

Aus der Abteilung Urologie
(Prof. Dr. med. R.-H. Ringert)
im Zentrum Chirurgie
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Untersuchung der Expression von Cyclooxygenase-2, VEGF und der
Gefäßdichte im Nierenzellkarzinom**

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

vorgelegt von
Libuša Galuschka
aus Balingen
Göttingen 2009

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Heuser

II. Berichterstatter / in: PD Dr. rer. nat. W. Krick

III. Berichterstatter / in:

Tag der mündlichen Prüfung: 11. August 2010

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Nierenzellkarzinom	1
1.2	Allgemeine Aspekte der Tumorentstehung	3
1.3	Die Cyclooxygenase-2 und ihre Bedeutung für die Tumorgenese	3
1.4	Tumorassoziierte Angiogenese	7
1.5	Der Gefäßwachstumsfaktor VEGF	9
1.6	Tumorassoziierte Makrophagen	10
1.7	Fragestellung	12
2	Material und Methoden	13
2.1	Überblick	13
2.2	Verbrauchsmaterialien	13
2.3	Technische Geräte	14
2.4	Untersuchungsmaterial	14
2.5	Untersuchungen an Tumorgewebe	15
2.5.1	Präparation der Gewebeschnitte	15
2.5.2	Histochemische Standardfärbung	16
2.5.3	Immunhistochemische Untersuchung	16
2.5.4	Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen	18
2.5.5	RNA-Extraktion aus Gewebe	18

2.6	Zellkulturexperimente	18
2.6.1	Nierenkarzinomzellkulturen und Tumorzellsphäroide	18
2.6.2	Makrophagenzellkulturen	19
2.6.3	Zellstimulation	19
2.6.4	RNA-Isolierung, Reinheitskontrolle und Quantifizierung	20
2.6.5	RNA-Reverse-Transkriptase PCR	21
2.6.6	Realtime PCR	22
2.6.7	Auswertung der Ergebnisse der Realtime PCR	24
2.6.8	Proteinnachweis mittels Western-Blot-Analyse	25
2.6.9	ELISA	27
2.7	Statistische Analyse	28
3	Ergebnisse	29
3.1	Untersuchungen an humanem Tumormaterial	29
3.1.1	COX-2-Proteinexpression und COX-2-mRNA-Expression im Nierenzellkarzinom	29
3.1.2	VEGF-Proteinexpression und VEGF-mRNA-Expression im Nierenzellkarzinom	30
3.1.3	Expression von COX-2 und VEGF im Zusammenhang mit der Tumorgefäßdichte und Tumornekrosen im Nierenzellkarzinom	35
3.2	In-vitro-Untersuchungen	38
3.2.1	COX-2- und VEGF-mRNA-Expression in Tumorzellen unter Hypoxie	38
3.2.2	COX-2- und VEGF-Proteinexpression in Tumorzellsphäroiden	39
3.2.3	COX-2- und VEGF-mRNA-Expression in Makrophagen unter Hypoxie und unter Stimulation mit nekrotischen Tumorzellen	40
3.2.4	COX-2- und VEGF-Proteinexpression in Makrophagen unter Hypoxie und unter Stimulation mit nekrotischen Tumorzellen	42

4	Diskussion	43
4.1	Die Expression von COX-2 im Nierenzellkarzinom	43
4.2	Die Expression von VEGF im Nierenzellkarzinom	47
4.3	Einfluß der COX-2-Expression auf die Expression von VEGF im Nierenzellkarzinom	48
4.4	Einfluß der Expression von COX-2 und VEGF auf die Tumorgefäßdichte und Tumornekrosen im Nierenzellkarzinom	48
4.5	Die Expression von COX-2 und VEGF in Tumorzellen und Makrophagen unter Hypoxie und unter Stimulation mit nekrotischen Tumorzellen	50
4.6	Ausblick: COX-2-Inhibitoren – eine Option in der Prävention und Behandlung von Nierenzellkarzinomen?	51
5	Zusammenfassung	53
6	Literaturverzeichnis	54

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung der Umwandlung von Arachidonsäure in Prostaglandine und Thromboxan durch die Enzyme COX-1 und COX-2	4
Abbildung 2:	Rolle der COX-2 in Tumoren	6
Abbildung 3:	Exemplarische Darstellung einer elektrophoretischen mRNA-Probenauftrennung und des daraus erstellten Elektropherogrammes	20
Abbildung 4:	Exemplarische Darstellung einer cDNA-Probenmessung mittels Realtime PCR	22
Abbildung 5:	Exemplarische Darstellung einer Standardgeraden in der Realtime PCR	22
Abbildung 6:	Immunhistochemische Darstellung von COX-2 und VEGF in Tumorgewebe und tumorfremem Gewebe	31
Abbildung 7:	Immunhistochemische Darstellung von COX-2, VEGF und Makrophagen in Tumorgewebe	32
Abbildung 8:	Korrelationsanalyse der relativen VEGF-mRNA-Expression und der VEGF-Protein-Expression in Tumorgewebe	34
Abbildung 9:	a) Korrelationsanalyse der relativen VEGF-mRNA-Expression und der mikrovaskulären Gefäßdichte im Tumorgewebe b) Korrelationsanalyse der VEGF-Protein-Expression und der mikrovaskulären Gefäßdichte im Tumorgewebe	36
Abbildung 10:	Balkendiagramm: Mikrovaskuläre Gefäßdichte in Tumoren	37
Abbildung 11:	Balkendiagramm: Relative mRNA-Expression von COX-2 und VEGF in Tumorzellen unter Hypoxie	38
Abbildung 12:	Proteinexpression von COX-2 und VEGF in Sphäroiden und multizellulären Aggregaten von Tumorzellen	39
Abbildung 13:	Boxplot-Diagramm: COX-2-mRNA-Expression in Makrophagen unter Hypoxie und unter Stimulation mit nekrotischen Tumorzellen	40
Abbildung 14:	Boxplot-Diagramm: VEGF-mRNA-Expression in Makrophagen unter Hypoxie und unter Stimulation mit nekrotischen Tumorzellen	41
Abbildung 15:	Exemplarischer Western-Blot: Expression von COX-2-Protein in Makrophagen unter Stimulation mit nekrotischen Tumorzellen	42

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	TNM-Klassifikation der Nierenzellkarzinome	2
Tabelle 2:	WHO-Klassifikation der Nierenzellkarzinome	2
Tabelle 3:	Pathologische Typisierung, Differenzierungsgrad und Tumorstadium der untersuchten Tumoren	15
Tabelle 4:	Färbeprotokolle für die immunhistochemischen Untersuchungen	17
Tabelle 5:	Verwendete Antikörper für die immunhistochemischen Untersuchungen	17
Tabelle 6:	Materialien für die immunhistochemischen Untersuchungen	17
Tabelle 7:	Materialien für die Herstellung des Zellkulturmediums	19
Tabelle 8:	Reaktionsansatz für die RNA-Reverse-Transkriptase PCR	21
Tabelle 9:	Temperaturprofil für die RNA-Reverse-Transkriptase PCR	21
Tabelle 10:	Materialien für die RNA-Reverse-Transkriptase PCR	21
Tabelle 11:	Reaktionsansatz für die Realtime PCR	23
Tabelle 12:	Temperaturprofile der Realtime PCR	23
Tabelle 13:	Verwendete Primer für die Realtime PCR	24
Tabelle 14:	Materialien für die Realtime PCR	24
Tabelle 15:	Inkubationsprotokolle für den Western-Blot	26
Tabelle 16:	Verwendete Antikörper für den Western-Blot	27
Tabelle 17:	Materialien für die Gelelektrophorese und die Chemilumineszenzreaktion	27
Tabelle 18:	Synopsis der immunhistochemischen Daten und der PCR-Daten	33
Tabelle 19:	Untersuchungen der COX-2-Expression in menschlichen Nierenzellkarzinomen	44
Tabelle 20:	Untersuchungen der COX-2-Expression an menschlichen Nierenzellkarzinomzelllinien	45
Tabelle 21:	Untersuchungen der COX-2-Expression an tierischen Nierenzellkarzinomen und Nierenzellkarzinomzelllinien	45

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
APC	adenomatöse Polyposis coli
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
as	antisense
bp	Basenpaar
CCL	Chemokinligand
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	zelluläre Desoxyribonukleinsäure
COX	Cyclooxygenase
CpG	Cytosin-Phosphatidyl-Guanosin
DAB	Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DPBS	Dulbecco's Phosphate buffered Solution
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis coli
FCS	fötales Kälberserum
FGF	Fibroblast Growth Factor
flt	fms-like Tyrosinkinase
GCSF	Granulocyte-Colony stimulating Factor
G-MCSF	Granulocyte-Macrophage-Colony stimulating Factor
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIF	Hypoxia inducible Factor
HRP	Horseradish Peroxidase
IL	Interleukin
IRS	immunoreaktiver Score
Kb	Kilobase
KDR	Kinase Domain Region
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
m	Milli
M	Mol

MCP 1	Macrophage chemotactic Protein
M-CSF	Macrophage-Colony stimulating Factor
MHC	Major Histocompatibility Complex
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	Messenger Ribonucleinacid
MVD	Microvessel Density, mikrovaskuläre Gefäßdichte
n	Fallzahl
NF	Nuclear Factor
NFκβ	Nuclear Factor kappa beta
NSAR	nicht steroidale Antirheumatika
PBS	Phosphate buffered Solution
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet derived Growth Factor
PG	Prostaglandin
PLGF	Placental Growth Factor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
pVHL	von-Hippel-Lindau-Protein
RNA	Ribonucleinacid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	Standard Error of the Mean
TAM	Tumorasoziierte Makrophagen
TBS	Tris buffered Solution
TGF	Transforming Growth Factor
TIMP	Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases
TNF	Tumornekrosefaktor
TNM	Tumor Node Metastasis
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UICC	Union Internationale contre le Cancer
Upm	Umdrehungen pro Minute
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VHL	von-Hippel-Lindau
vs.	versus
ZNS	Zentrales Nervensystem
∞	unendlich

1 Einleitung

1.1 Das Nierenzellkarzinom

Das Nierenzellkarzinom stellt bei Erwachsenen mit etwa 85% der Fälle den wichtigsten bösartigen Nierentumor dar und macht 3% aller bösartigen Tumore aus, wobei Männer doppelt so häufig wie Frauen betroffen sind. Der Häufigkeitsgipfel des Nierenzellkarzinoms liegt im 6. Lebensjahrzehnt. Es manifestiert sich selten vor dem 40. Lebensjahr (STÖRKEL 1999).

Die Ätiologie des Nierenzellkarzinoms ist nicht vollständig geklärt. Starker Nikotinabusus sowie Adipositas stellen erwiesenermaßen Risikofaktoren dar, ebenso wie arterielle Hypertension, zystische Nierenerkrankungen und eine Dialysetherapie. Desweiteren werden bestimmte kanzerogene Substanzen wie z.B. Asbest oder polyzyklische Kohlenwasserstoffverbindungen als Ursache diskutiert. Der Einfluß von phenacetinhaltigen Analgetika auf die Tumorentstehung, wie er bei Urothelkarzinomen im Bereich des Urogenitaltraktes nachgewiesen ist, ist beim Nierenzellkarzinom nur gering. Es gibt keine Hinweise dafür, daß Aspirin eine ursächliche Rolle bei der Tumorentstehung spielt (McLAUGHLIN et al. 2006).

In der Regel tritt das Nierenzellkarzinom sporadisch auf, kommt aber gelegentlich auch familiär vor, wie zum Beispiel beim mit wechselnder Penetranz autosomal dominant vererbten von-Hippel-Lindau-Syndrom, bei dem eine Inaktivierung des VHL-Tumorsuppressorgens (3p25) vorliegt. Die betroffenen Patienten entwickeln neben ZNS-Tumoren, Nebennierentumoren und zystischen Veränderungen in parenchymatösen Organen in ca. 50 % der Fälle ein Nierenzellkarzinom. Genetisch bedingte Tumorformen manifestieren sich meist früher und treten häufig bilateral bzw. multifokal auf, wohingegen die sporadischen Formen zum überwiegenden Teil unilateral lokalisiert sind (BUENTIG et al. 2002; ILIOPOULOS und ENG 2000).

Bei 30 % der betroffenen Patienten liegen bereits Metastasen vor, wenn der Primärtumor entdeckt wird. In den letzten Jahren erfolgt die Diagnosestellung aufgrund verbesserter diagnostischer Möglichkeiten jedoch zunehmend früher, oft als Zufallsbefund. In Abhängigkeit vom Sitz des Tumors metastasiert das Nierenzellkarzinom sowohl lymphogen (35%), als auch hämatogen (65%). In über 50% der Fälle finden sich Metastasen in der Lunge, gefolgt von Metastasen in Leber, Knochen (30%), Gehirn und kontralateraler Niere (RIEDE et al. 2004).

Als wichtigste prognostische Faktoren sind bisher Tumorstadium, - grad und der histologische Typ des Nierenzellkarzinoms anerkannt (RINI und VOGELZANG 2000), wobei die Stadieneinteilung nach dem TNM-System von 2002 erfolgt (Tabelle 1) (UICC 2003). Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt bei noch nicht metastasierten Nierenzellkarzinomen 70%. Bei Befall der regionalen Lymphknoten reduziert sich die 5-Jahres-Überlebensrate auf unter 25 % (HULAND und HEINZER 2001; RIEDE et al. 2004).

Tabelle 1: TNM-Klassifikation der Nierenzellkarzinome

TumorgroÙe /- Lokalisation	TNM-Stadium
< 7 cm, Tumor auf die Niere beschränkt	T 1
< 4 cm	T 1a
> 4 cm	T 1 b
> 7 cm, Tumor auf die Niere beschränkt	T 2
Tumor bricht in Venen und perirenales Gewebe ein, überschreitet nicht die Gerota'sche Faszie	T 3
Tumor infiltrierte Nebennieren oder perirenales Gewebe	T 3 a
Tumor infiltrierte Nierenvenen oder Vena cava unterhalb des Diaphragmas	T 3 b
Tumor infiltrierte Vena cava oberhalb des Diaphragmas	T 3 c
Tumorausdehnung über die Gerota'sche Faszie hinaus	T 4

Tabelle 2: WHO-Klassifikation der Nierenzellkarzinome (LOPEZ-BELTRAN et al. 2006)

Tumortyp	Häufigkeit
Klarzelliges Nierenzellkarzinom	75 %
Papilläres Nierenzellkarzinom	10 %
Chromophobes Nierenzellkarzinom	5 %
Sammelgang-Karzinom (Ductus-Bellini-Karzinom)	1 %
Multilokulär-zystisches Nierenzellkarzinom	< 1 %
Neuroblastomassoziierte Nierenzellkarzinome	< 1 %
Muzinös-tubuläres und spindelzelliges Nierenzellkarzinom	< 1 %
Nicht klassifiziertes Nierenzellkarzinom	4 – 6 %

Die Behandlungsmöglichkeiten des Nierenzellkarzinoms sind begrenzt. Es ist nicht strahlensensibel, und Behandlungsversuche mit Chemotherapien sind zum großen Teil frustant (AMATO 2000). Bei nicht metastasierten Tumoren ist die Nephrektomie Therapie der Wahl, ggf. kombiniert mit einer Lymphadenektomie und Adrenalektomie. Die partielle Nephrektomie stellt inzwischen bei Tumoren bis 5 cm Größe eine Alternative zum radikalen Eingriff dar. Ob die Resektion eines metastasierten Tumors selbst oder die der Metastasen sinnvoll ist, ggf. auch im Hinblick auf eine spätere systemische Therapie, hängt von mehreren Faktoren wie Zahl und Lokalisation der Metastasen ab, und ist Gegenstand der Diskussion (LEIBOVICH und BLUTE 2006). Die Behandlung mit Interferon- α und Interleukin-2 einzeln oder in Kombination zeigt Ansprechraten von 10 – 20 %, bei nur geringem Einfluß auf die Überlebensdauer (BUKOWSKI 2001; JACOBSON und WOOD 2006).

Vor diesem Hintergrund stellt die weitere Aufklärung der Entstehungsmechanismen von Nierenzellkarzinomen und die daraus abgeleitete Entwicklung neuer Therapieoptionen ein ebenso interessantes wie relevantes Forschungsgebiet dar. Als vielversprechender Behandlungsansatz des gefäßreichen Nierenzellkarzinoms hat sich inzwischen der Einsatz von Angiogeneseinhibitoren erwiesen, die durch unterschiedliche Mechanismen in die Funktion des Gefäßwachstumsfaktors VEGF eingreifen (PATARD et al. 2006).

1.2 Allgemeine Aspekte der Tumorentstehung

Das Fortschreiten von einem lokal begrenzten zu einem infiltrativen und metastasierenden Wachstum erfordert die Zersetzung der extrazellulären Matrix durch Proteolyse, die Anregung der Zellen zur Migration, die Modifikation der Zelladhärenz und die Induktion der Angiogenese. Dabei interagieren Tumorzellen, akzessorische Zellen, Endothelzellen und Komponenten der extrazellulären Matrix (PRICE et al. 1997).

Außerdem sind zahlreiche Botenstoffe und Enzyme an der Steuerung dieser Vorgänge beteiligt. Dem Enzym Cyclooxygenase-2 (COX-2) ist in den letzten Jahren gesteigertes Interesse zugekommen. Es hat sich gezeigt, daß die Cyclooxygenase-2 und Prostaglandine als Produkte ihrer Aktivität in vielen Tumoren überexprimiert werden, und auf mehrere der oben beschriebenen Prozesse Einfluß zu haben scheinen (CAO und PRESCOTT 2002). Die physiologische Funktion der COX-2 sowie ihre Effekte in Tumoren werden im Folgenden vertiefend betrachtet.

1.3 Die Cyclooxygenase-2 und ihre Bedeutung für die Tumorgenese

Bereits Anfang der neunziger Jahre beobachtete man bei Patienten, die regelmäßig Aspirin oder andere nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) einnahmen, ein im Vergleich zur Durchschnittsbevölkerung um 40 - 50 % erniedrigtes Risiko, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken (THUN et al. 1991; THUN et al. 1993). Bei von familiärer adenomatöser Polyposis coli (FAP) betroffenen Patienten konnte unter der Behandlung mit NSAR eine Regression von Adenomen beobachtet werden (GIARDIELLO et al. 1995).

Wichtige Erkenntnisse über die spezielle Bedeutung der COX-2 in Tumoren ließen sich aus Tierversuchen ableiten. Mäuse mit Mutationen im APC-Gen stellen ein Modell für die FAP dar. Tiere, bei denen außerdem das COX-2-Gen gezielt ausgeschaltet worden war, entwickelten eine wesentlich geringere Zahl von Polypen als eine Kontrollgruppe (OSHIMA et al. 1996). In Modellversuchen bei Ratten konnte durch die Behandlung mit COX-2-Inhibitoren eine verminderte Inzidenz von chemisch induzierten Kolontumoren sowie eine Reduktion der Tumormasse von bis zu 80 % erzielt werden (KAWAMORI et al. 1998).

Die COX ist das Schlüsselenzym bei der Umwandlung von Arachidonsäure in Prostaglandine (PG) und Thromboxan (Abbildung 1). Sie hat, vermittelt durch das breite Wirkungsspektrum dieser Substanzgruppe, Einfluß auf zahlreiche physiologische und pathologische Vorgänge im Körper. 2 Isoformen der COX, COX-1 und COX-2, sind bekannt. Beide sind als Glykoproteine in die Membran des endoplasmatischen Retikulums integriert. Die COX-2 ist auch in der Kernmembran lokalisiert. Während die Primärproteinstruktur der beiden Enzyme zu 60 % und die von ihnen katalysierte Reaktion identisch ist, werden sie von 2 unterschiedlichen Genen kodiert (SMITH et al. 2000; SPENCER et al. 1998).

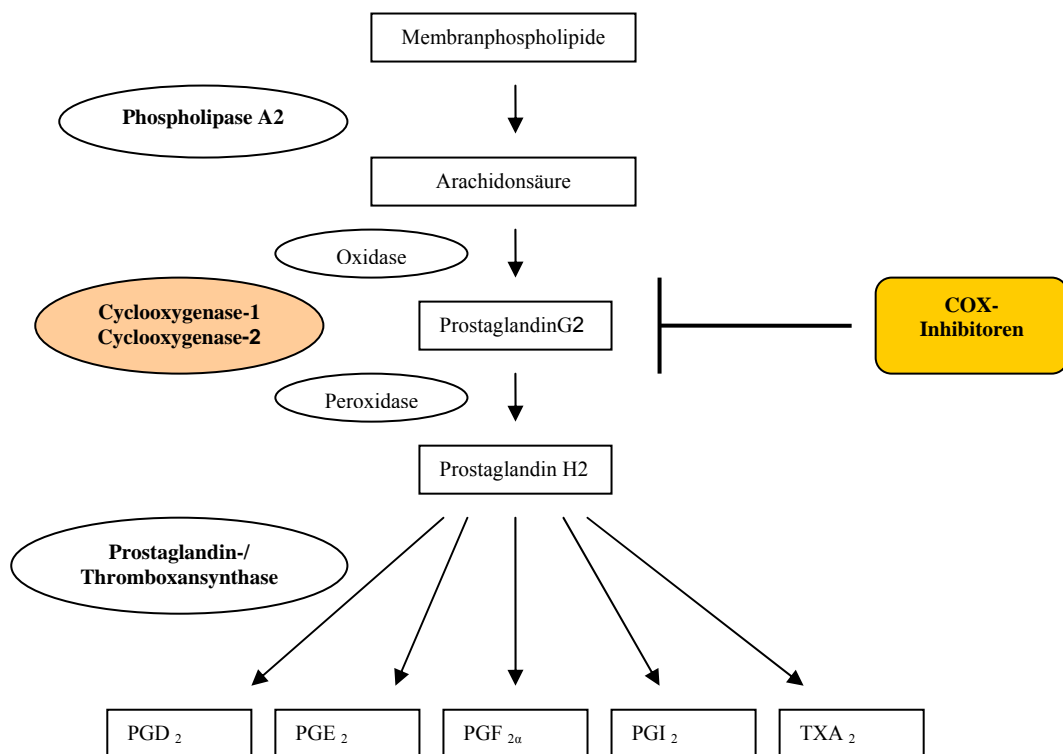


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Umwandlung von Arachidonsäure in Prostaglandine und Thromboxan durch die Enzyme COX-1 und COX-2

Die COX-1 wird in nahezu jedem Gewebe konstitutiv exprimiert, und spielt unter anderem eine wichtige Rolle bei der Blutgerinnung, sowie bei der Regulation der Durchblutung der Magenschleimhaut und der Niere (DUBOIS et al. 1998). Die COX-2 hat ein deutlich niedrigeres spontanes Expressionsniveau, und ist im Normalgewebe nicht oder nur schwach detektierbar. Sie ist jedoch durch zahlreiche Stimuli induzierbar (SMITH et al. 2000). Eine Hochregulation der COX-2-Expression und damit eine vermehrte Produktion von Prostaglandinen spielt beispielsweise eine Rolle bei der Ovulation, bei der Implantation, der Vaskulogenese und Angiogenese des Embryos, im Rahmen von Entzündungen und bei der Schmerzreaktion (DUBOIS et al. 1998). Anhand von Zellkulturexperimenten konnten Faktoren identifiziert werden, die die COX-2 induzieren oder supprimieren. Die COX-2 wird unter anderem unter dem Einfluß der proinflammatorischen Substanzen IL-1, IL-6, TNF- α und LPS sowie durch die Wachstumsfaktoren TGF- α und - β , EGF, FGF, HGF und PDGF vermehrt exprimiert. Die antiinflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-13 sowie Glukokortikoide inhibieren die COX-2-Expression (DUBOIS et al. 1998; FOSSLIEN 2000).

Eine Überexpression der COX-2 wurde initial beim kolorektalen Karzinom beschrieben und ist inzwischen auch bei vielen anderen bösartigen Neubildungen gefunden worden (SAUKKONEN et al. 2004). Einige spezifische Effekte der COX-2 bei der Karzinogenese (Abbildung 2) sollen im Folgenden näher beschrieben werden. Anscheinend kann die Überexpression der COX-2 zu einer malignen Transformation von Zellen führen (LIU CH et al. 2001). Daß chronische Entzündungen einen Risikofaktor für die Tumorentstehung darstellen, läßt sich dementsprechend zumindest teilweise durch die im entzündlichen Gewebe erhöhte Konzentration von COX-2 erklären. Bei der Größenzunahme von Tumoren spielen unkontrolliertes Wachstum und eine gesteigerte Zellproliferationsrate eine Rolle. Letztere konnte im Modellversuch durch Inhibition der COX-2 gesenkt werden (FUJITA et al. 2002; JOKI et al. 2000). Auch zeigten Tumoren bei Mäusen, bei denen das COX-2-Gen inaktiviert worden war, ein deutlich vermindertes Wachstum im Vergleich zu Tumoren beim Wildtyp (WILLIAMS et al. 2000). Mehrere Arbeiten belegen den Zusammenhang zwischen der Expression von COX-2 und der Apoptose. Durch die COX-2 wird die Apoptose in Tumorzelllinien unterdrückt, andererseits läßt sie sich durch Inhibitoren der COX-2 induzieren (KAMIJO et al. 2001; LI et al. 2001; TSUJII und DUBOIS 1995). Desweiteren moduliert die COX-2 die Tumordinvasion unter anderem durch die Freisetzung von Matrixmetalloproteinasen (MMP) via PGE₂. Durch den selektiven COX-2-Inhibitor NS-398 konnte die Freisetzung von MMP reduziert sowie die Invasivität von Tumorzellen gesenkt werden (ATTIGA et al. 2000; DENKERT et al. 2001; DOHADWALA et al. 2002). Die COX-2-Expression korreliert in Kolonkarzinomen mit hämatogenen Metastasen und in Blasenkarzinomen mit der Invasion in Lymphgefäße und mit der Bildung von Lymphknotenmetastasen. Dies zeigt den Einfluß der COX-2 auf das Metastasierungspotential von Tumoren (SHIRAHAMA et al. 2001; TOMOZAWA et al. 2000).

Insbesondere im Zusammenhang mit Tumoren, bei denen eine immunogene Ursache vermutet wird, ist die Beobachtung von Bedeutung, daß die COX-2 regulierend in die Zytokinproduktion von Lymphozyten und Makrophagen einzugreifen scheint, und dadurch die Immunabwehr unterdrücken kann. PGE₂ als Produkt der COX-2-Aktivität supprimiert sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunität (HUANG et al. 1998; PLESCIA et al. 1975; STOLINA et al. 2000). In-vitro-Experimente und Tierversuche führten zu der Annahme, daß die COX-2 bei der Bildung von Blutgefäßen in Entzündungsgebieten eine wichtige Rolle spielt. Dabei wird, vermittelt durch PGE₂, VEGF induziert (BEN AV et al. 1995). Dieser bei Entzündungen beschriebene Mechanismus scheint auch auf die Vorgänge in Tumoren übertragbar zu sein, wie spätere Experimente an Kolonkarzinomzellen zeigten (TSUJII et al. 1998). Die Tatsache, daß in Fibroblasten von Mäusen, bei denen das COX-2-Gen inaktiviert wurde, die VEGF-Bildung um über 90 % reduziert ist, legt die Vermutung nahe, dass die COX-2 für die VEGF-Expression sogar von großer Bedeutung ist (WILLIAMS et al. 2000). Das gemeinsame Vorkommen von COX-2 mit VEGF, und der bei verschiedenen Tumoren beobachtete Zusammenhang zwischen der COX-2-Expression und dem Ausmaß der Vaskularisierung des Gewebes sind Hinweise darauf, daß der COX-2 auch bei der tumorinduzierten Angiogenese eine entscheidende Funktion zukommt (CHAPPLE et al. 2002; WU et al. 2004; YUAN et al. 2005). Die Tatsache, daß unter Hypoxie, die einen starken Stimulus zur Gefäßbildung darstellt, eine vermehrte COX-2-Expression in Endothelzellen beobachtet werden kann, unterstützt diese Annahme (SCHMEDTJE, Jr. et al. 1997; YANG et al. 2002).

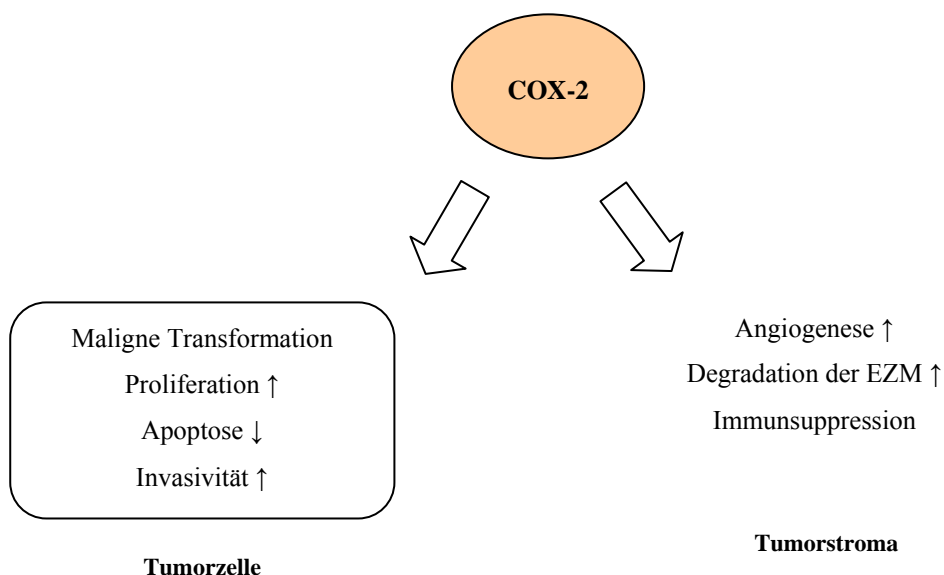


Abbildung 2: Rolle der COX-2 in Tumoren

Im nächsten Abschnitt werden zunächst allgemeine Aspekte der Gefäßneubildung in Tumoren beschrieben, anschließend wird die zentrale Funktion des Gefäßwachstumsfaktors VEGF erläutert.

1.4 Tumorassoziierte Angiogenese

Als Angiogenese bezeichnet man die Aussprossung von neuen Gefäßen aus bereits existierenden Kapillaren oder postkapillären Venolen. Dieser Vorgang wird durch ein äußerst sensibles, dynamisches Gleichgewicht zwischen angiogenen und antiangiogenen Faktoren reguliert (FOLKMAN und KLAGSBRUN 1987; FOSSLIN 2001). Im gesunden Organismus und unter physiologischen Bedingungen spielt die Angiogenese nur in Ausnahmefällen eine Rolle, nämlich bei den zyklusabhängigen Veränderungen des Endometriums, bei der Follikelreifung, bei der Bildung der Plazenta sowie bei der Embryogenese. Außerdem kommt es im Zuge von Entzündungen und bei der Wundheilung zur Gefäßneubildung (ROCKWELL und KNISELY 1997). In normalen Geweben überwiegen ansonsten inhibitorische über stimulierende Einflüsse der Angiogenese (DETMAR 2000).

Bei Entwicklung und Wachstum von Tumoren sowie bei deren Metastasierung hingegen ist die Neubildung von Gefäßen ein fundamentaler Prozeß. Um über eine mikroskopische Größe von ungefähr 1 mm^3 hinaus wachsen zu können, müssen Tumoren die Bildung eigener Blutgefäße initiieren, und damit die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen sicherstellen (FOLKMAN 1971). Es wurde postuliert, daß entartete Zellen in der komplexen Abfolge von Veränderungen, die schließlich zur Entstehung eines invasiven und metastasierenden Tumors führen, die Fähigkeit zur Angiogeneseinduktion erwerben, noch bevor sie andere charakteristische Eigenschaften neoplastischer Zellen exprimieren. Hanahan und Folkman prägten damit den Begriff „angiogenic switch“ (HANAHAN und FOLKMAN 1996).

Das Ausmaß der Vaskularisierung eines Tumors kann durch die Bestimmung der mikrovaskulären Gefäßdichte (MVD) mit Hilfe immunhistochemischer Verfahren objektiviert werden, und in mehreren Arbeiten ist eine Korrelation zwischen Gefäßreichtum und klinischem Verhalten von Malignomen belegt worden. So gilt die MVD bei einigen Tumoren als prognostischer Faktor, wobei eine hohe MVD meist als ungünstig eingestuft wird (WEIDNER 2000). Obwohl Tumoren meistens relativ stark vaskularisiert sind, ist die Blutversorgung des Gewebes insgesamt häufig unzureichend. Die Architektur des Gefäßnetzes unterscheidet sich von der in normalem Gewebe in wichtigen Aspekten. Tumorgefäße sind stark gewunden, unregelmäßig verzweigt, und es kommt zu Shuntbildungen. Der Wandaufbau der Gefäße ist atypisch und ihr Durchmesser variabel. Unreife und strukturell atypische Gefäße können durch den Druck des Tumorgewebes komprimiert, oder aufgrund der schwachen Gefäßwand durch Blutdruckschwankungen beschädigt werden.

Folge dieser besonderen Gegebenheiten ist ein räumlich und zeitlich äußerst heterogener Blutfluß, der sich auf Umgebungsbedingungen wie Sauerstoff- und Glucoseverfügbarkeit im Gewebe, und damit auf den Metabolismus und das Proliferationsverhalten der Tumorzellen auswirkt (CARMELIET 2000; ROCKWELL und KNISELY 1997). Eine quantitativ oder auch qualitativ unzureichende Gefäßversorgung, die zur Sauerstoffunterversorgung des Gewebes führt, wird ursächlich für die Entstehung von Tumornekrosen angenommen (HEMMERLEIN et al. 2001; LEEK et al. 1999; SABO et al. 2001).

Die Gefäßneubildung in Tumoren vollzieht sich durch eine komplexe Interaktion zwischen Tumorzellen, Endothelzellen, akzessorischen Zellen wie Makrophagen und Fibroblasten, sowie Komponenten der extrazellulären Matrix (CARMELIET 2000; YANCOPOULOS et al. 2000). Zahlreiche Einflüsse sind an dieser Regulation beteiligt. Es ist leicht nachvollziehbar, daß Sauerstoffmangel im Gewebe einen starken Reiz zur Freisetzung angiogener Faktoren und zur Neubildung von Gefäßen darstellt. In Prostatakarzinomzellen war unter Hypoxie sowohl eine Hochregulation der VEGF-Expression als auch eine Hochregulation der COX-2-Expression zu beobachten (LIU XH et al. 1999). VEGF wird unter Hypoxie von unterschiedlichen Zelllinien vermehrt exprimiert. Als potentester angiogener Faktor fungiert er als Mediator für vielfältige indirekt wirkende Substanzen und Signale und nimmt unter den angiogenen Faktoren eine zentrale Stellung ein (FERRARA und KEYT 1997). Zu den angiogenen Faktoren gehören außerdem EGF, FGF, HGF, TGF und PDGF (CARMELIET 2000; FERRARA und KEYT 1997; GUPTA und QIN 2003). Interleukine, Proteasen und Adhäsionsmoleküle zählen ebenfalls zu den proangiogenen Proteinen. Einer der wichtigsten antiangiogenen Faktoren scheint Thrombospondin 1 zu sein. Weiterhin besitzen die als Angiostatin und Endostatin bezeichneten proteolytischen Fragmente des Plasminogen und Kollagen XVIII, TIMP sowie bestimmte Interleukine und Interferone antiangiogene Eigenschaften (CARMELIET 2000; FOSSLIEN 2001; GUPTA und QIN 2003).

Auf die Funktion von VEGF bei der physiologischen und tumorassoziierten Gefäßneubildung soll nun näher eingegangen werden.

1.5 Der Gefäßwachstumsfaktor VEGF

Ferrera et al. konnten zeigen, daß Embryonen von Mäusen, bei denen das VEGF-Gen aufgrund von Mutationen inaktiviert ist, nicht überlebensfähig sind (FERRARA et al. 1996). Außerdem inhibieren VEGF-Antikörper im Tierexperiment komplett die Gefäßbildung in Tumoren, welche nach einer initialen, von der Angiogenese unabhängigen Wachstumsphase, nicht mehr an Größe zunehmen (BORGSTROM et al. 1998; WARREN et al. 1995). Anhand dieser Beispiele wird ersichtlich, daß VEGF eine Schlüsselfunktion sowohl in der physiologischen, als auch in der tumorinduzierten Angiogenese ausübt, und dadurch entscheidenden Einfluß auf das Wachstum von Tumoren hat.

VEGF oder VEGF A regt spezifisch die Teilung und Migration von Gefäßendothelzellen an, wurde jedoch ursprünglich als vaskulärer Permeabilitätsfaktor beschrieben, da er ebenfalls als hochpotente Substanz die Permeabilität von Blutgefäßen erhöht. Außerdem induziert VEGF Plasminogenaktivatoren, deren Inhibitoren, sowie Matrixmetalloproteinasen in Endothelzellen. Dadurch hat VEGF, abgesehen von seiner Eigenschaft als Wachstumsfaktor, Einfluß auf zwei weitere wichtige Vorgänge bei der Gefäßneubildung: die Degradierung der extrazellulären Matrix, sowie die Bildung eines Fibringels durch das Austreten von Plasmaproteinen. Dieses dient als Substrat für das Wachstum von Endothelzellen und auch von Tumorzellen (DVORAK et al. 1995; SENGER et al. 1983).

VEGF ist ein dimeres Glykoprotein. Seine vier häufigsten Isoformen entstehen durch alternatives RNA-Splicing. Sie bestehen aus jeweils 121, 165, 189 und 206 Aminosäuren, wobei VEGF 165 die sowohl in Normalgewebe als auch in Tumoren dominierende Form darstellt. Obwohl die jeweiligen VEGF-Moleküle unterschiedliche physikalische Eigenschaften besitzen, ist ihre biologische Aktivität dieselbe. VEGF 165, VEGF 189 und VEGF 206 sind meist an Zelloberflächen oder Komponenten der extrazellulären Matrix gebunden. Sie können durch Proteasen wie Plasmin oder durch Heparin abgespalten und damit aktiviert werden. VEGF 121 und in gewissem Ausmaß auch VEGF 165 kommen in gelöster Form vor (FERRARA et al. 2003; FERRARA und KEYT 1997). Zwei Tyrosinkinasen, VEGFR 1 oder flt -1 und VEGFR 2 oder KDR sind als Rezeptoren mit hoher Affinität für VEGF bekannt. Sie kommen fast ausschließlich auf vaskulären Endothelzellen vor. Die Bindung von VEGF an den jeweiligen Rezeptor löst unterschiedliche Wirkungen aus. Anscheinend ist die Interaktion mit dem KDR-Rezeptor entscheidend dafür, daß das volle Wirkungsspektrum von VEGF vermittelt werden kann (DE VRIES et al. 1992; FERRARA et al. 2003; TERMAN et al. 1992).

Neben VEGF A, der hier als wichtigster Faktor bei der Entstehung von Blutgefäßen beschrieben wurde, sind VEGF B, VEGF C, VEGF D und PLGF als Mitglieder der VEGF-Familie bekannt, für deren Signalübermittlung weitere Rezeptoren (VEGFR 3, Neuropilin) existieren. VEGF C und VEGF D regulieren die Entstehung von lymphatischen Gefäßen (FERRARA et al. 2003) .

Verschiedene Zellarten können VEGF exprimieren, wenn im Zuge physiologischer oder pathologischer Prozesse Gefäße entstehen. Im menschlichen Fetus z.B. ist VEGF in nahezu allen Geweben nachweisbar. Es gibt jedoch keinen Anhaltspunkt dafür, daß Endothelzellen selbst VEGF bilden, weshalb ein rein parakriner Wirkungsmechanismus angenommen wird (FERRARA und KEYT 1997). Ein erhöhtes Expressionsniveau von VEGF in Tumoren ist belegt, unter anderen auch beim Nierenzellkarzinom. Ein Zusammenhang zwischen der Expression von VEGF und der Gefäßdichte eines Tumors erscheint naheliegend, konnte jedoch in Untersuchungen an Nierenzellkarzinomen bisher nicht eindeutig bestätigt werden (FOSSLIEN 2001; PARADIS et al. 2000; SLATON et al. 2001).

Zu den VEGF-produzierenden Zellen gehören auch Makrophagen. Sie sind im Immuninfiltrat eines Tumors zahlreich zu finden, und aufgrund ihrer vielseitigen Funktionen an der Regulation und Steuerung unterschiedlicher Vorgänge in Tumoren beteiligt. Abschließend soll die Rolle der tumorassoziierten Makrophagen genauer beschrieben werden.

1.6 Tumorassoziierte Makrophagen

Zellen des mononukleären Makrophagensystems entstehen wie Granulozyten aus einer gemeinsamen Progenitorzelle im Knochenmark. Sie durchlaufen dort mehrere Entwicklungsstadien und gelangen als Monozyten ins Blut. Von chemotaktisch wirksamen Substanzen gesteuert migrieren sie ins Gewebe, wo sich unter dem Einfluß von Zytokinen ihre weitere Reifung und Differenzierung vollzieht. Je nach Ort und Funktion zeigen die Monozyten/ Makrophagen eine unterschiedliche Morphologie und exprimieren abhängig von Entwicklungsstadium und Aktivitätszustand bestimmte Oberflächenantigene und Rezeptoren (ROSS und AUGER 2002).

Monozyten/ Makrophagen sind an Entzündungsreaktionen und an allen Stadien der Immunantwort beteiligt. Im Rahmen der unspezifischen Immunreaktion können sie direkt durch körpereigene Zerfallsprodukte, ebenso wie durch Fremdpartikel, Bakterien oder Viren, aktiviert werden und diese phagozytieren. Auch bei der spezifischen, zellvermittelten und humoralen Immunantwort spielen Monozyten/ Makrophagen eine wichtige Rolle. Antigenfragmente werden prozessiert und an der Zelloberfläche zusammen mit MHC – Antigenen an T-Lymphozyten präsentiert.

Aktiviert Monozyten/ Makrophagen zeichnen sich durch eine hohe sekretorische Aktivität aus. Sie sezernieren eine Vielzahl von Zytokinen, außerdem Enzyme wie Proteasen und Hydrolasen, Proteine wie Fibronectin, Komplementfaktoren, Koagulationsfaktoren und auch Arachidonsäuremetabolite wie Prostaglandine. Durch die Freisetzung zytotoxischer Substanzen können Zielzellen direkt zerstört werden (HAMILTON 2002; ROSS und AUGER 2002).

Ein großer Teil des Immuninfiltrates eines Tumors wird von Makrophagen gebildet. Sie können z.B. im Mammakarzinom bis zu 50 % der Zellmasse ausmachen (LEEK et al. 1996). Ihre Rekrutierung erfolgt unter anderen durch das chemotaktische Protein MCP-1 oder CCL 2 sowie durch M-CSF und GM-CSF (FU et al. 1992; O'SULLIVAN und LEWIS 1994; SCHOLL et al. 1994). Die tumorassoziierten Makrophagen (TAM) weisen eine ausgeprägte phänotypische Heterogenität auf und können anhand ihrer in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium exprimierten Oberflächenantigene subtypisiert werden. Ihr funktionelles Spektrum ist groß, ihre Wirkung mitunter sogar entgegengesetzt (HAUPTMANN et al. 1993). Im Rahmen einer komplexen Interaktion bestimmen Tumorzellen mit über Entwicklung und Eigenschaften der TAM (KREUTZ et al. 2002).

Die ausgeprägte Infiltration von Tumoren mit Entzündungszellen wird als Abwehrreaktion des Körpers interpretiert. Es wird angenommen, daß TAM im Rahmen der antikörperabhängigen Zytotoxizität, durch die Produktion zytotoxischer Substanzen oder durch die Präsentation von Tumorantigenen an Lymphozyten zur Tumorabwehr beitragen. So erkennen und zerstören Makrophagen in-vitro spezifisch Tumor-Targetzellen. Die tumorizide Aktivität der Makrophagen wird durch M-CSF, G-MCSF und Interferon- γ gesteigert (ANDREESSEN et al. 1998; HENNEMANN et al. 1998; MUNN und CHEUNG 1995). Die in-vitro nachgewiesene antitumoröse Funktion von Makrophagen konnte jedoch in-vivo bisher nicht sicher bestätigt werden (HEMMERLEIN et al. 2000).

Es ist hervorzuheben, daß TAM sowie die im Tumor ablaufenden entzündlichen Prozesse auch tumorfördernde Eigenschaften haben. Es wird immer deutlicher, daß Makrophagen, beispielsweise durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren und von angiogenen Faktoren sowie durch die Bildung von Enzymen, welche die extrazelluläre Matrix degradieren, Tumorwachstum, -invasion und -metastasierung unterstützen (BALKWILL und MANTOVANI 2001; KREUTZ et al. 2002).

1.7 Fragestellung

Die Cyclooxygenase ist das Schlüsselenzym bei der Umwandlung von Arachidonsäure in Prostaglandine und Thromboxan. In den letzten Jahren ist der Funktion der Cyclooxygenase-2 bei Tumorentstehung, -wachstum und -ausbreitung gesteigertes Interesse zugekommen. In vielen Tumoren ist eine erhöhte Expression der COX-2 belegt. Ihr wird eine Rolle bei der malignen Transformation von Zellen sowie deren Proliferation, bei der Unterdrückung der Apoptose, bei der Tumordinvasion und -metastasierung zugeschrieben. Außerdem wird postuliert, daß die COX-2 über die Induktion von VEGF entscheidenden Einfluß auf die Neubildung von Tumorgefäßen hat. Einen starken Reiz zur Gefäßbildung stellen dabei hypoxische Zustände dar.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Expression der COX-2 im Nierenzellkarzinom im Vergleich zum angrenzenden Normalgewebe zu untersuchen. Im Speziellen sollte geprüft werden, ob sich ein Zusammenhang zwischen dem Expressionsniveau von COX-2 und VEGF und der Gefäßdichte der Tumoren bestätigen läßt. In Modellversuchen sollte ferner die Auswirkung eines Sauerstoffmangels auf Tumorzellen und Makrophagen hinsichtlich der Expression von COX-2 und VEGF getestet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Überblick

Die vorliegende Untersuchung gliedert sich in zwei Teile.

Im ersten Teil diente Tumorgewebe und tumorfreies Gewebe aus Nephrektomiepräparaten als Untersuchungsmaterial. Dabei wurde die Proteinexpression von COX-2 und VEGF sowie die Gefäßdichte immunhistochemisch an Gewebeschnitten untersucht. Außerdem wurde das Ausmaß der Makrophageninfiltration und das Vorkommen von nekrotischen Bereichen im jeweiligen Präparat beurteilt. Die mRNA-Expression von COX-2 und VEGF im Gewebe wurde mittels Realtime PCR ermittelt.

Im zweiten Teil wurden Versuche sowohl an Zellkulturen von Nierenkarzinomzelllinien sowie an Makrophagen durchgeführt. Zunächst wurde die Expression von COX-2- und VEGF-mRNA in Tumorzelllinien unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen mittels Realtime PCR bestimmt. An Tumorzellsphäroiden wurden die Auswirkungen einer dauerhaften Hypoxie auf die Proteinexpression von COX-2 und VEGF immunhistochemisch untersucht. An Makrophagen wurden die Auswirkungen einer vorübergehenden Hypoxie getestet. Außerdem wurde der Einfluß von nekrotischen Tumorzellen auf Makrophagen untersucht, indem sie in Medium kultiviert wurden, dem ein Tumorzelllysatz zugesetzt war. Die Messung der COX-2- und VEGF-mRNA-Expression erfolgte mittels Realtime PCR, die Proteinexpression von COX-2 wurde mittels Western-Blot bestimmt. Zur Ermittlung der VEGF-Proteinexpression wurde der ELISA gewählt, anhand dessen VEGF in den Zellkulturüberständen gemessen wurde.

2.2 Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Substanzen stammen, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Boehringer (Mannheim), Merck (Darmstadt) und Sigma (München).

2.3 Technische Geräte

Folgende Geräte wurden verwendet:

Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Waldbronn
iCycler iQ Real Time Thermocycler	Bio Rad
Magnetrührer: Ikamag RH	Ika-Werk, Oberstaufen
Mikrotom: Schlittenmikrotom Typ HN40	Reichert-Jung, Heidelberg
pH-Meter: Typ HI 9321	HANNA Instruments, Kehl/ Rhein
Schüttler Heidolph Polymax 1040	Schütt, Göttingen
Semidryblotter Transblot SD Semidry Transfer Cell	Bio Rad
Spannungsquelle GPS 200/400	Pharmacia Biotech
Spannungsquelle Power Paq 200	Bio Rad
Spectrophotometer Ultrospec III	Pharmacia Biotech
Thermocycler	Hybaid, Middlesex/England
Thermocycler Progene	Techno
Thermomixer: Modell 5436	Eppendorf, Hamburg
UV-Lichtquelle: Fluo-Link	Biometra, Göttingen
Vortex: Genie 2: G-560E	Bender&Hobein, Zürich/ Schweiz
Waage: Modell MCI; Typ MD BA 200	Sartorius, Göttingen
Wasserbad Modell 1002/1013/1083	GFL, Burgwedel
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus Sepatech, Hanau
Zentrifuge Biofuge stratos	Heraeus Sepatech, Hanau
Zentrifuge Megafuge 1.0 R, Rotoren 2705/1379	Heraeus Sepatech, Hanau

2.4 Untersuchungsmaterial

Die Tumornephrektomiepräparate stammten von Patienten, die an einem Nierenzellkarzinom erkrankt waren, und in der urologischen Abteilung des Universitätsklinikums Göttingen operiert wurden. Gewebeproben wurden aus Tumorgewebe sowie aus angrenzendem normalem Nierengewebe entnommen. Die Präparate wurden durch die Mitarbeiter der pathologischen Abteilung untersucht und nach den Richtlinien der WHO (Tabelle 2) histologisch klassifiziert. Das Staging erfolgte nach der TNM-Klassifikation (Tabelle 1).

Eine Aufstellung der untersuchten Tumore findet sich in Tabelle 3. Für die Asservation der humanen Gewebeproben bestand ein Votum der Ethikkommission (Antragsnummer 2/2/03)

Tabelle 3: Pathologische Typisierung, Differenzierungsgrad und Tumorstadium der untersuchten Tumoren

Fall	Typ	Grad	pTNM	Fall	Typ	Grad	pTNM
1	klarzellig	G2	pT3a N0M0	13	papillär	G2	pT3bN2M0
2	klarzellig	G3	pT3b N0M0	14	sarkomatoid	G3	pT3bN1M1
3	papillär	G2	pT2 N0M0	15	klarzellig	G2	pT3a N0M0
4	klarzellig	G2	pT2 N0M0	16	klarzellig	G2	pT3b N0M0
5	klarzellig	G1	pT1 N0M0	17	klarzellig	G2	pT2 N0M0
6	chromophob	G2	pT2 N0M0	18	klarzellig	G2	pT2 N0M0
7	klarzellig	G2	pT1 N0M0	19	papillär	G2	pT3b N0M0
8	klarzellig	G1	pT3b N0M0	20	klarzellig	G3	pT3N0M1
9	klarzellig	G3	pT3b N0M0	21	sarkomatoid	G3	pT3bN2M1
10	klarzellig	G2	pT3cN1M0	22	klarzellig	G2	pT3b N0M0
11	klarzellig	G2	pT3a N0M0	23	klarzellig	G2	pT1 N0M0
12	papillär	G2	pT1N1M0	24	klarzellig	G1	pT1 N0M0

Für die Zellkulturexperimente wurden die Tumorzelllinien A498, Caki-1 und Caki-2 aus der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen in Braunschweig verwendet. Außerdem wurden Monozyten/ Makrophagen aus Leukapheresepräparaten von gesunden Personen isoliert, die freundlicherweise von der Abteilung für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Göttingen zur Verfügung gestellt wurden.

2.5 Untersuchungen an Tumorgewebe

2.5.1 Präparation der Gewebeschnitte

Für die morphologische Analyse wurde tumorfreies Nierengewebe und Tumorgewebe aus Nephrektomiepräparaten verwendet. Das Gewebe wurde in 4% neutral gepuffertem Formaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet. 2 bis 4 µm dicke Serienschnitte wurden angefertigt und auf Silan-beschichtete Objektträger aufgezogen.

2.5.2 Histochemische Standardfärbung

Die Beurteilung der Morphologie und des histopathologischen Malignitätsgrades erfolgte in allen Fällen anhand Hämatoxylin-Eosin-gefärbter Schnittpräparate. Zur Kerndarstellung wurden die Schnitte 5 min. in Meyers-Hämalaun gefärbt und anschließend in fließendem Leitungswasser gespült. Die Gegenfärbung des Zytoplasmas erfolgte durch kurzzeitiges Eintauchen in Eosin.

2.5.3 Immunhistochemische Untersuchung

Bei der verwendeten Methode handelt es sich um ein indirektes Nachweisverfahren für Antigene durch monoklonale Antikörper, einen nachgeschalteten Antikörper-Reporterenzym-Komplex und eine dadurch katalysierte Farbreaktion. Zunächst bindet der Primärantikörper an das nachzuweisende Antigen. Der Sekundärantikörper ist an ein peroxidasekonjugiertes Dextranpolymer gebunden, das den Umsatz eines Chromogens und die Lokalisierung des Antigens ermöglicht.

Zunächst wurden die Paraffinschnitte für 20 min. in Xylol entparaffiniert und jeweils 7 min. in einer Ethanolreihe absteigender Konzentration rehydriert. Nach einer Spülung in entionisiertem Wasser für 5 min. folgte eine Mikrowellenbehandlung zur Demaskierung der durch Formalinfixation maskierten Antigene. Dabei wurden die Schnitte in einem 10 mM Citratpuffer (pH 6,0) 15 min. bei 700 Watt erhitzt. Anschließend kühlten die Schnitte etwa 20 min. ab. Um die endogene Peroxidase der Gewebeschnitte zu blockieren, wurden sie nach kurzem Spülen in entionisiertem Wasser und Tris buffered Solution (TBS) mit Wasserstoffperoxid behandelt. Daraufhin wurden die Präparate in TBS gespült und dann 15 min. mit fötalem Kälberserum (FCS) inkubiert, um unspezifische Bindungen des Antikörpers und damit unspezifische Anfärbungen zu verhindern. Im Anschluß an eine Spülung in TBS wurde der für das Zielantigen (COX-2, VEGF, Endothelmarker CD31, Makrophagenmarker CD68) spezifische Primärantikörper in entsprechender Verdünnung mit TBS aufpipettiert und in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach erneutem Spülen in TBS wurde der Sekundärantikörper für eine Stunde inkubiert. Es folgte ein dreimaliges Spülen in TBS, und schließlich das Auftragen des Chromogens, mit welchem die Schnitte 20 min. inkubiert wurden. Die antikörpermarkierten Gewebestrukturen wurden durch ein Farbsignal sichtbar. Die Farbreaktion wurde durch gründliches Spülen mit entionisiertem Wasser abgestoppt, und die Schnitte mit Meyers Hämalaun 3 min. gegengefärbt. Die Zellkerne färbten sich nach 5 min. Spülen in lauwarmem Leitungswasser blau an. Anschließend wurden die Schnitte in Eindeckmedium eingedeckt. Als Negativkontrollen dienten Schnitte, die bis auf die Inkubation mit dem Primärantikörper identisch zu den übrigen Schnitten behandelt wurden. Die Färbeprotokolle sowie die verwendeten Antikörper und Detektionssysteme sind in den Tabellen 4-6 näher spezifiziert.

Tabelle 4: Färbeprotokolle für die immunhistochemischen Untersuchungen

Antikörper	Vorbehandlung	Verdünnung, Inkubation	Chromogen
COX-2	Mikrowelle 0,6% H ₂ O ₂ , 15 min	1:50 RT, über Nacht	DAB
VEGF	Mikrowelle 3% H ₂ O ₂ , 15 min	1:200 4°C, über Nacht	DAB
CD68 (Makrophagenmarker)	Mikrowelle 3% H ₂ O ₂ , 10 min	1:50 RT, 1h	AEC
CD31 (Endothelmarker)	Mikrowelle 3% H ₂ O ₂ , 15 min	1:50 4°C, über Nacht	DAB

Tabelle 5: Verwendete Antikörper für die immunhistochemischen Untersuchungen

COX-2 monoklonal Maus-anti-Mensch	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
VEGF monoklonal Maus-anti-Mensch	Zymed, San Francisco, USA
CD68 monoklonal Maus-anti-Mensch	DAKO Diagnostika, Hamburg
CD31 monoklonal Maus-anti-Mensch	DAKO Diagnostika, Hamburg

Tabelle 6: Materialien für die immunhistochemischen Untersuchungen

EnVision-HRP-Peroxidase	DAKO Diagnostika, Hamburg
EnVision-Multilinksystem (Ziege-anti-Maus/-Kaninchen)	DAKO Diagnostika, Hamburg
Chromogen-Ansatz (Diaminobenzidine, DAB)	DAKO Diagnostika, Hamburg
Chromogen-Ansatz (3-Amino-9-Ethylcarbazol, AEC)	Biogenex, San Ramon, CA, USA
Eindeckmedium: Aquamount Mountant	BDH Laboratory Supplies, England

2.5.4 Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen

Die Proteinexpression in den Gewebeschnitten wurde in Zusammenarbeit mit einem erfahrenen Pathologen anhand eines semiquantitativen additiven immunoreaktiven Scores (IRS) beurteilt, bei dem einerseits die Intensität der Farbreaktion (0 - negativ; 1 - schwach; 2 - mittelgradig; 3 - stark), andererseits die Zahl angefärbter Zellen als Kriterien herangezogen wurden (0 - keine positiven Zellen; 1 – unter 10% positive Zellen; 2 - 10-50% positive Zellen; 3 – über 50% positive Zellen). Die beiden Teilscores wurden aufaddiert.

Die mikrovaskuläre Gefäßdichte in den Gewebeschnitten wurde mit Hilfe eines Okularaufsatzes bestimmt, der Gitternetzlinien in das Gesichtsfeld projiziert. Die MVD wurde durch das Auszählen der Schnittpunkte CD31-positiver Gefäße mit diesen Linien ermittelt. Dabei wurden 20 Gesichtsfelder bei 250-facher Vergrößerung beurteilt und der Mittelwert der Ergebnisse gebildet.

2.5.5 RNA-Extraktion aus Gewebe

Zerkleinerte Gewebestücke aus Tumor und -normalgewebe der Nephrektomiepräparate wurden zur Stabilisierung der RNA in RNAlater Reagenz (Qiagen, Hilden) aufgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei – 20°C gelagert. Das Gewebe wurde unter Verwendung von Shredder-Säulen (Qiagen) homogenisiert. Die Extraktion der Gesamt-RNA erfolgte unter Verwendung des Rneasy Mini Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers.

Die Isolierung, Reinheitskontrolle und Quantifizierung der mRNA erfolgte wie unter 2.6.4 beschrieben. Die RNA-Reverse-Transkriptase-PCR und die Realtime PCR erfolgten wie unter 2.6.5 und 2.6.6 beschrieben.

2.6 Zellkulturexperimente

2.6.1 Nierenkarzinomzellkulturen und Tumorzellsphäroide

Die Tumorzellen wurden in vollsubstituiertem Zellkulturmedium RPMI 1640 kultiviert. Für die Stimulationsexperimente (siehe 2.6.3) wurden jeweils 5×10^5 Zellen in Petrischalen ausgesät und über Nacht bei 37°C gelagert.

Zur Generierung der Sphäroide wurden Tumorzellen mit einer Konzentration von $2,5 \times 10^5$ /ml Kulturmedium in mit 1% Agarose beschichteten Mikrotiterplatten ausgesät. Nach 4 Tagen wurden die Zellaggregate geerntet, in 4% neutral gepuffertem Formaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet. Von den Präparaten wurden 3 µm dicke Schnitte angefertigt. Die Proteinexpression von COX-2 und VEGF wurde sodann immunhistochemisch wie unter 2.5.3 beschrieben untersucht.

Tabelle 7: Materialien für die Herstellung des Zellkulturmediums

RPMI 1640 Medium	PAA Labore, Linz, Österreich
FCS	C C pro, Neustadt
L- Glutamin 200 mM	Biowhittaker, Verviers, Belgien
HEPES 1 M	PAA Labore, Linz, Österreich
Penicillin/ Streptomycin	PAA Labore, Linz, Österreich

2.6.2 Makrophagenzellkulturen

Die Makrophagen/ Monozyten wurden aus Leukapheresepreparaten von gesunden Blutspendern mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Dazu wurde Leukozytenseparationsmedium (Ficoll, PAA Labore, Linz, Österreich) mit einem Buffy Coat/ DPBS Gemisch (Verhältnis 1:3) überschichtet und 20 min. bei 2000 Upm zentrifugiert. Die Leukozyten, die sich nach der Zentrifugation in einer Zwischenphase befinden, wurden abpipettiert und 3 x mit DPBS (Biowhittaker, Verviers, Belgien) gewaschen. Anschließend wurden jeweils 3×10^7 Zellen in Zellkulturmedium RPMI 1640 aufgenommen und in Petrischalen überführt. Zur Adhärenz wurden sie sodann bei 37°C gelagert. Nicht adhärenz Zellen wurden nach 3 Std. mit dem Überstand abgesaugt. Nach zweimaligem vorsichtigem Spülen der Petrischalen mit DPBS wurden die Makrophagen/ Monozyten über Nacht bei 37°C in vollsubstituiertem Zellkulturmedium RPMI 1640 gelagert.

2.6.3 Zellstimulation

Um die Effekte einer kurzzeitigen Hypoxie auf die Genexpression von COX-2 und VEGF zu untersuchen, wurden Tumorzellen der Linien A498 und Caki-1 sowie einen Tag alte Makrophagen für 5 Std. unter hypoxischen Bedingungen kultiviert. Dazu wurde das AnaeroGen System von Oxoid nach Angaben des Herstellers verwendet. Desweiteren wurden einen Tag alte Makrophagen über 24 Std. mit 1×10^6 lysierten Tumorzellen pro Petrischale in einem Gesamtvolumen von 6 ml Kulturmedium stimuliert. Das Tumorzelllysate stammte in gleicher Menge aus den Tumorzelllinien A 498, Caki-1 und Caki-2. Die Lyse der Tumorzellen wurde durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen in Kulturmedium erreicht.

2.6.4 RNA-Isolierung, Reinheitskontrolle und Quantifizierung

Nach Abschluß der Stimulationsexperimente wurden die Zellkulturüberstände abgesaugt. Die Zellen wurden vorsichtig mit DPBS gespült, mit Hilfe eines Zellschabers geerntet und in Lysepuffer/ β -Mercaptoethanol aufgenommen. Die Aufreinigung der RNA erfolgte unter Verwendung des Rneasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers.

Die Menge sowie die Qualität der isolierten RNA wurden in dieser Arbeit durch kapilläre Elektrophorese unter Verwendung des RNA 6000 Nano Assay Kit (Lab-on-a-chip Technologie, Agilent Technologies, Waldbronn) evaluiert. Die elektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgte in einem standardisierten Verfahren. Dabei wird ein RNA- Größen- und Gewichtsstandard mitgeführt. Die entstehenden fluoreszierenden Banden werden vom Gerät detektiert und auf einem Bildschirm dargestellt. Bei guter Qualität der RNA sind typische prominente Banden erkennbar, denen 18 S und 28 S ribosomale RNA zugrunde liegt. Das Bild wird in ein Elektropherogramm umgewandelt, bei dem diese Banden als prominente Spitzen zu erkennen sind (Abbildung 3). Außerdem erfolgt eine densitometrische Auswertung des Bildes, anhand derer eine quantitative Aussage über den jeweiligen RNA-Gehalt der Probe getroffen werden kann.

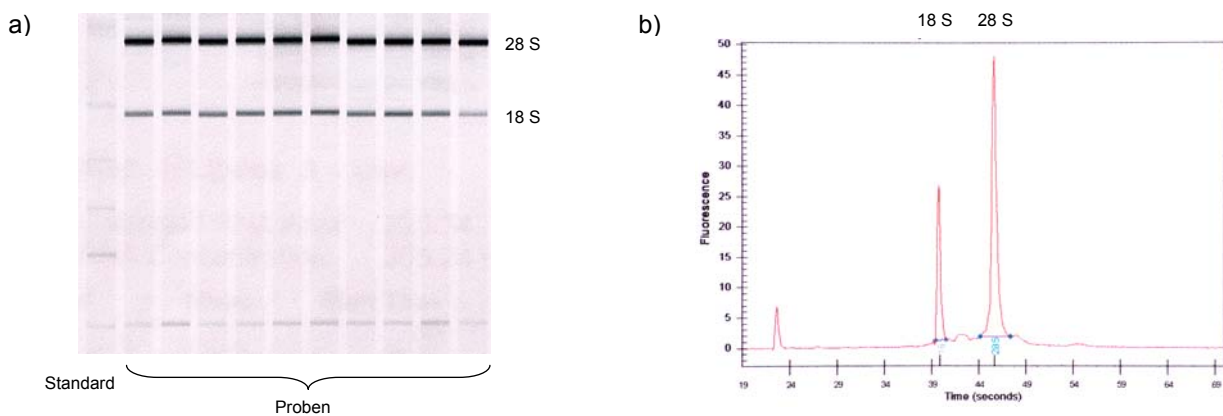


Abbildung 3: a) Exemplarische Darstellung einer elektrophoretischen mRNA-Probenauftrennung. Die Banden entsprechen 18 S und 28 S ribosomaler RNA. b) Anhand der Elektrophorese erstelltes Elektropherogramm. Die 18-S- und 28-S- Banden kommen als prominente Spitzen zur Darstellung.

2.6.5 RNA-Reverse-Transkriptase PCR

Um RNA mit Hilfe einer PCR vervielfältigen zu können, hybridisiert man einen Primer an die RNA-Matrize und erstellt mittels der Reversen Transkriptase (RT) eine cDNA-Kopie.

In dieser Arbeit wurden zur Denaturierung 500 ng RNA mit nukleasefreiem, bidestilliertem Wasser 5 min. bei 70°C erhitzt und dann auf Eis rasch abgekühlt. Nach Zugabe des Reaktionsansatzes wurde die jeweilige Probe im Thermocycler inkubiert. Die so generierte c-DNA wurde bis zum weiteren Gebrauch bei – 20°C gelagert. Der Reaktionsansatz sowie das Temperaturprofil sind in Tabelle 8 und 9 angegeben.

Tabelle 8: Reaktionsansatz für die RNA-Reverse-Transkriptase PCR

RNA-Probe (500 ng Gesamt-RNA)	10 µl
dNTP-Mix	2 µl
Random Hexaprimer	2 µl
RT	1µl
RNase-Inhibitor	1µl
Puffer	1µl
Nukleasefreies bidestilliertes H ₂ O	3 µl

Tabelle 9: Temperaturprofil für die RNA-Reverse-Transkriptase PCR

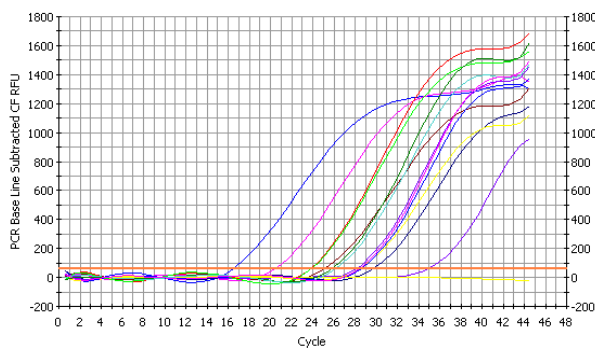
60 min.	37°C
5 min.	96°C
∞	4°C

Tabelle 10: Materialien für die RNA-Reverse-Transkriptase PCR

Omniscript Reverse Transkriptase Kit	Qiagen
Random Hexa Primer	Invitrogen, Karlsruhe
RNAse Inhibitor	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

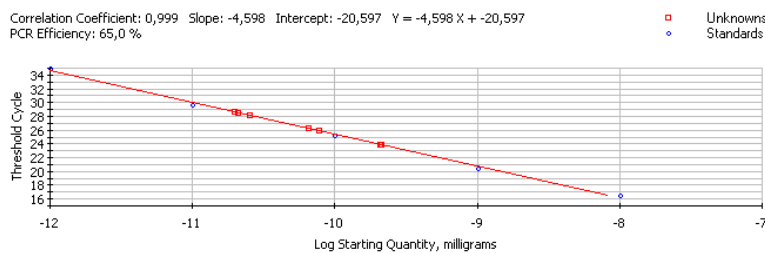
2.6.6 Realtime PCR

Im Gegensatz zur Standard PCR erlaubt die in der vorliegenden Arbeit im iCycler durchgeführte Realtime PCR eine quantitative Bestimmung der eingesetzten cDNA. Das Prinzip der quantitativen Realtime PCR beruht darauf, daß dem Reaktionsansatz ein Farbstoff zugesetzt ist, der in die neusynthetisierte doppelsträngige DNA interkaliert. Durch Licht aktiviert, sendet der Farbstoff ein Fluoreszenzsignal aus. Anhand der Intensität des Signals wird bereits während der Reaktion gemessen, wie die PCR-Produkte akkumulieren (Abbildung 4). Bei jeder Messung wird eine Verdünnungsreihe aus einer cDNA-Probe bekannter Konzentration mitgeführt. Dadurch läßt sich eine Standardgerade erstellen, anhand derer die cDNA-Konzentrationen der unbekannt Proben ermittelt werden können (Abbildung 5).



Die Kurven zeigen die Fluoreszenzzunahme und damit die Zunahme der PCR-Produkte der einzelnen Proben. Die orangefarbene Linie markiert den Schwellenwert C_t („Threshold cycle“), ab dem die Fluoreszenz über die Basisfluoreszenz während der ersten PCR-Zyklen ansteigt und eine exponentielle Zunahme der PCR-Produkte zu verzeichnen ist.

Abbildung 4: Exemplarische Darstellung einer cDNA-Probenmessung mittels Realtime PCR



Die blauen Markierungen entsprechen den Proben der Verdünnungsreihe. Rot markiert sind die unbekannt Proben, deren Konzentration anhand der Standardgeraden ermittelt wurde.

Abbildung 5: Exemplarische Darstellung einer Standardgeraden in der Realtime PCR

In der vorliegenden Arbeit wurde der Reaktionsansatz auf Eis pipettiert. Anschließend wurde die Reaktion sofort im Thermocycler gestartet. Zur Erstellung einer Standardgerade wurde eine Verdünnungsreihe von hochkonzentrierter cDNA aus Nierenkarzinomzelllinien parallel zu den Proben amplifiziert. Die Qualität der PCR-Produkte wurde durch eine Schmelzpunktanalyse überprüft. Der Reaktionsansatz sowie Temperaturprofile und verwendete Primer sind in den Tabellen 11-13 aufgeführt.

Tabelle 11: Reaktionsansatz für die Realtime PCR

cDNA	5 µl
SYBR Green Supermix	10 µl
Primer (s)	0,15 µl
Primer (as)	0,15 µl
Nukleasefreies bidestilliertes H ₂ O	4,7 µl

Tabelle 12: Temperaturprofile der Realtime PCR

a) COX-2-PCR

Taq-Aktivierung	1x	15 min	95°C
Denaturierung	45x	30 s	95°C
Primeranlagerung		30 s	61°C
Elongation		30 s	72°C
Schmelzpunktanalyse	1x	7 min.	
		∞	4°C

b) VEGF-PCR

Taq-Aktivierung	1x	15 min	95°C
Denaturierung	45x	20 s	95°C
Primeranlagerung		20 s	57°C
Elongation		20 s	72°C
Schmelzpunktanalyse	1x	7 min.	
		∞	4°C

c) β-Actin-PCR

Taq-Aktivierung	1x	15 min	94°C
Denaturierung	35x	30 s	95°C
Primeranlagerung		30 s	60°C
Elongation		30 s	72°C
Schmelzpunktanalyse	1x	7 min.	
		∞	4°C

Tabelle 13: Verwendete Primer für die Realtime PCR

Gene		Primer Sequenzen (5' - 3')
COX-2	antisense	gtgcactgtgtttggagtgg
	sense	tcagccatacagcaaactcctt
VEGF ₁₂₁₊₁₆₅	antisense	cttggtctagagagtgtcc
	sense	tcgggcctccgaaacctga
β-Actin	antisense	ggtaaccgttactcgccaaggcgac
	sense	tcaccacactgtgccatctacga

Tabelle 14: Materialien für die Realtime PCR

iQ SYBR Green Supermix	BioRad, Hercules, USA
Cox-2-Primer	MWG Biotech AG
VEGF-Primer	MWG Biotech AG
β-Actin Primer	MWG Biotech AG
DNA-Längenstandard: GeneRuler 100 bp DNA-Leiter	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

2.6.7 Auswertung der Ergebnisse der Realtime PCR

Um eine Vergleichbarkeit der Werte untereinander zu gewährleisten und sicher zu stellen, daß eine differentielle Expression des Zielgens vor dem Hintergrund einer gleichbleibenden Expression tumorirrelevanter Gene stattfindet, verwendet man interne Kontrollen. Als solche eignen sich Gene, von denen man annimmt, daß sie in allen Geweben und Zellen, und damit in unterschiedlichen Ansätzen, gleichermaßen exprimiert werden, sogenannte *housekeeping*-Gene. Ein solches Gen ist das β-Actin Gen, welches für die Zytoarchitektur der Zellen eine Rolle spielt (THELLIN et al. 1999). Man bezieht die Menge an spezifischem Produkt auf das *housekeeping*-Gen, dessen Menge man für eine Konstante hält. Dadurch werden auch Unterschiede der Meßwerte, die durch Schwankungen der Effizienz der cDNA-Synthese oder der Integrität der cDNA verursacht werden könnten, ausgeglichen.

In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb die absoluten Werte der COX-2- und VEGF-mRNA-Expression auf die der β-Actin-mRNA-Expression des entsprechenden Präparates bezogen. Aus den so „normalisierten“ Werten der mRNA-Expression wurde ein „Faktor der Hochregulation“ berechnet, indem die Expression des Zielgens in Tumorgewebe auf die Expression des Zielgens in korrespondierendem Normalgewebe bezogen wurde.

2.6.8 Proteinnachweis mittels Western-Blot-Analyse

Der erste Schritt des Verfahrens ist eine Auftrennung der Proteinmischung nach Molekülgröße durch diskontinuierliche Gelelektrophorese. Die Proteine werden nach der Elektrophorese durch eine senkrecht zum Gel angelegte Spannung auf eine proteinbindende Nitrozellulosemembran übertragen. Diese Membran wird dann mit der Lösung eines ersten Antikörpers inkubiert, der spezifisch ist für das gesuchte Protein. Nach einer bestimmten Reaktionszeit, in der sich Antigen-Antikörperkomplexe bilden, wird die Membran gewaschen, um überschüssige, nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Im letzten Schritt wird die Membran mit einem zweiten Antikörper inkubiert, der spezifisch an den ersten bindet, und über den die Detektion der Proteine erfolgt. An den Sekundärantikörper ist ein Enzym gebunden, welches eine Farbreaktion – oder wie in der vorliegenden Arbeit eine Chemilumineszenzreaktion – katalysiert, welche die markierten Banden sichtbar macht.

Proteinisolierung

Zur Proteingewinnung wurden die Makrophagen nach Abschluß der Zellkulturexperimente mit einem Zellschaber aus den Petrischalen gelöst, in DPBS (Biowhittaker, Verviers, Belgien) aufgenommen und 2 Waschzentrifugationen (1200 Upm, 6 min. bei 4°C) unterzogen. Die weiteren Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Das Zellpellet wurde in 1 mM EDTA Complete Protease Inhibitoren Cocktail (Roche, Penzberg) resuspendiert. Um die Proteine aus den Zellen freizusetzen, wurden die Zellmembranen durch mehrmaliges Aspirieren der Zellen durch eine feine Kanüle mechanisch zerstört. Nach Zugabe von 0,1% Triton X-100 wurde das Gemisch nochmals mehrere Male durch eine Kanüle passiert und dann für 10 min. bei 4000 Upm und 4°C zentrifugiert. Die Proteine, die sich nach der Zentrifugation im Überstand befanden, wurden sodann abpipettiert. Ihre Konzentration wurde photometrisch unter Verwendung von Protein-Assay Farbstoff-Konzentrat (BioRad, München) mit dem Protein-Assay nach Bradford bestimmt (BRADFORD 1976).

Proteinauftrennung mittels Elektrophorese

Für die weitere Analyse wurde eine jeweils 50 µg Protein entsprechende Menge der Proben eingesetzt. Um die Proteine zu fällen, wurden 1000 µl Azeton zu der jeweiligen Probe gegeben, die sodann 10 min auf Eis inkubiert wurde. Es folgte eine Zentrifugation bei 4000 Upm und RT für 10 min. Danach wurden die Überstände dekantiert und das Proteinpellet mit 40 µl Probenpuffer resuspendiert. Zur Denaturierung wurden die Proben anschließend 10 min. bei 70 °C im Thermomixer inkubiert. Zur Proteinauftrennung verwendeten wir ein Elektrophorese System der Firma Biorad. Polyacrylamidgele (Trenngel mit 12 % Vernetzungsgrad, Sammelgel mit 5 % Vernetzungsgrad) wurden in Gießständen gegossen und in eine vertikale Elektrophoresekammer eingespannt. Die Proben wurden in die vorbereiteten Geltaschen pipettiert und in der mit SDS-Laufpuffer gefüllten Kammer bei einer Spannung von initial 80 V für 10 min., dann bei 120 V für 2,5 Std. aufgetrennt. Zur Beurteilung der Proteingewichte wurde ein farbig markierter Proteinstandard mitgeführt.

Proteintransfer und Darstellung

Das Gel wurde vorsichtig auf eine PVDF-Membran überführt, die zuvor kurz in Transferpuffer geschwenkt wurde, und zwischen ebenfalls mit Puffer getränktem Filterpapier in einem Semidry-Blot-System gelagert. Dadurch wurde ein Druck auf die Gel-Membraneinheit ausgeübt und damit ein luftblasenfreier Transfer der Proteine gewährleistet. Dieser dauerte 1 Stunde bei 0,04 A. Um danach die freien, unspezifischen Bindungsstellen auf der Blot-Membran zu blockieren, wurde sie unter leichtem Schütteln für 1 Std. bei Raumtemperatur mit Blockpuffer inkubiert, anschließend 3 x 5 min. mit Waschpuffer gewaschen. Dann wurde die Membran mit dem entsprechenden Primärantikörper inkubiert. Auf einen erneuten Waschvorgang folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 1 Stunde. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Horseradish Peroxidase katalysierte eine Chemilumineszenzreaktion. Die dabei entstehenden Banden wurden auf Röntgenfilmen abgebildet. Die Inkubationsprotokolle sowie die verwendeten Antikörper und Detektionssysteme sind in den Tabellen 15 – 17 angegeben.

Tabelle 15: Inkubationsprotokolle für den Western-Blot

Antikörper	Verdünnung	Inkubation
COX-2	1:100	4°C, über Nacht
β-Actin	1:2000	4°C, über Nacht

Tabelle 16: Verwendete Antikörper für den Western-Blot

<u>Primärantikörper</u>	
COX-2, monoklonal, Maus	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
β -Actin, monoklonal, Maus	Oncogene, San Diego, CA, USA
<u>Sekundärantikörper</u>	
Kaninchen-anti-Maus COX-2	Dako
Kaninchen-anti-Maus-HRP- β -Actin	Dako

Tabelle 17: Materialien für die Gel-Elektrophorese und die Chemilumineszenzreaktion

Proteinstandard Full Range Rainbow, Recombinant Protein Molecular Weight Markers, RPN 800	Amersham Life Science, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK
Western Lightning Chemilumineszenz Reagenz Plus	Perkin Elmer Life Sciences Boston, USA
Röntgenfilme	Agfa

2.6.9 ELISA

Beim *enzyme-linked immunosorbent assay* handelt es sich um ein immunologisches Nachweisverfahren für Proteine. Ein an eine Mikrotiterplatte gebundener erster Antikörper bindet spezifisch an das gesuchte Antigen. Ungebundene Bestandteile werden nach Ablauf der Inkubationszeit durch Waschen entfernt. In einem nächsten Schritt wird ein Detektionsantikörper zugegeben, der ebenfalls spezifisch an das gesuchte Antigen bindet, jedoch an einer anderen Stelle. Es entsteht ein Antigen - Antikörper - Antigen - Komplex. An den zweiten Antikörper ist ein Enzym gebunden, welches nach erneutem Waschen der Probe und Zugabe eines Chromogens eine Farbreaktion in Gang bringt. Sie kann im Photometer verfolgt werden. Die Intensität der Farbe ist dabei proportional zur Konzentration des zu bestimmenden Antigens in der Probe.

In der vorliegenden Arbeit wurde der ELISA unter Verwendung des Biotrak hVEGF Human ELISA System (Amersham Biosciences, Piscataway, USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.7 Statistische Analyse

Die Ergebnisse wurden anhand des Mann-Whitney-Testes bzw. des Wilcoxon-Rangsummentestes auf signifikante Unterschiede überprüft. Anhand des Spearman-Rang-Korrelationskoeffizienten wurde getestet, ob sich eine Korrelation zwischen den untersuchten Parametern nachweisen ließ. Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe der Software GraphPad Prism Version 3.0 für Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt.

Die Ergebnisse der Untersuchung der mRNA-Expression in Tumorgewebe sowie Teile der immunhistochemischen Untersuchungen und der Proteinnachweis mittels Western-Blot-Analyse wurden deskriptiv angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen an humanem Tumormaterial

3.1.1 COX-2-Proteinexpression und Cox-2-mRNA-Expression im Nierenzellkarzinom

Immunhistochemisch konnte eine Expression von zellgebundenem COX-2-Protein im Tumorepithel und in kleinen Gefäßen der Tumoren lokalisiert werden. Außerdem ließen sich positive Signale für COX-2 in interstitiellen Makrophagen sowie in Makrophagen im Bereich von Nekrosen detektieren (Abbildung 6 und Abbildung 7). Im tumorfreien Gewebe war COX-2-Protein in den Zellen der Sammelrohre und, wenn auch deutlich schwächer, im Epithel der proximalen und distalen Tubuli nachweisbar (Abbildung 6). Der immunoreaktive Score war im Tumorepithel maximal [3+3] und minimal [1+1]. Im normalen Epithel ergab der immunoreaktive Score ebenfalls einen Maximalwert von [3+3] und einen Minimalwert von [1+1]. Obgleich tendenziell eine höhere Expression von COX-2-Protein im Tumor vorlag, zeigte die statistische Analyse im Vergleich zwischen Tumorepithel und Epithel tumorfreien Gewebes keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der COX-2-Protein-Expression.

In 19 von 23 Fällen zeigte sich eine deutliche Abnahme der COX-2-mRNA-Expression im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe, im Mittel um den Faktor 6,7 (1,2 bis 33,3). Eine Zunahme der COX-2-Expression im Tumorgewebe fand sich nur in 4 Fällen, im Mittel um den Faktor 2,6 (1,6 bis 3,8)

Eine Korrelation zwischen der mRNA-Expression und der Protein-Expression von COX-2 lag nicht vor.

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse und der PCR sind in Tabelle 18 zusammengefaßt.

3.1.2 VEGF-Proteinexpression und VEGF-mRNA-Expression im Nierenzellkarzinom

Immunhistochemisch konnte eine Expression von zellgebundenem VEGF-Protein im Tumorepithel und in interstitiellen Makrophagen sowie in Makrophagen im Randbereich von Nekrosen detektiert werden (Abbildung 6 und Abbildung 7). Im tumorfreien Gewebe war VEGF-Protein in den Zellen der Sammelrohre und im Epithel der proximalen und distalen Tubuli nachweisbar (Abbildung 6). Der immunoreaktive Score war in den Tumorepithelien maximal [3+3] und minimal [1+1]. Im normalen Epithel ergab der immunoreaktive Score ebenfalls einen Maximalwert von [3+3] und einen Minimalwert von [1+1]. Insgesamt war die Expression von VEGF-Protein im Tumorepithel im Vergleich zum Epithel normalen Gewebes signifikant erhöht ($P = 0,0004$).

In 18 von 23 Fällen fand sich eine deutliche Zunahme der VEGF-mRNA-Expression im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe, im Mittel um den Faktor 9 (1,4 bis 33,8). In 3 Fällen nahm die VEGF-Expression ab, im Mittel um den Faktor 3,8 (1,6 bis 5,3). In 2 Fällen war sie unverändert.

Zwischen der Protein-Expression von VEGF und der mRNA-Expression von VEGF in Tumorgewebe zeigte sich eine umgekehrte Korrelation (Spearman's $r = -0,54$, $P=0,0076$), (Abbildung 8).

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse und der PCR sind in Tabelle 18 zusammengefaßt.

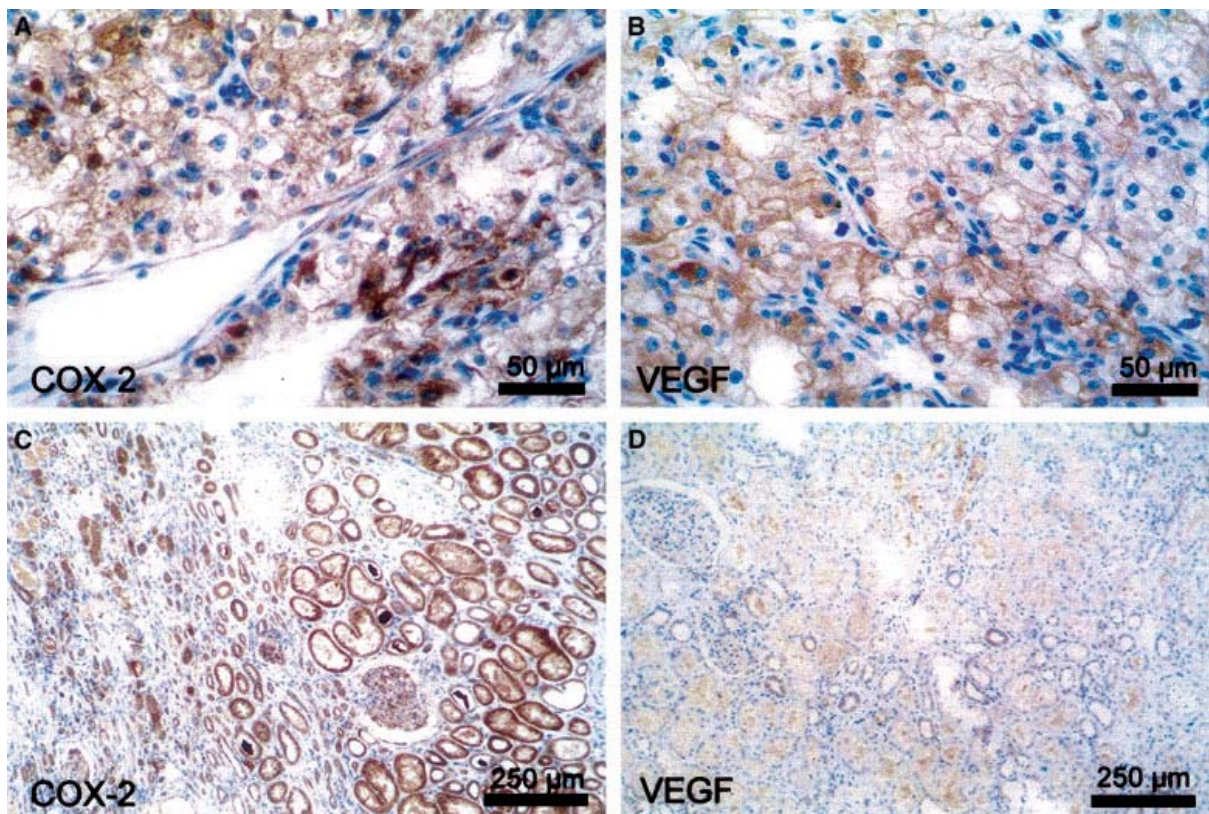


Abbildung 6: Immunhistochemische Darstellung von COX-2 und VEGF in Tumorgewebe und tumorfreiem Gewebe.

Bild A: Expression von COX-2 im Tumorepithel und im Endothel sinusoidaler Tumorgefäße

Bild B: Expression von VEGF im Tumorepithel

Bild C: Expression von COX-2 in tumorfreiem Gewebe

Bild D: Expression von VEGF in tumorfreiem Gewebe

(Bilder A-D von Fall 1, Chromogen DAB, übernommen aus HEMMERLEIN et al. 2004)

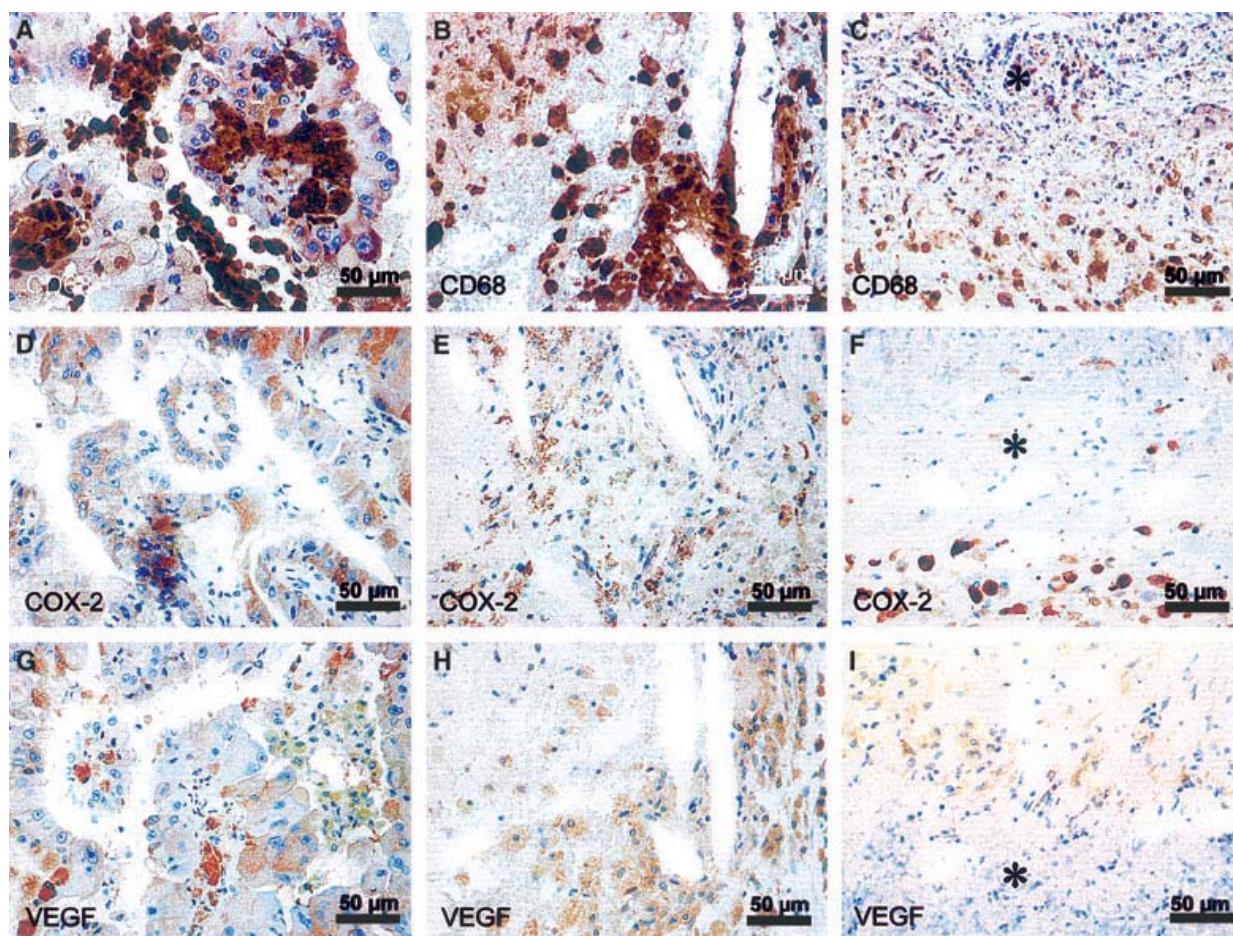


Abbildung 7: Immunhistochemische Darstellung von COX-2, VEGF und Makrophagen in Tumorgewebe

Bild A: CD68-positive interstitielle Makrophagen ohne COX-2 Expression

Bild B: CD68-positive Makrophagen innerhalb und am Rand einer Nekrosezone

Bild C: CD68-positive Makrophagen am Rand einer Nekrosezone

Bild D: Expression von COX-2 im Tumorepithel

Bild E: Expression von COX-2 in Makrophagen innerhalb und am Rand einer Nekrosezone

Bild F: Expression von COX-2 in Makrophagen am Rand einer Nekrosezone

Bild G: Expression von VEGF in Makrophagen und im Tumorepithel

Bild H: Expression von VEGF in Makrophagen innerhalb und am Rand einer Nekrosezone

Bild I: Expression von VEGF in Makrophagen am Rand einer Nekrosezone

(Bilder A,D,G von Fall 13, Bilder B,E,H von Fall 12, Bilder C,F,I von Fall 2.

Chromogen DAB für COX-2 und VEGF, Chromogen AEC für CD68, * = Nekrose.

Übernommen aus HEMMERLEIN et al. 2004)

Tabelle 18: Synopsis der immunhistochemischen Daten und der PCR- Daten

Fall	COX-2			VEGF			MVD	Nekrosen
	mRNA	IRS Tumor	IRS Normal	mRNA	IRS Tumor	IRS Normal		
1	0,81	2+3	3+3	3,94	2+3	1+3	15,70	
2	3,8	3+3	1+2	5,36	3+2	1+2	10,25	+
3	0,27	2+2	2+3	1,42	2+3	1+2	10,70	+
4	1,96	2+2	2+1	5,45	2+3	1+2	3,25	
5	0,60	2+3	2+2	2,48	1+3	2+1	34,05	
6	0,36	2+3	1+2	1,44	2+3	2+2	11,65	
7	0,08	2+2	1+2	5,18	2+3	1+2	23,20	
8	0,81	2+2	1+2	7,2	2+3	2+2	42,75	
9	0,09	2+3	2+2	4,64	3+2	2+2	7,5	+
10	0,14	2+2	2+3	6,01	2+3	1+3	14,60	
11	0,81	1+2	2+2	26,05	1+2	2+2	21,00	
12	0,18	3+3	2+3	0,45	2+3	2+1	5,65	+
13	0,07	3+3	3+3	19,21	2+2	1+1	11,62	+
14	0,53	2+3	ne	1,03	3+3	Ne	3,6	+
15	0,42	2+2	1+2	1,09	3+3	2+2	5,61	+
16	0,42	1+2	1+1	3,68	1+3	1+2	36,60	
17	3,16	3+3	2+2	5,81	3+3	2+2	11,60	
18	1,63	2+3	2+2	14,31	3+2	1+3	13,02	
19	0,03	2+2	2+2	0,57	3+3	2+3	6,20	+
20	0,41	1+1	2+2	3,99	1+2	2+3	11,15	
21	0,07	3+2	2+2	0,19	3+3	2+2	3,5	
22	0,42	1+1	1+2	33,78	3+1	1+2	20,35	
23	ne	2+3	1+2	ne	3+2	2+2	10,05	+
24	0,19	1+3	2+2	12,63	1+3	1+2	28,65	

mRNA: Faktor der Hochregulation vs. Normalgewebe

IRS: Immunoreaktiver Score

MVD: Mikrovaskuläre Gefäßdichte

ne: Nicht erfaßt

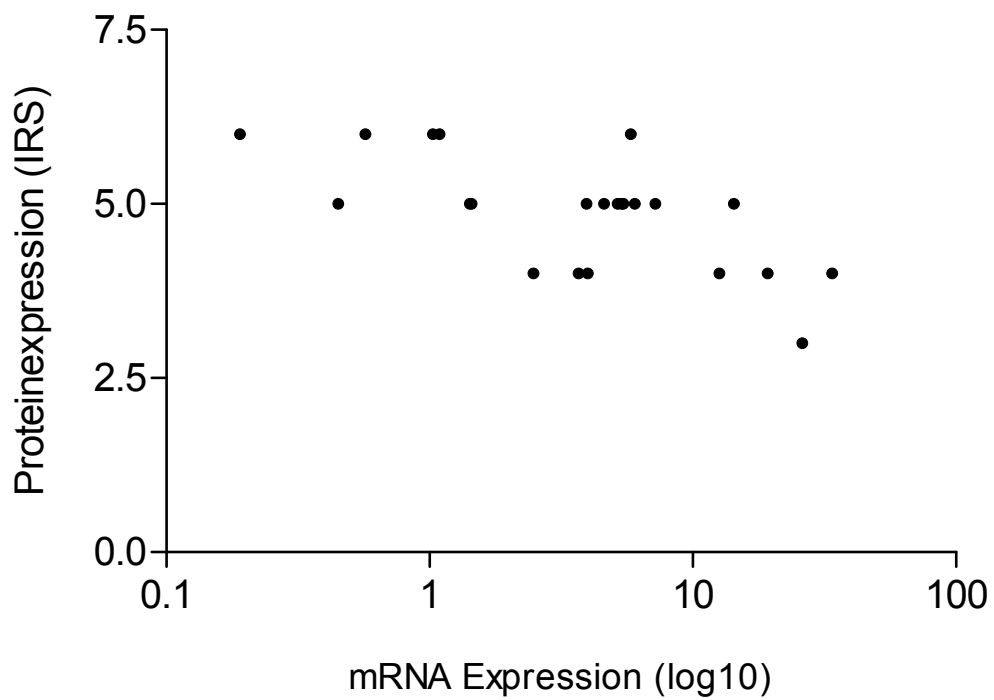


Abbildung 8: Korrelationsanalyse der relativen VEGF-mRNA-Expression (Faktor der Hochregulation vs. Normalgewebe, logarithmische Darstellung), und der VEGF-Protein-Expression (immunoreaktiver Score) in Tumorgewebe. Spearman's $r = -0,54$, $P = 0,0076$. Übernommen aus HEMMERLEIN et al. (2004).

3.1.3 Expression von COX-2 und VEGF im Zusammenhang mit der Tumorgefäßdichte und Tumornekrosen im Nierenzellkarzinom

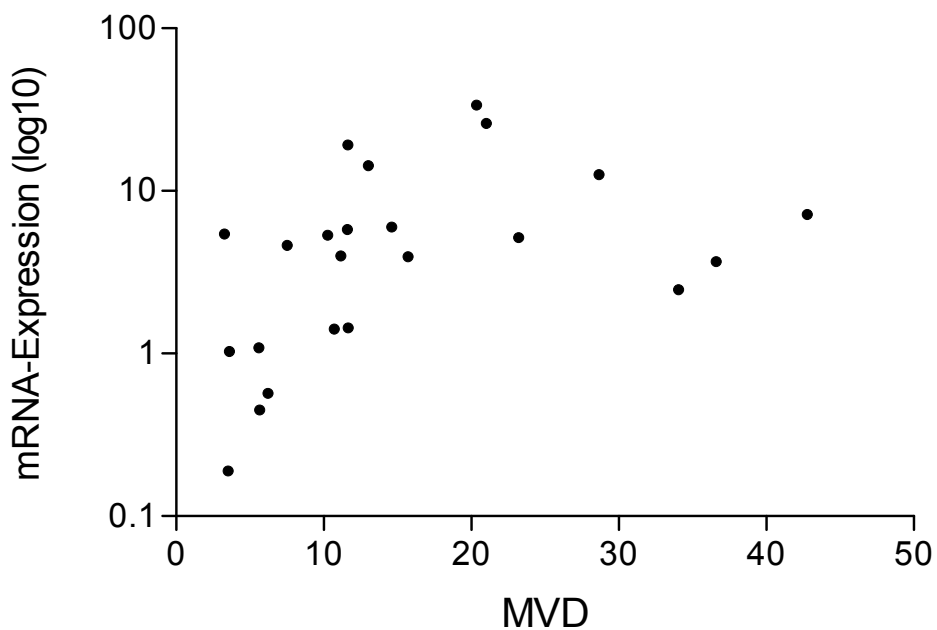
Zwischen der Expression von COX-2 und der MVD ließ sich kein Zusammenhang konstatieren.

Eine direkte Korrelation bestand zwischen der Expression von VEGF-mRNA und der MVD (Spearman's $r = 0,53$; $P = 0,0098$; Abbildung 9a). Eine umgekehrte Korrelation zeigte sich zwischen der Expression von VEGF-Protein und der MVD (Spearman's $r = -0,62$, $P = 0,0014$; Abbildung 9b).

Weder für die Expression von COX-2 noch für die Expression von VEGF ließ sich ein Zusammenhang mit dem Vorkommen von Nekrosen darstellen.

Die Untersuchung der Gefäßdichte im Nierenzellkarzinom und ihres potentiellen Einflusses auf die Entwicklung von Nekrosen führte zu folgendem Ergebnis: Für die MVD ergab sich im Mittel ein Wert von 19,4 (3,3 bis 42,8). 9 von 24 Tumoren wiesen Nekrosezonen auf. Für die MVD in Tumoren mit Nekrosen ergab sich im Mittel ein Wert von 7,9 (3,6 bis 11,6). Für die MVD in Tumoren ohne Nekrosen ergab sich im Mittel ein Wert von 19,4 (3,3 bis 42,8). Tumoren mit Nekrosen zeigten somit eine signifikant verminderte MVD im Vergleich zu Tumoren ohne nekrotische Bereiche ($P = 0,0051$) Die Ergebnisse sind in Tabelle 18 zusammengefaßt und in Abbildung 10 graphisch dargestellt.

a)



b)

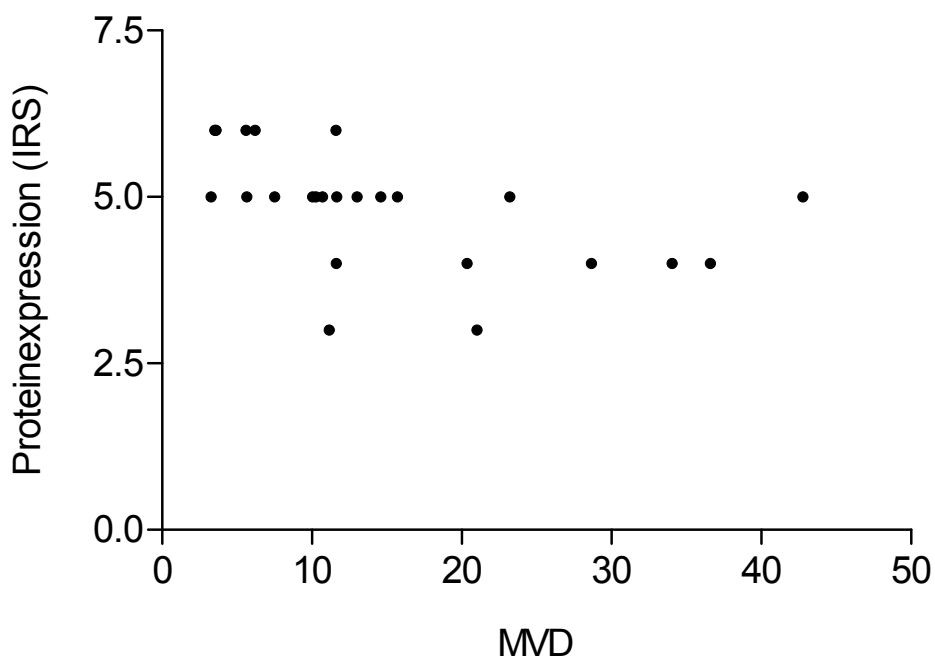


Abbildung 9 : a) Korrelationsanalyse der relativen VEGF-mRNA-Expression (Faktor der Hochregulation vs. Normalgewebe, logarithmische Darstellung) und der mikrovaskulären Gefäßdichte (MVD) in Tumorgewebe. Spearman's $r = 0,53$; $P = 0,0098$.

b) Korrelationsanalyse der VEGF-Protein-Expression (immunoreaktiver Score) und der mikrovaskulären Gefäßdichte (MVD) in Tumorgewebe. Spearman's $r = -0,62$; $P = 0,0014$.

Übernommen aus HEMMERLEIN et al. (2004).

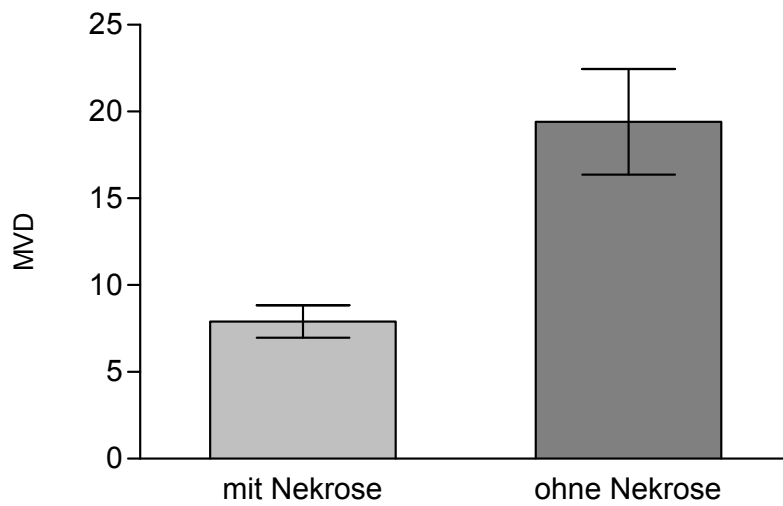


Abbildung 10: Balkendiagramm: Mikrovaskuläre Gefäßdichte (MVD) in Tumoren. Dargestellt sind die Mittelwerte der Gefäßdichte in Tumoren mit Nekrosen Vergleich zu Tumoren ohne Nekrosen +/- SEM. Übernommen aus HEMMERLEIN et al. (2004).

3.2 In-vitro-Untersuchungen

3.2.1 COX-2- und VEGF-mRNA-Expression in Tumorzellen unter Hypoxie

Unter Normoxie wurde COX-2 und VEGF in den Zelllinien A498 und Caki 1 schwach exprimiert. Unter Hypoxie zeigte sich bei Zellen der Linie A498 eine signifikante Herabregulation von COX-2 um den Faktor 0,6 (0,4 bis 0,8); ($P=0,0078$; $n=7$) und eine leichte aber nicht signifikante Hochregulation von VEGF um den Faktor 1,6 (0,7 bis 3,7). Die COX-2 Expression bei Zellen der Linie Caki 1 blieb unter Hypoxie nahezu konstant, VEGF wurde signifikant um den Faktor 2,3 (0,6 bis 4,8) hochreguliert; ($P=0,039$; $n=7$).

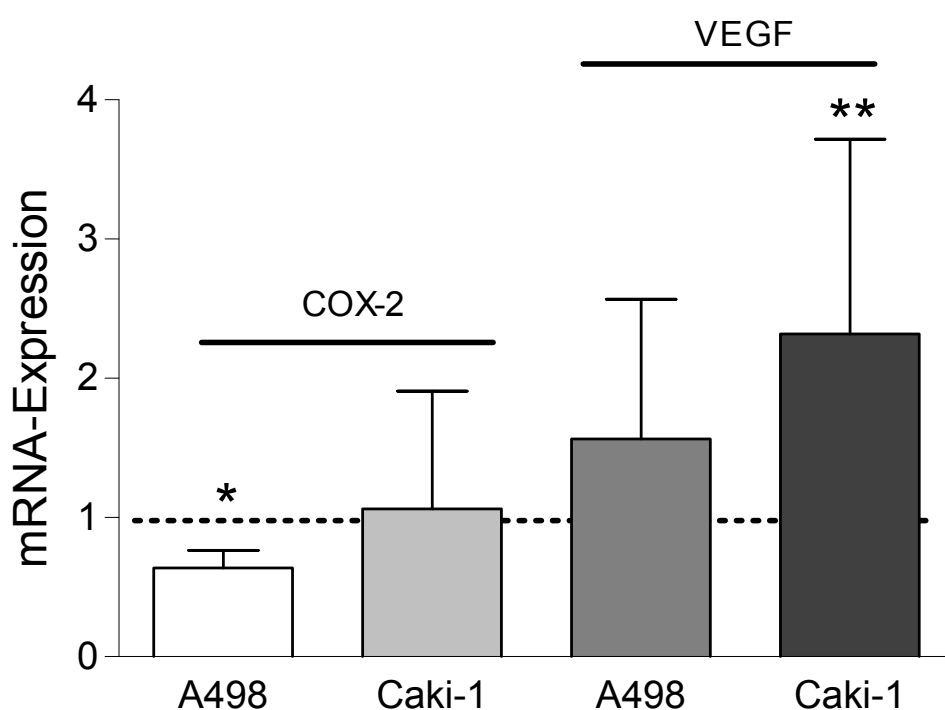


Abbildung 11: Balkendiagramm: Relative mRNA-Expression von COX-2 und VEGF in Tumorzellen unter Hypoxie, angegeben als Faktor der Hochregulation vs. Normoxie. Dargestellt sind die Mittelwerte und der SEM. * $P = 0,0078$, ** $P = 0,039$; $n=7$. Übernommen aus HEMMERLEIN et al. (2004).

3.2.2 COX-2- und VEGF-Proteinexpression in Tumorzellsphäroiden

Aus Zellen der Linie A498 ließen sich gleichmäßige Sphäroide generieren. Bei der immunhistochemischen Färbung fiel auf, daß die Signalstärke sowohl für COX-2 als auch für VEGF vom Zentrum zur Peripherie der Sphäroide hin abnahm. Zellen der Linie Caki 1 formten nur unregelmäßige multizelluläre Aggregate. Ein deutlicher Gradient der Signalstärke in der immunhistochemischen Färbung war hier nicht zu beobachten.

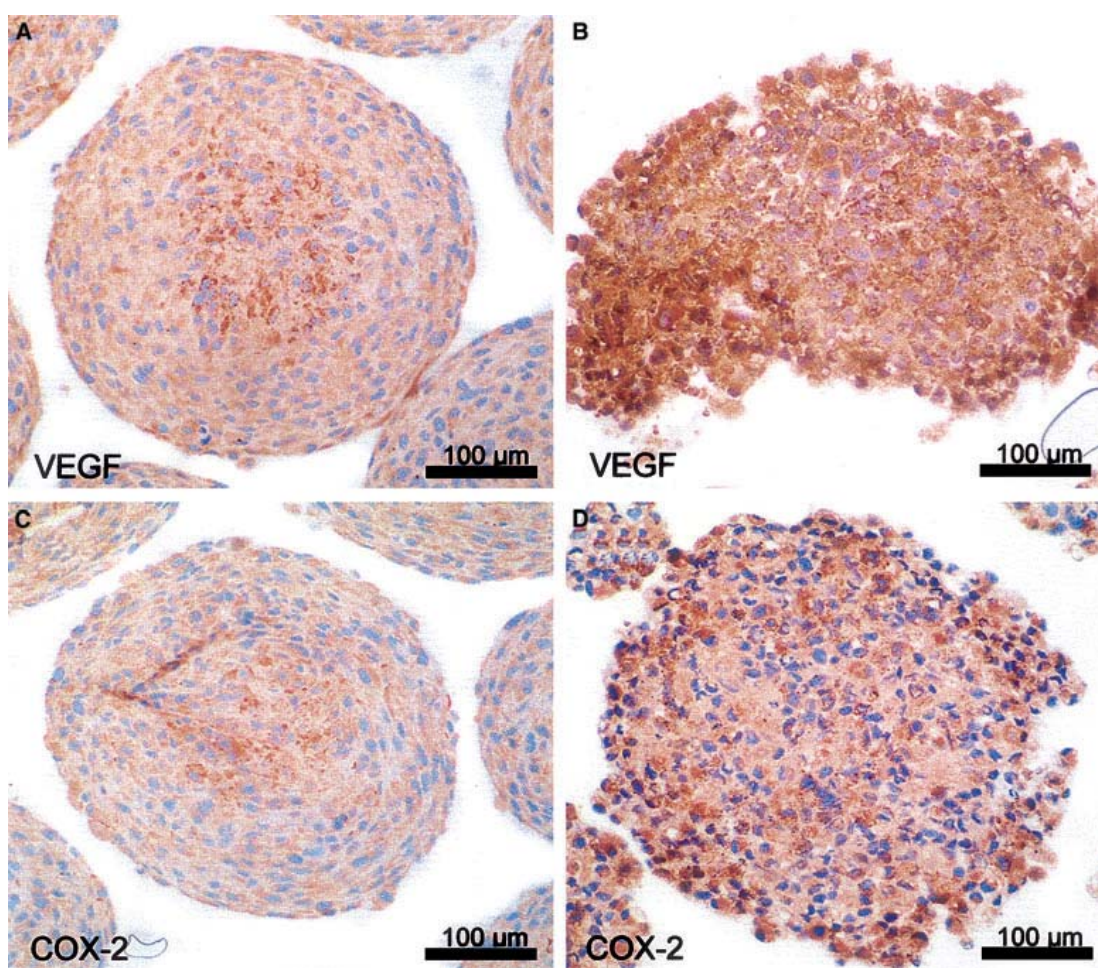


Abbildung 12: Proteinexpression von COX-2 und VEGF in Sphäroiden und multizellulären Aggregaten von Tumorzellen

Bild A, C: Zellen der Linie A498 formten gleichmäßige Sphäroide, die Signalstärke für VEGF und COX-2 nahm vom Zentrum zur Peripherie hin ab.

Bild B, D: Zellen der Linie Caki-1 formten unregelmäßige zelluläre Aggregate, ein Gradient der Signalstärke war nicht zu erkennen.

(Chromogen DAB. Übernommen aus HEMMERLEIN et al. 2004)

3.2.3 COX-2- und VEGF-mRNA-Expression in Makrophagen unter Hypoxie und unter Stimulation mit nekrotischen Tumorzellen

Unter Normoxie zeigten Makrophagen nur eine niedrige Expression von COX-2- und VEGF-mRNA.

Unter hypoxischen Bedingungen war eine deutliche Zunahme der COX-2-mRNA-Expression zu beobachten. Sie nahm im Mittel um den Faktor 10,9 (5,2 bis 18,8) zu; ($p=0,0078$; $n=8$). Stark ausgeprägt war die Zunahme der COX-2-mRNA-Expression unter Stimulation mit lysierten Tumorzellen. Sie nahm im Mittel um den Faktor 94,4 (3 bis 490,1) zu; ($p=0,0156$; $n=7$).

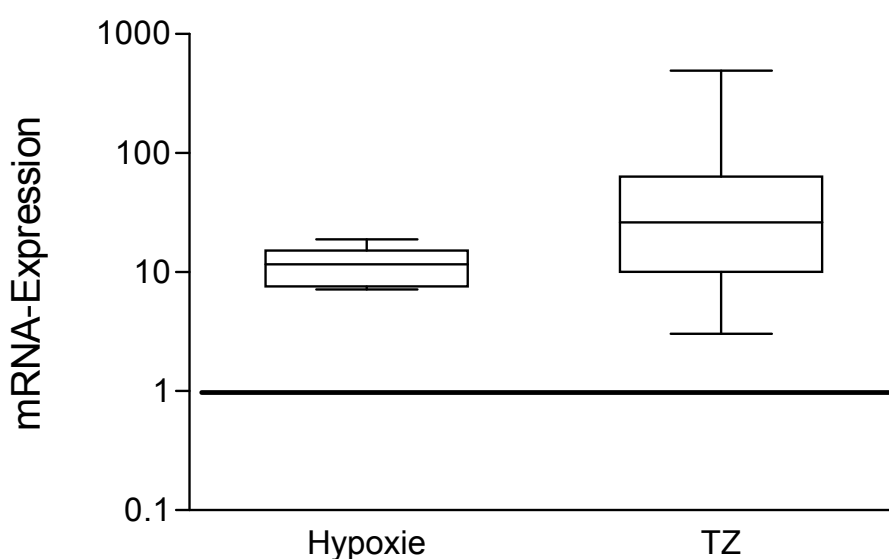


Abbildung 13: Boxplot-Diagramm: COX-2 mRNA-Expression in Makrophagen unter Hypoxie und unter Stimulation mit nekrotischen Tumorzellen (TZ), angegeben als Faktor der Hochregulation vs. unstimulierte Makrophagen. Logarithmische Darstellung. Abgebildet sind der Median, das obere und das untere Quartil sowie die Maximal- und Minimalwerte. $n = 8$ (Hypoxie), $n = 7$ (TZ).

Bei der Expression von VEGF-mRNA war unter Hypoxie eine Zunahme im Mittel um den Faktor 29,5 (12,8 bis 50,6) festzustellen; ($p=0,0078$; $n=8$). Unter Stimulation mit lysierten Tumorzellen nahm die Expression von VEGF-mRNA im Mittel um den Faktor 9,2 (2,3 bis 19,2) zu; ($p=0,0156$; $n=7$).

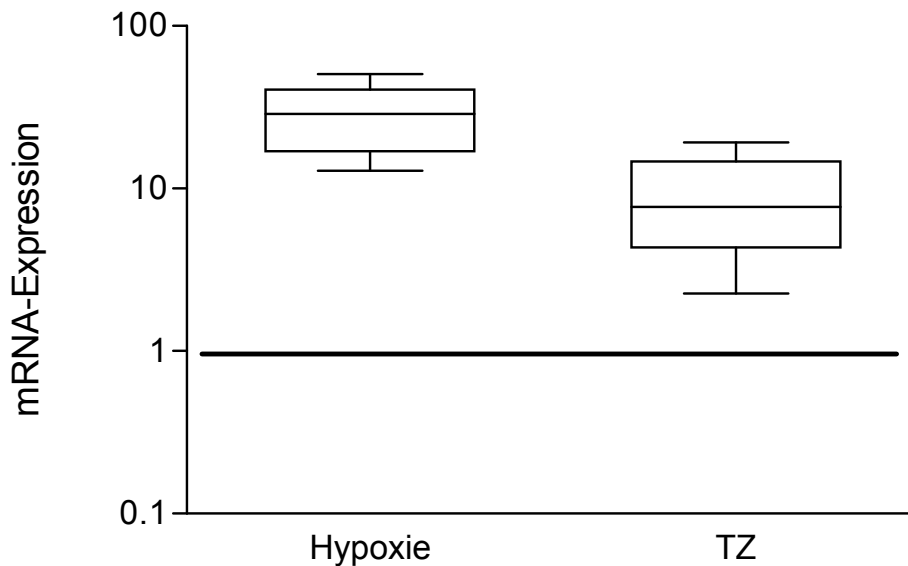


Abbildung 14: Boxplot Diagramm: VEGF-mRNA-Expression in Makrophagen unter Hypoxie und unter Stimulation mit nekrotischen Tumorzellen (TZ), angegeben als Faktor der Hochregulation vs. unstimulierte Makrophagen, Logarithmische Darstellung. Abgebildet sind der Median, das obere und das untere Quartil sowie die Maximal- und Minimalwerte. $n = 8$ (Hypoxie), $n = 7$ (TZ).

3.2.4 COX-2- und VEGF- Proteinexpression in Makrophagen unter Hypoxie und unter Stimulation mit nekrotischen Tumorzellen

Nach Stimulation mit lysierten Tumorzellen exprimierten Makrophagen COX-2-Protein, welches im Western-Blot durch das Vorhandensein einer Bande bei 72 kDa gezeigt werden konnte. Im Gegensatz dazu war weder in unstimulierten Makrophagen noch in Makrophagen unter Hypoxie eine COX-2-Proteinexpression nachweisbar.

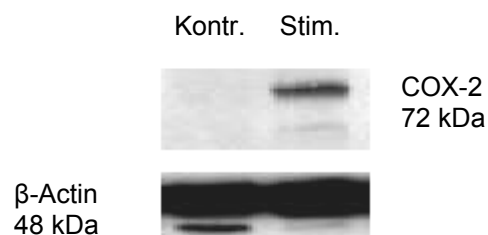


Abbildung 15: Exemplarischer Western-Blot : Expression von COX-2-Protein in Makrophagen ohne Stimulation (Kontr.) und nach Stimulation mit nekrotischen Tumorzellen (Stim.). Abgebildet ist außerdem die Expression von β -Actin-Protein als interne Kontrolle.

VEGF-Protein ließ sich in den Makrophagen selbst im Western-Blot nicht nachweisen. Der Nachweis gelang in den Zellkulturüberständen mittels ELISA. Eine VEGF-Protein-Expression war sowohl unter Normoxie sowie unter Hypoxie und unter Stimulation mit Tumorzellen nachweisbar. Lediglich unter Tumorzellstimulation fand sich eine relevante Hochregulation von VEGF-Protein im Vergleich zu unstimulierten Makrophagen um den Faktor 1,7 (1,4 bis 2,2); ($p=0,024$; $n=3$).

4 Diskussion

In den letzten Jahren häufen sich Hinweise darauf, daß die enzymatische Aktivität der COX-2 bei Entstehung, Wachstum und Ausbreitung von Tumoren eine wichtige Rolle spielt. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind jedoch nicht vollständig aufgeklärt.

Eine im Vergleich zum Normalgewebe erhöhte COX-2-Expression ist wiederholt bei verschiedenen bösartigen Tumoren beschrieben worden (SAUKKONEN et al. 2004). Über das Nierenzellkarzinom finden sich diesbezüglich nur wenige Publikationen. Die Tabellen 19 – 21 fassen diese zusammen. Bislang existieren keine Arbeiten, die den Gesamtzusammenhang zwischen der Expression von COX-2, VEGF und der Gefäßneubildung im Nierenzellkarzinom evaluieren. Ebenso wenig finden sich Daten, die eine Aussage über die Hypoxiesensitivität von COX-2 und VEGF im Nierenzellkarzinom zulassen.

Basierend auf den an anderen Tumoren gewonnenen Erkenntnissen ging die vorliegende Untersuchung davon aus, daß eine Induktion von COX-2 im Nierenzellkarzinom nachweisbar ist, welche die Expression von VEGF und die Bildung von Tumorgefäßen beeinflusst und unter Hypoxie verstärkt wird.

4.1 Die Expression von COX-2 im Nierenzellkarzinom

In der vorliegenden Arbeit waren in allen untersuchten Präparaten positive Signale für COX-2-Protein im Tumorgewebe detektierbar. In gesundem Nierengewebe konnten wir, übereinstimmend mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, ebenfalls eine Expression von COX-2-Protein nachweisen (HASHIMOTO et al. 2004; MIYATA et al. 2003; MUNGAN et al. 2006; TUNA et al. 2004; YOSHIMURA et al. 2004b). Dies läßt sich durch den Umstand erklären, daß die COX-2 in der Niere auch unter physiologischen Bedingungen eine Funktion erfüllt, indem sie, in Interaktion mit dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, die Homöostase des Wasser- und Elektrolythaushaltes moduliert. Abgesehen davon bilden Tubuluszellen Interleukin 6, das möglicherweise durch die Bindung an die Promotorregion des COX-2-Gens die Expression von COX-2 in der Niere induziert (OOSTERWIJK und MULDER 2006).

Die Annahme, daß im Tumor ein signifikant erhöhtes Expressionsniveau von COX-2-Protein vorliegt, ließ sich hier im Gegensatz zu den Ergebnissen der oben angeführten Untersuchungen von HASHIMOTO et al., MIYATA et al., MUNGAN et al., TUNA et al. und YOSHIMURA et al. nicht bestätigen.

Tabelle 19: Untersuchungen der COX-2-Expression in menschlichen Nierenzellkarzinomen

Autor	Material	Methoden	COX-2-Expression	Korrelation der COX-2-Expression mit anderen Parametern
MIYATA et al. 2003	131 Tumoren	IHC	53,4 % Tumoren positiv Schwache Signale im assoziierten Normalgewebe (Tubulus)	Korrelation mit Stage, Grade Korrelation mit Proliferation, MMP, MVD Keine Korrelation mit Apoptose
YOSHIMURA et al. 2004b	108 Tumoren 20 normale Nieren	IHC	100 % Tumoren positiv, (Epithel, Gefäße, Stroma) Deutlich schwächere Signale in normaler Niere (Tubulus)	Keine Korrelation mit Stage, Grade
	10 Tumoren 5 normale Nieren	PCR	Deutliche Banden in Tumoren Keine Banden in normaler Niere	
HASHIMOTO et al. 2004	75 Tumoren	IHC	100% Tumoren positiv, variable Ausprägung Schwache Signale in normaler Niere (Tubulus)	Korrelation mit Stage, Grade
TUNA et al. 2004	71 Tumoren	IHC	63 % Tumoren positiv Signale Tumor > Signale entzündetes Normalgewebe > Signale Normalgewebe	Korrelation mit Tumogröße, Stage, Grade Keine Korrelation mit Metastasierung oder Überleben
CHO et al. 2005	92 Tumoren	IHC	75% Tumoren moderat bis stark positiv	Korrelation mit Tumogröße Keine Korrelation mit Überleben, P53 Expression
MUNGAN et al. 2006	75 Tumoren 16 normale Nieren	IHC	65 % Tumoren positiv 56 % normale Nieren positiv, variable Ausprägung	
SOZEN et al. 2008	62 Tumoren	IHC	56 % Tumoren positiv	Korrelation mit Stage, Überleben

Tabelle 20: Untersuchungen der COX-2-Expression an menschlichen Nierenzellkarzinomzelllinien

Autor	Material	Methoden	COX-2-Expression	Korrelation der COX 2-Expression mit anderen Parametern
CHEN et al. 2004b	3 Tumorzelllinien 1 normale Zelllinie	PCR Western-Blot	mRNA- und Proteinexpression in 1 Tumorzelllinie	Korrelation mit PGE2 Produktion, Zellproliferation, Apoptose Korrelation mit Tumorwachstum, Angiogenese im Tierversuch
CHEN et al. 2004a	1 Tumorzelllinie		Bekannt positiv	Korrelation mit Adhäsivität, Invasivität

Tabelle 21: Untersuchungen der COX-2-Expression an tierischen Nierenzellkarzinomen und Nierenkarzinomzelllinien

Autor	Material	Methoden	COX-2-Expression
KHAN et al. 2001	3 Tumoren von Hunden	IHC	In 2 von 3 Tumoren moderate bis starke Signale
OKAMOTO et al. 2003	8 Tumoren von Ratten 2 Tumorzelllinien	PCR PCR	In 6 von 8 Tumoren m-RNA schwächer exprimiert als in normalen Gewebe In Tumorzelllinien mRNA schwächer exprimiert als in normalen Zelllinien
		IHC	Kein Nachweis von Protein in Tumorzellen

Es ist denkbar, daß diese Diskrepanz zumindest teilweise auf Unterschiede bei der Auswahl des Probenmaterials zurückzuführen ist. Während die hier verwendeten Gewebeprobe aus Tumor und angrenzendem Normalgewebe derselben Niere stammten, wurden von HASHIMOTO et al. (2004), MUNGAN et al. (2006) und YOSHIMURA et al. (2004) Tumorgewebe und tumorfreies Gewebe aus unterschiedlichen Nieren miteinander verglichen. Lediglich von MIYATA et al. (2003) und TUNA et al. (2004) wurde ein direkter Vergleich geführt, der sich jedoch auf Stichproben beschränkte. Dies mag insofern von Bedeutung sein, daß in Normalgewebe, welches direkt an maligne verändertes Gewebe grenzt, tumorübergreifende und inflammatorische Stimuli wirken und die Expression von COX-2 verstärken können. Untersuchungen an Mammakarzinomen, bei denen sich in 81 % der Fälle COX-2-Protein im an den Tumor angrenzenden Normalgewebe nachweisen ließ, bekräftigen diese Annahme (HALF et al. 2002). Nierenzellkarzinome bilden anders als Mammakarzinome jedoch häufig Kapseln, welche die Auswirkung des Tumors auf umgebendes Gewebe einschränken dürften. Generell ist beim Vergleich von Gewebeprobe aus verschiedenen Organen zu beachten, daß Differenzen der Proteinexpression durch eine unterschiedlich lange Dauer der warmen Ischämiezeit bei der Probengewinnung zustande kommen können (MATSUYAMA et al. 2005). Die bisher verfügbaren Angaben zur Häufigkeit der Expression von COX-2-Protein in maligne transformiertem Gewebe der Niere schwanken zwischen ca. 50% - 100% (s. Tabelle 19), wobei sich, wie auch in dieser Arbeit, innerhalb der einzelnen Studien deutliche interindividuelle Varianzen hinsichtlich des Ausmaßes und der Stärke der Expression zeigten. Einerseits kann dies die Tatsache widerspiegeln, daß Nierenzellkarzinome eine intra- und intertumoral heterogene Tumorentität darstellen. Andererseits unterscheiden sich in vergleichbaren immunhistochemischen Untersuchungen unter anderem Färbeprotokolle und verwendete Antikörper. Es ist daher nicht auszuschließen, daß methodisch bedingte Differenzen der Sensitivität und Spezifität ursächlich für abweichende Untersuchungsergebnisse sind.

Eine Kontrolle der COX-2-Expression scheint sowohl auf translationaler als auch auf transkriptionaler Ebene zu erfolgen (PRUTHI et al. 2003), so daß wir neben der Protein- auch die mRNA-Expression von COX-2 untersuchten. Hierbei zeigte sich im Tumorgewebe eine im Vergleich zum Normalgewebe signifikant erniedrigte COX-2-mRNA-Expression. Dieses Resultat erstaunt sowohl angesichts der gegenwärtigen Vorstellung der Funktion von COX-2 in Tumoren, als auch in Bezug auf die hier gezeigten Ergebnisse der immunhistochemischen Proteinexpressionsanalyse.

Eine eindeutige Erklärung für unsere Beobachtung läßt sich anhand der im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten nicht formulieren. Jedoch zeigte sich beispielsweise auch bei einem Teil kolorektaler Tumoren ein niedriges Expressionsniveau von COX-2-mRNA, obgleich eine generell vermehrte Expression von COX-2 im kolorektalen Karzinom, als einem der ersten in diesem Zusammenhang untersuchten Tumoren, inzwischen unbestritten ist (TOYOTA et al. 2000). Bisher haben nur 2 Arbeitsgruppen die COX-2-mRNA-Expression im Nierenzellkarzinom untersucht: OKAMOTO et al. (2003) stellten bei Nierentumoren von Ratten ebenfalls eine zum Normalgewebe verminderte COX-2-mRNA-Expression fest, wobei interessanterweise eine erhöhte COX-1-Expression im Tumorgewebe vorlag. Dahingegen fanden YOSHIMURA et al. (2004b) in menschlichen Nierenzellkarzinomen spezifische Banden für COX-2-mRNA in Tumorproben, nicht aber in Proben aus normalen Nieren.

Für eine verminderte mRNA-Expression können epigenetische Veränderungen im Bereich der Promotorregion bestimmter Gene verantwortlich sein. Durch Methylierung wird die DNA so modifiziert, daß die Transkription des betreffenden Gens unterdrückt wird. Es ist möglich, daß dieser Mechanismus, der bei kolorektalen Karzinomen und Magenkarzinomen bereits beschrieben wurde, auch die COX-2-mRNA-Expression im Nierenzellkarzinom beeinflusst. Wenn eine heterogene Methylierung vorliegt und somit nicht alle Allele des COX-2-Gens betrifft, ist COX-2-Protein dennoch detektierbar (TOYOTA et al. 2000).

Da allerdings nur Untergruppen von Karzinomen eine deutliche Methylierung aufweisen („CpG island methylator type“), läßt sich die signifikant erniedrigte mRNA-Expression von COX-2 in den untersuchten Nierenzellkarzinomen allein durch epigenetische Veränderungen nicht ausreichend erklären. Es ist deshalb zu vermuten, daß posttranskriptionelle Modifikationen der mRNA eine Rolle spielen.

4.2 Die Expression von VEGF im Nierenzellkarzinom

Nierenzellkarzinome weisen ein dichtes Gefäßnetz auf. Sie exprimieren im Vergleich zu tumorfreiem Gewebe bekanntermaßen vermehrt VEGF (HEMMERLEIN et al. 2001). Die Ergebnisse dieser Arbeit sind damit kongruent. Sowohl immunhistochemisch als auch mittels PCR konnte eine intratumoral gesteigerte VEGF-Expression bestätigt werden. Eine hohe Expression von VEGF-mRNA im Tumorgewebe korrelierte dabei mit einer vergleichsweise schwachen intrazytoplasmatischen Signalausprägung für VEGF-Protein. Dies läßt sich möglicherweise dadurch erklären, daß bei einer sehr hohen Transkriptions- und Translationsrate eine rasche Proteinsekretion in den Extrazellulärraum erfolgt, und VEGF dadurch immunhistochemisch nur noch schwach detektierbar ist. Die Ergebnisse der Untersuchung der Tumorgefäßdichte, auf die an späterer Stelle eingegangen wird, lieferten einen weiteren Beleg für diese Vermutung.

4.3 Einfluß der COX-2-Expression auf die VEGF-Expression im Nierenzellkarzinom

Obwohl in den hier untersuchten Gewebeproben eine Co-Expression von COX-2 und VEGF konstatiert werden konnte, ließ sich kein Zusammenhang zwischen dem Expressionsniveau von COX-2 und VEGF nachweisen. Dies steht im Gegensatz zu den an anderen Tumoren gewonnenen Erkenntnissen (FOSSLIEN 2001) und kann als Hinweis dafür gewertet werden, daß die COX-2 im Nierenzellkarzinom nur bedingten Einfluß auf die Expression von VEGF hat. In der Gruppe der klarzelliger Tumoren könnten hierfür Mutationen im von-Hippel-Lindau-Gen verantwortlich sein, die in bis zu 70 % der Fälle vorliegen. Das von-Hippel-Lindau-Protein (pVHL) hat eine wichtige Funktion bei der Degradation des Transkriptionsfaktors Hypoxia inducible Factor 1 (HIF-1) (KIM und KAELIN 2004). Unter Normoxie wird HIF-1 alpha in gesundem Gewebe rasch abgebaut. Sauerstoffmangel, aber auch das Fehlen von intaktem pVHL, führen zu einer Akkumulation von HIF-1 alpha im Zellkern (PANTUCK et al. 2003). HIF-1 alpha kontrolliert in zentraler Position die Transkription mehrerer hypoxieinduzierbarer Gene, deren Wirkung sich auf zwei Wegen entfaltet: Durch die Induktion von VEGF und die daraufhin verstärkte Gefäßbildung wird eine bessere Oxygenierung des Tumorgewebes erreicht. Andere Genprodukte beeinflussen Metabolismus, Proliferation, Migration und Apoptose der Tumorzellen und ermöglichen dadurch eine Adaptation an die Hypoxie (PANTUCK et al. 2003). Bei klarzelliger Nierenzellkarzinomen korrelieren das Vorkommen von Mutationen im VHL-Gen, eine konstitutiv vermehrte Expression von HIF-1 alpha und eine erhöhte VEGF-Expression miteinander (NA et al. 2003; WIESENER et al. 2001). In Anbetracht der angeführten Aspekte erscheint die Annahme plausibel, daß die Expression von VEGF in klarzelliger Nierenzellkarzinomen durch pVHL und HIF-1 alpha wesentlich beeinflusst wird, und die Wirkung der COX-2 davor in den Hintergrund tritt. Dieser Erklärungsansatz ist allerdings nicht auf alle Untergruppen des Nierenzellkarzinoms übertragbar.

4.4 Einfluß der Expression von COX-2 und VEGF auf die Tumorgefäßdichte und Tumornekrosen im Nierenzellkarzinom

Anhand der hier gewonnenen Daten erschließt sich kein Zusammenhang zwischen der COX-2-Expression und der Tumorgefäßdichte. Mit Bezugnahme auf die im vorigen Abschnitt diskutierten Gesichtspunkte stellt diese Tatsache die Bedeutung der COX-2 für die Gefäßbildung in Nierenzellkarzinomen in Frage. Im Gegensatz dazu steht eine Publikation von CHEN et al. (2004b), die eine gesteigerte Angiogenese in COX-2-exprimierenden Tumoren im Tierversuch beschreibt. MIYATA et al. (2003) postulieren eine Beziehung zwischen der COX-2-Expression und der Gefäßdichte in menschlichen Tumoren.

Die Definition der Parameter, die in der Arbeit von MIYATA et al. für die statistische Analyse verwendet wurden, unterscheidet sich jedoch von der hier vorliegenden Arbeit: MIYATA et al. verglichen lediglich COX-2-positive und COX-2-negative Tumoren hinsichtlich der höchsten intratumoralen Gefäßdichte. Wir differenzierten die Expression von COX-2 anhand eines semiquantitativen immunreaktiven Scores und setzten die Werte in Beziehung zu der durchschnittlichen intratumoralen Gefäßdichte. Diese methodischen Unterschiede können für die Diskrepanz der Ergebnisse verantwortlich sein. Für weitergehende Aussagen über den Einfluß der COX-2 auf die Gefäßbildung in Nierenzellkarzinomen sind weitere Untersuchungen erforderlich.

Eine Beziehung zwischen der Gefäßdichte eines Tumors und der Expression von VEGF erscheint nahe liegend, konnte jedoch im Falle des Nierenzellkarzinoms bisher nicht eindeutig bewiesen werden (PARADIS et al. 2000; SLATON et al. 2001). In der vorliegenden Arbeit zeigten Tumoren, bei denen ein hohes Expressionsniveau von VEGF-mRNA vorlag einen hohen Vaskularisierungsgrad, während sich bei Tumoren mit einem hohen Expressionsniveau für VEGF-Protein eine niedrigere Gefäßdichte fand. Diese Beobachtung deckt sich hinsichtlich der mRNA-Expression mit den Untersuchungsergebnissen von THELEN et al. (1999), und hinsichtlich der Proteinexpression mit den Untersuchungsergebnissen von DJORDJEVIC et al. (2007). Sie gibt weiteren Grund zu der Annahme, daß VEGF-Protein bei einer hohen Transkriptions- und Proteinbiosyntheserate rasch aus der Zelle sezerniert wird. Es induziert eine vermehrte Gefäßbildung, ist jedoch immunhistochemisch nicht mehr detektierbar. Bei einer lediglich moderat gesteigerten Proteinbiosyntheserate und langsameren Sekretion bleibt VEGF hingegen intrazellulär nachweisbar.

An dieser Stelle sei angemerkt, daß die prognostische Relevanz der Gefäßdichte beim Nierenzellkarzinom kontrovers diskutiert wird. Während die Ergebnisse einiger Arbeiten eine inverse Korrelation zwischen MVD und Überlebensrate zeigen, belegen inzwischen mehrere Untersuchungen übereinstimmend eine höhere Überlebensrate bei stärker vaskularisierten Tumoren (SABO et al. 2001). Tumornekrosen werden im Allgemeinen wie auch beim Nierenzellkarzinom als prognostisch ungünstiges Zeichen aggressiv wachsender, entdifferenzierter Tumoren gewertet. Unsere Beobachtung, daß das Vorkommen von nekrotischen Tumorarealen mit einer niedrigeren Gefäßdichte assoziiert war, unterstützt die These, daß stärker vaskularisierte Nierenzellkarzinome eine bessere Prognose aufweisen (IMAO et al. 2004).

Ein direkter Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von Tumornekrosen als Indiz für einen Sauerstoffmangel und einer dadurch induzierten Expression von COX-2 und VEGF lag in dieser Arbeit nicht vor. Inwiefern dennoch eine hypoxieinduzierte Stimulation der Expression von COX-2 und VEGF im Nierenzellkarzinom vorliegt, wurde hier auch im Rahmen von Zellkulturexperimenten untersucht, die im Folgenden diskutiert werden.

4.5 Die Expression von COX-2 und VEGF in Tumorzellen und Makrophagen unter Hypoxie und unter Stimulation mit nekrotischen Tumorzellen

Aufgrund einer inadäquaten Gefäßversorgung herrscht in Tumorgewebe häufig ein relativer Sauerstoffmangel, der zur Entstehung von Nekrosen führt. In der Umgebung von Nekrosen wenig differenzierter Nierenzellkarzinome wurde bereits in früheren Untersuchungen ein besonders prominentes Makrophageninfiltrat beschrieben, das in gut differenzierten Tumoren ohne Nekrosen weniger ausgeprägt war (HEMMERLEIN et al. 2000). In der vorliegenden Arbeit war in nekrosenahen Makrophagen ebenso eine COX-2-Expression detektierbar wie in Endothelien kleiner Gefäße und in Tumorzellen selbst. Wir werteten diese Beobachtung als Zeichen dafür, daß die COX-2 in Makrophagen durch Sauerstoffmangel induziert wird, wobei wir zu diesem Zeitpunkt der Untersuchung davon ausgingen, daß die Aktivität der COX-2 durch die Induktion von VEGF die Gefäßneubildung im Nierenzellkarzinom beeinflusst, und somit zu einer verbesserten Oxygenierung des Tumorgewebes führt.

Es stellte sich nun die Frage, welchen Beitrag unterschiedliche Zellpopulationen im Tumor diesbezüglich leisten, und so wurde hier die Auswirkung einer Hypoxie auf die Expression von COX-2 in Nierenkarzinomzellen einerseits und in Makrophagen andererseits untersucht. Zum Vergleich, und als Indikator einer effektiven Hypoxie, wurde in den Experimenten ebenfalls die VEGF - Expression bestimmt. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung demonstrieren, daß sich die Expression von COX-2 und VEGF in Nierenkarzinomzellen unter Sauerstoffmangel nur in sehr geringfügigem Ausmaß verändert, wobei das Expressionsmuster in Abhängigkeit von der untersuchten Zelllinie und der Dauer der Hypoxie differiert. Im Gegensatz dazu nahm die COX-2- und VEGF-Expression in Makrophagen unter Sauerstoffmangel deutlich zu. Ein signifikanter Anstieg der COX-2- und VEGF-Expression zeigte sich auch unter Stimulation der Makrophagen mit nekrotischem Tumormaterial.

MANTOVANI et al. (2002) ordnen TAM aufgrund ihres Phänotyps und ihrer Funktion der Untergruppe der M2-Makrophagen zu. Neben der Angiogeneseinduktion spielen sie eine Rolle bei Gewebeumbau- und Reparatur und beim Unterlaufen der Immunabwehr. Typische Eigenschaften der auf klassischem Weg aktivierten M1-Makrophagen wie die Zerstörung von Mikroorganismen und Tumorzellen, die Antigenpräsentation, die Sekretion proinflammatorischer Substanzen und die Stimulation der zellulären Immunität sind bei TAM kaum ausgeprägt (MANTOVANI et al. 2002). TAM akkumulieren in hypoxischen Tumorarealen. Überwiegend durch in-vitro-Experimente ist belegt, daß Makrophagen unter Hypoxie vermehrt Wachstumsfaktoren wie FGF, PDGF und HGF, gewebedegradierende Enzyme wie MMP und immunsuppressive Substanzen wie IL-10 bilden. Sowohl in-vitro als auch in-vivo zeigte sich unter Hypoxie eine vermehrte Expression von VEGF-mRNA und Protein in Makrophagen (LEWIS und MURDOCH 2005; MANTOVANI et al. 2006).

Vor diesem Hintergrund sprechen die erhobenen Befunde dafür, daß Makrophagen, vielmehr als die Tumorzellen von Nierenzellkarzinomen selbst, durch die Sekretion von COX-2 und VEGF ein Fortschreiten des Tumorwachstums fördern können. Dies erklärt zumindest teilweise den auch bei Nierenzellkarzinomen beobachteten Zusammenhang zwischen einer hohen Makrophagendichte und einer schlechten Prognose (HAMADA et al. 2002; HEMMERLEIN et al. 2000).

4.6 Ausblick: COX-2-Inhibitoren – eine Option in der Prävention und Behandlung von Nierenzellkarzinomen ?

Epidemiologische Studien und Fall-Kontroll-Studien sprechen für einen präventiven Effekt von NSAR gegenüber Tumorerkrankungen. Dieser hat sich bei kolorektalen Tumoren, Ösophagus- und Magenkarzinomen, außerdem bei Bronchial- und Mammakarzinomen gezeigt (SAUKKONEN et al. 2004). Inzwischen vorliegende Daten belegen, daß auch unter der Behandlung mit selektiven COX-2-Inhibitoren ein geringeres Risiko für bestimmte Tumorerkrankungen besteht (HULL 2005). In Tierversuchen verminderten Inhibitoren der COX-2 Tumorentstehung und -wachstum bei Ösophagus-, Magen-, Kolon-, Pankreas-, Prostata- und Mammakarzinomen (HULL 2005). Daraufhin sind COX-2-Inhibitoren auch bei menschlichen Tumoren in präventiv ausgerichteten Therapiestudien zum Einsatz gekommen. Bei regelmäßiger Einnahme von COX-2-Inhibitoren über einen längeren Zeitraum zeigte sich allerdings ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Nebenwirkungen, so daß mehrere Studien abgebrochen werden mussten (FUJIMURA et al. 2006; HULL 2005).

In der Literatur finden sich keine epidemiologischen Erhebungen, aus denen sich ableiten ließe, daß unter regelmäßiger Einnahme von NSAR auch für Nierenzellkarzinome ein vermindertes Erkrankungsrisiko besteht. Allerdings ist die Expression von COX-2 in Nierenzellkarzinomen sowie deren Korrelationen mit klinisch-pathologischen und molekularbiologischen Eigenschaften der Tumoren in einigen Arbeiten gezeigt worden. Die Datenlage läßt jedoch keine eindeutigen Aussagen zu (Tabelle 19 – 21).

Nur eine Studie untersuchte bisher die Wirkung verschiedener COX-Inhibitoren auf Nierenzellkarzinomzelllinien. Dabei war weder ein Einfluß auf die Proliferation und das Wachstum noch auf die Apoptose der Tumorzellen zu verzeichnen (YOSHIMURA et al. 2004a). RINI et al. behandelten im Rahmen einer Phase-II-Studie 25 Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom mit einer Kombination aus Interferon- α und dem selektiven COX-2-Inhibitor Celecoxib p.o.. Dies führte nicht zu einer Verbesserung der objektiven Ansprechrate (12%) im Vergleich zu anderen Studien mit einer Interferon-Monotherapie. Interessanterweise zeigten aber die Tumoren der Patienten, die auf die Therapie ansprachen, eine starke COX-2-Expression (RINI et al. 2006).

In einer anderen Phase-II-Studie wurden 36 Patienten mit Cyclophosphamid p.o. in niedriger Dosis in Kombination mit Celecoxib p.o. behandelt - mit nur minimalem Effekt. Nur bei einem Patienten zeigte sich eine partielle Regression der Tumormasse. Bei drei weiteren Patienten nahmen die Tumoren über 6 Monate nicht an Größe zu (KRZYZANOWSKA et al. 2007).

In Zusammenschau der bisherigen Forschungsergebnisse ist der Einsatz von COX-2-Inhibitoren in der Prävention und Therapie von Nierenzellkarzinomen kritisch zu bewerten. Weitere präklinische Untersuchungen müssen klären, welche Relevanz die COX-2 für tumorfördernde Prozesse und insbesondere für die Gefäßbildung im Nierenzellkarzinom hat. Sollte sich ein entscheidender Einfluß bestätigen, so wäre es vorstellbar, Patienten in Abhängigkeit vom COX-2-Expressionsstatus der Tumoren zu behandeln. Möglicherweise wäre mit COX-2-Inhibitoren bei bestimmten Therapieansätzen ein synergistischer Effekt zu erzielen.

5 Zusammenfassung

Viele Daten geben Hinweise auf den Einfluß der COX-2 bei der malignen Transformation von Zellen, deren Proliferation, Migration und Invasion ins Gewebe, auf die Apoptose und auf die Neubildung von Gefäßen in Tumoren. Letztere ist bei der Tumorentstehung ein fundamentaler Prozeß, und VEGF nimmt unter den daran beteiligten angiogenen Wachstumsfaktoren eine zentrale Stellung ein. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Expression der COX-2 im Nierenzellkarzinom zu untersuchen. Im Speziellen sollte geklärt werden, ob die COX-2 im Zusammenhang mit VEGF zur Tumorangiogenese im Nierenzellkarzinom beiträgt, und inwiefern sich der Mangel an Sauerstoff dabei auswirkt.

Im ersten Teil der Arbeit wurde humanes Tumormaterial hinsichtlich der Expression von COX-2 und VEGF untersucht und die mikrovaskuläre Gefäßdichte bestimmt, wobei Tumorgewebe mit angrenzendem Normalgewebe verglichen wurde. Die Proteinexpression wurde immunhistochemisch beurteilt. Die mRNA-Expression wurde anhand der Realtime PCR ermittelt. Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Expression von COX-2 und VEGF in Nierenkarzinomzelllinien und Makrophagen unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen untersucht. Außerdem wurde überprüft, welche Effekte nekrotisches Tumormaterial auf die Expression von COX-2 und VEGF in Makrophagen hat. Die Realtime PCR diente zur Messung der mRNA-Expression. Western-Blot und ELISA dienten zur Messung der Proteinexpression.

Wir konnten zeigen, daß COX-2 im Nierenzellkarzinom exprimiert wird, wobei deutliche intra- und intertumorale Schwankungen vorliegen. Die Annahme einer höheren Expression von COX-2 im Tumorgewebe konnte nicht bestätigt werden. Auch bestand kein Zusammenhang zwischen der Expression von COX-2 und der Expression von VEGF, welches im Tumorgewebe signifikant hochreguliert war, und im Gegensatz zu COX-2 mit der mikrovaskulären Gefäßdichte korrelierte. Während die vorliegenden Ergebnisse somit die zentrale Rolle von VEGF für die Tumorangiogenese unterstreichen, stellen sie die Bedeutung der COX-2 für die Steuerung der VEGF-Expression und der Gefäßbildung im Nierenzellkarzinom in Frage. Die zelllinienabhängig moderaten Veränderungen der COX-2- und VEGF-Expression in Tumorzellen unter Hypoxie, im Unterschied zu der ausgeprägten Hochregulation von COX-2 und VEGF in Makrophagen unter Hypoxie und unter Stimulation mit nekrotischem Tumormaterial, weisen darauf hin, daß Makrophagen aufgrund ihrer tumormodulierenden Eigenschaften zum Tumorprogreß des Nierenzellkarzinoms beitragen.

6 Literaturverzeichnis

Amato RJ (2000): Chemotherapy for renal cell carcinoma. *Semin Oncol* 27: 177-186

Andreesen R, Hennemann B, Krause SW (1998): Adoptive immunotherapy of cancer using monocyte-derived macrophages: rationale, current status, and perspectives. *J Leukoc Biol* 64: 419-426

Attiga FA, Fernandez PM, Weeraratna AT, Manyak MJ, Patierno SR (2000): Inhibitors of prostaglandin synthesis inhibit human prostate tumor cell invasiveness and reduce the release of matrix metalloproteinases. *Cancer Res* 60: 4629-4637

Balkwill F, Mantovani A (2001): Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357: 539-545

Ben Av P, Crofford LJ, Wilder RL, Hla T (1995): Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis. *FEBS Lett* 372: 83-87

Borgstrom P, Bourdon MA, Hillan KJ, Sriramarao P, Ferrara N (1998): Neutralizing anti-vascular endothelial growth factor antibody completely inhibits angiogenesis and growth of human prostate carcinoma micro tumors in vivo. *Prostate* 35: 1-10

Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254

Buentig N, Störkel S, Atzpodien J (2002): Molecular genetic changes in renal cell carcinomas. *Urologe A* 41: 475-481

Bukowski RM (2001): Cytokine therapy for metastatic renal cell carcinoma. *Semin Urol Oncol* 19: 148-154

Cao Y, Prescott SM (2002): Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. *J Cell Physiol* 190: 279-286

Carmeliet P (2000): Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6: 389-395

Chapple KS, Scott N, Guillou PJ, Coletta PL, Hull MA (2002): Interstitial cell cyclooxygenase-2 expression is associated with increased angiogenesis in human sporadic colorectal adenomas. *J Pathol* 198: 435-441

Chen Q, Shinohara N, Abe T, Harabayashi T, Nonomura K (2004a): Impact of cyclooxygenase-2 gene expression on tumor invasiveness in a human renal cell carcinoma cell line. *J Urol* 172: 2153-2157

Chen Q, Shinohara N, Abe T, Watanabe T, Nonomura K, Koyanagi T (2004b): Significance of COX-2 expression in human renal cell carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 108: 825-832

Cho DS, Joo HJ, Oh DK, Kang JH, Kim YS, Lee KB, Kim SJ (2005): Cyclooxygenase-2 and p53 expression as prognostic indicators in conventional renal cell carcinoma. *Yonsei Med J* 46: 133-140

Denkert C, Kobel M, Berger S, Siegert A, Leclere A, Trefzer U, Hauptmann S (2001): Expression of cyclooxygenase 2 in human malignant melanoma. *Cancer Res* 61: 303-308

Detmar M (2000): Tumor angiogenesis. *J Investig Dermatol Symp Proc* 5: 20-23

de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT (1992): The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 255: 989-991

Djordjevic G, Mozetic V, Mozetic DV, Licul V, Ilijas KM, Mustac E, Oguic R, Fuckar Z, Jonjic N (2007): Prognostic significance of vascular endothelial growth factor expression in clear cell renal cell carcinoma. *Pathol Res Pract* 203: 99-106

Dohadwala M, Batra RK, Luo J, Lin Y, Krysan K, Pold M, Sharma S, Dubinett SM (2002): Autocrine/paracrine prostaglandin E2 production by non-small cell lung cancer cells regulates matrix metalloproteinase-2 and CD44 in cyclooxygenase-2-dependent invasion. *J Biol Chem* 277: 50828-50833

DuBois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, van de Putte LB, Lipsky PE (1998): Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 12: 1063-1073

Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM (1995): Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 146: 1029-1039

Ferrara N, Keyt B: Vascular endothelial growth factor: Basic and clinical implications; in: Regulation of Angiogenesis; hrsg. v. Goldberg ID, Rosen EM; Birkhäuser Verlag, Basel 1997, 209-232

Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW (1996): Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380: 439-442

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J (2003): The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9: 669-676

Folkman J (1971): Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285: 1182-1186

Folkman J, Klagsbrun M (1987): Angiogenic factors. *Science* 235: 442-447

Fosslien E (2000): Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia. *Ann Clin Lab Sci* 30: 3-21

Fosslien E (2001): Review: molecular pathology of cyclooxygenase-2 in cancer-induced angiogenesis. *Ann Clin Lab Sci* 31: 325-348

Fu YX, Cai JP, Chin YH, Watson GA, Lopez DM (1992): Regulation of leukocyte binding to endothelial tissues by tumor-derived GM-CSF. *Int J Cancer* 50: 585-588

Fujimura T, Ohta T, Oyama K, Miyashita T, Miwa K (2006): Role of cyclooxygenase-2 in the carcinogenesis of gastrointestinal tract cancers: a review and report of personal experience. *World J Gastroenterol* 12: 1336-1345

Fujita H, Koshida K, Keller ET, Takahashi Y, Yoshimoto T, Namiki M, Mizokami A (2002): Cyclooxygenase-2 promotes prostate cancer progression. *Prostate* 53: 232-240

Giardiello FM, Offerhaus GJ, DuBois RN (1995): The role of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in colorectal cancer prevention. *Eur J Cancer* 31A: 1071-1076

Gupta MK, Qin RY (2003): Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis. *World J Gastroenterol* 9: 1144-1155

Half E, Tang XM, Gwyn K, Sahin A, Wathen K, Sinicrope FA (2002): Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancers and adjacent ductal carcinoma in situ. *Cancer Res* 62: 1676-1681

Hamada I, Kato M, Yamasaki T, Iwabuchi K, Watanabe T, Yamada T, Itoyama S, Ito H, Okada K (2002): Clinical effects of tumor-associated macrophages and dendritic cells on renal cell carcinoma. *Anticancer Res* 22: 4281-4284

Hamilton TA: Molecular basis of macrophage activation: from gene expression to phenotypic diversity; in: *The Macrophage*; hrsg. v. Burke B, Lewis CE; Oxford University Press, New York 2002, 74-137

Hanahan D, Folkman J (1996): Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86: 353-364

Hashimoto Y, Kondo Y, Kimura G, Matsuzawa I, Sato S, Ishizaki M, Imura N, Akimoto M, Hara S (2004): Cyclooxygenase-2 expression and relationship to tumour progression in human renal cell carcinoma. *Histopathology* 44: 353-359

- Hauptmann S, Zwadlo-Klarwasser G, Jansen M, Klosterhalfen B, Kirkpatrick CJ (1993): Macrophages and multicellular tumor spheroids in co-culture: a three-dimensional model to study tumor-host interactions. Evidence for macrophage-mediated tumor cell proliferation and migration. *Am J Pathol* 143: 1406-1415
- Hemmerlein B, Markus A, Wehner M, Kugler A, Zschunke F, Radzun HJ (2000): Expression of acute and late-stage inflammatory antigens, c-fms, CSF-1, and human monocytic serine esterase 1, in tumor-associated macrophages of renal cell carcinomas. *Cancer Immunol Immunother* 49: 485-492
- Hemmerlein B, Kugler A, Ozisik R, Ringert RH, Radzun HJ, Thelen P (2001): Vascular endothelial growth factor expression, angiogenesis, and necrosis in renal cell carcinomas. *Virchows Arch* 439: 645-652
- Hemmerlein B, Galuschka L, Putzer N, Zischkau S, Heuser M (2004): Comparative analysis of COX-2, vascular endothelial growth factor and microvessel density in human renal cell carcinomas. *Histopathology* 45: 603-611
- Hennemann B, Kreutz M, Rehm A, Andreesen R (1998): Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor treatment on phenotype, cytokine release and cytotoxicity of circulating blood monocytes and monocyte-derived macrophages. *Br J Haematol* 102: 1197-1203
- Huang M, Stolina M, Sharma S, Mao JT, Zhu L, Miller PW, Wollman J, Herschman H, Dubinett SM (1998): Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent regulation of cytokine balance in lymphocytes and macrophages: up-regulation of interleukin 10 and down-regulation of interleukin 12 production. *Cancer Res* 58: 1208-1216
- Huland H, Heinzer H: Nierentumoren; in: *Urologie*; hrsg. v. Hautmann HE, Huland H; Springer Verlag, Berlin 2001, 183-204
- Hull MA (2005): Cyclooxygenase-2: how good is it as a target for cancer chemoprevention? *Eur J Cancer* 41: 1854-1863
- Iliopoulos O, Eng C (2000): Genetic and clinical aspects of familial renal neoplasms. *Semin Oncol* 27: 138-149
- Imao T, Egawa M, Takashima H, Koshida K, Namiki M (2004): Inverse correlation of microvessel density with metastasis and prognosis in renal cell carcinoma. *Int J Urol* 11: 948-953
- Jacobsohn KM, Wood CG (2006): Adjuvant therapy for renal cell carcinoma. *Semin Oncol* 33: 576-582
- Joki T, Heese O, Nikas DC, Bello L, Zhang J, Kraeft SK, Seyfried NT, Abe T, Chen LB, Carroll RS (2000): Expression of cyclooxygenase 2 (COX-2) in human glioma and in vitro inhibition by a specific COX-2 inhibitor, NS-398. *Cancer Res* 60: 4926-4931

- Kamijo T, Sato T, Nagatomi Y, Kitamura T (2001): Induction of apoptosis by cyclooxygenase-2 inhibitors in prostate cancer cell lines. *Int J Urol* 8: S35-S39
- Kawamori T, Rao CV, Seibert K, Reddy BS (1998): Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis. *Cancer Res* 58: 409-412
- Khan KN, Stanfield KM, Trajkovic D, Knapp DW (2001): Expression of cyclooxygenase-2 in canine renal cell carcinoma. *Vet Pathol* 38: 116-119
- Kim WY, Kaelin WG (2004): Role of VHL gene mutation in human cancer. *J Clin Oncol* 22: 4991-5004
- Kreutz M, Fritsche J, Andreesen R: Macrophages in tumor biology; in: *The Macrophage*; hrsg. v. Burke B, Lewis CE; Oxford University Press, New York 2002, 457-489
- Krzyzanowska MK, Tannock IF, Lockwood G, Knox J, Moore M, Bjarnason GA (2007): A phase II trial of continuous low-dose oral cyclophosphamide and celecoxib in patients with renal cell carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 60: 135-141
- Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, Harris AL (1996): Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res* 56: 4625-4629
- Leek RD, Landers RJ, Harris AL, Lewis CE (1999): Necrosis correlates with high vascular density and focal macrophage infiltration in invasive carcinoma of the breast. *Br J Cancer* 79: 991-995
- Leibovich BC, Blute ML (2006): Surgical management of renal cell carcinoma. *Semin Oncol* 33: 552-562
- Lewis C, Murdoch C (2005): Macrophage responses to hypoxia: implications for tumor progression and anti-cancer therapies. *Am J Pathol* 167: 627-635
- Li M, Wu X, Xu XC (2001): Induction of apoptosis in colon cancer cells by cyclooxygenase-2 inhibitor NS398 through a cytochrome c-dependent pathway. *Clin Cancer Res* 7: 1010-1016
- Liu CH, Chang SH, Narko K, Trifan OC, Wu MT, Smith E, Haudenschild C, Lane TF, Hla T (2001): Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *J Biol Chem* 276: 18563-18569
- Liu XH, Kirschenbaum A, Yao S, Stearns ME, Holland JF, Claffey K, Levine AC (1999): Upregulation of vascular endothelial growth factor by cobalt chloride-simulated hypoxia is mediated by persistent induction of cyclooxygenase-2 in a metastatic human prostate cancer cell line. *Clin Exp Metastasis* 17: 687-694

Lopez-Beltran A, Scarpelli M, Montironi R, Kirkali Z (2006): 2004 WHO classification of the renal tumors of the adults. *Eur Urol* 49: 798-805

Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A (2002): Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 23: 549-555

Mantovani A, Schioppa T, Porta C, Allavena P, Sica A (2006): Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev* 25: 315-322

Matsuyama M, Yoshimura R, Hase T, Kawahito Y, Sano H, Nakatani T (2005): Study of cyclooxygenase-2 in renal ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc* 37: 370-372

McLaughlin JK, Lipworth L, Tarone RE (2006): Epidemiologic aspects of renal cell carcinoma. *Semin Oncol* 33: 527-533

Miyata Y, Koga S, Kanda S, Nishikido M, Hayashi T, Kanetake H (2003): Expression of cyclooxygenase-2 in renal cell carcinoma: correlation with tumor cell proliferation, apoptosis, angiogenesis, expression of matrix metalloproteinase-2, and survival. *Clin Cancer Res* 9: 1741-1749

Mungan MU, Gurel D, Canda AE, Tuna B, Yorukoglu K, Kirkali Z (2006): Expression of COX-2 in normal and pyelonephritic kidney, renal intraepithelial neoplasia, and renal cell carcinoma. *Eur Urol* 50: 92-97

Munn DH, Cheung NK (1995): Antibody-independent phagocytosis of tumor cells by human monocyte-derived macrophages cultured in recombinant macrophage colony-stimulating factor. *Cancer Immunol Immunother* 41: 46-52

Na X, Wu G, Ryan CK, Schoen SR, di'Santagnese PA, Messing EM (2003): Overproduction of vascular endothelial growth factor related to von Hippel-Lindau tumor suppressor gene mutations and hypoxia-inducible factor-1 alpha expression in renal cell carcinomas. *J Urol* 170: 588-592

Okamoto T, Hara A, Hino O (2003): Down-regulation of cyclooxygenase-2 expression but up-regulation of cyclooxygenase-1 in renal carcinomas of the Eker (TSC2 gene mutant) rat model. *Cancer Sci* 94: 22-25

Oosterwijk E, Mulders PF (2006): The importance of cyclooxygenase in carcinogenesis: is it a therapeutic target? *Eur Urol* 50: 23-25

Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, Trzaskos JM, Evans JF, Taketo MM (1996): Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell* 87: 803-809

O'Sullivan C, Lewis CE (1994): Tumour-associated leucocytes: friends or foes in breast carcinoma. *J Pathol* 172: 229-235

Pantuck AJ, Zeng G, Belldegrun AS, Figlin RA (2003): Pathobiology, prognosis, and targeted therapy for renal cell carcinoma: exploiting the hypoxia-induced pathway. *Clin Cancer Res* 9: 4641-4652

Paradis V, Lagha NB, Zeimoura L, Blanchet P, Eschwege P, Ba N, Benoit G, Jardin A, Bedossa P (2000): Expression of vascular endothelial growth factor in renal cell carcinomas. *Virchows Arch* 436: 351-356

Patard JJ, Rioux-Leclercq N, Fergelot P (2006): Understanding the importance of smart drugs in renal cell carcinoma. *Eur Urol* 49: 633-643

Plescia OJ, Smith AH, Grinwich K (1975): Subversion of immune system by tumor cells and role of prostaglandins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72: 1848-1851

Price JT, Bonovich MT, Kohn EC (1997): The biochemistry of cancer dissemination. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 32: 175-253

Pruthi RS, Derksen E, Gaston K (2003): Cyclooxygenase-2 as a potential target in the prevention and treatment of genitourinary tumors: a review. *J Urol* 169: 2352-2359

Riede UN, Rumpelt HJ, Sauter G, Schmid O, Störkel S: Uropoetisches System: Neoplastische Läsionen; in: *Allgemeine und spezielle Pathologie*; hrsg. v. Riede UN, Werner M, Schaefer HE; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2004, 841-847

Rini BI, Vogelzang NJ (2000): Prognostic factors in renal carcinoma. *Semin Oncol* 27: 213-220

Rini BI, Weinberg V, Dunlap S, Elchinoff A, Yu N, Bok R, Simko J, Small EJ (2006): Maximal COX-2 immunostaining and clinical response to celecoxib and interferon alpha therapy in metastatic renal cell carcinoma. *Cancer* 106: 566-575

Rockwell S, Knisely JPS: Hypoxia and angiogenesis in experimental tumor models: Therapeutic implications; in: *Regulation of Angiogenesis*; hrsg. v. Goldberg ID, Rosen EM; Birkhäuser Verlag, Basel 1997, 335-360

Ross J, Auger M: The biology of the macrophage; in: *The Macrophage*; hrsg. v. Burke B, Lewis C; Oxford University Press, New York 2002, 1-72

Sabo E, Boltenko A, Sova Y, Stein A, Kleinhaus S, Resnick MB (2001): Microscopic analysis and significance of vascular architectural complexity in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 7: 533-537

- Saukkonen K, Buskens C, Sivula A, van Rees B, Erkinheimo T, Rintahaka J, Pohjola L, van Lanschot J, Offerhaus J, Haglund C, Ristimäki A: COX-2 in Cancer; in: COX-2 Inhibitors; hrsg. v. Pairet M, van Ryn J; Birkhäuser Verlag, Basel 2004, 227-243
- Schmedtje JF, Jr., Ji YS, Liu WL, DuBois RN, Runge MS (1997): Hypoxia induces cyclooxygenase-2 via the NF-kappaB p65 transcription factor in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 272: 601-608
- Scholl SM, Pallud C, Beuvon F, Hacene K, Stanley ER, Rohrschneider L, Tang R, Pouillart P, Lidereau R (1994): Anti-colony-stimulating factor-1 antibody staining in primary breast adenocarcinomas correlates with marked inflammatory cell infiltrates and prognosis. *J Natl Cancer Inst* 86: 120-126
- Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF (1983): Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219: 983-985
- Shirahama T, Arima J, Akiba S, Sakakura C (2001): Relation between cyclooxygenase-2 expression and tumor invasiveness and patient survival in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Cancer* 92: 188-193
- Slaton JW, Inoue K, Perrotte P, El Naggar AK, Swanson DA, Fidler IJ, Dinney CP (2001): Expression levels of genes that regulate metastasis and angiogenesis correlate with advanced pathological stage of renal cell carcinoma. *Am J Pathol* 158: 735-743
- Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM (2000): Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 69: 145-182
- Sozen S, Gurocak S, Erdem O, Acar C, Kordan Y, Akyol G, Alkibay T (2008): Cyclooxygenase-2 expression: does it have a probable role in tumorigenesis mechanisms of renal cell carcinoma? *Int Urol Nephrol* 40: 295-301
- Spencer AG, Woods JW, Arakawa T, Singer II, Smith WL (1998): Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by immunoelectron microscopy. *J Biol Chem* 273: 9886-9893
- Stolina M, Sharma S, Lin Y, Dohadwala M, Gardner B, Luo J, Zhu L, Kronenberg M, Miller PW, Portanova J (2000): Specific inhibition of cyclooxygenase 2 restores antitumor reactivity by altering the balance of IL-10 and IL-12 synthesis. *J Immunol* 164: 361-370
- Störkel S (1999): Epithelial tumors of the kidney. Pathological subtyping and cytogenetic correlation. *Urologe A* 38: 425-432
- Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, Bohlen P (1992): Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 187: 1579-1586

Thelen P, Hemmerlein B, Kugler A, Seiler T, Ozisik R, Kallerhoff M, Ringert RH (1999): Quantification by competitive quantitative RT-PCR of VEGF121 and VEGF165 in renal cell carcinoma. *Anticancer Res* 19: 1563-1565

Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E (1999): Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* 75: 291-295

Thun MJ, Namboodiri MM, Heath CW, Jr. (1991): Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. *N Engl J Med* 325: 1593-1596

Thun MJ, Namboodiri MM, Calle EE, Flanders WD, Heath CW, Jr. (1993): Aspirin use and risk of fatal cancer. *Cancer Res* 53: 1322-1327

Tomozawa S, Tsuno NH, Sunami E, Hatano K, Kitayama J, Osada T, Saito S, Tsuruo T, Shibata Y, Nagawa H (2000): Cyclooxygenase-2 overexpression correlates with tumour recurrence, especially haematogenous metastasis, of colorectal cancer. *Br J Cancer* 83: 324-328

Toyota M, Shen L, Ohe-Toyota M, Hamilton SR, Sinicrope FA, Issa JP (2000): Aberrant methylation of the Cyclooxygenase 2 CpG island in colorectal tumors. *Cancer Res* 60: 4044-4048

Tsuji M, DuBois RN (1995): Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* 83: 493-501

Tsuji M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN (1998): Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 93: 705-716

Tuna B, Yorukoglu K, Gurel D, Mungan U, Kirkali Z (2004): Significance of COX-2 expression in human renal cell carcinoma. *Urology* 64: 1116-1120

UICC: Niere; in: TNM-Klassifikation maligner Tumoren; hrsg. v. Wittekind C, Meyer H, Bootz F; Springer, Heidelberg 2003, 181-183

Warren RS, Yuan H, Matli MR, Gillett NA, Ferrara N (1995): Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. *J Clin Invest* 95: 1789-1797

Weidner N (2000): Angiogenesis as a predictor of clinical outcome in cancer patients. *Hum Pathol* 31: 403-405

Wiesener MS, Munchenhagen PM, Berger I, Morgan NV, Roigas J, Schwiertz A, Jurgensen JS, Gruber G, Maxwell PH, Loning SA (2001): Constitutive activation of hypoxia-inducible genes related to overexpression of hypoxia-inducible factor-1alpha in clear cell renal carcinomas. *Cancer Res* 61: 5215-5222

- Williams CS, Tsujii M, Reese J, Dey SK, DuBois RN (2000): Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth. *J Clin Invest* 105: 1589-1594
- Wu AW, Gu J, Li ZF, Ji JF, Xu GW (2004): COX-2 expression and tumor angiogenesis in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 10: 2323-2326
- Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J (2000): Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 407: 242-248
- Yang X, Sheares KK, Davie N, Upton PD, Taylor GW, Horsley J, Wharton J, Morrell NW (2002): Hypoxic induction of cox-2 regulates proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 27: 688-696
- Yoshimura R, Matsuyama M, Kawahito Y, Takemoto Y, Tsuchida K, Kuratsukuri K, Segawa Y, Shinnka T, Sano H, Nakatani T (2004a): The effects of cyclooxygenase-2 inhibitors on urological cancer cells. *Int J Mol Med* 13: 789-793
- Yoshimura R, Matsuyama M, Kawahito Y, Tsuchida K, Kuratsukuri K, Takemoto Y, Mitsuhashi M, Sano H, Nakatani T (2004b): Study of cyclooxygenase-2 in renal cell carcinoma. *Int J Mol Med* 13: 229-233
- Yuan A, Yu CJ, Shun CT, Luh KT, Kuo SH, Lee YC, Yang PC (2005): Total cyclooxygenase-2 mRNA levels correlate with vascular endothelial growth factor mRNA levels, tumor angiogenesis and prognosis in non-small cell lung cancer patients. *Int J Cancer* 115: 545-555

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. M. Heuser möchte ich für die Betreuung dieser Arbeit danken. Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. B. Hemmerlein aus der Abteilung für Pathologie, der durch seine Anleitung und Unterstützung und nicht zuletzt auch durch die Auswertung der Gewebeproben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Den Mitarbeitern im experimentellen Labor, insbesondere Frau Nicole Putzer, danke ich für die freundliche Zusammenarbeit.