus wurde der Median pro HPF der jeweiligen Zellpopulation für jedes Gewebe berechnet und in die Tabelle eingetragen. Aus den Werten der einzelnen Gewebe wurde der Median der Zellanzahl pro HPF für alle Tumoren und für alle tumorfreien Gewebe bestimmt und ebenfalls in die Tabelle (RCC bzw. NN) eingetragen.

## 8.2 Anzahl der CD3<sup>+</sup> Zellen und der CD3<sup>+</sup>FOXO1<sup>-</sup> Zellen in den verschiedenen Kompartimenten ermittelt aus der Immunfluoreszenzfärbung für CD3, FOXO1 und CD31

Gewebe		CD3 <sup>+</sup> Zellen aus 10 HPFs (Spannweite der absoluten Zellanzahl pro HPF)		
		Intravaskulär	Perivaskulär	Parenchymatös
T90		11 (0-3)	410 (16-97)	156 (3-47)
T105		15 (0-3)	580 (22-89)	646 (24-95)
	NN105	8 (0-2)	125 (6-24)	46 (1-10)
T114		22 (0-6)	128 (5-26)	132 (6-33)
	NN114	12 (0-4)	214 (3-41)	57 (0-18)
T118		10 (0-2)	200 (6-39)	163 (7-23)
	NN118	21 (0-5)	119 (5-30)	56 (2-18)

**Tabelle 8.2.1. Absolute Anzahl (Summe aus 10 HPFs) der CD3<sup>+</sup> Zellen in den verschiedenen Kompartimenten in Nierenzellkarzinomen und tumorfreien Geweben.**

Pro HPF wurde die Anzahl der CD3<sup>+</sup> Zellen in jedem Kompartiment ermittelt. Anschließend wurden für jedes Kompartiment die Anzahlen der CD3<sup>+</sup> Zellen aus 10 HPFs des Gewebes addiert und die Summen in die Tabelle eingetragen.

Gewebe		CD3 <sup>+</sup> FOXO1 <sup>-</sup> Zellen aus 10 HPFs (Spannweite der absoluten Zellanzahl pro HPF)		
		Intravaskulär	Perivaskulär	Parenchymatös
T90		9 (0-3)	330 (12-80)	115 (3-32)
T105		11 (0-3)	408 (13-67)	437 (15-76)
	NN105	7 (0-2)	100 (6-19)	38 (1-7)
T114		14 (0-5)	90 (3-17)	95 (4-23)
	NN114	9 (0-3)	208 (3-41)	55 (0-17)
T118		5 (0-2)	84 (0-19)	67 (3-10)
	NN118	14 (0-3)	101 (5-26)	48 (1-16)

**Tabelle 8.2.2. Absolute Anzahl (Summe aus 10 HPFs) der CD3<sup>+</sup>FOXO1<sup>-</sup> Zellen in den verschiedenen Kompartimenten in Nierenzellkarzinomen und tumorfreien Geweben.**

Pro HPF wurde die Anzahl der CD3<sup>+</sup>FOXO1<sup>-</sup> Zellen in jedem Kompartiment ermittelt. Anschließend wurden für jedes Kompartiment die Anzahlen der CD3<sup>+</sup>FOXO1<sup>-</sup> Zellen aus 10 HPFs des Gewebes addiert und die Summen in die Tabelle eingetragen.

### 8.3 Analyse der Tumorgewebe T105, T114 und T118 mittels Durchflusszytometrie

Gewebe	% der VSIG4 <sup>+</sup> Zellen in den ercDC	% der VSIG4 <sup>+</sup> Zellen in den Makrophagen	% der CD3 <sup>+</sup> Zellen in den VSIG4 <sup>+</sup> Zellen
T105	78,3	70,5	5,55
T114	59,2	28,6	1,19
T118	78,6	45,6	10,9

**Tabelle 8.3.1. Analyse der Tumorgewebe T105, T114 und T118 mittels Durchflusszytometrie.**

Die Messungen und ihre Auswertung wurden von Dr. rer. nat. Dorothee Brech durchgeführt und zur Verfügung gestellt.

Gewebe-Zellsuspensionen wurden, wie in anderen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe (Brech 2015) beschrieben, aus den RCC-Geweben hergestellt und anschließend mittels Durchflusszytometrie (Oberflächenfärbung) untersucht. Für die Oberflächenfärbung der RCC-Gewebe-Zellsuspensionen wurden  $2 \times 10^5 - 8 \times 10^5$  Zellen verwendet. Diese wurden zuvor unter dem Mikroskop als potentielle Leukozyten innerhalb der Gewebe-Zellsuspension bestimmt. Die Gewebe-Zellsuspension wurde in ein 5 ml-FACS-Röhrchen überführt, mit 500  $\mu$ l PBS-EDTA-Puffer versetzt und für 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vollständig entfernt und das Zellpellet in 30  $\mu$ l PBS-EDTA-Puffer aufgenommen. Die zugegebene Antikörpermenge wurde individuell angepasst. Hierbei wurden sowohl die Anzahl lebender Leukozyten, die Gesamtanzahl lebender Zellen sowie die Gesamtanzahl toter Zellen berücksichtigt. Folgende Antikörper wurden verwendet: CD45-PeCy7 (Maus IgG1, Klon: HI30, Hersteller: BD Biosciences), CD11c-APC (Maus IgG1, Klon: B-ly6, Hersteller: BD Biosciences), CD3-PB (Maus IgG1, Klon: UCHT1, Hersteller: BD Biosciences), CD209-PE (Maus IgG2b, Klon: DCN46, Hersteller: BD Biosciences), CD14-PerCPCy5.5 (Maus IgG1, Klon: 61D3, Hersteller: eBioscience), VSIG4 (unmarkiert, Kaninchen, Klon: polyklonal, Hersteller: Abcam) zusammen mit Anti-Kaninchen-A488 (Ziege, Klon: Polyklonal, Hersteller: Thermo Fisher Scientific). Zusammen mit dem entsprechenden Volumen der Antikörper wurde, je nach Zellzahl, 1 - 3  $\mu$ l des Lebend/tot-Farbstoffs „near-IR fluorescence reactive dye“ (Hersteller: Thermo Fisher Scientific) zugegeben. Dieser fixierbare Lebend/Tot-Farbstoff dringt in tote Zellen ein, verbindet sich dort mit freien Aminen und bewirkt eine Anfärbung der Zellen, so dass diese durch die starke Fluoreszenz von den lebenden Zellen unterschieden werden können. Es folgte eine 25-minütige Inkubation bei 4°C im Dunkeln, danach wurde mit 500  $\mu$ l PBS-EDTA-Puffer gewaschen und für 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet je nach Größe und Zellzahl in 0,4 – 1 ml PBS-EDTA-Puffer aufgenommen. Um störende größere Gewebepartikel zu entfernen, wurde die Gewebe-Zellsuspension durch ein Zellsieb (Porengröße: 70  $\mu$ m) filtriert. Danach schloss sich eine 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit 200 U/ml DNase I an, um eine Verstopfung des Durchflusszytometers durch DNA-Fäden und darin verklumpte Zellen zu verhindern. Die Proben wurden am LSR II-Durchflusszytometer (Hersteller: BD Biosciences) analysiert. (Brech 2015)

Die Auswertung erfolgte mit der Software „FlowJo“ (Hersteller: TreeStar Inc). Im ersten Schritt wurden die CD45<sup>+</sup> Leukozyten ausgewählt. Anschließend wurden die lebenden Zellen und die Einzellzellen ausgewählt. Innerhalb dieser Population wurden die myeloischen CD11c<sup>+</sup> Zellen eingegrenzt. Anschließend wurden innerhalb der myeloischen Zellen die CD209<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> ercDC und die CD209<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> Makrophagen ausgewählt. Innerhalb der CD11c<sup>-</sup> Zellen wurden die CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten ausgewählt. (Brech 2015). Innerhalb der eingegrenzten ercDC und Makrophagen wurde der prozentuale Anteil der VSIG4<sup>+</sup> Zellen ermittelt. Innerhalb der VSIG4<sup>+</sup> Zellen wurde der prozentuale Anteil der CD3<sup>+</sup> Zellen ermittelt.

## 9 Literaturverzeichnis

Ahn, Jung Hoon; Lee, Yoon; Jeon, ChoonJu; Lee, Sang-Jin; Lee, Byung-Hak; Choi, Kang Duk; Bae, Yong-Soo (2002): Identification of the genes differentially expressed in human dendritic cell subsets by cDNA subtraction and microarray analysis. In: *Blood* 100 (5), S. 1742–1754.

Aran, Dvir; Camarda, Roman; Odegaard, Justin; Paik, Hyojung; Oskotsky, Boris; Krings, Gregor et al. (2017): Comprehensive analysis of normal adjacent to tumor transcriptomes. In: *Nature communications* 8 (1), S. 1077. DOI: 10.1038/s41467-017-01027-z.

Arstila, T. P.; Casrouge, A.; Baron, V.; Even, J.; Kanellopoulos, J.; Kourilsky, P. (1999): A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. In: *Science (New York, N.Y.)* 286 (5441), S. 958–961. DOI: 10.1126/science.286.5441.958.

Baharom, Faezzah; Thomas, Saskia; Rankin, Gregory; Lepzien, Rico; Pourazar, Jamshid; Behndig, Annelie F. et al. (2016): Dendritic Cells and Monocytes with Distinct Inflammatory Responses Reside in Lung Mucosa of Healthy Humans. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 196 (11), S. 4498–4509. DOI: 10.4049/jimmunol.1600071.

Barata, Pedro C.; Rini, Brian I. (2017): Treatment of renal cell carcinoma: Current status and future directions. In: *CA: a cancer journal for clinicians* 67 (6), S. 507–524. DOI: 10.3322/caac.21411.

Barnes, Tristan A.; Amir, Eitan (2017): HYPE or HOPE: the prognostic value of infiltrating immune cells in cancer. In: *British journal of cancer* 117 (4), S. 451–460. DOI: 10.1038/bjc.2017.220.

Bedke, Jens; Stühler, Viktoria; Stenzl, Arnulf; Brehmer, Bernhard (2018): Immunotherapy for kidney cancer: status quo and the future. In: *Current opinion in urology* 28 (1), S. 8–14. DOI: 10.1097/MOU.0000000000000466.

Bianchi-Frias, Daniella; Damodarasamy, Mamatha; Hernandez, Susana A.; Gil da Costa, Rui M.; Vakar-Lopez, Funda; Coleman, Ilsa M. et al. (2019): The Aged Microenvironment Influences the Tumorigenic Potential of Malignant Prostate Epithelial Cells. In: *Molecular cancer research : MCR* 17 (1), S. 321–331. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-18-0522.

Bilzer, Manfred; Roggel, Frigga; Gerbes, Alexander L. (2006): Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. In: *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 26 (10), S. 1175–1186. DOI: 10.1111/j.1478-3231.2006.01342.x.

Biswas, Subhra K.; Mantovani, Alberto (2010): Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. In: *Nature immunology* 11 (10), S. 889–896. DOI: 10.1038/ni.1937.

Bonilla, Francisco A.; Oettgen, Hans C. (2010): Adaptive immunity. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 125 (2 Suppl 2), S33-40. DOI: 10.1016/j.jaci.2009.09.017.

Brech, Dorothee (2015): Ein neuartiger humaner CD209+CD14+ myeloischer Zelltyp im klarzelligen Nierenzellkarzinom. Genexpressionsprofil, funktionelle Polarisierung und Einordnung im mononukleären Phagozytensystem. Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften. Ludwig-Maximilians-Universität, München. Institut für Molekulare Immunologie, Helmholtz Zentrum München.



Brierley, J. D.; Gospodarowicz, M. K.; O'Sullivan B.; Wittekind Ch. (2017): Einleitung. In: Christian Wittekind (Hg.): *TNM - Klassifikation maligner Tumoren*. 8. Aufl. Weinheim, Deutschland: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, S. 1–23.

Bromwich, E. J.; McArdle, P. A.; Canna, K.; McMillan, D. C.; McNicol, A-M; Brown, M.; Aitchison, M. (2003): The relationship between T-lymphocyte infiltration, stage, tumour grade and survival in patients undergoing curative surgery for renal cell cancer. In: *British journal of cancer* 89 (10), S. 1906–1908. DOI: 10.1038/sj.bjc.6601400.

Byun, Jung Mi; Jeong, Dae Hoon; Choi, In Hak; Lee, Dae Sim; Kang, Mi Seon; Jung, Keun Ok et al. (2017): The Significance of VSIG4 Expression in Ovarian Cancer. In: *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society* 27 (5), S. 872–878. DOI: 10.1097/IGC.0000000000000979.

Chaplin, David D. (2010): Overview of the immune response. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 125 (2 Suppl 2), S3-23. DOI: 10.1016/j.jaci.2009.12.980.

Chen, Daniel S.; Mellman, Ira (2017): Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. In: *Nature* 541 (7637), S. 321–330. DOI: 10.1038/nature21349.

Chen, Lieping; Flies, Dallas B. (2013): Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. In: *Nature reviews. Immunology* 13 (4), S. 227–242. DOI: 10.1038/nri3405.

Clark, Georgina J.; Silveira, Pablo A.; Hogarth, P. Mark; Hart, Derek N. J. (2019): The cell surface phenotype of human dendritic cells. In: *Seminars in cell & developmental biology* 86, S. 3–14. DOI: 10.1016/j.semcdb.2018.02.013.

Collin, Matthew; Bigley, Venetia (2018): Human dendritic cell subsets: an update. In: *Immunology* 154 (1), S. 3–20. DOI: 10.1111/imm.12888.

Collin, Matthew; McGovern, Naomi; Haniffa, Muzlifah (2013): Human dendritic cell subsets. In: *Immunology* 140 (1), S. 22–30. DOI: 10.1111/imm.12117.

Conrad, Curdin; Gregorio, Josh; Wang, Yi-Hong; Ito, Tomoki; Meller, Stephan; Hanabuchi, Shino et al. (2012): Plasmacytoid dendritic cells promote immunosuppression in ovarian cancer via ICOS costimulation of Foxp3(+) T-regulatory cells. In: *Cancer research* 72 (20), S. 5240–5249. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2271.

Cools, Nathalie; Ponsaerts, Peter; van Tendeloo, Viggo F. I.; Berneman, Zwi N. (2007): Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells. In: *Journal of leukocyte biology* 82 (6), S. 1365–1374. DOI: 10.1189/jlb.0307166.

Coomans de Brachène, Alexandra; Demoulin, Jean-Baptiste (2016): FOXO transcription factors in cancer development and therapy. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 73 (6), S. 1159–1172. DOI: 10.1007/s00018-015-2112-y.

Coulie, Pierre G.; van den Eynde, Benoît J.; van der Bruggen, Pierre; Boon, Thierry (2014): Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. In: *Nature reviews. Cancer* 14 (2), S. 135–146. DOI: 10.1038/nrc3670.

Curiel, Tyler J.; Wei, Shuang; Dong, Haidong; Alvarez, Xavier; Cheng, Pui; Mottram, Peter et al. (2003): Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. In: *Nature medicine* 9 (5), S. 562–567. DOI: 10.1038/nm863.

Curtis, Susanna A.; Cohen, Justine V.; Kluger, Harriet M. (2016): Evolving Immunotherapy Approaches for Renal Cell Carcinoma. In: *Current oncology reports* 18 (9), S. 57. DOI: 10.1007/s11912-016-0542-9.

Davies, Luke C.; Taylor, Philip R. (2015): Tissue-resident macrophages: then and now. In: *Immunology* 144 (4), S. 541–548. DOI: 10.1111/imm.12451.

Delves, P. J.; Roitt, I. M. (2000): The immune system. First of two parts. In: *The New England journal of medicine* 343 (1), S. 37–49. DOI: 10.1056/NEJM200007063430107.

Devi, K. Sanjana P.; Anandasabapathy, Niroshana (2017): The origin of DCs and capacity for immunologic tolerance in central and peripheral tissues. In: *Seminars in immunopathology* 39 (2), S. 137–152. DOI: 10.1007/s00281-016-0602-0.

Dijkers, P. F.; Medema, R. H.; Pals, C.; Banerji, L.; Thomas, N. S.; Lam, E. W. et al. (2000): Forkhead transcription factor FKHR-L1 modulates cytokine-dependent transcriptional regulation of p27(KIP1). In: *Molecular and cellular biology* 20 (24), S. 9138–9148. DOI: 10.1128/mcb.20.24.9138-9148.2000.

Dong, Haidong; Strome, Scott E.; Salomao, Diva R.; Tamura, Hideto; Hirano, Fumiya; Flies, Dallas B. et al. (2002): Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. In: *Nature medicine* 8 (8), S. 793–800. DOI: 10.1038/nm730.

Dumitriu, Ingrid E.; Dunbar, Donald R.; Howie, Sarah E.; Sethi, Tariq; Gregory, Christopher D. (2009): Human dendritic cells produce TGF-beta 1 under the influence of lung carcinoma cells and prime the differentiation of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 182 (5), S. 2795–2807. DOI: 10.4049/jimmunol.0712671.

Dunn, Gavin P.; Bruce, Allen T.; Ikeda, Hiroaki; Old, Lloyd J.; Schreiber, Robert D. (2002): Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. In: *Nature immunology* 3 (11), S. 991–998. DOI: 10.1038/ni1102-991.

Epelman, Slava; Lavine, Kory J.; Beaudin, Anna E.; Sojka, Dorothy K.; Carrero, Javier A.; Calderon, Boris et al. (2014): Embryonic and Adult-Derived Resident Cardiac Macrophages Are Maintained through Distinct Mechanisms at Steady State and during Inflammation. In: *Immunity* 40 (1), S. 91–104. DOI: 10.1016/j.immuni.2013.11.019.

Figel, Ainhoa-M; Brech, Dorothee; Prinz, Petra U.; Lettenmeyer, Ulrike K.; Eckl, Judith; Turqueti-Neves, Adriana et al. (2011): Human renal cell carcinoma induces a dendritic cell subset that uses T-cell crosstalk for tumor-permissive milieu alterations. In: *The American journal of pathology* 179 (1), S. 436–451. DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.03.011.

Finn, O. J. (2012): Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 23 Suppl 8, viii6-9. DOI: 10.1093/annonc/mds256.

Finsterbusch, Michaela; Kitching, A. Richard; Hickey, Michael J. (2017): Imaging Leukocyte Responses in the Kidney. In: *Transplantation* 101 (3), S. 506–516. DOI: 10.1097/TP.0000000000001557.

- Fontenot, Jason D.; Gavin, Marc A.; Rudensky, Alexander Y. (2003): Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. In: *Nature immunology* 4 (4), S. 330–336. DOI: 10.1038/ni904.
- Friedl, P.; Gunzer, M. (2001): Interaction of T cells with APCs: the serial encounter model. In: *Trends in immunology* 22 (4), S. 187–191. DOI: 10.1016/s1471-4906(01)01869-5.
- Galon, Jérôme; Costes, Anne; Sanchez-Cabo, Fatima; Kirilovsky, Amos; Mlecnik, Bernhard; Lagorce-Pagès, Christine et al. (2006): Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. In: *Science (New York, N.Y.)* 313 (5795), S. 1960–1964. DOI: 10.1126/science.1129139.
- Garcia-Vallejo, Juan J.; van Kooyk, Yvette (2015): DC-SIGN: The Strange Case of Dr. Jekyll and Mr. Hyde. In: *Immunity* 42 (6), S. 983–985. DOI: 10.1016/j.immuni.2015.05.021.
- Geissler, Katharina; Fornara, Paolo; Lautenschläger, Christine; Holzhausen, Hans-Jürgen; Seliger, Barbara; Riemann, Dagmar (2015): Immune signature of tumor infiltrating immune cells in renal cancer. In: *Oncoimmunology* 4 (1), e985082. DOI: 10.4161/2162402X.2014.985082.
- Gonzalez, Hugo; Hagerling, Catharina; Werb, Zena (2018): Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. In: *Genes & development* 32 (19-20), S. 1267–1284. DOI: 10.1101/gad.314617.118.
- Gordon, Siamon; Taylor, Philip R. (2005): Monocyte and macrophage heterogeneity. In: *Nature reviews. Immunology* 5 (12), S. 953–964. DOI: 10.1038/nri1733.
- Gorgani, Nick N.; Thathaisong, Umaporn; Mukaro, Violet R. S.; Pongpair, Ornnuthchar; Tirimacco, Amanda; Hii, Charles S. T.; Ferrante, Antonio (2011): Regulation of CR1g expression and phagocytosis in human macrophages by arachidonate, dexamethasone, and cytokines. In: *The American journal of pathology* 179 (3), S. 1310–1318. DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.05.021.
- Gospodarowicz, M. K.; Mason, M. (2017): Urologische Tumoren. In: Christian Wittekind (Hg.): TNM - Klassifikation maligner Tumoren. 8. Aufl. Weinheim, Deutschland: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, S. 241–266.
- Grakoui, A.; Bromley, S. K.; Sumen, C.; Davis, M. M.; Shaw, A. S.; Allen, P. M.; Dustin, M. L. (1999): The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. In: *Science (New York, N.Y.)* 285 (5425), S. 221–227. DOI: 10.1126/science.285.5425.221.
- Guilliams, Martin; Mildner, Alexander; Yona, Simon (2018): Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. In: *Immunity* 49 (4), S. 595–613. DOI: 10.1016/j.immuni.2018.10.005.
- Guo, Sheng; Yang, Chengying; Mei, Feng; Wu, Shengxi; Luo, Na; Fei, Lei et al. (2010): Down-regulation of Z39Ig on macrophages by IFN-gamma in patients with chronic HBV infection. In: *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 136 (2), S. 282–291. DOI: 10.1016/j.clim.2010.03.007.
- Hanahan, Douglas; Weinberg, Robert A. (2011): Hallmarks of cancer: the next generation. In: *Cell* 144 (5), S. 646–674. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

Hara, Takuto; Miyake, Hideaki; Fujisawa, Masato (2017): Expression pattern of immune checkpoint-associated molecules in radical nephrectomy specimens as a prognosticator in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with tyrosine kinase inhibitors. In: *Urologic oncology* 35 (6), S. 363–369. DOI: 10.1016/j.urolonc.2017.01.002.

He, Jeannie Q.; Katschke, Kenneth J.; Gribling, Peter; Suto, Eric; Lee, Wyne P.; Diehl, Lauri et al. (2013): CRlg mediates early Kupffer cell responses to adenovirus. In: *Journal of leukocyte biology* 93 (2), S. 301–306. DOI: 10.1189/jlb.0612311.

He, Jeannie Q.; Wiesmann, Christian; van Lookeren Campagne, Menno (2008): A role of macrophage complement receptor CRlg in immune clearance and inflammation. In: *Molecular immunology* 45 (16), S. 4041–4047. DOI: 10.1016/j.molimm.2008.07.011.

Heath, William R.; Belz, Gabrielle T.; Behrens, Georg M. N.; Smith, Christopher M.; Forehan, Simon P.; Parish, Ian A. et al. (2004): Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. In: *Immunological reviews* 199, S. 9–26. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2004.00142.x.

Hedrick, Stephen M.; Hess Michelini, Rodrigo; Doedens, Andrew L.; Goldrath, Ananda W.; Stone, Erica L. (2012): FOXO transcription factors throughout T cell biology. In: *Nature reviews. Immunology* 12 (9), S. 649–661. DOI: 10.1038/nri3278.

Helmy, Karim Y.; Katschke, Kenneth J.; Gorgani, Nick N.; Kljavin, Noelyn M.; Elliott, J. Michael; Diehl, Lauri et al. (2006): CRlg: a macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens. In: *Cell* 124 (5), S. 915–927. DOI: 10.1016/j.cell.2005.12.039.

Hess Michelini, Rodrigo; Doedens, Andrew L.; Goldrath, Ananda W.; Hedrick, Stephen M. (2013): Differentiation of CD8 memory T cells depends on Foxo1. In: *The Journal of experimental medicine* 210 (6), S. 1189–1200. DOI: 10.1084/jem.20130392.

Hu, Chao; Li, Long; Ding, Peipei; Li, Ling; Ge, Xiaowen; Zheng, Long et al. (2018): Complement Inhibitor CRlg/FH Ameliorates Renal Ischemia Reperfusion Injury via Activation of PI3K/AKT Signaling. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 201 (12), S. 3717–3730. DOI: 10.4049/jimmunol.1800987.

Hwang, Wei-Ting; Adams, Sarah F.; Tahirovic, Emin; Hagemann, Ian S.; Coukos, George (2012): Prognostic significance of tumor-infiltrating T cells in ovarian cancer: a meta-analysis. In: *Gynecologic oncology* 124 (2), S. 192–198. DOI: 10.1016/j.ygyno.2011.09.039.

Iannello, Alexandre; Thompson, Thornton W.; Ardolino, Michele; Marcus, Assaf; Raulet, David H. (2016): Immunosurveillance and immunotherapy of tumors by innate immune cells. In: *Current opinion in immunology* 38, S. 52–58. DOI: 10.1016/j.coi.2015.11.001.

Irvine, Katharine M.; Banh, Xuan; Gadd, Victoria L.; Wojcik, Kyle K.; Ariffin, Juliana K.; Jose, Sara et al. (2016): CRlg-expressing peritoneal macrophages are associated with disease severity in patients with cirrhosis and ascites. In: *JCI insight* 1 (8), e86914. DOI: 10.1172/jci.insight.86914.

Jacobs, Frank M. J.; van der Heide, Lars P.; Wijchers, Patrick J. E. C.; Burbach, J. Peter H.; Hoekman, Marco F. M.; Smidt, Marten P. (2003): FoxO6, a novel member of the FoxO class of transcription

factors with distinct shuttling dynamics. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (38), S. 35959–35967. DOI: 10.1074/jbc.M302804200.

Jonasch, Eric; Gao, Jianjun; Rathmell, W. Kimryn (2014): Renal cell carcinoma. In: *BMJ (Clinical research ed.)* 349, g4797. DOI: 10.1136/bmj.g4797.

Jung, Keunok; Kang, Miseon; Park, Cheol; Hyun Choi, Yung; Jeon, Youkyung; Park, Se-Ho et al. (2012): Protective role of V-set and immunoglobulin domain-containing 4 expressed on kupffer cells during immune-mediated liver injury by inducing tolerance of liver T- and natural killer T-cells. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 56 (5), S. 1838–1848. DOI: 10.1002/hep.25906.

Jung, Keunok; Seo, Su-Kil; Choi, Inhak (2015): Endogenous VSIG4 negatively regulates the helper T cell-mediated antibody response. In: *Immunology letters* 165 (2), S. 78–83. DOI: 10.1016/j.imlet.2015.04.004.

Kahlmeyer, Andreas; Stöhr, Christine G.; Hartmann, Arndt; Goebell, Peter J.; Wullich, Bernd; Wach, Sven et al. (2019): Expression of PD-1 and CTLA-4 Are Negative Prognostic Markers in Renal Cell Carcinoma. In: *Journal of clinical medicine* 8 (5). DOI: 10.3390/jcm8050743.

Kammula, Ellen C.; Mötter, Jessica; Gorgels, Alexandra; Jonas, Esther; Hoffmann, Silke; Willbold, Dieter (2012): Brain transcriptome-wide screen for HIV-1 Nef protein interaction partners reveals various membrane-associated proteins. In: *PLoS one* 7 (12), e51578. DOI: 10.1371/journal.pone.0051578.

Kang, Myoung Jae; Kim, Kyoung Min; Bae, Jun Sang; Park, Ho Sung; Lee, Ho; Chung, Myoung Ja et al. (2013): Tumor-infiltrating PD1-Positive Lymphocytes and FoxP3-Positive Regulatory T Cells Predict Distant Metastatic Relapse and Survival of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. In: *Translational oncology* 6 (3), S. 282–289. DOI: 10.1593/tlo.13256.

Katschke, Kenneth J.; Helmy, Karim Y.; Steffek, Micah; Xi, Hongkang; Yin, JianPing; Lee, Wyne P. et al. (2007): A novel inhibitor of the alternative pathway of complement reverses inflammation and bone destruction in experimental arthritis. In: *The Journal of experimental medicine* 204 (6), S. 1319–1325. DOI: 10.1084/jem.20070432.

Keizer, Peter L. J. de; Packer, Leisl M.; Szybowska, Anna A.; Riedl-Polderman, Paulien E.; van den Broek, Niels J. F.; Bruin, Alain de et al. (2010): Activation of forkhead box O transcription factors by oncogenic BRAF promotes p21cip1-dependent senescence. In: *Cancer research* 70 (21), S. 8526–8536. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1563.

Kerdiles, Yann M.; Beisner, Daniel R.; Tinoco, Roberto; Dejean, Anne S.; Castrillon, Diego H.; DePinho, Ronald A.; Hedrick, Stephen M. (2009): Foxo1 links homing and survival of naive T cells by regulating L-selectin, CCR7 and interleukin 7 receptor. In: *Nature immunology* 10 (2), S. 176–184. DOI: 10.1038/ni.1689.

Kerdiles, Yann M.; Stone, Erica L.; Beisner, Daniel R.; Beisner, Daniel L.; McGargill, Maureen A.; Ch'en, Irene L. et al. (2010): Foxo transcription factors control regulatory T cell development and function. In: *Immunity* 33 (6), S. 890–904. DOI: 10.1016/j.immuni.2010.12.002.

Kessenbrock, Kai; Plaks, Vicki; Werb, Zena (2010): Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. In: *Cell* 141 (1), S. 52–67. DOI: 10.1016/j.cell.2010.03.015.

- Kim, Seung-Mi; Oh, Se Won; Park, Sang Hyun; Hur, Dae Young; Hong, Seung-Woo; Han, Sang Youb (2017): Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 induces epithelial to mesenchymal transition by inducing V-set Ig domain containing 4 (VSIG4) expression via NF- $\kappa$ B in renal tubular epithelial HK-2 cells. In: *Biochemical and biophysical research communications* 492 (3), S. 316–322. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.08.116.
- Krempski, James; Karyampudi, Lavakumar; Behrens, Marshall D.; Erskine, Courtney L.; Hartmann, Lynn; Dong, Haidong et al. (2011): Tumor-infiltrating programmed death receptor-1+ dendritic cells mediate immune suppression in ovarian cancer. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 186 (12), S. 6905–6913. DOI: 10.4049/jimmunol.1100274.
- Kuang, Dong-Ming; Zhao, Qiyi; Peng, Chen; Xu, Jing; Zhang, Jing-Ping; Wu, Changyou; Zheng, Limin (2009): Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1. In: *The Journal of experimental medicine* 206 (6), S. 1327–1337. DOI: 10.1084/jem.20082173.
- Lainé, Alexandra; Martin, Bruno; Luka, Marine; Mir, Lucile; Auffray, Cédric; Lucas, Bruno et al. (2015): Foxo1 Is a T Cell-Intrinsic Inhibitor of the ROR $\gamma$ t-Th17 Program. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 195 (4), S. 1791–1803. DOI: 10.4049/jimmunol.1500849.
- Lam, Eric W-F; Brosens, Jan J.; Gomes, Ana R.; Koo, Chuay-Yeng (2013): Forkhead box proteins: tuning forks for transcriptional harmony. In: *Nature reviews. Cancer* 13 (7), S. 482–495. DOI: 10.1038/nrc3539.
- Langnaese, K.; Colleaux, L.; Kloos, D. U.; Fontes, M.; Wieacker, P. (2000): Cloning of Z39lg, a novel gene with immunoglobulin-like domains located on human chromosome X. In: *Biochimica et biophysica acta* 1492 (2-3), S. 522–525. DOI: 10.1016/s0167-4781(00)00131-7.
- Lanitis, Evripidis; Irving, Melita; Coukos, George (2015): Targeting the tumor vasculature to enhance T cell activity. In: *Current opinion in immunology* 33, S. 55–63. DOI: 10.1016/j.coi.2015.01.011.
- Lee, Min-Young; Kim, Won-Jung; Kang, Yoon-Joong; Jung, Young-Mi; Kang, Young-Mo; Suk, Kyoungho et al. (2006): Z39lg is expressed on macrophages and may mediate inflammatory reactions in arthritis and atherosclerosis. In: *Journal of leukocyte biology* 80 (4), S. 922–928. DOI: 10.1189/jlb.0306160.
- Li, Yan; Wang, Yi-Qin; Wang, Dai-Hong; Hou, Wei-Ping; Zhang, Ying; Li, Ming et al. (2014): Costimulatory molecule VSIG4 exclusively expressed on macrophages alleviates renal tubulointerstitial injury in VSIG4 KO mice. In: *Journal of nephrology* 27 (1), S. 29–36. DOI: 10.1007/s40620-013-0022-3.
- Liao, Yunmei; Guo, Sheng; Chen, Yongwen; Cao, Dayan; Xu, Huan; Yang, Chengying et al. (2014): VSIG4 expression on macrophages facilitates lung cancer development. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 94 (7), S. 706–715. DOI: 10.1038/labinvest.2014.73.
- Lieberman, Linda A.; Mizui, Masayuki; Nalbandian, Angèle; Bossé, Robin; Crispín, José C.; Tsokos, George C. (2015): Complement receptor of the immunoglobulin superfamily reduces murine lupus nephritis and cutaneous disease. In: *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 160 (2), S. 286–291. DOI: 10.1016/j.clim.2015.05.006.

Liotta, Francesco; Gacci, Mauro; Frosali, Francesca; Querci, Valentina; Vittori, Gianni; Lapini, Alberto et al. (2011): Frequency of regulatory T cells in peripheral blood and in tumour-infiltrating lymphocytes correlates with poor prognosis in renal cell carcinoma. In: *BJU international* 107 (9), S. 1500–1506. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2010.09555.x.

Ljungberg, Börje; Albiges, Laurance; Abu-Ghanem, Yasmin; Bensalah, Karim; Dabestani, Saeed; Fernández-Pello, Sergio et al. (2019): European Association of Urology Guidelines on Renal Cell Carcinoma: The 2019 Update. In: *European urology* 75 (5), S. 799–810. DOI: 10.1016/j.eururo.2019.02.011.

Luo, Chong T.; Li, Ming O. (2018): Foxo transcription factors in T cell biology and tumor immunity. In: *Seminars in cancer biology* 50, S. 13–20. DOI: 10.1016/j.semcancer.2018.04.006.

Luo, Chong T.; Liao, Will; Dadi, Saida; Toure, Ahmed; Li, Ming O. (2016): Graded Foxo1 activity in Treg cells differentiates tumour immunity from spontaneous autoimmunity. In: *Nature* 529 (7587), S. 532–536. DOI: 10.1038/nature16486.

Ma, Yuefang; Usuwanthim, Kanchana; Munawara, Usma; Quach, Alex; Gorgani, Nick N.; Abbott, Catherine A. et al. (2015): Protein kinase  $\alpha$  regulates the expression of complement receptor Ig in human monocyte-derived macrophages. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 194 (6), S. 2855–2861. DOI: 10.4049/jimmunol.1303477.

Malissen, B. (1999): Dancing the immunological two-step. In: *Science (New York, N.Y.)* 285 (5425), S. 207–208. DOI: 10.1126/science.285.5425.207.

Mantovani, Alberto; Biswas, Subhra K.; Galdiero, Maria Rosaria; Sica, Antonio; Locati, Massimo (2013): Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. In: *The Journal of pathology* 229 (2), S. 176–185. DOI: 10.1002/path.4133.

Martel, Catherine de; Ferlay, Jacques; Franceschi, Silvia; Vignat, Jérôme; Bray, Freddie; Forman, David; Plummer, Martyn (2012): Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. In: *The Lancet. Oncology* 13 (6), S. 607–615. DOI: 10.1016/S1470-2045(12)70137-7.

Masouris, Ilias (2016): Verteilung und zytotoxische Qualität von T-Zellen und natürlichen Killerzellen im klarzelligen Nierenzellkarzinom. Gefäßsystem-bezogene Lokalisation und Ausstattung mit Perforin beeinflussen Metastasierung und Tumor-spezifisches Überleben. Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin. Ludwig-Maximilians-Universität, München. Institut für Molekulare Immunologie, Helmholtz Zentrum München.

Medema, R. H.; Kops, G. J.; Bos, J. L.; Burgering, B. M. (2000): AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. In: *Nature* 404 (6779), S. 782–787. DOI: 10.1038/35008115.

Menyhart, Otilia; Kakisaka, Tatsuhiko; Pongor, Lőrinc Sándor; Uetake, Hiroyuki; Goel, Ajay; Györffy, Balázs (2019): Uncovering Potential Therapeutic Targets in Colorectal Cancer by Deciphering Mutational Status and Expression of Druggable Oncogenes. In: *Cancers* 11 (7). DOI: 10.3390/cancers11070983.

- Merza, Hussein; Bilusic, Marijo (2017): Current Management Strategy for Metastatic Renal Cell Carcinoma and Future Directions. In: *Current oncology reports* 19 (4), S. 27. DOI: 10.1007/s11912-017-0583-8.
- Michielsen, Adriana J.; Hogan, Andrew E.; Marry, Joseph; Tosetto, Miriam; Cox, Fionnuala; Hyland, John M. et al. (2011): Tumour tissue microenvironment can inhibit dendritic cell maturation in colorectal cancer. In: *PloS one* 6 (11), e27944. DOI: 10.1371/journal.pone.0027944.
- Mitra, Abhisek; Mishra, Lopa; Li, Shulin (2015): EMT, CTCs and CSCs in tumor relapse and drug-resistance. In: *Oncotarget* 6 (13), S. 10697–10711. DOI: 10.18632/oncotarget.4037.
- Molawi, Kaaweh; Wolf, Yochai; Kandalla, Prashanth K.; Favret, Jeremy; Hagemeyer, Nora; Frenzel, Kathrin et al. (2014): Progressive replacement of embryo-derived cardiac macrophages with age. In: *The Journal of experimental medicine* 211 (11), S. 2151–2158. DOI: 10.1084/jem.20140639.
- Mosser, David M.; Edwards, Justin P. (2008): Exploring the full spectrum of macrophage activation. In: *Nature reviews. Immunology* 8 (12), S. 958–969. DOI: 10.1038/nri2448.
- Motz, Gregory T.; Santoro, Stephen P.; Wang, Li-Ping; Garrabrant, Tom; Lastra, Ricardo R.; Hagemann, Ian S. et al. (2014): Tumor endothelium FasL establishes a selective immune barrier promoting tolerance in tumors. In: *Nature medicine* 20 (6), S. 607–615. DOI: 10.1038/nm.3541.
- Mulligan, Jennifer Konopa; Young, M. Rita I. (2010): Tumors induce the formation of suppressor endothelial cells in vivo. In: *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 59 (2), S. 267–277. DOI: 10.1007/s00262-009-0747-y.
- Munawara, Usma; Small, Annabelle G.; Quach, Alex; Gorgani, Nick N.; Abbott, Catherine A.; Ferrante, Antonio (2017): Cytokines regulate complement receptor immunoglobulin expression and phagocytosis of *Candida albicans* in human macrophages: A control point in anti-microbial immunity. In: *Scientific reports* 7 (1), S. 4050. DOI: 10.1038/s41598-017-04325-0.
- Nicholson, Lindsay B. (2016): The immune system. In: *Essays in biochemistry* 60 (3), S. 275–301. DOI: 10.1042/EBC20160017.
- Noessner, Elfriede (2017): DGK- $\alpha$ : A Checkpoint in Cancer-Mediated Immuno-Inhibition and Target for Immunotherapy. In: *Frontiers in cell and developmental biology* 5, S. 16. DOI: 10.3389/fcell.2017.00016.
- Noessner, Elfriede; Brech, Dorothee; Mendler, Anna N.; Masouris, Ilias; Schlenker, Ramona; Prinz, Petra U. (2012): Intratumoral alterations of dendritic-cell differentiation and CD8(+) T-cell anergy are immune escape mechanisms of clear cell renal cell carcinoma. In: *Oncoimmunology* 1 (8), S. 1451–1453. DOI: 10.4161/onci.21356.
- Noessner, Elfriede; Lindenmeyer, Maja; Nelson, Peter J.; Segerer, Stephan (2011): Dendritic cells in human renal inflammation--Part II. In: *Nephron. Experimental nephrology* 119 (4), e91-8. DOI: 10.1159/000332032.
- O'Donnell, Jake S.; Teng, Michele W. L.; Smyth, Mark J. (2019): Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. In: *Nature reviews. Clinical oncology* 16 (3), S. 151–167. DOI: 10.1038/s41571-018-0142-8.



- Ouyang, Weiming; Beckett, Omar; Flavell, Richard A.; Li, Ming O. (2009): An essential role of the Forkhead-box transcription factor Foxo1 in control of T cell homeostasis and tolerance. In: *Immunity* 30 (3), S. 358–371. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.02.003.
- Ouyang, Weiming; Beckett, Omar; Ma, Qian; Paik, Ji-hye; DePinho, Ronald A.; Li, Ming O. (2010): Foxo proteins cooperatively control the differentiation of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. In: *Nature immunology* 11 (7), S. 618–627. DOI: 10.1038/ni.1884.
- Ouyang, Weiming; Li, Ming O. (2011): Foxo: in command of T lymphocyte homeostasis and tolerance. In: *Trends in immunology* 32 (1), S. 26–33. DOI: 10.1016/j.it.2010.10.005.
- Ouyang, Weiming; Liao, Will; Luo, Chong T.; Yin, Na; Huse, Morgan; Kim, Myoungjoo V. et al. (2012): Novel Foxo1-dependent transcriptional programs control T(reg) cell function. In: *Nature* 491 (7425), S. 554–559. DOI: 10.1038/nature11581.
- Pagès, F.; Galon, J.; Dieu-Nosjean, M-C; Tartour, E.; Sautès-Fridman, C.; Fridman, W-H (2010): Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. In: *Oncogene* 29 (8), S. 1093–1102. DOI: 10.1038/onc.2009.416.
- Palucka, A. Karolina; Coussens, Lisa M. (2016): The Basis of Oncoimmunology. In: *Cell* 164 (6), S. 1233–1247. DOI: 10.1016/j.cell.2016.01.049.
- Parkin, J.; Cohen, B. (2001): An overview of the immune system. In: *Lancet (London, England)* 357 (9270), S. 1777–1789. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)04904-7.
- Pollard, Jeffrey W. (2009): Trophic macrophages in development and disease. In: *Nature reviews. Immunology* 9 (4), S. 259–270. DOI: 10.1038/nri2528.
- Prinz, Petra U.; Mandler, Anna N.; Masouris, Ilias; Durner, Leopold; Oberneder, Ralph; Noessner, Elfriede (2012): High DGK- $\alpha$  and disabled MAPK pathways cause dysfunction of human tumor-infiltrating CD8<sup>+</sup> T cells that is reversible by pharmacologic intervention. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 188 (12), S. 5990–6000. DOI: 10.4049/jimmunol.1103028.
- Quail, Daniela F.; Joyce, Johanna A. (2013): Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. In: *Nature medicine* 19 (11), S. 1423–1437. DOI: 10.1038/nm.3394.
- Rao, Rajesh R.; Li, Qingsheng; Gubbels Bupp, Melanie R.; Shrikant, Protul A. (2012): Transcription factor Foxo1 represses T-bet-mediated effector functions and promotes memory CD8<sup>(+)</sup> T cell differentiation. In: *Immunity* 36 (3), S. 374–387. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.01.015.
- Reis, Edimara S.; Mastellos, Dimitrios C.; Ricklin, Daniel; Mantovani, Alberto; Lambris, John D. (2018): Complement in cancer: untangling an intricate relationship. In: *Nature reviews. Immunology* 18 (1), S. 5–18. DOI: 10.1038/nri.2017.97.
- Reis e Sousa, Caetano (2006): Dendritic cells in a mature age. In: *Nature reviews. Immunology* 6 (6), S. 476–483. DOI: 10.1038/nri1845.
- Rheinländer, Andreas; Schraven, Burkhardt; Bommhardt, Ursula (2018): CD45 in human physiology and clinical medicine. In: *Immunology letters* 196, S. 22–32. DOI: 10.1016/j.imlet.2018.01.009.

- Rini, Brian I.; Campbell, Steven C.; Escudier, Bernard (2009): Renal cell carcinoma. In: *Lancet (London, England)* 373 (9669), S. 1119–1132. DOI: 10.1016/S0140-6736(09)60229-4.
- Rodig, Nancy; Ryan, Timothy; Allen, Jessica A.; Pang, Hong; Grabie, Nir; Chernova, Tatyana et al. (2003): Endothelial expression of PD-L1 and PD-L2 down-regulates CD8+ T cell activation and cytotoxicity. In: *European journal of immunology* 33 (11), S. 3117–3126. DOI: 10.1002/eji.200324270.
- Roh, Jin; Jeon, Youkyoung; Lee, A-Neum; Lee, Sang Min; Kim, YeonMee; Sung, Chang Ohk et al. (2017): The immune checkpoint molecule V-set Ig domain-containing 4 is an independent prognostic factor for multiple myeloma. In: *Oncotarget* 8 (35), S. 58122–58132. DOI: 10.18632/oncotarget.19468.
- Salgado, R.; Denkert, C.; Demaria, S.; Sirtaine, N.; Klauschen, F.; Pruneri, G. et al. (2015): The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 26 (2), S. 259–271. DOI: 10.1093/annonc/mdu450.
- Schildberg, Frank A.; Klein, Sarah R.; Freeman, Gordon J.; Sharpe, Arlene H. (2016): Coinhibitory Pathways in the B7-CD28 Ligand-Receptor Family. In: *Immunity* 44 (5), S. 955–972. DOI: 10.1016/j.immuni.2016.05.002.
- Schmidt, Marc; Fernandez de Mattos, Silvia; van der Horst, Armando; Klompaker, Rob; Kops, Geert J. P. L.; Lam, Eric W-F et al. (2002): Cell cycle inhibition by FoxO forkhead transcription factors involves downregulation of cyclin D. In: *Molecular and cellular biology* 22 (22), S. 7842–7852. DOI: 10.1128/mcb.22.22.7842-7852.2002.
- Schulz, Christian; Perdiguero, Elisa Gomez; Chorro, Laurent; Szabo-Rogers, Heather; Cagnard, Nicolas; Kierdorf, Katrin et al. (2012): A Lineage of Myeloid Cells Independent of Myb and Hematopoietic Stem Cells. In: *Science (New York, N.Y.)* 336 (6077), S. 86–90. DOI: 10.1126/science.1219179.
- Schwartz, Ronald H. (2003): T cell anergy. In: *Annual review of immunology* 21, S. 305–334. DOI: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141110.
- Segerer, S.; Heller, F.; Lindenmeyer, M. T.; Schmid, H.; Cohen, C. D.; Draganovici, D. et al. (2008): Compartment specific expression of dendritic cell markers in human glomerulonephritis. In: *Kidney international* 74 (1), S. 37–46. DOI: 10.1038/ki.2008.99.
- Segura, Elodie; Amigorena, Sebastian (2013): Inflammatory dendritic cells in mice and humans. In: *Trends in immunology* 34 (9), S. 440–445. DOI: 10.1016/j.it.2013.06.001.
- Segura, Elodie; Touzot, Maxime; Bohineust, Armelle; Cappuccio, Antonio; Chiochia, Gilles; Hosmalin, Anne et al. (2013): Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation. In: *Immunity* 38 (2), S. 336–348. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.10.018.
- Selenko-Gebauer, Nicole; Majdic, Otto; Szekeres, Andreas; Höfler, Gerald; Guthann, Elisabeth; Korthäuer, Ulf et al. (2003): B7-H1 (programmed death-1 ligand) on dendritic cells is involved in the induction and maintenance of T cell anergy. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 170 (7), S. 3637–3644. DOI: 10.4049/jimmunol.170.7.3637.

Shapouri-Moghaddam, Abbas; Mohammadian, Saeed; Vazini, Hossein; Taghadosi, Mahdi; Esmaeili, Seyed-Alireza; Mardani, Fatemeh et al. (2018): Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. In: *Journal of cellular physiology* 233 (9), S. 6425–6440. DOI: 10.1002/jcp.26429.

Sharpe, Arlene H.; Freeman, Gordon J. (2002): The B7-CD28 superfamily. In: *Nature reviews. Immunology* 2 (2), S. 116–126. DOI: 10.1038/nri727.

Shetty, Shishir; Weston, Christopher J.; Oo, Ye H.; Westerlund, Nina; Stamataki, Zania; Youster, Janine et al. (2011): Common lymphatic endothelial and vascular endothelial receptor-1 mediates the transmigration of regulatory T cells across human hepatic sinusoidal endothelium. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 186 (7), S. 4147–4155. DOI: 10.4049/jimmunol.1002961.

Siddiqui, Sameer A.; Frigola, Xavier; Bonne-Annee, Sandra; Mercader, Maria; Kuntz, Susan M.; Krambeck, Amy E. et al. (2007): Tumor-infiltrating Foxp3-CD4+CD25+ T cells predict poor survival in renal cell carcinoma. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13 (7), S. 2075–2081. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2139.

Small, Annabelle Grace; Al-Baghdadi, Marwah; Quach, Alex; Hii, Charles; Ferrante, Antonio (2016): Complement receptor immunoglobulin: a control point in infection and immunity, inflammation and cancer 146, w14301. DOI: 10.4414/smw.2016.14301.

Speiser, Daniel E.; Ho, Ping-Chih; Verdeil, Grégory (2016): Regulatory circuits of T cell function in cancer. In: *Nature reviews. Immunology* 16 (10), S. 599–611. DOI: 10.1038/nri.2016.80.

Staron, Matthew M.; Gray, Simon M.; Marshall, Heather D.; Parish, Ian A.; Chen, Jonathan H.; Perry, Curtis J. et al. (2014): The transcription factor FoxO1 sustains expression of the inhibitory receptor PD-1 and survival of antiviral CD8(+) T cells during chronic infection. In: *Immunity* 41 (5), S. 802–814. DOI: 10.1016/j.immuni.2014.10.013.

Stelzer, G. T.; Shults, K. E.; Loken, M. R. (1993): CD45 gating for routine flow cytometric analysis of human bone marrow specimens. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 677, S. 265–280. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1993.tb38783.x.

Stoitzner, Patrizia; Green, Laura K.; Jung, Jae Y.; Price, Kylie M.; Atarea, Haley; Kivell, Bronwyn; Ronchese, Franca (2008): Inefficient presentation of tumor-derived antigen by tumor-infiltrating dendritic cells. In: *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 57 (11), S. 1665–1673. DOI: 10.1007/s00262-008-0487-4.

Tahbaz, Rana; Schmid, Marianne; Merseburger, Axel S. (2018): Prevention of kidney cancer incidence and recurrence: lifestyle, medication and nutrition. In: *Current opinion in urology* 28 (1), S. 62–79. DOI: 10.1097/MOU.0000000000000454.

Tanaka, Masashi; Nagai, Taku; Usami, Makoto; Hasui, Kazuhisa; Takao, Sonshin; Matsuyama, Takami (2012): Phenotypic and functional profiles of CR1g (Z39Ig)-expressing macrophages in the large intestine. In: *Innate immunity* 18 (2), S. 258–267. DOI: 10.1177/1753425911400641.

The Human Protein Atlas: VSIG4 - Antibodies. Online verfügbar unter <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000155659-VSIG4/antibody>, zuletzt geprüft am 28.06.2020.

Thurman, Joshua M.; Holers, V. Michael (2006): The central role of the alternative complement pathway in human disease. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 176 (3), S. 1305–1310. DOI: 10.4049/jimmunol.176.3.1305.

Tran Janco, Jo Marie; Lamichhane, Purushottam; Karyampudi, Lavakumar; Knutson, Keith L. (2015): Tumor-infiltrating dendritic cells in cancer pathogenesis. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 194 (7), S. 2985–2991. DOI: 10.4049/jimmunol.1403134.

Ueda, Kosuke; Suekane, Shigetaka; Kurose, Hirofumi; Chikui, Katsuaki; Nakiri, Makoto; Nishihara, Kiyooki et al. (2018): Prognostic value of PD-1 and PD-L1 expression in patients with metastatic clear cell renal cell carcinoma. In: *Urologic oncology* 36 (11), 499.e9-499.e16. DOI: 10.1016/j.urolonc.2018.07.003.

van Lookeren Campagne, Menno; Verschoor, Admar (2018): Pathogen clearance and immune adherence "revisited": Immuno-regulatory roles for CR1g. In: *Seminars in immunology* 37, S. 4–11. DOI: 10.1016/j.smim.2018.02.007.

van Lookeren Campagne, Menno; Wiesmann, Christian; Brown, Eric J. (2007): Macrophage complement receptors and pathogen clearance. In: *Cellular microbiology* 9 (9), S. 2095–2102. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2007.00981.x.

Vogt, Lorenz; Schmitz, Nicole; Kurrer, Michael O.; Bauer, Monika; Hinton, Heather I.; Behnke, Silvia et al. (2006): VSIG4, a B7 family-related protein, is a negative regulator of T cell activation. In: *The Journal of clinical investigation* 116 (10), S. 2817–2826. DOI: 10.1172/JCI25673.

Volpe, Alessandro; Finelli, Antonio; Gill, Inderbir S.; Jewett, Michael A. S.; Martignoni, Guido; Polascik, Thomas J. et al. (2012): Rationale for percutaneous biopsy and histologic characterisation of renal tumours. In: *European urology* 62 (3), S. 491–504. DOI: 10.1016/j.eururo.2012.05.009.

Volpe, Alessandro; Patard, Jean Jacques (2010): Prognostic factors in renal cell carcinoma. In: *World journal of urology* 28 (3), S. 319–327. DOI: 10.1007/s00345-010-0540-8.

Waisman, Ari; Lukas, Dominika; Clausen, Björn E.; Yogev, Nir (2017): Dendritic cells as gatekeepers of tolerance. In: *Seminars in immunopathology* 39 (2), S. 153–163. DOI: 10.1007/s00281-016-0583-z.

Walker, Michael G. (2002): Z39Ig is co-expressed with activated macrophage genes. In: *Biochimica et biophysica acta* 1574 (3), S. 387–390. DOI: 10.1016/s0167-4781(01)00358-x.

Walzog, Barbara; Fandrey, Joachim (2010): Blut: Ein flüssiges Organsystem. In: Rainer Klinke, Hans-Christian Pape, Armin Kurtz und Stefan Silbernagl (Hg.): *Physiologie*. 6. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, S. 224–256.

Wang, Minghui; Zhang, Xiangzhe; Zhao, Hongbo; Wang, Qishan; Pan, Yuchun (2009): FoxO gene family evolution in vertebrates. In: *BMC evolutionary biology* 9, S. 222. DOI: 10.1186/1471-2148-9-222.

Watchmaker, Payal B.; Lahl, Katharina; Lee, Mike; Baumjohann, Dirk; Morton, John; Kim, Sun Jung et al. (2014): Comparative transcriptional and functional profiling defines conserved programs of intestinal DC differentiation in humans and mice. In: *Nature immunology* 15 (1), S. 98–108. DOI: 10.1038/ni.2768.

Wculek, Stefanie K.; Cueto, Francisco J.; Mujal, Adriana M.; Melero, Ignacio; Krummel, Matthew F.; Sancho, David (2019): Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy. In: *Nature reviews. Immunology*. DOI: 10.1038/s41577-019-0210-z.

Webster, W. Scott; Lohse, Christine M.; Thompson, R. Houston; Dong, Haidong; Frigola, Xavier; Dicks, Demetrius L. et al. (2006): Mononuclear cell infiltration in clear-cell renal cell carcinoma independently predicts patient survival. In: *Cancer* 107 (1), S. 46–53. DOI: 10.1002/cncr.21951.

Weisheit, Christina K.; Engel, Daniel R.; Kurts, Christian (2015): Dendritic Cells and Macrophages: Sentinels in the Kidney. In: *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 10 (10), S. 1841–1851. DOI: 10.2215/CJN.07100714.

Wiesmann, Christian; Katschke, Kenneth J.; Yin, JianPing; Helmy, Karim Y.; Steffek, Micah; Fairbrother, Wayne J. et al. (2006): Structure of C3b in complex with CR1g gives insights into regulation of complement activation. In: *Nature* 444 (7116), S. 217–220. DOI: 10.1038/nature05263.

Wilde, Benjamin; van Paassen, Pieter; Damoiseaux, Jan; Heerings-Rewinkel, Petra; van Rie, Henk; Witzke, Oliver; Tervaert, Jan Willem Cohen (2009): Dendritic cells in renal biopsies of patients with ANCA-associated vasculitis. In: *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 24 (7), S. 2151–2156. DOI: 10.1093/ndt/gfp019.

Woltman, A. M.; Fijter, J. W. de; Zuidwijk, K.; Vlug, A. G.; Bajema, I. M.; van der Kooij, S. W. et al. (2007): Quantification of dendritic cell subsets in human renal tissue under normal and pathological conditions. In: *Kidney international* 71 (10), S. 1001–1008. DOI: 10.1038/sj.ki.5002187.

Wu, Ting; Dai, Yun (2017): Tumor microenvironment and therapeutic response. In: *Cancer letters* 387, S. 61–68. DOI: 10.1016/j.canlet.2016.01.043.

Wu, Zhaoying; Yang, Lin; Shi, Linsen; Song, Hu; Shi, Peicong; Yang, Ting et al. (2019): Prognostic Impact of Adenosine Receptor 2 (A2aR) and Programmed Cell Death Ligand 1 (PD-L1) Expression in Colorectal Cancer. In: *BioMed research international* 2019, S. 8014627. DOI: 10.1155/2019/8014627.

Xu, Shuxiong; Sun, Zhaolin; Li, Lian; Liu, Jun; He, Jian; Song, Dalong et al. (2010): Induction of T cells suppression by dendritic cells transfected with VSIG4 recombinant adenovirus. In: *Immunology letters* 128 (1), S. 46–50. DOI: 10.1016/j.imlet.2009.11.003.

Xu, Tao; Jiang, Ying; Yan, Yong; Wang, Hongxiang; Lu, Chengyin; Xu, Hanchong et al. (2015): VSIG4 is highly expressed and correlated with poor prognosis of high-grade glioma patients. In: *American journal of translational research* 7 (6), S. 1172–1180.

Yona, Simon; Kim, Ki-Wook; Wolf, Yochai; Mildner, Alexander; Varol, Diana; Breker, Michal et al. (2013): Fate Mapping Reveals Origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis. In: *Immunity* 38 (1), S. 79–91. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.12.001.

Zang, Xingxing; Allison, James P. (2006): To be or not to be B7. In: *The Journal of clinical investigation* 116 (10), S. 2590–2593. DOI: 10.1172/JCI30103.

Zhang, Qiong-wen; Liu, Lei; Gong, Chang-yang; Shi, Hua-shan; Zeng, Yun-hui; Wang, Xiao-ze et al. (2012): Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature. In: *PloS one* 7 (12), e50946. DOI: 10.1371/journal.pone.0050946.

Zhu, Sicong; Tan, Wenliang; Li, Wenxin; Zhou, Rui; Wu, Xiaolin; Chen, Xianqing et al. (2018): Low expression of VSIG4 is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma patients with hepatitis B infection. In: *Cancer management and research* 10, S. 3697–3705. DOI: 10.2147/CMAR.S165822.

## 10 Abkürzungen

ANCA	antineutrophile zytoplasmatische Antikörper ( <i>anti-neutrophil cytoplasmic antibodies</i> )
ANOVA	Varianzanalyse ( <i>analysis of variance</i> )
APZ	antigenpräsentierende Zelle
B7-H1	B7 Homolog 1
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CCL5	<i>C-C chemokine ligand 5</i>
CCR7	<i>C-C chemokine receptor type 7</i>
ccRCC	klarzelliges Nierenzellkarzinom ( <i>clear cell renal cell carcinoma</i> )
CXCL10	<i>C-X-C motif chemokine 10</i>
CD	Differenzierungscluster ( <i>cluster of differentiation</i> )
cDC	konventionelle ( <i>conventional</i> ) dendritische Zelle
Cdk	Zyclin-abhängige Kinase ( <i>cyclin dependent kinase</i> )
CR1	Komplementrezeptor 1 ( <i>complement receptor 1</i> )
CR3	Komplementrezeptor 3 ( <i>complement receptor 3</i> )
CRlg	<i>complement receptor immunoglobulin</i>
CT	Computertomographie
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten ( <i>cytotoxic T Lymphocytes</i> )
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
DAMPs	<i>danger-associated molecular patterns</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DC	dendritische Zelle ( <i>dendritic cell</i> )
DC-SIGN	<i>dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin</i>
DKG- $\alpha$	Diacylglycerol-Kinase $\alpha$
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
ercDC	in Nierenzellkarzinom angereicherte dendritische Zellen ( <i>enriched-in-renal-carcinoma dendritic cells</i> )
ERK	<i>Extracellular signal-Regulated Kinase</i>
FH	Faktor H
FOXO	<i>Forkhead-Box-O</i>
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor ( <i>granulocyte</i>

	<i>macrophage colony-stimulating factor</i> )	
HCC	hepatozelluläres Karzinom ( <i>hepatocellular carcinoma</i> )	
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor	
HPF	Hauptgesichtsfeld ( <i>high-power field</i> )	
huCRIg(L)	humanes langes CRIg-Protein	
huCRIg(S)	humanes kurzes CRIg-Protein	
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$	
Ig	Immunglobulin	
IKK	I $\kappa$ B-Kinase	
IL-x	Interleukin-x	
JNK	<i>C-Jun N-terminal kinase</i>	
LMP1	<i>latent membrane protein 1</i>	
LT- $\alpha$	Lymphotoxin-alpha	
M-CSF	Monozytenkolonien-stimulierender Faktor ( <i>macrophage colony-stimulating factor</i> )	
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )	
MMP	Matrixmetalloprotease	
moDC	Monozyten-abgeleitete dendritische Zelle	
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>	
MRT	Magnetresonanztomographie	
Mst1-Kinase	<i>mammalian Ste20-like kinase 1</i>	
mTOR	<i>mechanistic Target of Rapamycin</i>	
muCRIg	murines CRIg	
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>	
NK-Zelle	natürliche Killerzelle	
PAMPs	pathogen-assoziierte molekulare Muster ( <i>pathogen-associated molecular patterns</i> )	
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung	
PD-1	<i>programmed cell death protein 1</i>	
pDC	plasmazytoide dendritische Zelle	
PD-L1	<i>programmed cell death 1 ligand 1</i>	
PD-L2	<i>programmed cell death 1 ligand 2</i>	
PECAM-1	Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül ( <i>platelet/endothelial cell adhesion molecule 1</i> )	1
PFA	Paraformaldehyd	
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase	



pRCC	papilläres Nierenzellkarzinom
PRRs	<i>pattern recognition receptors</i>
RCC	Nierenzellkarzinom ( <i>renal cell carcinoma</i> )
ROI	Bereich von Interesse ( <i>region of interest</i> )
ROS	reaktive Sauerstoffspezies ( <i>reactive oxygen species</i> )
SGK	<i>serum and glucocorticoid-regulated kinase</i>
TAM	tumor-assoziierte Makrophagen
TGF- $\beta$ 1	Transformierender Wachstumsfaktor ( <i>transforming growth factor</i> ) - $\beta$ 1
T <sub>H</sub> -Zellen	T-Helferzellen
TIDC	tumorinfiltrierende dendritische Zellen
TIL	tumorinfiltrierende Lymphozyten
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	regulatorische T-Zellen
TZR	T-Zell-Rezeptor
UICC	<i>Union for International Cancer Control</i>
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor ( <i>vascular endothelial growth factor</i> )
VHL	von-Hippel-Lindau
VSIG4	<i>V-set and immunoglobulin domain-containing protein 4</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation ( <i>world health organisation</i> )
z.B.	zum Beispiel

## 11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich während meiner Doktorarbeit begleitet und unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Elfriede Nößner, die die Erstellung meiner Doktorarbeit mit einem sehr spannenden Thema ermöglichte. Sie stand jederzeit als Ansprechpartnerin zur Verfügung und führte mich immer wieder mit unseren konstruktiven fachlichen Diskussionen und mit ihren wertvollen Vorschlägen auf den richtigen Weg. Ihre große Begeisterung für die Wissenschaft und ihr tiefes Fachwissen haben mich sehr beeindruckt.

Bei Frau Anna Brandl möchte ich mich für die optimale technische Betreuung und die Unterstützung bei jeglichen technischen Fragen und Problemen danken.

Bei meiner Arbeitsgruppe (Adam, Anja, Anna, Babs, Doro, Julia, Julia, Luis, Thomas) sowie allen anderen ehemaligen Doktoranden, Master- und Bachelorstudenten möchte ich mich für die wunderschöne gemeinsame Zeit und für die Unterstützung und Hilfe bedanken. Ich möchte mich besonders bei Adam für die Unterstützung bei jeglichen Computerfragen und bei Doro für die Einarbeitung bedanken.

Zusätzlich möchte ich mich noch bei meiner Familie und besonders meinen Eltern bedanken. Sie sind mein großer Rückhalt. Sie haben mich immer unterstützt, sie waren und sind immer für mich da.

## Veröffentlichungen

Brech, Dorothee; Straub, Tobias; **Kokolakis, Evangelos**; Irmeler, Martin; Beckers, Johannes; Buettner, Florian; Schaeffeler, Elke; Winter, Stefan; Schwab, Matthias; Nelson, Peter J; Noessner, Elfriede (2020): A mosaic renal myeloid subtype with T-cell inhibitory and protumoral features is linked to immune escape and survival in clear cell renal cell cancer. In: *bioRxiv* 2020.01.20.912865. DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.01.20.912865>.

# Eidesstattliche Versicherung

Kokolakis, Evangelos

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

„Charakterisierung der T-Zellen im Kontakt mit ercDC in Nierenzellkarzinom“

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 21.05.2021

---

Ort, Datum

Evangelos Kokolakis

---

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand