

Aus der Abteilung Pathologie
(Prof. Dr. med. H.-J. Radzun)

Im Zentrum Pathologie und Rechtsmedizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Makrophageninfiltration, Hypoxie und Stickstoffmonoxidsynthesen

im humanen Nierenzellkarzinom

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Tanja Melanie Hümmer

aus

Strullendorf bei Bamberg

Göttingen 2011

Dekan: Prof. Dr. med. Frömmel
I. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Hemmerlein
II. Berichterstatter/in: Priv.-Doz. Dr. med. Loertzer
III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. rer. nat. Virsik-Köpp
Tag der mündlichen Prüfung: 05. Dezember 2011

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	7
1.1	DAS MONOZYTEN-MAKROPHAGEN-SYSTEM	7
1.2	TUMORASSOZIIERTE MAKROPHAGEN	7
1.3	TUMORASSOZIIERTE MAKROPHAGEN IN DER ANGIOGENESE UND TUMORHYPOXIE	9
1.4	STICKSTOFFMONOXID UND STICKSTOFFMONOXIDSYNTHESEN IN DER HYPOXIE	10
1.5	DAS NIERENZELLKARZINOM ALS TUMORMODELL	12
2	ZIELE DER ARBEIT	14
3	MATERIAL UND METHODEN	15
3.1	REAGENZIEN UND FÄRBUNGEN	15
3.2	HOPE-KONSERVIERUNG, PARAFFINEINBETTUNG UND SCHNITTPRÄPARATERSTELLUNG	16
3.3	HÄMATOXYLIN-EOSIN-FÄRBUNG	17
3.4	IMMUNHISTOCHEMIE	17
3.5	DOPPELMARKIERUNG MITTELS INDIREKTER IMMUNFLUORESCENZ	17
3.6	IMMUNOREAKTIVER SCORE	18
3.7	MORPHOMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN	19
3.7.1	<i>Makrophagendichte</i>	19
3.7.2	<i>Gefäßabstände</i>	19
3.7.3	<i>Nekrosenquantifizierung</i>	19
3.8	BESTIMMUNG DER RELATIVEN mRNA-EXPRESSION	19
3.8.1	<i>Entparaffinierung und RNA-Extraktion</i>	19
3.8.2	<i>Reverse Transkription und RT-PCR</i>	20
3.9	BESTIMMUNG DES NITRITGEHALTES IM HUMANEN NIERENZELLKARZINOM	21
3.9.1	<i>Proteinbestimmung nach Bradford</i>	22
3.9.2	<i>Kolorimetrische Nitritbestimmung nach Griess (Griess-Reaktion)</i>	22
3.10	STATISTISCHE ANALYSE	22

4	ERGEBNISSE	23
4.1	PATIENTENKOLLEKTIV	23
4.2	QUANTIFIZIERUNG DES MAKROPHAGENINFILTRATES	23
4.3	CHARAKTERISIERUNG DER HYPOXIE IM KARZINOMGEWEBE	27
4.3.1	<i>Gefäßabstände und Nekrosenquantifizierung</i>	27
4.3.2	<i>HIF-1α-Expression</i>	30
4.4	STICKSTOFFMONOXID IM KARZINOMGEWEBE	32
4.4.1	<i>eNOS-Expression</i>	32
4.4.2	<i>iNOS und α-Actinin-4</i>	34
4.4.2.1	iNOS und α -Actinin-4 auf Proteinebene	34
4.4.2.2	mRNA-Analyse der iNOS- und α -Actinin-4-Expression	37
4.4.2.3	Doppelmarkierung mittels indirekter Immunfluoreszenz	39
4.4.3	<i>Nitrotyrosin-Expression</i>	40
4.5	ANALYSE DER NITRITKONZENTRATION	41
5	DISKUSSION	43
6	ZUSAMMENFASSUNG	51
7	ANHANG: TABELLEN 1, 2, 8, 10	53
8	LITERATURVERZEICHNIS	57

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
cDNA	complementary DNA, komplementäre DNA
cGMP	cyclic Guanosine Monophosphate, zyklisches Guanodinmonophosphat
DAB	3,3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DNA	Desoxyribonucleic Acid, Desoxyribonukleinsäure
eNOS	endothelial Nitric Oxide Synthase, endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
FCS-BSA	fetales Kälberserum-bovines Serumalbumin
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor, Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
HIF-1 α	Hypoxia Inducible Factor-1 α , hypoxieinduzierbarer Faktor-1 α
HOPE	Hepes Glutamic Acid Buffer Mediated Organic Solvent Protection Effect
iNOS	inducible Nitric Oxide Synthase, induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-1
M-CSF	Macrophage Colony Stimulating Factor, Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
MHC	Major Histocompatibility Complex
mRNA	messenger RNA
MW	Mittelwert
nNOS	neuronal Nitric Oxide Synthase, neuronale Stickstoffmonoxidsynthase
p	Signifikanzniveau
PBGD	Porphobilinogendeaminase
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion

pT, pN, pM	pathologische(s) Tumorstadium, Noduli (regionäre Lymphknoten), Metastasen (Fernmetastasen)
RNA	Ribonucleic Acid, Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
TBST [®] -Puffer	Tris Buffered Saline Tween [®] -Puffer
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TNF- α	Tumor Necrosis Faktor- α , Tumornekrosefaktor- α
TNM-Klassifikation	TNM Classification of Malignant Tumours, TNM Staging System, TNM-System (T = Tumor, N = Nodes, M = Metastasen)
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

1 EINLEITUNG

1.1 Das Monozyten-Makrophagen-System

Dem mononukleären Phagozytosesystem gehören neben den zur Phagozytose befähigten Zellen, den Monozyten und Makrophagen, weitere Differenzierungsformen an, wie die Kupffer-Sternzellen der Leber, die Mikrogliazellen des zentralen Nervensystems, die Alveolarmakrophagen der Lunge, die Hofbauerzellen der Plazenta sowie die professionell Antigen-präsentierenden Zellen, denen die folliculären dendritischen Retikulumzellen und die Langerhanszellen der Epidermis zuzuordnen sind.

Als essentielle zelluläre Komponenten des angeborenen Immunsystems stammen Monozyten von Progenitorzellen des Knochenmarks ab. Die Differenzierung erfolgt aus der pluripotenten, hämatopoetischen Stammzelle unter dem Einfluss verschiedener spezifischer Wachstumsfaktoren wie GM-CSF, M-CSF und Interleukin-3. Monoblasten, die sich nach weiterer Teilung und Differenzierung in Promonozyten wandeln, stellen die Vorläuferzellen der zirkulierenden Blutmonozyten dar. Diese sind in der Lage, im Falle einer tumorösen Veränderung oder Entzündung vermehrt die Gefäßwände zu permeieren und sich gleichzeitig unter dem Einfluss von Zytokinen in sessile Gewebsmakrophagen, die Histozyten, zu differenzieren. Charakteristisch für diese Zellen ist, dass sie sich an die jeweilige spezifische Umgebung anpassen können. Ihre Überlebenszeit kann mehrere Monate betragen.

Ihre Grundfunktionen, wie Infektabwehr, Phagozytose, Regulierung des Zellumsatzes, Heilung von Gewebdefekten und Antigenpräsentation an T-Lymphozyten, sind in allen Geweben gleich, jedoch unterscheiden sie sich in wichtigen Merkmalen, wie der Expression von MHC-Molekülen der Klasse II, Reaktivität auf Lymphokine, F_c-Rezeptoren sowie der Produktion von Peroxidase. Zudem sezernieren sie Wachstumsfaktoren, Zytokine, Komplementfaktoren, Prostaglandine und Enzyme (Lewis CE and Pollard 2006).

1.2 Tumorassoziierte Makrophagen

Die meisten malignen Tumoren enthalten in ihrem Stroma als bedeutendste Komponente ihres Leukozyteninfiltrates Makrophagen (Elgert et al. 1998). Dabei

kann etwa die Hälfte der Zellmasse aus den sogenannten tumorassoziierten Makrophagen bestehen (Balkwill and Mantovani 2001). Ihre eigentliche Anzahl ist sowohl vom jeweiligen Tumortyp als auch vom Tumorstadium abhängig (Savarese et al. 1998). Melanome und Mammakarzinome können beispielsweise bis zu 30, experimentell durch chemische Kanzerogene induzierte Tumoren bis zu 55 Prozent tumorassoziierte Makrophagen am Gesamtvolumen enthalten (Rees and Parry 1992). Einen weiteren großen Anteil der mononukleären Zellen stellen T-Lymphozyten dar, einen geringeren B-Lymphozyten (van den Hove et al. 1997).

Bei den Ausgangszellen handelt es sich ursprünglich um zirkulierende Blutmonozyten (Yamashiro et al. 1994). Eine Theorie bezüglich der Rekrutierung von tumorassoziierten Makrophagen geht davon aus, dass in hypoxischen Tumorarealen spezifische chemotaktische Proteine, wie beispielsweise M-CSF (Savarese et al. 1998) oder GM-CSF (Mantovani et al. 1992), hochreguliert werden (Fox et al. 2000). Diese Proteine können sowohl von Tumorzellen als auch von tumorassoziierten Makrophagen sezerniert werden (Mantovani et al. 1992). Hemmerlein et al. (2001) zeigen am Beispiel des Nierenzellkarzinoms, dass im peripheren Blut zirkulierende Monozyten durch die Anwesenheit von MCP-1 rekrutiert werden können. TGF- β und VEGF, von Tumorzellen exprimiert, können ebenfalls chemotaktisch auf Monozyten wirken (Leek et al. 2000).

Tumorassoziierte Makrophagen repräsentieren eine spezielle Makrophagensubpopulation und scheinen eine ambivalente Rolle einzunehmen. Als effiziente Effektorzellen verhindern sie bei klassischer Aktivierung die Tumorprogression, indem sie neoplastische Zellen und Mikroorganismen destruieren, tumorassoziierte Antigene präsentieren, T-Zell-stimulierende Zytokine produzieren und somit eine führende Rolle in der Induktion der spezifischen Immunantwort übernehmen. Bei alternativer Aktivierung unterstützen sie die Tumorproliferation und Metastasierung, indem sie mit malignen Zellen eine Art Symbiose einzugehen scheinen (Sica et al. 2002). Im Gegensatz zu normalen Gewebemakrophagen sind tumorassoziierte Makrophagen oft in einem aktivierten Zustand zu finden (Valdez et al. 1990).

1.3 Tumorassoziierte Makrophagen in der Angiogenese und Tumorhypoxie

Hypoxie resultiert aus einem Missverhältnis von Sauerstoffangebot und -bedarf. Beispielsweise kann sich in arteriosklerotischen Plaques, im Rahmen einer bakteriellen Infektion, aber auch in soliden Malignomen, ein derartiges Missverhältnis ausbilden. In malignen Tumoren entsteht dieses Missverhältnis durch die Tumorzellproliferation (Brown and Giaccia 1998). Eine weitere Ursache der Tumorhypoxie ist der hohe Sauerstoffverbrauch der Tumorzellen (Murdoch et al. 2004).

Hypoxische Areale sind durch Avaskularität und Nekrosen gekennzeichnet. Sie entstehen durch oftmals blind endende, unreife Gefäße, die eine hohe Kollapstendenz aufweisen (Brown and Giaccia 1998), woraus ein irregulärer Blutfluss mit unzureichender Sauer- und Nährstoffversorgung im Tumor resultiert (Murdoch et al. 2004). Nach Überschreiten einer kritischen Tumorgöße von maximal zwei Kubikmillimetern kann Tumorgewebe nicht mehr ausreichend durch Diffusion versorgt werden (Slaton et al. 2001) und es bilden sich Nekrosen (Brown and Giaccia 1998).

Ausgedehnte hypoxische Areale im Tumor sind mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet (Vaupel et al. 2001). Verantwortlich dafür ist die Selektion aggressiver Zellklone durch Hypoxie. Ein weiterer Grund ist, dass gut oxygenierte Tumorzellen wesentlich besser auf die konventionelle Krebstherapie reagieren als hypoxische. Dies gilt insbesondere für die Radiotherapie. Die meisten Chemotherapeutika zerstören nur schnell proliferierende Tumorzellen (Brown and Giaccia 1998).

1971 bringt Folkman erstmalig das Tumorwachstum mit der Angiogenese in Zusammenhang. In viele Schritte eingeteilt, unterliegt die Angiogenese der unmittelbaren Tumorumgebung einem andauernden Prozess. Dabei unterscheiden sich die Eigenschaften der Gefäße im Tumor von denen unter physiologischen Bedingungen entstandenen (Newman et al. 1990).

Unter anderem durch nekrotisches Gewebe angezogen, wandern tumorassoziierte Makrophagen in sauerstoffarme Tumorareale ein und reichern sich in hypoxischen, perinekrotischen Randgebieten an. Dort scheinen sie durch die Hypoxie in ihrer

Migration inhibiert und immobilisiert zu werden (Lewis CE and Pollard 2006). Als relevanter Faktor für die Aktivierung und Differenzierung von Makrophagen ist die Hypoxie zum Teil für ihren tumorspezifischen Phänotyp verantwortlich (Lewis JS et al. 1999). Das bedeutet, dass Makrophagen unter Hypoxie ihren Phänotyp verändern können. Zudem sind sie in der Lage, die Expression verschiedener Zytokine und Enzyme, wie zum Beispiel VEGF oder Interleukin-1, zu beeinflussen (Murdoch et al. 2004).

Durch eine Überexpression von Genen, die für Angiogenesefaktoren kodieren, und durch eine Reihe von Wachstumsfaktoren wird die Neovaskularisation als essentielle Komponente der Tumorprogression induziert (Lewis CE and Pollard 2006). Tumorzellen selbst, aber auch infiltrierende Leukozyten, insbesondere tumorassoziierte Makrophagen, können Gefäßwachstumsfaktoren, wie VEGF, bFGF, TNF- α oder Interleukin-8, sezernieren (Lewis JS et al. 1999). Als wichtige Modulatoren der Angiogenese sind tumorassoziierte Makrophagen nicht nur an der Bildung neuer Blutgefäße beteiligt, sondern auch an der Umwandlung bereits bestehender Gefäße in ein funktionelles Netzwerk (Lewis CE and Pollard 2006). Die Neovaskularisation garantiert die Versorgung des Tumors und verhindert Hypoxie und Nährstoffmangel. Somit spielt die Angiogenese eine Schlüsselrolle im Tumorwachstum (Slaton et al. 2001). Letztendlich wird auf diese Weise nicht nur die Angiogenese gefördert, sondern auch das lokale Tumorwachstum und die Metastasierung induziert (Murdoch et al. 2004).

1.4 Stickstoffmonoxid und Stickstoffmonoxidsynthasen in der Hypoxie

Stickstoffmonoxid spielt eine wichtige Rolle beim Tumorwachstum, bei der Metastasierung und der Vaskularisierung von Tumoren (Brennan et al. 2001) und scheint zudem eine entscheidende Rolle in der Zellregulation und Aktivierung proinflammatorischer Zellen einzunehmen. Dadurch, dass die Vasodilatation, die endotheliale Permeabilität und die VEGF-Expression gefördert werden (Xu et al. 2002) und die Leukozytenadhäsion an die Endotheloberflächen verhindert wird (Chiarugi et al. 1999), wird die Angiogenese im Tumor angeregt. Stickstoffmonoxid wird deshalb als Mediator der Angiogenese und des Blutflusses betrachtet (Dulak et al. 2000). Von Stickstoffmonoxidsynthasen synthetisiert, wird die Produktion von

Stickstoffmonoxid wahrscheinlich über eine erhöhte cGMP-Produktion aktiviert (Connelly et al. 2003).

Stickstoffmonoxidsynthasen gehören einer Enzymfamilie an, die durch enzymatische Konversion einen Guanidinstickstoff der Aminosäure L-Arginin zu Stickstoffmonoxid oxidiert, wodurch im Körper freie Radikale und Citrullin entstehen. Das auf diese Weise generierte Stickstoffmonoxid fungiert als Botenstoff bei verschiedenen biologischen Prozessen, wie der Vasodilatation, und bei zytotoxischen Vorgängen. Die drei Isoenzyme der Stickstoffmonoxidsynthasen steuern aufgrund ihrer unterschiedlichen Regulationsmechanismen auch verschiedene physiologische Aufgaben. Einige klinische Studien gehen davon aus, dass sie sehr früh beziehungsweise kurz vor dem Auftreten hypoxischer Bedingungen nachweisbar sind.

Die nNOS und die eNOS produzieren calciumabhängig kontinuierlich eine geringe Menge an Stickstoffmonoxid. Die dritte Isoform, die iNOS, wird calciumunabhängig in Anwesenheit von proinflammatorischen Zytokinen und Lipopolysacchariden meist in Monozyten und aktivierten Makrophagen, aber auch in anderen Zelltypen, wie den glialen Zellen oder Tumorzellen, synthetisiert (Lee et al. 2002). Dadurch wird eine permanente Synthese von Stickstoffmonoxid ermöglicht (Mantovani et al. 1992). Eine Aktivitätssteigerung von iNOS in aktivierten Zellen führt zu einer höheren Stickstoffmonoxidproduktion (Dulak et al. 2000). Unter physiologischen Bedingungen bindet iNOS an α -Actinin-4, unter hypoxischen Bedingungen löst sich diese Bindung wieder. Dadurch wird iNOS inaktiviert und die Stickstoffmonoxidproduktion sinkt.

Als eines von vier homologen Proteinen wird α -Actinin-4 zusammen mit α -Actinin-1 in Nichtmuskelzellen exprimiert. Seine Aufgabe besteht darin, Aktinfilamente zu parallelen Fasern zu vernetzen. Besonders konzentriert wird es in F-Aktin exprimiert, wodurch ein fokaler Kontakt zur Plasmamembran entsteht. Es fungiert somit als Ankerprotein und fixiert andere Proteine, wie iNOS, am Zytoskelett. Dies impliziert eine zusätzliche Rolle als regulierendes Signalprotein als auch eine regulierende Rolle bei der iNOS-Aktivität (Daniluc et al. 2003).

Die Stickstoffmonoxidsynthaseaktivität kann indirekt durch Messung von Nitrit in Geweben und Zellkulturüberständen nachgewiesen werden, in denen Stickstoffmonoxid in Nitrit umgewandelt wird. Die Produktion von hochreaktivem

Stickstoff aus Stickstoffmonoxid auf zellulärer Ebene führt zur Nitrierung von Tyrosinresten in Gewebeproteinen, die auch immunhistochemisch nachgewiesen werden können. Sie liefern somit einen Anhaltspunkt für die Produktion von reaktiven Stickstoffmonoxidderivaten beziehungsweise potentiellen Zellschäden über einen definierten Zeitraum.

1.5 Das Nierenzellkarzinom als Tumormodell

Das Nierenzellkarzinom ist der häufigste bösartige Primärtumor der Niere und steht an dritthäufigster Stelle der urologischen malignen Tumoren. Mit einem Anteil von etwa drei Prozent an allen soliden Malignomen tritt es relativ selten auf. Männer sind etwa zwei- bis dreimal häufiger betroffen als Frauen. Das Prädilektionsalter liegt mit einem durchschnittlichen Häufigkeitsgipfel um das 60. Lebensjahr.

Als maligner epithelialer Tumor des Nierenparenchyms leitet sich das Nierenzellkarzinom von unterschiedlichen Abschnitten des Nierentubulussystems beziehungsweise den Sammelrohren ab. Es kann sowohl sporadisch als auch in selteneren Fällen familiär gehäuft auftreten, zum Beispiel im Rahmen des Von-Hippel-Lindau-Syndroms.

Als Risikofaktoren für die Entstehung von Nierenzellkarzinomen werden Rauchen, arterieller Hypertonus und Adipositas diskutiert. Auch hormonelle Faktoren scheinen eine gewisse Rolle zu spielen. Eine chronische Niereninsuffizienz, die Von-Hippel-Lindau'sche Krankheit, eine positive Familienanamnese und die Tuberöse Sklerose gelten als gesicherte Faktoren.

Die Mehrheit der Nierenzellkarzinome sind asymptomatisch und werden durch Zufall im Rahmen von sonographischen Untersuchungen gefunden. Zu den klassischen Symptomen im Spätstadium zählen Hämaturie, Flankenschmerz, Polyglobulie und Fieber. Die einzig kurative Behandlungsoption stellt die operative Resektion dar.

Nierenzellkarzinome metastasieren meist frühzeitig hämatogen, insbesondere in die Lungen, die Leber, das Skelettsystem und das Gehirn. Eine lymphogene Metastasierung ist selten. Tumorstadium und Malignitätsgrad stellen die wichtigsten Prognosefaktoren dar.

Makroskopisch imponieren die im Durchschnitt drei bis 15 Zentimeter großen Malignome als solitäre unilaterale Tumoren mit häufiger Lokalisation an den Nierenpolen. Oftmals sind sie durch eine Pseudokapsel zum angrenzenden Parenchym abgegrenzt und zeigen Nekrosen, Hämorrhagien und Zysten.

Mit etwa 70 Prozent ist der klarzellige Typ, ausgehend vom proximalen Tubulusepithel, am häufigsten vertreten. Der papilläre Typ tritt mit circa 15 Prozent am zweithäufigsten auf und entwickelt sich ebenfalls aus proximalen Tubulusepithelzellen. Der chromophobe Typ, der aus dem Tubulusepithel entsteht, ist mit etwa fünf Prozent relativ selten. Das Duct-Bellini-Karzinom entwickelt sich aus den Sammelrohren und tritt sehr selten auf.

Das Nierenzellkarzinom wurde in den vorliegenden Untersuchungen als Tumormodell verwendet, weil das Karzinom einerseits eine hohe Infiltrationsdichte an Makrophagen aufweist und andererseits scharf gegen das tumorfreie Nierennormalgewebe abgrenzbar ist. Zudem sind die Gefäße innerhalb des Tumors alle über Neoangiogenese entstanden.

2 ZIELE DER ARBEIT

In der vorliegenden Studie sollte das Makrophageninfiltrat im humanen Nierenzellkarzinom hinsichtlich der Verteilung von Makrophagen, des Auftretens von Hypoxie und eines möglichen Einflusses auf die Expression und Funktion der iNOS untersucht werden.

Folgende Aspekte sollten charakterisiert werden:

1. Charakterisierung der Makrophageninfiltrate im Nierenzellkarzinom, speziell ihrer Verteilung und Infiltratdichte
2. Charakterisierung des morphologischen Zusammenhanges von Gefäßdichte, Hypoxie und spontanen Tumornekrosen, darüber hinaus Markierung hypoxischer Areale im Nierenzellkarzinom mit Hilfe der Bestimmung der HIF-1 α -Expression
3. Untersuchung der Expression von Stickstoffmonoxidsynthasen, speziell iNOS, unter Berücksichtigung der α -Actinin-4-Expression und der Stickstoffmonoxidsynthasefunktion mittels Bestimmung der Gewebenitritkonzentration

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Reagenzien und Färbungen

Immunhistochemie, Immunfluoreszenz
Citrat-Puffer (pH-Wert 6,0) <u>Stammlösung A</u> 21 g Zitronensäuremonohydrat, $C_6H_8O \times H_2O$ (Merck, Darmstadt) ad 1 l bidestilliertes Wasser <u>Stammlösung B</u> 29 g Natriumcitrat, $C_6H_5O_7Na_3$ (Merck, Darmstadt) ad 1 l bidestilliertes Wasser Mischung im Verhältnis A (9 ml) + B (41 ml) ad 450 ml bidestilliertes Wasser Titration mit 1 N Salzsäure, HCl (Merck, Darmstadt)
TBST[®]-Puffer (pH-Wert 7,4) 6,5 g Trishydroxymethylaminomethan, Tris, $C_4H_{11}NO_3$ (Carl Roth, Karlsruhe) 8,5 g Natriumchlorid, NaCl (Merck, Darmstadt) ad 1 l bidestilliertes Wasser 500 µl TWEEN [®] , 20 Detergent (Calbiochem [®] , Frankfurt) Titration mit 1 N Salzsäure, HCl (Merck, Darmstadt)
FCS-BSA (0,5 %) 5 ml fetales Kälberserum, FCS (Sigma, München) 10 g bovines Serumalbumin, BSA Fraktion V (Paesel & Lorei, Hanau) ad 100 ml TBST [®] -Puffer
Hämatoxylin-Eosin-Färbung <u>Hämalaun nach Mayer</u> 1 g Hämatoxylin, $C_{16}H_{14}O_6$ (Merck, Darmstadt) 50 g Kaliumaluminiumsulfatdodecahydrat, $KAl(SO_4)_2 \times 12 H_2O$ (Merck, Darmstadt) 0,2 g Natriumjodat, $NaJO_4$ (Merck, Darmstadt) 50 g Chloralhydrat, $C_2H_3Cl_3O_2$ (Merck, Darmstadt) ad 1 l bidestilliertes Wasser <u>Eosin</u> 0,5 g Eosin G, $C_{20}H_6Br_4Na_2O_5$ (Merck, Darmstadt) ad 100 ml bidestilliertes Wasser vor Gebrauch einige Tropfen Essigsäure, CH_3COOH , 100 % (Merck, Darmstadt)

RT-PCR
<p>RT-Master-Mix</p> <p>2 µl RT-Puffer (Qiagen, Hilden) 2 µl dNTP-Mix (Qiagen, Hilden) 1 µl Omniscript[®] Kit (Qiagen, Hilden) 1 µl Hexa-Primer 1 µl Ribonuklease-Inhibitor (Fermentas, St. Leon-Rot)</p>
<p>Hexa-Primer</p> <p>13,2 µl Random-Primer (Invitrogen, Karlsruhe) 6,8 µl RNase-freies Wasser (Qiagen, Hilden)</p>
<p>PCR-Master-Mix</p> <p>10 µl SYBR-Green-Supermix (Bio-Rad, München) 0,15 µl PCR-Primer (siehe Tabelle 7) 4,75 µl RNase-freies Wasser (Qiagen, Hilden)</p>
Griess-Reaktion
<p>Triton X 100-Tris-HCl (0,5 %, pH-Wert 7,4)</p> <p>50 mg Trishydroxymethylaminomethan, Tris, C₄H₁₁NO₃ (Carl Roth, Karlsruhe) ad 100 ml bidestilliertes Wasser 500 µl Triton X 100, t-Octylphenoxypolyethoxyethanol (Sigma, München) Titration mit 1 N Salzsäure, HCl (Merck, Darmstadt)</p>
<p>Lysis-Puffer</p> <p>5 ml Triton X 100-Tris-HCl (0,5 %, pH-Wert 7,4) 100 µl Phenylmethansulfonsäurefluorid, PMSF, C₇H₇FO₂S (Sigma, München) 30 µl Aprotinin (Roche Diagnostics, Indianapolis) 25 µl Leupeptin (Roche Diagnostics, Indianapolis)</p>

3.2 HOPE-Konservierung, Paraffineinbettung und Schnittpräparatherstellung

Die Gewebefixierung in HOPE (HOPE I: Protektionslösung, HOPE II: Konzentrat) und Einbettung in Low Melting Paraffin erfolgte nach einer Standardprozedur entsprechend den Herstellerangaben (DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Hamburg). Die Paraffinblöcke wurden bei vier Grad Celsius archiviert.

Mittels eines Schlittenmikrotoms (Reichert & Jung, Heidelberg) wurden zwei-Mikrometer-dicke Paraffinschnitte angefertigt, in einem Wasserbad (Köttermann Labortechnik, Uetze) auf zuvor silanisierte (3-Aminopropyltriethoxysilan, Sigma, München) Objektträger aufgezogen und staub- beziehungsweise lichtgeschützt bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

3.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die histologischen Präparate wurden standardisiert mit Mayer's Hämalaun (Kerndarstellung) und Eosin (Zytoplasmadarstellung) gefärbt und nach Dehydratation in alkoholischen Lösungen aufsteigender Konzentration mittels Cytoseal™ XYL Mounting Medium (Richard-Allan Scientific®, Kalamazoo) über Xylol eingedeckt.

3.4 Immunhistochemie

Alle Inkubationsschritte wurden in einer feuchten Kammer und, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt. Verwendete Antikörper, deren Verdünnungen und Inkubationszeiten sowie ein Färbekurzprotokoll werden in den Tabellen 1 und 2 im Anhang erläutert.

Die Antigendemaskierung erfolgte in Citrat-Puffer (pH-Wert 6,0) in einem Dampfgarer (Braun, Melsungen), die Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität mit dreiprozentigem Wasserstoffperoxid (Merck, Darmstadt). Unspezifische Antikörperbindungen wurden durch Applikation von 0,5-prozentigem FCS-BSA in TBST®-Puffer (pH-Wert 7,4) geblockt. Die Detektion der Primärantikörper erfolgte mit EnVision-Peroxidase™ (Dako, Hamburg) und braun-schwarzem DAB-Chromogen (Dako Cytomation, Hamburg) beziehungsweise blau-violettem Vector® VIP Substrate Kit for Peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame). Die Gewebe wurden mit Mayer's Hämalaun gegengefärbt und nach Dehydrierung mit Cytoseal™ XYL Mounting Medium (Richard-Allan Scientific®, Kalamazoo) über Xylol eingedeckt.

3.5 Doppelmarkierung mittels indirekter Immunfluoreszenz

Prinzipiell wurde wie bei der Immunhistochemie verfahren. Mittels Fluorescent Mounting Medium (Dako, Hamburg) wurden die Gewebe über Xylol eingedeckt. Die

genauen Reaktionsbedingungen und Anwendungsschritte können der nachfolgenden Tabelle 3 entnommen werden.

Primärantikörper	iNOS	α -Actinin-4	CD68
	1/50 2 h	1/50 2 h	1/200 2 h
FCS-BSA (0,5 %)	5 min (1)	5 min (1)	20 min (1)
Detektionssystem	1/200 1 h im Dunkeln (2a)	1/200 1 h im Dunkeln (2a)	1/300 1 h im Dunkeln (2b)

Tabelle 3: Färbekurzprotokoll Doppelmarkierung (iNOS/CD68 und α -Actinin-4/CD68). (1) Blockierung unspezifischer Antikörperbindungen. (2a) Detektion des Primärantikörpers mit Alexa Fluor[®] 488, anti-Kaninchen (Invitrogen, Karlsruhe) und (2b) Alexa Fluor[®] 555, anti-Maus (Invitrogen, Karlsruhe).

3.6 Immunreaktiver Score

Die Beurteilung der immunhistochemischen Färbeargebnisse von HIF-1 α , eNOS, iNOS, α -Actinin-4 und Nitrotyrosin erfolgte semiquantitativ an einem Diagnostiklichtmikroskop der Firma Zeiss (Göttingen) unter Zuhilfenahme des immunreaktiven Scores. Dieser basiert auf der Farbtintensität der prozentualen Anzahl der positiven Zellen und dient der Quantifizierung von Zellsignalen, die mittels Immunhistochemie erzeugt werden (Tabelle 4).

Farbtintensität	prozentualer Anteil positiver Zellen
0	keine Zellsignale
1	Zellsignale in < 10 % der Zellen
2	Zellsignale in > 10 und < 50 % der Zellen
3	starke Zellsignale in > 50 % der Zellen

Tabelle 4: Immunreaktiver Score: Intensität der Zellsignale.

3.7 Morphometrische Untersuchungen

3.7.1 Makrophagendichte

Die quantitative Analyse der mit dem Makrophagenantikörper CD68 immunhistochemisch gefärbten Tumorschnittpräparate erfolgte an einem Diagnostiklichtmikroskop der Firma Zeiss, Göttingen. In Tumoren mit Nekrose wurde ein 1,5 Millimeter breiter Randsaum als perinekrotisches Areal und die weiter entfernten Bereiche als nekrosefernes Tumorgewebe definiert. Die Makrophagenquantifizierung erfolgte bei 40-facher Vergrößerung unter Zuhilfenahme eines optischen Zählgitterokulars (Zeiss, Göttingen).

3.7.2 Gefäßabstände

Die Gefäßabstände im Tumorgewebe wurden computergestützt an CD31-gefärbten Schnittpräparaten beurteilt (Histolab-Programm, Microvision Instruments, Evry). Zunächst wurden bei zweifacher Vergrößerung repräsentative vitale Tumorareale selektiert und anschließend 500 Kapillarabstände bei zehnfacher Vergrößerung ausgemessen.

3.7.3 Nekrosenquantifizierung

Das Ausmaß der nekrotischen Areale wurde anhand Hämatoxylin-Eosin-gefärbter Gewebeschnitte computerassistent mit Hilfe des Histolab-Programmes (Microvision Instruments, Evry) in vierfacher Vergrößerung bestimmt. Durch manuelle Skizzierung der Gesamttumorfläche und Markierung der vitalen Areale konnte der prozentuale Anteil hinsichtlich der nekrotischen Areale bestimmt werden.

3.8 Bestimmung der relativen mRNA-Expression

3.8.1 Entparaffinierung und RNA-Extraktion

Pro Fall wurden acht etwa zehn-Mikrometer-dicke Paraffinschnitte in 60 Grad Celsius heißem Isopropanol entparaffiniert. Nach Homogenisierung der Gewebepellets in Lysis-Puffer (Qiagen, Hilden) erfolgte unter Verwendung des RNeasy[®] Mini Kits

(Qiagen, Hilden) die Isolierung der Gesamt-RNA, deren Qualität und Menge mittels automatisierter Kapillarelektrophorese (Agilent BioAnalyzer 2100, Agilent RNA 6000 Nano Kit, Agilent Technologies, Böblingen) bestimmt wurde.

3.8.2 Reverse Transkription und RT-PCR

Das Umschreiben der isolierten RNA zur cDNA erfolgte mittels Omniscript® Kit entsprechend den Herstellerangaben (Qiagen, Hilden). Die Verdünnung der RNA richtete sich nach dem RNA-Gehalt der Proben, wobei entweder 500 oder 250 Nanogramm in einem Ansatz von 20 Mikrolitern eingesetzt wurden. Nach Denaturierung im Thermocycler (Biometra®, Göttingen) wurden die Proben auf Eis abgekühlt, mit dem RT-Master-Mix versetzt, inkubiert, denaturiert und gestoppt. Anschließend wurde die cDNA auf fünf Nanogramm pro Mikroliter verdünnt.

Die Genexpression in den cDNA-Proben wurde in Doppelansätzen bestimmt. Pro Ansatz wurden 25 Nanogramm cDNA gemessen. Die spezifische Genexpression von iNOS und α -Actinin-4 wurde mittels der Δ ct-Methode in Referenz zum in allen Tumoren konstant exprimierten „Housekeepinggen“ PBGD bestimmt (Tabelle 5). Die verwendeten iCycler-Profilen und PCR-Primer können den nachfolgenden Tabellen 6 und 7 entnommen werden.

$y = 2^{\Delta \text{ct PBGD} - \text{iNOS}}$	$y = 2^{\Delta \text{ct PBGD} - \alpha\text{-Actinin-4}}$
---	---

Tabelle 5: Δ ct-Methode zur relativen mRNA-Expressionsbestimmung von iNOS und α -Actinin-4.

		α -Actinin-4	iNOS	PBGD
PCR-Schritte	Zeit	Schmelztemperatur		
initiale Hitzedenaturierung	15 min	57° C	95° C	70° C
Hitzedenaturierung	30 sec	57° C	95° C	70° C
Primer-Annealing	30 sec	57° C	59° C	70° C
Elongation	30 sec	57° C	72° C	70° C

Tabelle 6: iCycler-Profil.

PCR-Primer		Sequenz
α -Actinin-4	Sense (reverse)	5`-CGA ACC TAA GGA TGA TGG TC-3`
	Antisense (forward)	5`-CTC CTG GAG GTC ATA TCA GG-3`
iNOS	Sense (reverse)	5`-CAT AGC GGA TGA GCT GAG CAT T-3`
	Antisense (forward)	5`-GTG GTC CAA CCT GCA GGT CT-3`
PBGD	Sense (reverse)	5`-TCA ATG TTG CCA CCA CAC TGT CCG TCT-3`
	Antisense (forward)	5`-TGT CTG GTA ACG GCA ATG CGG CTG CAA C-3`

Tabelle 7: PCR-Primer (MWG-Biotech AG, Ebersberg).

3.9 Bestimmung des Nitritgehaltes im humanen Nierenzellkarzinom

Die bei minus 80 Grad Celsius gelagerten Proben wurden mit Lysis-Puffer versetzt, mechanisch mit einem Stößel zerdrückt und mittels Ultraschallgerät (Bandelin Technologies, Berlin) homogenisiert. Nach Zentrifugation der Lysate (Biofuge stratos und fresco, Heraeus Instruments, Düsseldorf) wurden die Überstände weiter verwendet.

3.9.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Quantifizierung des Proteingehaltes erfolgte als Dreifachbestimmung nach der Bradford-Methode entsprechend den Angaben des Herstellers (Bio-Rad, München). Computergestützt wurde die Absorption der Analysenproben photometrisch entgegen dem Standard bei 595 Nanometer gemessen. Zur Quantifizierung wurde eine BSA-Standardverdünnungsreihe mitgeführt.

3.9.2 Kolorimetrische Nitritbestimmung nach Griess (Griess-Reaktion)

Mit Hilfe des Griess-Reagent-Systems (Promega, Madison) wurde der Nitritgehalt der Proben in Form von Triplets an Überständen von Gewebshomogenisaten ermittelt. Die Absorptionsmessung erfolgte computerassistent durch Bestimmung der optischen Dichte bei 540 Nanometer. Zur Kontrolle wurde ein Nitritstandard mitgeführt, der, ausgehend von einer einmillimolaren Konzentration, verdünnt wurde.

3.10 Statistische Analyse

Die statistischen Berechnungen und graphischen Darstellungen der Untersuchungsergebnisse erfolgten computergestützt unter Verwendung des Statistikprogrammes GraphPad Prism 4 (GraphPad, San Diego). Zur Erstellung der Statistiken fand die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA, Analysis of Variance) Anwendung. Mittels des Newman-Keuls-Multiple-Comparison- und des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests wurden die Ergebnisse ermittelt und als Mittelwerte mit den Standardfehlern der Mittelwerte angegeben. Als Signifikanzniveau wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von fünf Prozent ($p < 0,05$) vorgegeben.

4 ERGEBNISSE

4.1 Patientenkollektiv

In der vorliegenden Arbeit wurden Nierenzellkarzinome 23 nephrektomierter Patienten der Urologischen Klinik der Georg-August-Universität Göttingen untersucht. Ein Ethikvotum der Medizinischen Fakultät lag hierfür vor.

Das Patientenkollektiv setzte sich aus 16 Männern und sieben Frauen zusammen (Geschlechtsverhältnis: eins zu 0,56), mit einem zum Operationszeitpunkt durchschnittlichen Alter von 66,7 Jahren. Die histologische Untersuchung beinhaltete 19 klarzellige Karzinome, ein sarkomatöses, ein papilläres, ein chromophobes und ein Duct-Bellini-Karzinom. Der nukleäre Malignitätsgrad wurde nach Fuhrmann et al. (1982) bestimmt. Die Graduierung der Tumoren ergab drei Grad-1-, acht Grad-2-, zehn Grad-3- und zwei Grad-4-Tumoren. Das Tumorstadium wurde nach der TNM-Klassifikation (Wittekind et al. 2002) beurteilt und wies eine Verteilung von vier pT1b-Tumoren, vier pT2-Tumoren, vier pT3a-Tumoren, zehn pT3b-Tumoren und einem pT4-Tumor auf. Patienten, die mindestens ein pT3-Stadium, einen Lymphknotenbefall oder Fernmetastasen aufwiesen, wurden als „fortgeschrittene“ Tumoren klassifiziert. Alle anderen Tumoren wurden als „lokalisiert“ bezeichnet. In Tabelle 8 im Anhang sind die wesentlichen Falldaten des Patientenkollektives gelistet.

4.2 Quantifizierung des Makrophageninfiltrates

Mittels quantitativer Analyse der CD68-positiven Makrophageninfiltrate konnte eine statistisch signifikant höhere Infiltrationsdichte in Tumoren mit Nekrose, im Gegensatz zu nekrosefreien Karzinomen, belegt werden (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, $p = 0,0014$). Weiterhin zeigte sich eine signifikant höhere Makrophageninfiltration in perinekrotischen Tumorarealen im Vergleich zu nekrosefernen Bezirken (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, $p = 0,017$) (Abbildung 1 und 2). Anhand von Tabelle 9 wird die vermehrte Makrophageninfiltration in Tumoren mit Nekrose, insbesondere in perinekrotischen Tumorregionen, verdeutlicht. In den Abbildungen 3 A bis C sind typische Beispiele dieser Versuchsreihe dargestellt.

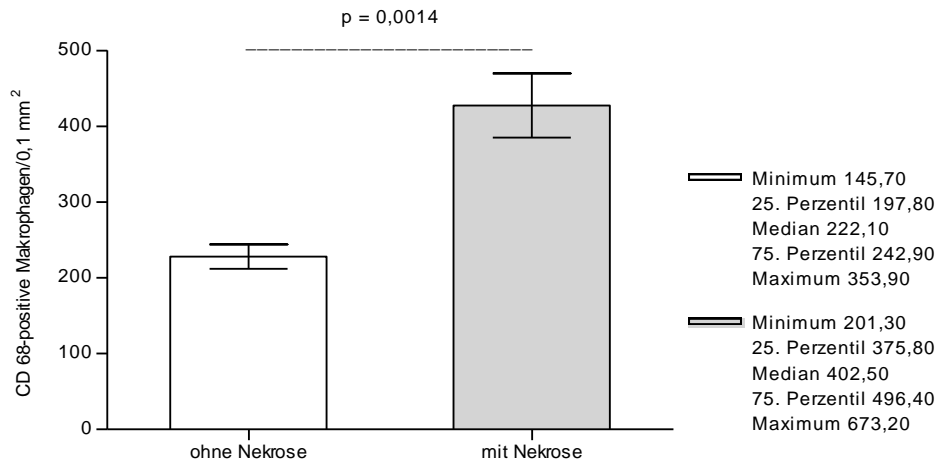


Abbildung 1: CD68-positive Makrophagen in Tumoren ohne versus mit Nekrose. Tumoren mit Nekrose wurden signifikant mehr von CD68-positiven Makrophagen infiltriert (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, $p = 0,0014$).

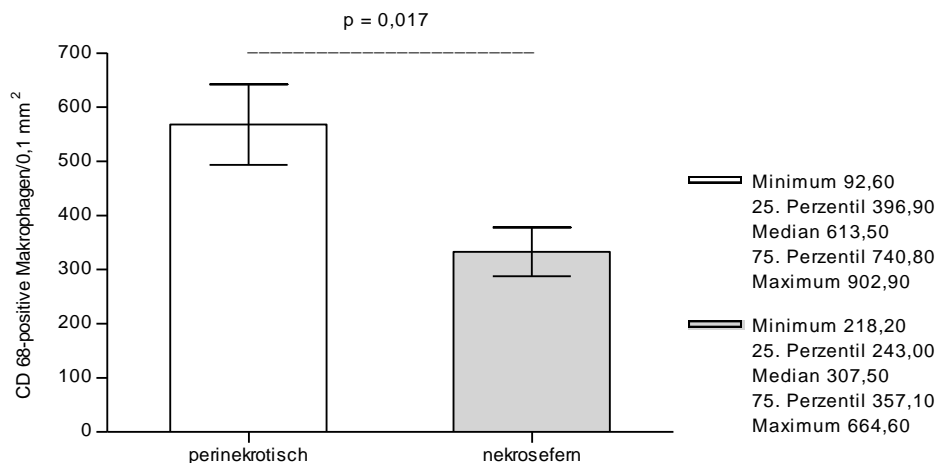
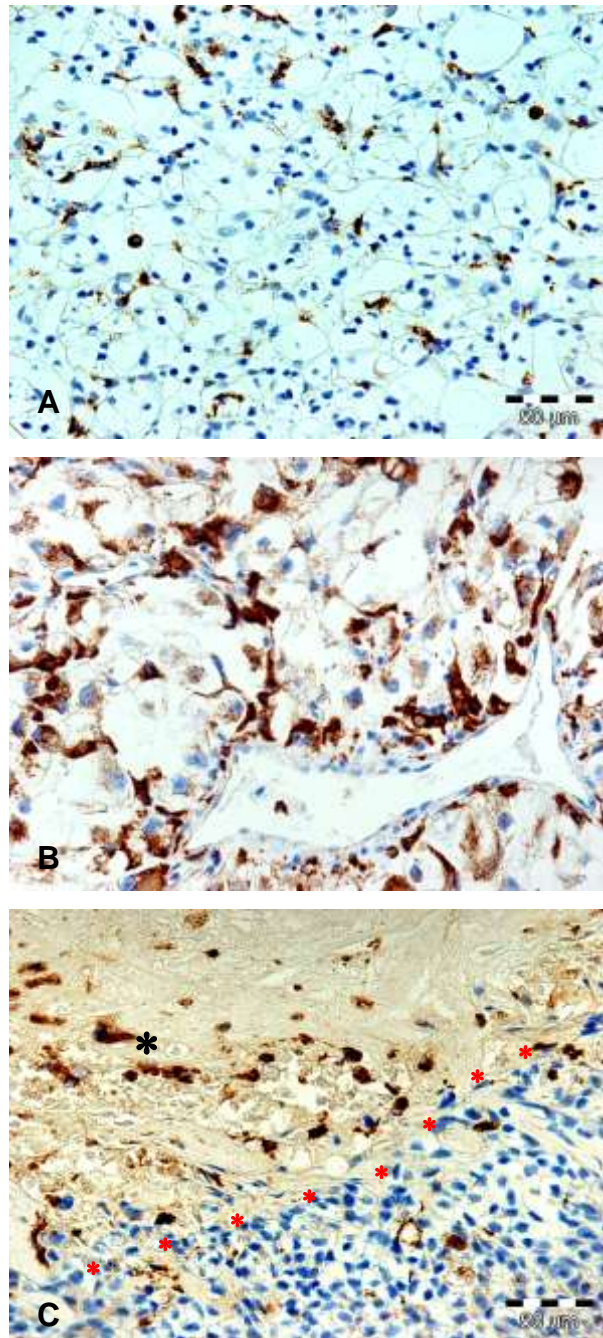


Abbildung 2: CD68-positive Makrophagen in Tumoren mit Nekrose: perinekrotisch versus nekrosefern. Perinekrotische Tumorareale wurden signifikant mehr von CD68-positiven Makrophagen infiltriert (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, $p = 0,017$).

CD68-positive Makrophagen/0,1 mm ²	MW	SEM
Tumoren ohne Nekrose	228,00	58,60
Tumoren mit Nekrose	427,50	126,60
perinekrotisch	567,80	235,40
nekrosefern	332,90	134,70

Tabelle 9: Tumoren mit Nekrose wiesen, insbesondere in perinekrotischen Tumorarealen, eine vermehrte Makrophageninfiltration auf (MW 427,50 bzw. 567,80, SEM 126,60 bzw. 235,40).



Abbildungen 3 A-C: CD68-Immunhistochemie (Peroxidasefärbung mit DAB-Chromogen). Fall 6 (B) zeigt einen Tumor mit Nekrose und einer erhöhten Makrophagendichte im vitalen Tumorgewebe im Vergleich zu Fall 5 (A), einem Tumor ohne Nekrose. In Abbildung C (Fall 14) ist die Akkumulation von Makrophagen am Nekroserand (*) dargestellt. (*) markiert eine Nekrose.

4.3 Charakterisierung der Hypoxie im Karzinomgewebe

4.3.1 Gefäßabstände und Nekrosenquantifizierung

In 18 Nierenzellkarzinomen wurde die mittlere Gefäßdistanz im vitalen Tumorgewebe bestimmt. Tumoren ohne Nekrose zeigten signifikant geringere Gefäßabstände bei hoher Vaskularisationsdichte, im Gegensatz zu nekrotischen Tumoren, die zugleich eine niedrige Gefäßdichte aufwiesen (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, $p = 0,04$) (Abbildungen 4, 5, 6 A bis D).

Anhand von Tabelle 10 im Anhang wird deutlich, dass sich die Gefäßabstände bei fortschreitendem Organstadium und zunehmender Nekrotisierung beziehungsweise Tumorgroße, vergrößern. In Tumoren ohne Nekrose betrug der minimale mittlere Gefäßabstand 23,03 und der maximale 78,76 Mikrometer. Dagegen war in Tumoren mit Nekrose die minimale mittlere Gefäßdistanz 39,59 und die maximale 112,20 Mikrometer. Insgesamt wiesen sieben der untersuchten Nierenzellkarzinome nekrotische Areale auf, wobei sechs Fälle einem fortgeschrittenen Organstadium zugeordnet werden konnten. Der größte Tumor mit Nekrose maß 16 Zentimeter und entsprach einem fortgeschrittenem Tumorstadium. In diesem Fall betrug der mittlere Gefäßabstand 112,2 Mikrometer.

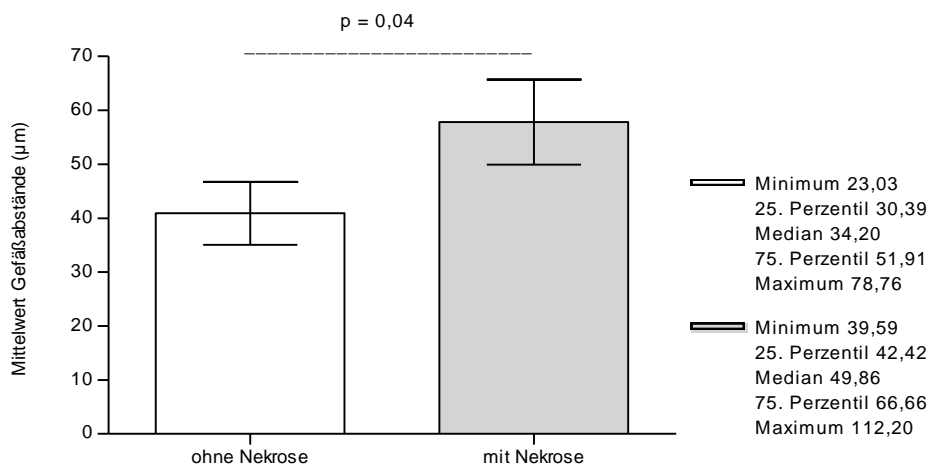


Abbildung 4: Darstellung der mittleren Gefäßabstände in Tumoren ohne versus mit Nekrose. In nekrosefreien Tumoren zeigte sich eine signifikant niedrigere Gefäßdistanz (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, $p = 0,04$).

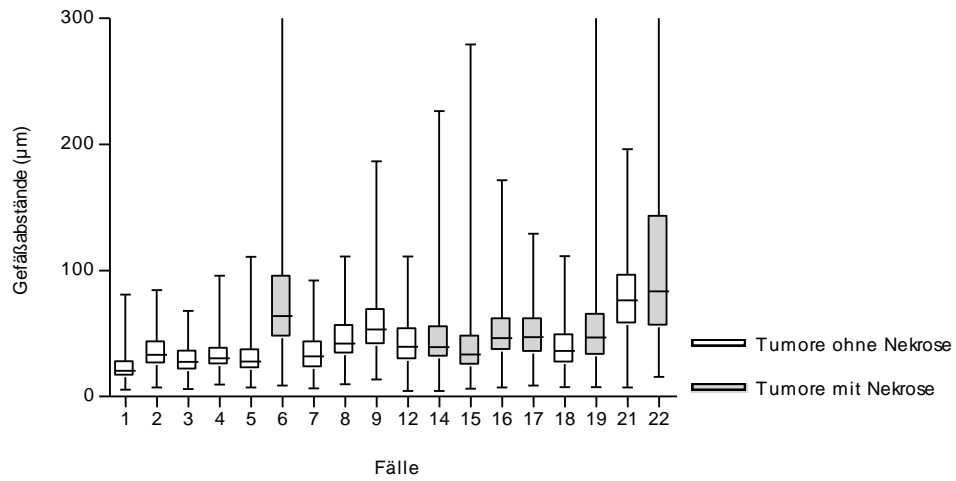


Abbildung 5: Darstellung der mittleren Gefäßabstände in Tumoren ohne und mit Nekrose. In nekrotischen Tumoren stellte sich ein größerer Gefäßabstand dar.

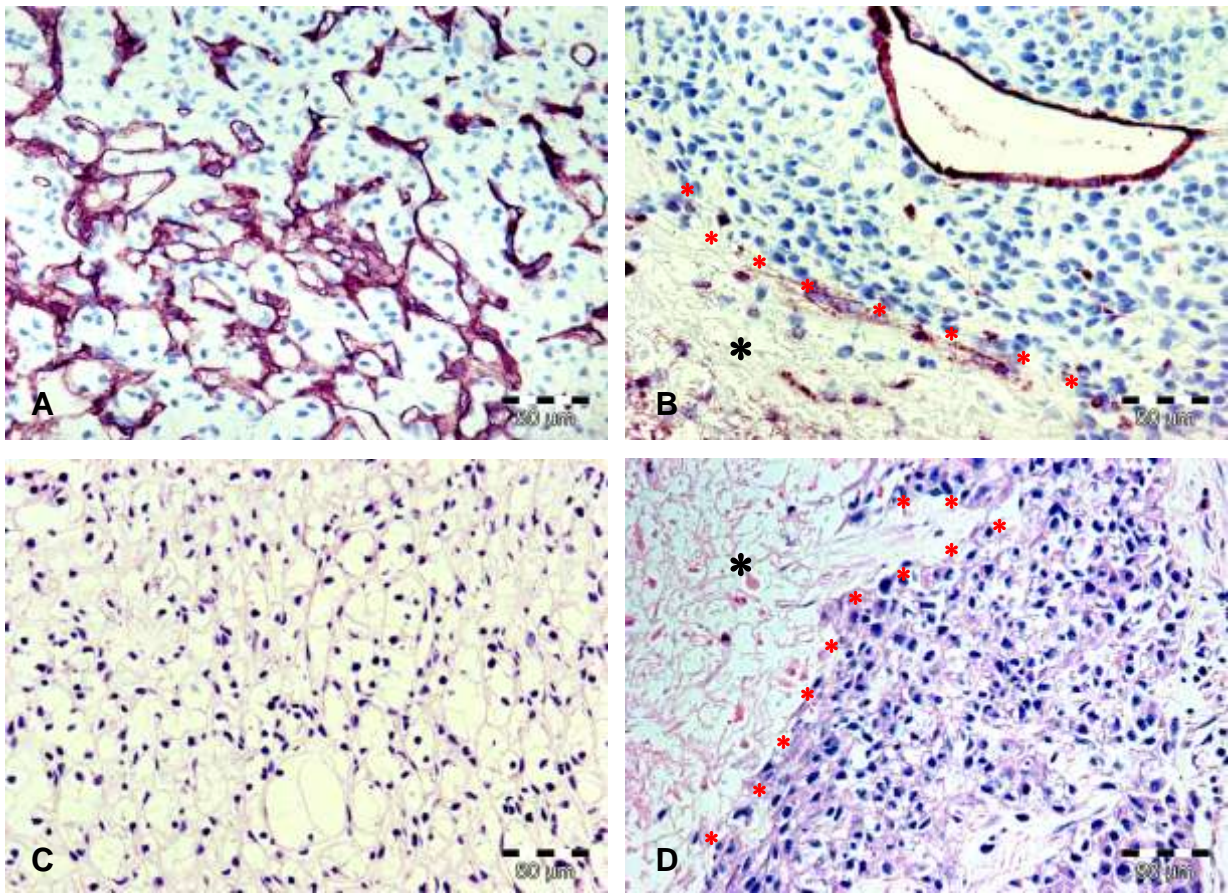


Abbildung 6: **A-B:** CD31-Immunhistochemie (Peroxidasefärbung mit VIP-Chromogen). Im Vergleich zu Fall 5 (A), einem Nierenzellkarzinom ohne Nekrose, zeigt Fall 14 (B), ein Nierenzellkarzinom mit Nekrose, eine reduzierte Gefäßdichte. **C-D:** Fall 5 (Abbildung C) und Fall 14 (Abbildung D) sind Beispiele Hämatoxylin-Eosin-färbter Präparate, die der Auswertung nekrotischer Tumorareale dienen. (*) markiert jeweils den Nekroserand, (*) Nekrosen.

4.3.2 HIF-1 α -Expression

HIF-1 α imponierte eher diffus sowohl im Nierennormal- als auch im Tumorgewebe. Hinsichtlich der Ausdehnung der hypoxischen Areale wurde in der Expression kein signifikanter Unterschied deutlich (Newman-Keuls-Multiple-Comparison-Test, $p > 0,05$) (Abbildungen 7, 8 D und Tabelle 11). Nur in manchen Karzinomen konnte perinekrotisch eine entsprechende Hochregulation nachgewiesen werden (Abbildungen 8 A bis C).

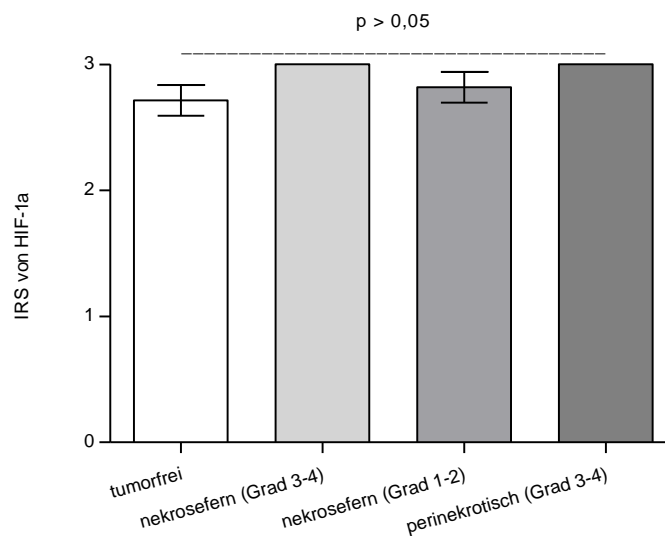
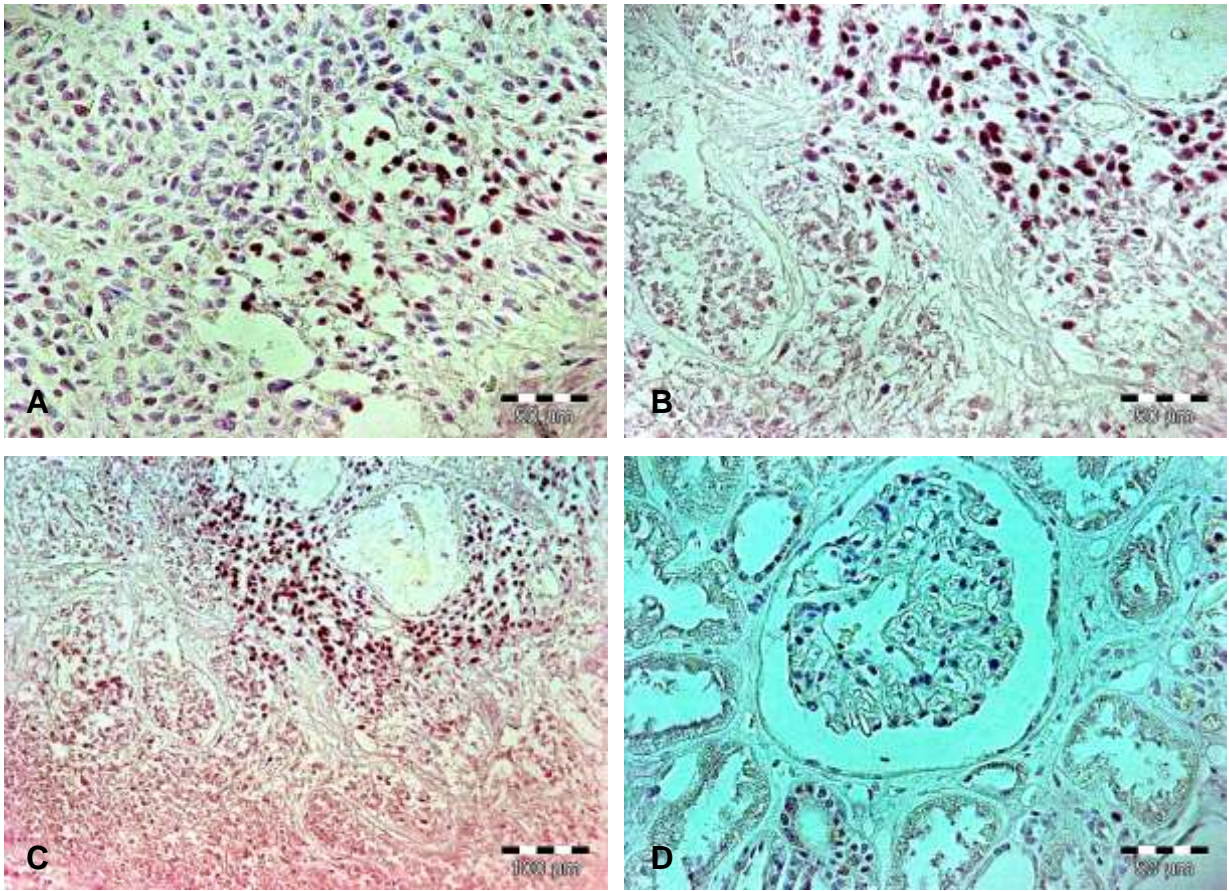


Abbildung 7: Immunoreaktiver Score von HIF-1 α . Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Expression (Newman-Keuls-Multiple-Comparison-Test, $p > 0,05$).

HIF-1 α -Immunoreaktivität	MW	SEM
tumorfrei	2,71	0,56
nekrosefern (Grad 3-4)	3,00	0,00
nekrosefern (Grad 1-2)	2,82	0,41
perinekrotisch (Grad 3-4)	3,00	0,00

Tabelle 11: Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der HIF-1 α -Expression.



Abbildungen 8 A-D: HIF-1 α -Immunhistochemie (Peroxidasefärbung mit VIP-Chromogen). In einigen Tumoren zeigte sich perinekrotisch eine vermehrte Expression von HIF-1 α (A-C, Fall 14). Auch im tumorfreien Nierennormalgewebe wurde HIF-1 α exprimiert (D, Fall 5).

4.4 Stickstoffmonoxid im Karzinomgewebe

4.4.1 eNOS-Expression

In perinekrotischen Tumorgefäßen wurde eNOS, im Gegensatz zu Endothelien nekroseferner Tumorareale bzw. im Nierennormalgewebe, vermindert exprimiert. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied (Newman-Keuls-Multiple-Comparison-Test, $p < 0,05$) (Abbildungen 9, 10 A bis C und Tabelle 12).

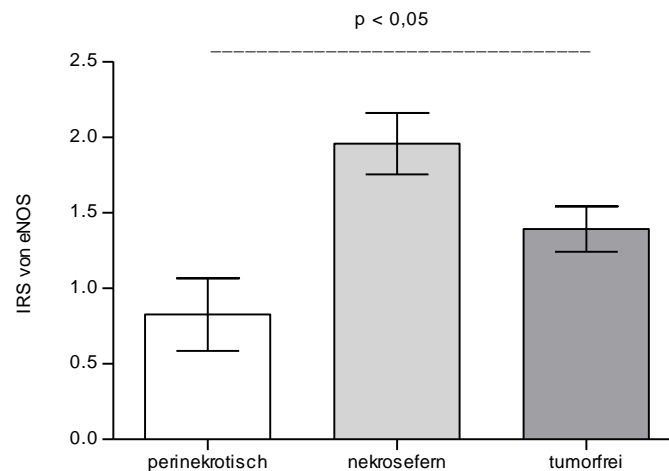
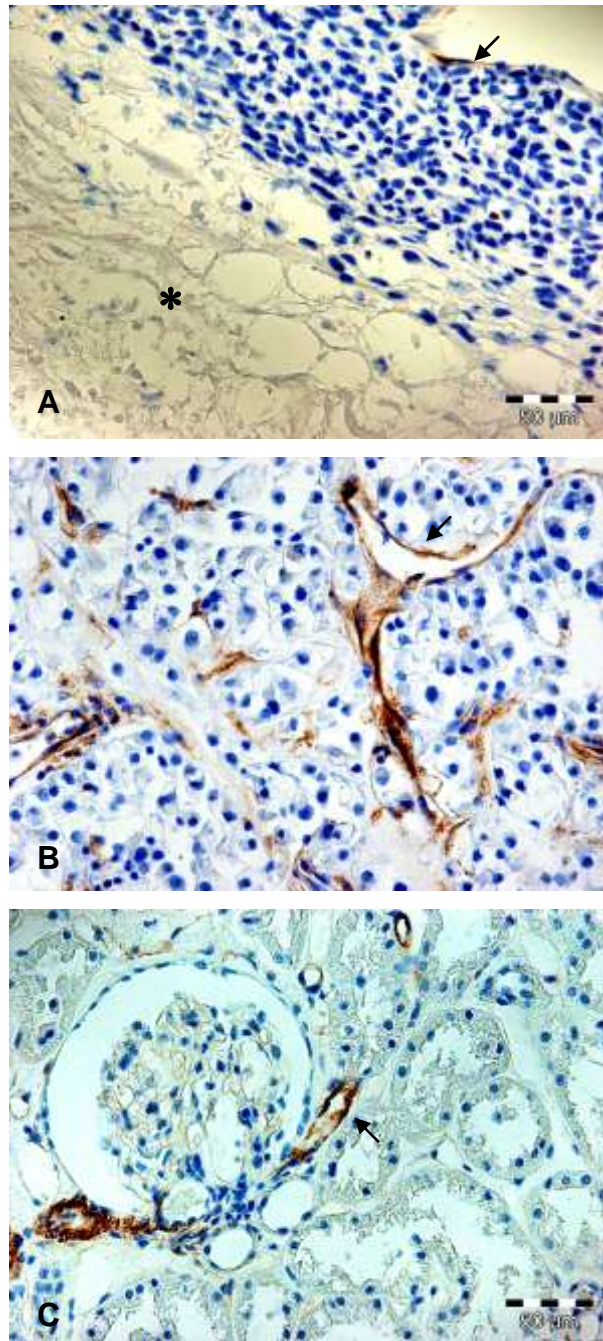


Abbildung 9: Immunoreaktiver Score von eNOS. In perinekrotischen Gefäßendothelien zeigte sich eine signifikant niedrige eNOS-Expression (Newman-Keuls-Multiple-Comparison-Test, $p < 0,05$).

eNOS-Immunoreaktivität	MW	SEM
perinekrotisch	0,83	1,15
nekrosefern	1,96	0,98
tumorfrei	1,39	0,72

Tabelle 12: Insbesondere in Endothelien perinekrotischer Tumorareale wurde eNOS vermindert exprimiert (MW 0,83, SEM 1,15).



Abbildungen 10 A-C: eNOS-Immunhistochemie (Peroxidasefärbung mit DAB-Chromogen). Im perinekrotischen Tumorgewebe zeigte sich eine niedrigere eNOS-Expression (A, Fall 14) als im nekrosefreien Tumorgewebe (B, Fall 6) oder im tumorfreien Nierennormalgewebe (C, Fall 5). (*) markiert eine Nekrose. Die Pfeile zeigen auf eNOS-positive Gefäße.

4.4.2 iNOS und α -Actinin-4

4.4.2.1 iNOS und α -Actinin-4 auf Proteinebene

Auf Proteinebene zeigte sich beim Vergleich von perinekrotischem Tumorgewebe mit tumorfreiem Nierennormalgewebe ein hochsignifikanter Unterschied in der iNOS-Expression (Newman-Keuls-Multiple-Comparison-Test, $p < 0,05$). Beim Vergleich von perinekrotischem Tumorgewebe mit nekrosefreien Tumorregionen konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (Newman-Keuls-Multiple-Comparison-Test, $p < 0,001$) (Abbildungen 11, 13 A bis B und Tabelle 13).

Bei der immunhistochemischen Untersuchung der α -Actinin-4-Expression stellte sich beim Vergleich von tumorfreiem Nierennormalgewebe mit Tumorgewebe kein signifikanter Unterschied dar (Newman-Keuls-Multiple-Comparison-Test, $p > 0,05$) (Abbildungen 12, 13 C bis D und Tabelle 13).

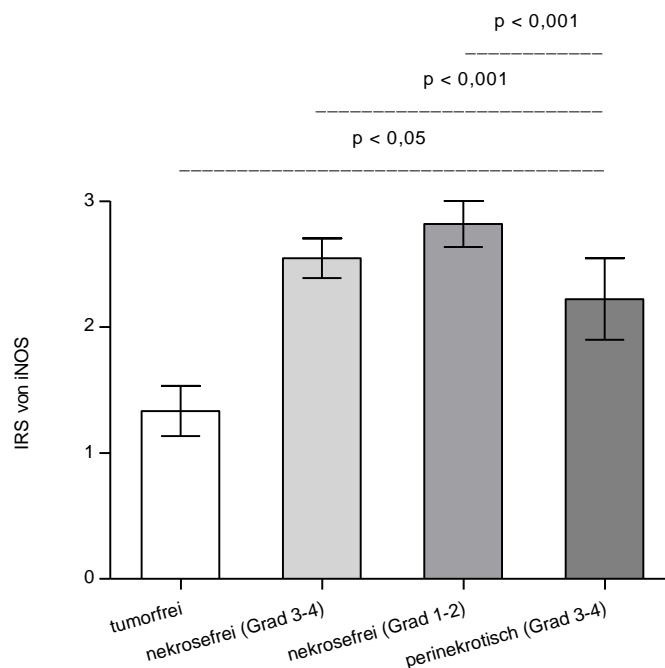


Abbildung 11: Immunoreaktiver Score von iNOS. Beim Vergleich von perinekrotischem Tumorgewebe mit tumorfreiem Nierennormalgewebe zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied (Newman-Keuls-Multiple-Comparison-Test, $p < 0,05$).

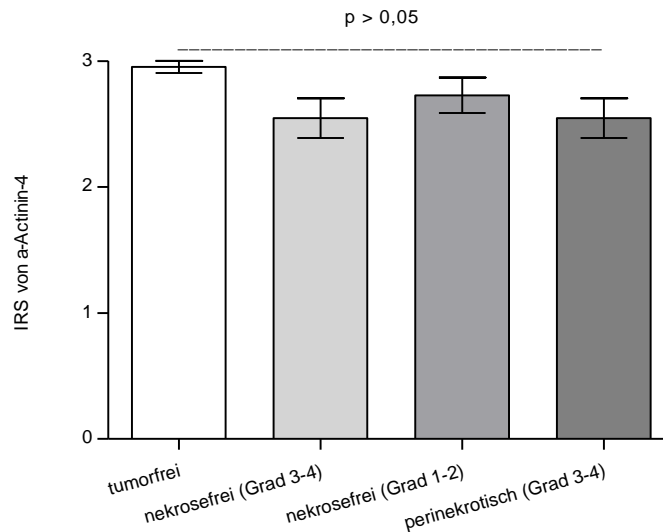


Abbildung 12: Immunoreaktiver Score von α -Actinin-4. Es konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (Newman-Keuls-Multiple-Comparison-Test, $p > 0,05$).

Immunoreaktivität	iNOS		α -Actinin-4	
	MW	SEM	MW	SEM
tumorfrei	1,33	0,91	2,95	0,22
nekrosefrei (Grad 3-4)	2,55	0,52	2,55	0,52
nekrosefrei (Grad 1-2)	2,82	0,60	2,73	0,47
perinekrotisch (Grad 3-4)	2,22	0,97	2,55	0,52

Tabelle 13: Die höchste Expression von iNOS fand sich in nekrosefreien Grad-1- bis Grad-2-Tumoren (MW 2,82, SEM 0,60). In der α -Actinin-4-Expression zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

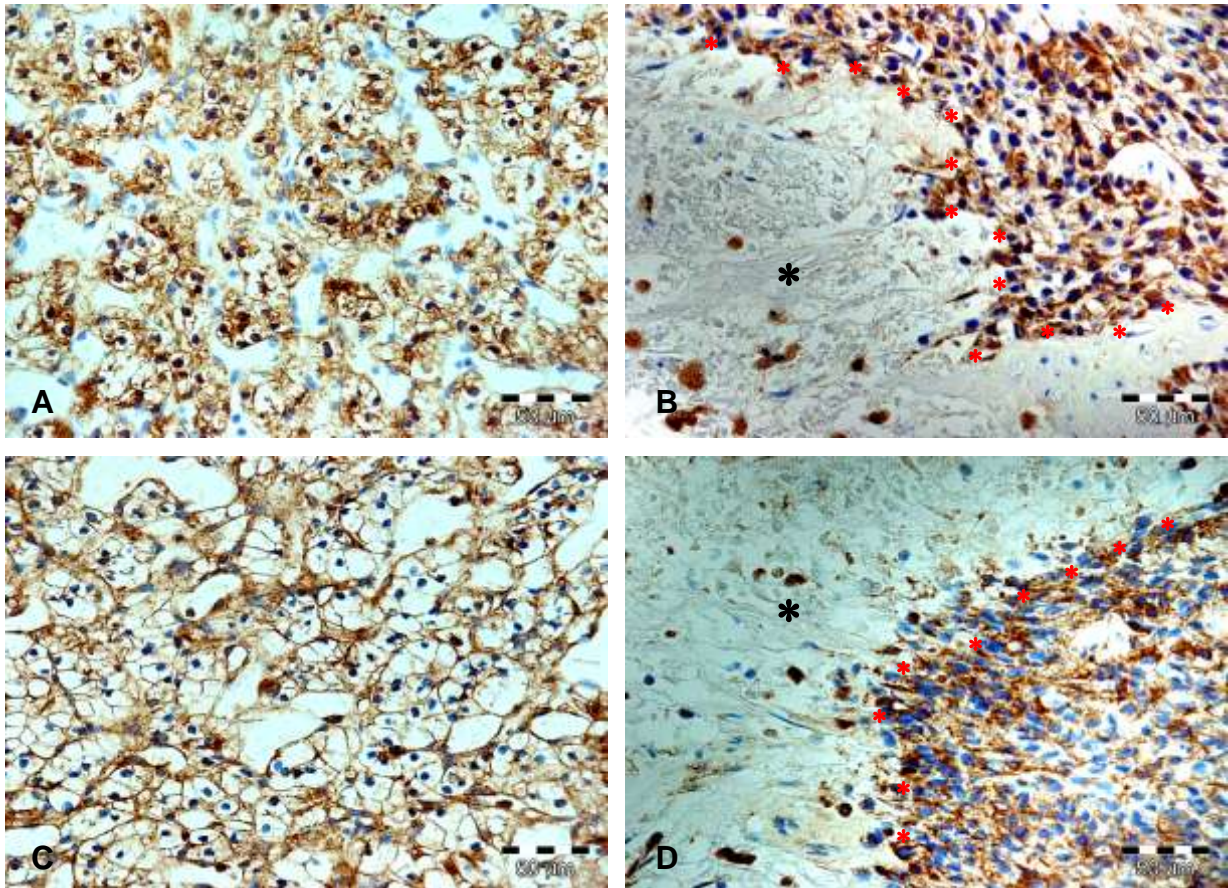


Abbildung 13: **A-B:** iNOS-Immunhistochemie (Peroxidasefärbung mit DAB-Chromogen). In der iNOS-Expression zeigte sich im nekrosefreien Nierenzellkarzinom (A, Fall 5) und im perinekrotischen Tumorgewebe (B, Fall 14) kein Unterschied. iNOS wurde am Nekroserand (*) kräftig exprimiert. **C-D:** α -Actinin-4-Immunhistochemie (Peroxidasefärbung mit DAB-Chromogen). Nekrosefreie Tumoren (A, Fall 5) zeigten eine gleichartige Expression wie Karzinome mit Nekrose (B, Fall 14). (*) markiert jeweils eine Tumornekrose, (*) den Nekroserand.

4.4.2.2 mRNA-Analyse der iNOS- und α -Actinin-4-Expression

Auf mRNA-Ebene zeigte sich weder in der iNOS- noch in der α -Actinin-4-Expression, sowohl beim Vergleich von tumorfremiem Nierennormalgewebe mit Karzinomgewebe als auch beim Vergleich von nekrosefreiem Gewebe mit nekrotischen Tumoren, ein signifikanter Unterschied (Abbildungen 14, 15 und Tabelle 14).

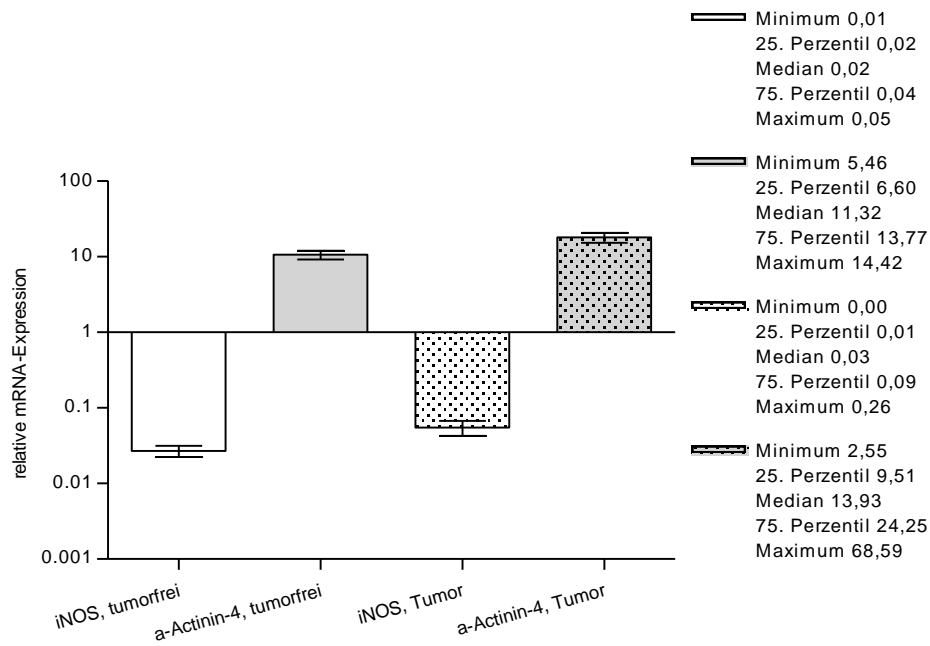


Abbildung 14: Relative mRNA-Expression von iNOS und α -Actinin-4 im tumorfremiem Nierennormalgewebe und Tumorgewebe. Es zeigte sich weder in der iNOS- noch in der α -Actinin-4-Expression ein signifikanter Unterschied.

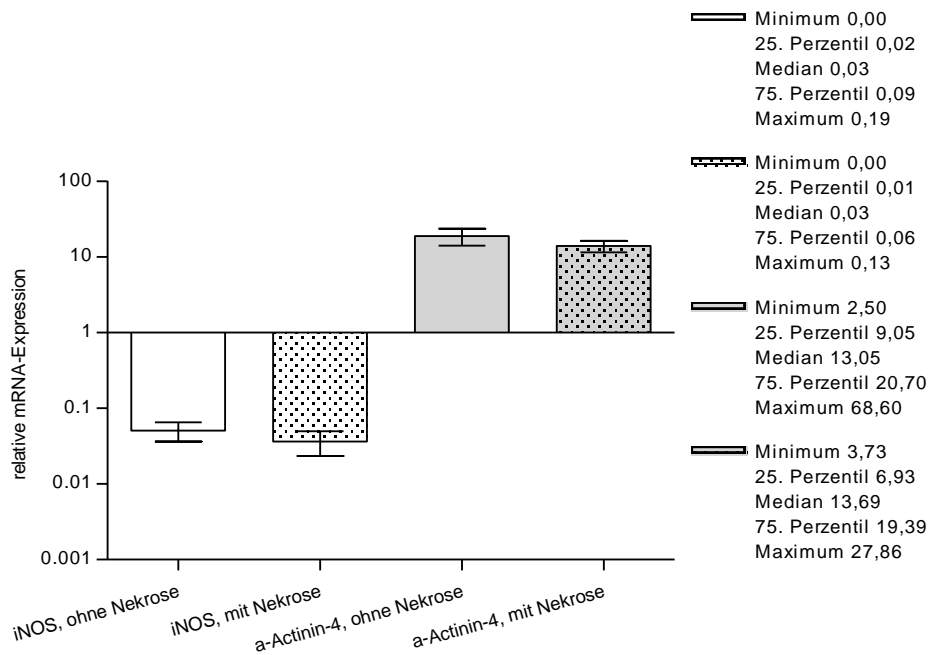


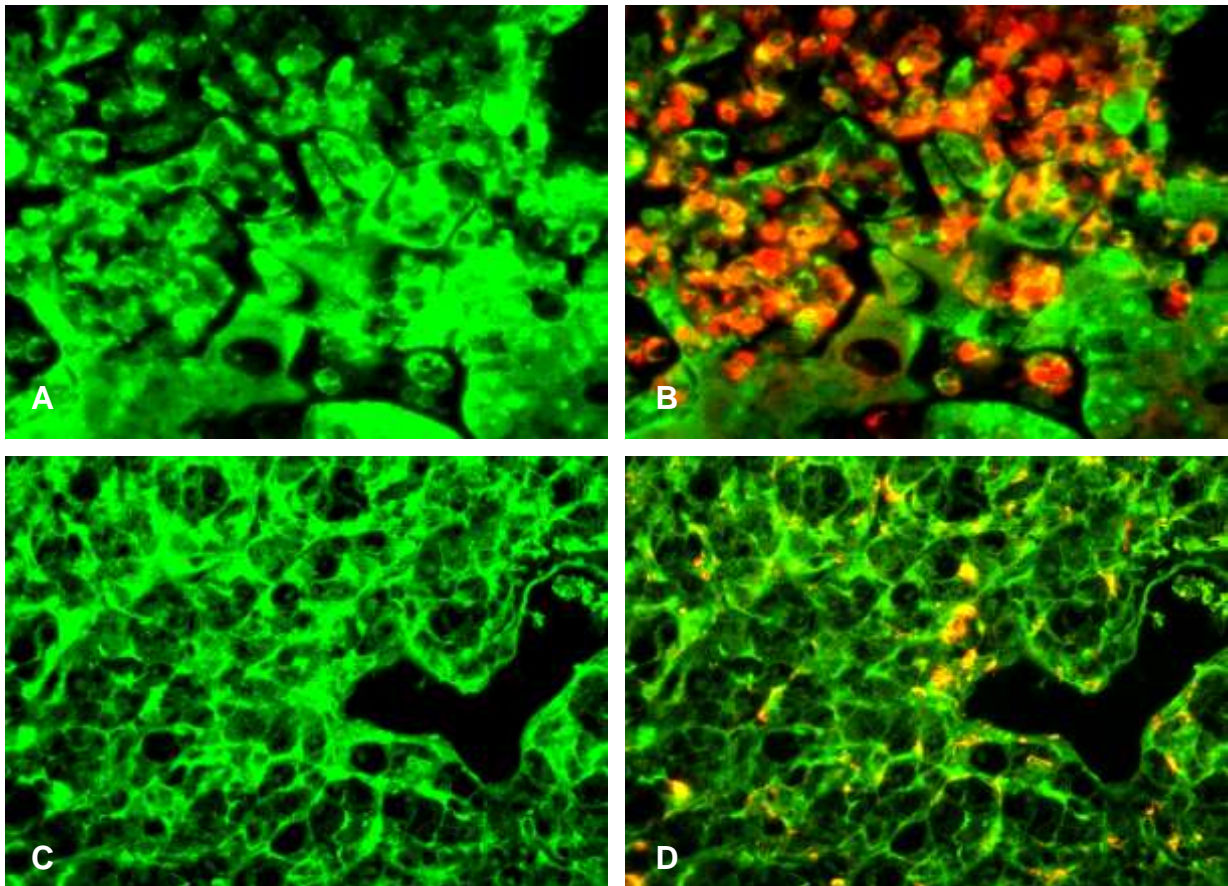
Abbildung 15: Relative mRNA-Expression von iNOS und α -Actinin-4 in Tumoren ohne und mit Nekrose. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

relative mRNA-Expression	iNOS		α -Actinin-4	
	MW	SEM	MW	SEM
tumorfrei	0,03	0,01	10,54	3,36
Tumor	0,06	0,06	17,89	14,05
Tumoren ohne Nekrose	0,05	0,05	18,75	17,85
Tumoren mit Nekrose	0,04	0,04	13,83	7,40

Tabelle 14: In der Expression von iNOS und α -Actinin-4 wurde auf mRNA-Ebene kein signifikanter Unterschied deutlich.

4.4.2.3 Doppelmarkierung mittels indirekter Immunfluoreszenz

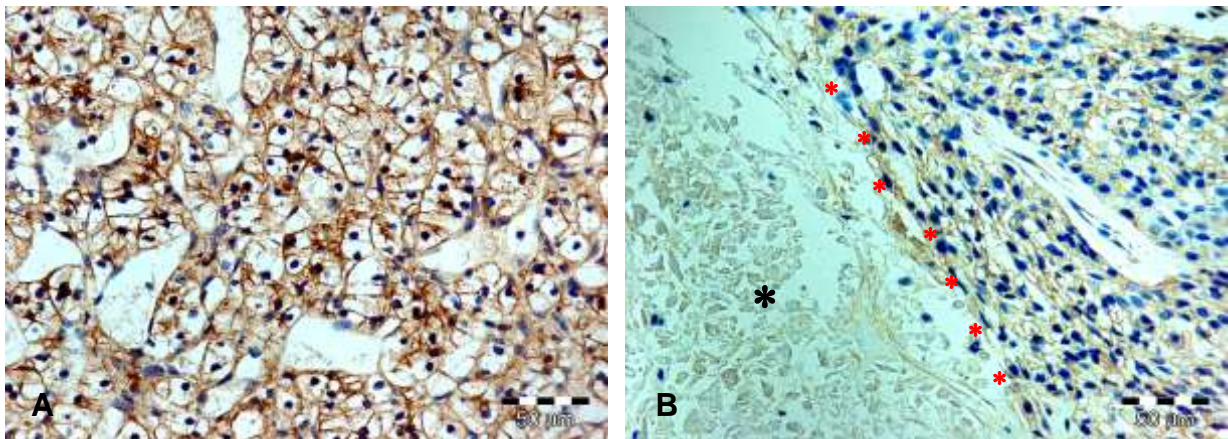
Mittels Doppelimmunfluoreszenz konnte gezeigt werden, dass Nierenzellkarzinomzellen und tumorassoziierte Makrophagen iNOS exprimieren (Abbildungen 16 A und B). α -Actinin-4 war sowohl in Tumorzellen als auch in tumorassoziierten Makrophagen nachweisbar (Abbildungen 16 C und D).



Abbildungen 16 A-D: Doppelimmunfluoreszenzuntersuchungen. **A-B:** Doppelmarkierung iNOS/CD68 (Fall 19). iNOS-positive Zellen stellen sich über Alexa Fluor 488 grün dar, CD68-positive Zellen sind über Alexa Fluor 555 rot markiert. In der Überlagerung (B) zeigen sich die iNOS-positiven Makrophagen gelb. **C-D:** Doppelmarkierung α -Actinin-4/CD68 (Fall 14). α -Actinin-4-positive Zellen werden über Alexa Fluor 488 grün markiert. α -Actinin-4-/CD68-positive Makrophagen zeigen sich in der Überlagerung gelb.

4.4.3 Nitrotyrosin-Expression

Die vorliegenden Ergebnisse ergaben hinsichtlich der Expression von Nitrotyrosin keinen signifikanten Unterschied. Sowohl im tumorfreien Nierennormalgewebe als auch im Tumor färbten sich die Zellen diffus an. Auch der Vergleich von nekrosefreien zu nekrotischen Tumoren erbrachte keinen Unterschied. In den Abbildungen 17 A und B sind typische Beispiele dargestellt.



Abbildungen 17 A-B: Nitrotyrosin-Immunhistochemie (Peroxidasefärbung mit DAB-Chromogen). Ein Vergleich zwischen Tumoren ohne Nekrose (A, Fall 5) und Tumoren mit Nekrose (B, Fall 14) erbrachte keinen Unterschied in der Expression. (*) markiert eine Nekrose, (*) den Nekroserand.

4.5 Analyse der Nitritkonzentration

Die Ergebnisse belegen eine niedrige Nitritkonzentration im tumorfreien Nierennormalgewebe. Der Vergleich mit nekrosefreien Grad-1- bis Grad-2-Tumoren zeigte einen signifikanten Unterschied (Newman-Keuls-Multiple-Comparison-Test, $p < 0,001$). Im Gegensatz dazu ergab sich beim Vergleich von tumorfreiem Nierennormalgewebe mit nekrotischen Grad-3- bis Grad-4-Tumoren kein signifikanter Unterschied (Newman-Keuls-Multiple-Comparison-Test, $p > 0,05$). Beim Vergleich von nekrosefreien Grad-1- und Grad-2-Tumoren mit nekrotischen Grad-3- bis Grad-4-Tumoren konnte wiederum ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (Newman-Keuls-Multiple-Comparison-Test, $p < 0,05$) (Abbildung 18 und Tabelle 15).

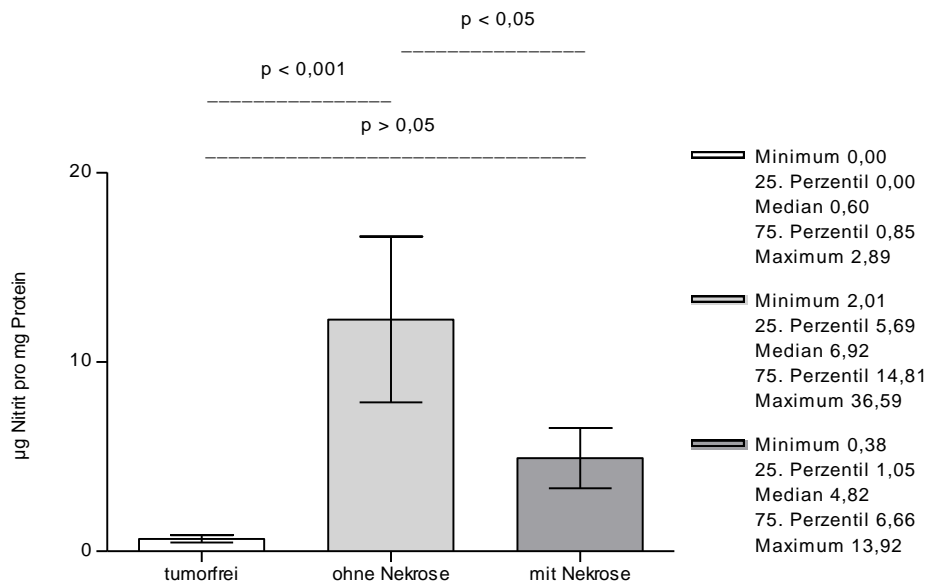


Abbildung 18: Nitritgehalt in Mikrogramm pro Milligramm Protein. Beim Vergleich von tumorfreiem Nierennormalgewebe mit nekrosefreien Tumoren zeigte sich ein signifikanter Unterschied (Newman-Keuls-Multiple-Comparison-Test, $p < 0,001$), zudem beim Vergleich von Tumoren mit versus ohne Nekrose (Newman-Keuls-Multiple-Comparison-Test, $p < 0,05$).

Nitritgehalt in µg/mg Protein					
tumorfrees Gewebe		Tumoren ohne Nekrose		Tumoren mit Nekrose	
Fall 6	0,60	Fall 1	14,81	Fall 6	5,01
Fall 12	0,66	Fall 2	36,59	Fall 12	1,12
Fall 13	0,72	Fall 4	12,88	Fall 13	4,63
Fall 14	0,00	Fall 7	5,69	Fall 14	0,38
Fall 15	0,95	Fall 8	6,92	Fall 15	8,25
Fall 22	0,55	Fall 9	6,78	Fall 22	0,97
Fall 23	0,85	Fall 21	2,01	Fall 23	5,06

Tabelle 15: Der höchste Nitritgehalt fand sich in gut bis mäßig differenzierten Tumoren ohne Nekrose.

5 DISKUSSION

In der vorliegenden Studie sollte das Makrophageninfiltrat im humanen Nierenzellkarzinom hinsichtlich der Verteilung von Makrophagen, des Auftretens von Hypoxie und eines möglichen Einflusses auf die Expression und Funktion der iNOS untersucht werden.

Im Vergleich zu nekrosefreien Nierenzellkarzinomen zeigen Nierenzellkarzinome mit spontanen Nekrosen eine erhöhte Makrophagendichte und Akkumulation von Makrophagen im perinekrotischen Randsaum.

Das Nierenzellkarzinom gehört neben dem Mammakarzinom, dem malignen Melanom und dem Kolonkarzinom zu den am stärksten von Immunzellen infiltrierten Tumoren. Dabei wird der Hauptanteil des Immuninfiltrates von Monozyten und Makrophagen repräsentiert (Balch et al. 1990). Virchow beschrieb erstmals die Präsenz von Leukozyten in humanen Tumoren. Er verstand deren Anwesenheit als Tumorangriff und assoziierte dies mit einer frühen chronischen Entzündung (Rees and Parry 1992).

Banner et al. (1990) zeigten, dass Nierenzellkarzinome in fortgeschrittenen Tumorstadien mit einer erhöhten Dichte an Makrophagen assoziiert sind. Sie wiesen in wenig differenzierten Karzinomen im Vergleich zu mäßig und gut differenzierten Tumoren eine signifikant erhöhte Makrophageninfiltration nach. Hemmerlein et al. (2000) zeigten, dass bestimmte Aktivierungsformen von tumorassoziierten Makrophagen mit dem Malignitätsgrad und einem fortgeschrittenen Tumorstadium korreliert sind. Darüber hinaus konnte in Nierenzellkarzinomen gezeigt werden, dass Tumornekrosen mit einem höheren Malignitätsgrad assoziiert sind (Hemmerlein et al. 2001). In Lungenkarzinomen wurde im Vergleich zum Lungengewebe gesunder Patienten keine erhöhte Dichte an CD68-positiven Makrophagen nachgewiesen (Endress et al. 1997). Im Endometriumkarzinom korrelierte eine erhöhte Dichte von tumorassoziierten Makrophagen mit einem niedrigen histologischen Differenzierungsgrad und einer schlechten Prognose (Salvesen and Asklen 1999). In Plattenepithelkarzinomen der Zervix konnte dieser Zusammenhang nicht nachgewiesen werden (Davidson et al. 1999). Eine hohe Infiltration von tumorassoziierten Makrophagen ohne Korrelation zum Tumorstadium

beziehungsweise histologischen Differenzierungsgrad zeigte sich im Mamma- und Kolonkarzinom (Rees and Parry 1992). Im Dickdarmkarzinom fanden Hauptmann et al. (1994) eine erhöhte Dichte von tumorassoziierten Makrophagen im Vergleich zur korrespondierenden tumorfreien Darmmukosa. Im Prostatakarzinom zählte man ebenfalls eine erhöhte Makrophagendichte (Lissbrant et al. 2000).

Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass in nekrotischen Tumoren, insbesondere im perinekrotischen Randsaum, CD68-positive Makrophagen akkumulieren. Bereits Lewis CE und Pollard (2006) erkannten, dass tumorassoziierte Makrophagen am Rande hypoxischer Nekrosen akkumulieren, an denen sie immobilisiert werden. Im Gegensatz dazu zeigt sich in nekrosefreien Tumoren eine niedrigere Makrophagendichte. Demnach scheinen in Abhängigkeit vom histologischen Malignitätsgrad und dem damit assoziierten aggressiveren Wachstum nekrotische Tumoren vermehrt Makrophagen zu rekrutieren. Unter Hypoxie werden vermehrt chemotaktische Substanzen freigesetzt, die Makrophagen in perinekrotische Areale locken (Turner et al. 1999).

Der Gefäßabstand ist in nekrosefreien Tumoren signifikant geringer als in Tumoren mit Nekrose.

Hemmerlein et al. (2001) und Yildiz et al. (2008) beobachteten, dass hypoxische Tumornekrosen mit einer signifikant erniedrigten Gefäßdichte und einem niedrigen histologischen Differenzierungsgrad assoziiert sind. Eine Zunahme der Gefäßdichte bei steigendem Malignitätsgrad und zunehmender Tumorgröße konnte beim Rektumkarzinom beobachtet werden (Rasheed et al. 2009). Als Marker für eine frühzeitige Tumorprogression zogen Weidner et al. (1991) beim Mammakarzinom und Choi et al. (1998) beim Kolonkarzinom die Gefäßdichte heran. Auch beim Prostatakarzinom korrelierten Weidner et al. (1993) die Gefäßdichte mit der Tumorprogression. Ein Zusammenhang mit einer frühen Metastasierung konnte bislang nicht gezeigt werden (Slaton et al. 2001).

Mit Hilfe von Sauerstoffmikroelektroden und hypoxiespezifischen Markern wurden in vielen humanen Tumorarten, zum Beispiel der Mamma, Zervix und des Gehirns, hypoxische und anoxische Areale nachgewiesen (Raleigh et al. 2001). Während sich im gesunden Gewebe typischerweise ein Sauerstoffgehalt von 30 bis 70 Millimeter

Quecksilbersäule zeigt, kann in vielen Gebieten solider Tumoren nur ein durchschnittlicher Sauerstoffgehalt von weniger als zehn Millimeter Quecksilbersäule nachgewiesen werden. Durch die rapide Tumorexpansion und den Sauerstoffverbrauch der Tumorzellen um neue Blutgefäße herum kommt es zur Ausbildung hypoxischer Areale. Sobald ein hypoxischer Schwellenwert erreicht wird, resultiert ein Proliferationsstopp der Tumorzellen in diesen Arealen. Zur Energiegewinnung erfolgt die Umstellung auf die anaerobe Glykolyse (Brown 2000).

Vorliegende Ergebnisse zeigen, dass die Gefäßabstände in nekrosefreien Tumoren signifikant geringer sind als in Tumoren mit Nekrose. Folglich kann die Versorgung des Tumors nicht mehr aufrechterhalten werden, da der erhöhte Gefäßabstand einen höheren Diffusionsgradienten bedingt. Hypoxie und Tumornekrosen resultieren. Gründe für die erhöhten Gefäßabstände im Nierenzellkarzinom könnten einerseits in einer physiologischen Gefäßregression liegen, andererseits beispielsweise in der Hemmung proangiogenetischer Faktoren, zum Beispiel durch eine vermehrte Stickstoffmonoxidanreicherung. Stickstoffmonoxid ist in hohen Konzentrationen toxisch, so dass die Hemmung der Angiogenese die Folge sein könnte.

HIF-1 α wird im perinekrotischen Randsaum unter Hypoxie nicht vermehrt exprimiert.

Das Heterodimer HIF-1 α besteht aus zwei Untereinheiten, die unter hypoxischen Bedingungen zu einem Komplex dimerisieren und an Hypoxie-Response-Elemente binden. Die α -Untereinheit wird sauerstoffabhängig reguliert und ist nur unter hypoxischen Bedingungen stabil, die β -Untereinheit wird dagegen konstant exprimiert. Unter Sauerstoffzufuhr wird die HIF-1 α -Expression nahezu eingestellt (Shih and Claffey 1998).

HIF-1 α besitzt die Fähigkeit an DNA zu binden und spielt unter hypoxischen Bedingungen als Transkriptionsfaktor diverser Schlüsselgene eine wichtige Rolle in der Regulierung von Genen, die für die Angiogenese im Tumor (VEGF), den Glukosetransport (Glut 1 und Glut 3), die Glykolyse (6-Phosphofruktose-2-Kinase), die pH-Kontrolle (Carboanhydrasen), die Tumorprogression beziehungsweise epitheliale Proliferation (TGF- α), die Metastasierung und die Apoptoseinitiierung verantwortlich sind (Shih and Claffey 1998, Grabmaier et al. 2000). Auch die

Carboanhydrase IX hat während der Hypoxie eine regulierende Rolle in der Zellproliferation und ist zudem in die Onkogenese und Tumorprogression involviert (Wykoff et al. 2000). Die Hypoxie ist somit ein wichtiger Regulator in einem Netzwerk von Genexpressionen und besitzt die Fähigkeit, Gene sowohl zu stimulieren als auch zu hemmen und ihre Expression posttranskriptional zu beeinflussen (Hockel and Vaupel 2001).

Vorliegende Ergebnisse zeigen eine eher diffuse HIF-1 α -Expression sowohl im gesunden Nierennormalgewebe als auch im Tumorgewebe ohne signifikante Hochregulation in hypoxischen Tumorrandgebieten. In einigen Karzinomen konnte jedoch eine entsprechende perinekrotische Hochregulation beobachtet werden. Dies lässt Rückschlüsse darauf ziehen, dass in diesen Tumoren HIF-1 α infolge von Mutationen im Von-Hippel-Lindau-Gen nicht degradiert und deshalb insbesondere in perinekrotischen Arealen relativ stark exprimiert wird. Somatische Mutationen im Von-Hippel-Lindau-Gen spielen eine Rolle in der Entwicklung von sporadischen Nierenzellkarzinomen. In diesen Fällen können der Verlust eines Allels, Mutationen oder Inaktivierungen anderer Allele nachgewiesen werden (Anglard et al. 1991, Gnarra et al. 1994).

Das Von-Hippel-Lindau-Gen, ein klassisches Tumorsuppressorgen, befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom drei (3p25) (Kovacs et al. 1988) und reguliert die Expression von HIF-1 α (Harris 2002, Semenza 2002). Unter physiologischen Bedingungen hydroxyliert HIF-1 α an die Aminosäure Prolin oder Asparagin und wird nach Bindung an das Von-Hippel-Lindau-Gen degradiert. Demzufolge hat HIF-1 α eine sehr kurze Halbwertszeit und ist gewöhnlich unter normoxischen Bedingungen nicht nachweisbar. Im Gegensatz dazu bindet unter hypoxischen Bedingungen die unhydroxylierte Form von HIF-1 α nicht an das Von-Hippel-Lindau-Gen und wird demzufolge auch nicht degradiert. Aus diesem Grund kann eine HIF-1 α -Überexpression in Tumoren, Metastasen und selten auch in gesunden Geweben beobachtet werden (Zhong et al. 1999).

Man betrachtet die Inzidenz von Nekrosen im Tumor als einen wichtigen prognostischen Faktor im Hinblick auf den Verlauf maligner Erkrankungen, wobei die Nekrosenausprägung als Zeichen für Tumoren mit einem aggressiven Phänotyp verstanden wird (Leek et al. 1999). Seit 1990 ist bekannt, dass die Hypoxie für den

schnellen Progress vieler Tumoren, darunter auch das Nierenzellkarzinom, verantwortlich ist (Vaupel and Hockel 2000, Hockel and Vaupel 2001). Unter anderen sahen Gray et al. (1953) darin auch ein therapeutisches Problem, da sich herausstellte, dass Hypoxie solide Tumoren widerstandsfähiger gegen die Effekte der Strahlentherapie macht.

Fasst man die Daten zusammen, so zeigt sich ein Zusammenhang zwischen niedriger Gefäßdichte, Tumornekrosen und erhöhtem Makrophageninfiltrat.

Immunzellen können mittels zytotoxischer Moleküle Tumorgefäße attackieren und letztendlich eine Tumorphoxie induzieren. Roitt et al. (1991) und Nishihara et al. (1995) beschrieben, dass es durch Freisetzung lysosomaler Enzyme, Zytokine, Sauerstoffmetaboliten und zytotoxischer Faktoren zu einer Destabilisierung der Tumorzellmembran und letztendlich zur Tumorzelllyse kommt. Zudem inhibiert die Sekretion von Prostaglandinen, Interleukin-1 und TNF- α die Tumorzellteilung (Auger and Ross 1992). Die durch das Immuninfiltrat vermittelten Tumornekrosen sind möglicherweise auf eine Schädigung von Blutgefäßen durch TNF- α zurückzuführen, weniger auf die direkte Wirkung von TNF- α gegen Tumorzellen (Roitt et al. 1991) und somit auch Ausdruck einer indirekt vermittelten Hypoxie. Dies spielt für das Nierenzellkarzinom wahrscheinlich keine Rolle, weil dieses zwar mit einer reduzierten Gefäßdichte assoziiert ist, aber Endothelapoptosen oder Gefäßnekrosen beziehungsweise -thrombosen nicht beobachtet werden.

Somit könnte folgendes Modell postuliert werden: insbesondere immunogen wirkende Tumoren, wie das Nierenzellkarzinom, weisen eine erhöhte Dichte an tumorassoziierten Makrophagen und anderen Immunzellen auf. Diese Zellpopulation ist in ihrer Tumorzytotoxizität inhibiert, jedoch in der Lage, das Tumorstroma, speziell die Gefäßversorgung, zu attackieren, wodurch im Verlauf des Tumorwachstums eine Gefäßregression induziert wird, die zu Tumornekrosen führt, welche wiederum Immunzellen rekrutieren. Diese modulieren einerseits das Stroma und fördern andererseits über entsprechende Wachstumsfaktoren das Tumorzellwachstum.

Das Ausmaß der Protein- und mRNA-Expression der iNOS ist im Nierenzellkarzinom unabhängig vom Auftreten von Nekrosen und höher als im korrespondierenden, tumorfreien Nierennormalgewebe. α -Actinin-4 wird

konstant exprimiert. Die Nitritkonzentration als Ausdruck der Stickstoffmonoxidsynthaseaktivität ist im Nierenzellkarzinom mit Nekrose im Vergleich zu Tumoren ohne Nekrose erniedrigt.

Eine iNOS-Expression wurde in vielen soliden Tumoren gefunden (Mantovani et al. 1992), am häufigsten in tumorassoziierten Makrophagen, aber auch in Tumorzellen selbst (Gallo et al. 1998, Xu et al. 2002). Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen eine erhöhte iNOS-Expression im Tumorgewebe im Vergleich zum tumorfreien Nierennormalgewebe, die unabhängig von der Inzidenz von Nekrosen war. Die Stickstoffmonoxidsynthaseaktivität, gemessen als Nitritkonzentration, war im Tumorwebe signifikant gesteigert. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Aktivität in Karzinomen mit Nekrose im Vergleich zu Karzinomen ohne Nekrose signifikant reduziert war. Da Tumornekrosen überwiegend in schlechter differenzierten Karzinomen auftreten, kann geschlossen werden, dass insbesondere schlecht differenzierte Karzinome einen niedrigeren Nitritgehalt und eine supprimierte Stickstoffmonoxidsynthaseaktivität aufweisen. Ein Grund dafür könnte die Tumorphoxie sein. Stickstoffmonoxid ist in hohen Konzentrationen ein zytotoxisches Molekül und in niedriger Konzentration ein Botenstoff, der unter anderem die Gewebedurchblutung fördert. Daher kommt der Expression und Funktion von iNOS in malignen Tumoren eine besondere Bedeutung zu.

iNOS ist normalerweise durch α -Actinin-4 an das Zytoskelett gebunden. Daniliuc et al. (2003) konnten in vitro zeigen, dass unabhängig von der mRNA- und Proteinmenge an iNOS die Aktivität von iNOS und die Menge an gebildetem Stickstoffmonoxid unter Hypoxie drastisch reduziert wird. Die Dissoziation einer über α -Actinin-4 vermittelten Bindung an das Zytoskelett scheint hierfür maßgeblich zu sein. Das bedeutet, dass in hypoxischen Tumorarealen die Verbindung zwischen α -Actinin-4 des Zytoskelettes und iNOS unterbrochen wird. Dabei wird iNOS inaktiviert, ohne jedoch die Expression von iNOS beziehungsweise α -Actinin-4 zu beeinflussen. Die in vitro erhobenen Daten von Daniliuc et al. (2003) können durch die vorliegenden Befunde dahin gehend gestützt werden, dass iNOS wahrscheinlich durch Hypoxie inaktiviert wird.

Klotz et al. (1999) und Li and Xu (2005) fanden im Blasen- und Adenokarzinom des Magens eine signifikant erhöhte iNOS-Expression und korrelierten dies mit dem

histologischen Differenzierungsgrad. Xu et al. (2002) korrelierten eine hohe iNOS-Expression mit einem fortgeschrittenen Tumorgrad und Invasivität. Im Gegensatz dazu korrelierte in den hier vorliegenden Ergebnissen eine hohe iNOS-Expression weder mit einem invasiven Wachstum noch mit einem fortgeschrittenen Tumorgrad. Die Bedeutung der immunhistochemischen Quantifizierung der iNOS wird, unabhängig von den technischen Problemen dieser Methode, durch die hier verwendeten funktionellen Analysen relativiert.

Eine vermehrte Expression von α -Actinin-4 konnte beim Vergleich von Nierennormalgewebe mit Tumorgewebe weder auf Protein- noch auf mRNA-Ebene beobachtet werden. Im Gegensatz dazu beobachteten beispielsweise Honda et al. (1998) im Mammakarzinom und Fu et al. (2007) im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus eine erhöhte α -Actinin-4-Konzentration und assoziierten dies mit einem signifikant schlechteren Überleben beziehungsweise einem histologisch weit fortgeschrittenen Tumor. Entgegen dieser Aussagen ist beim Nierenzellkarzinom von keiner direkten prognostischen Bedeutung auszugehen. Auch Yamamoto et al. (2009) wiesen im Ovarialkarzinom eine erhöhte α -Actinin-4-Konzentration nach und korrelierten dies mit einem signifikant schlechteren Überleben und einem histologisch weit fortgeschrittenen Tumorstadium.

Nitrotyrosin markiert nitrifizierte Proteine im Gewebe und kann auch nachgewiesen werden, wenn kein Stickstoffmonoxid mehr vorhanden ist. Der Nachweis von Nitrotyrosin lässt somit lediglich die Aussage zu, dass Stickstoffmonoxid im Gewebe vorhanden war. Es kann weder eine Aussage über die Zeitdauer der Einwirkung noch über deren Effekte getroffen werden. Eine Überproduktion reaktiver Moleküle führt zu Zell- und DNA-Schäden.

Den vorliegenden Ergebnissen zur Folge scheint der Nachweis nitrifizierter Tyrosinreste an Proteinen nicht mit der Inzidenz und dem Ausmaß von Tumornekrosen und den damit einhergehenden hypoxischen Arealen zu korrelieren. Soini et al. (2006) korrelierten den Nachweis einer vermehrten Nitrotyrosin-Expression in Tumoren des Pankreas, des Ösophagus und auch im Nierenzellkarzinom mit einem aggressiven Phänotyp, mit Metastasierung und einem niedrigen Malignitätsgrad. Bancel et al. (2006) fanden bei ihren Untersuchungen am Adenokarzinom des Magens keine signifikante Korrelation bezüglich Invasivität,

Metastasierung und dem Nachweis von Nitrotyrosin. MacMillan-Crow et al. (2000) erkannten am Beispiel des Pankreaskarzinoms, dass es während der Tumorgenese zur Nitrierung von Tyrosinresten kommen kann und deuteten dies als Hinweis auf ein beschleunigtes Zellwachstum und erhöhte Aggressivität des Tumors.

eNOS wird im Tumor vermindert exprimiert.

eNOS ist die einzige Isoform, die Stickstoffmonoxid sowohl unter normoxischen als auch unter komplett anoxischen Bedingungen bilden kann (Mikula et al. 2009). Das bedeutet, dass eNOS auch unter physiologischen Bedingungen existiert und dauerhaft eine geringe Menge Stickstoffmonoxid produziert (Papapetropoulos et al. 1997, Dulak et al. 2000), welches die Endothelzellproliferation fördert, die Gefäßpermeabilität erhöht und die Angiogenese stimuliert. Eine wichtige Rolle bei der eNOS-Expression und -Aktivität spielt VEGF, dessen Anwesenheit zu einer dosisabhängigen Hochregulation in humanen Endothelzellen führt (Hood et al. 1998).

Mit den vorliegenden Ergebnissen kann eine signifikant erniedrigte eNOS-Expression in perinekrotischen Tumorendothelien im Vergleich zu Gefäßen nekrosefreier Tumoren belegt werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass perinekrotische Gefäße eine niedrigere eNOS-Expression aufweisen als Endothelien im Nierennormalgewebe. Auch Yu et al. (2006) erkannten in Endothelien kolorektaler Karzinome eine signifikant erniedrigte eNOS-Expression im Vergleich zum Normalgewebe. Lukes et al. (2008) dagegen beobachteten beim Tonsillenkarzinom im Vergleich zum Normalgewebe eine signifikant erhöhte eNOS-Expression. Auch in anderen Geweben wie dem Lungengewebe wurde unter hypoxischen Bedingungen eine Hochregulation der eNOS, sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene, beobachtet (Le Cras et al. 1996). Die Ursachen der unterschiedlichen Expressionsmuster sind bislang unklar.

6 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Studie sollte das Makrophageninfiltrat im humanen Nierenzellkarzinom hinsichtlich der Verteilung von Makrophagen, des Auftretens von Hypoxie und eines möglichen Einflusses auf die Expression und Funktion der iNOS untersucht werden.

1. Im Vergleich zu nekrosefreien Nierenzellkarzinomen zeigen Nierenzellkarzinome mit spontanen Nekrosen eine erhöhte Makrophagendichte und Akkumulation von Makrophagen im perinekrotischen Randsaum.
2. Der Gefäßabstand ist in nekrosefreien Tumoren signifikant geringer als in Tumoren mit Nekrose. HIF-1 α wird im perinekrotischen Randsaum unter Hypoxie nicht vermehrt exprimiert.
3. Das Ausmaß der Protein- und mRNA-Expression der iNOS ist in Nierenzellkarzinomen unabhängig vom Auftreten von Nekrosen und höher als im korrespondierenden, tumorfreien Nierennormalgewebe. α -Actinin-4 wird konstant exprimiert. Die Nitritkonzentration als Ausdruck der Stickstoffmonoxidsynthaseaktivität ist in Nierenzellkarzinomen mit Nekrose im Vergleich zu Tumoren ohne Nekrose erniedrigt.

Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass Hypoxie ein generelles Phänomen, insbesondere in fortgeschrittenen, malignen Tumoren, darstellt. HIF-1 α ist dabei im Nierenzellkarzinom kein verlässlicher Hypoxiemarker. Unter Einbeziehung der Ergebnisse von Daniliuc et al. (2003) kann geschlossen werden, dass Hypoxie auch in vivo die Aktivität der Stickstoffmonoxidsynthasen, speziell der iNOS, supprimiert.

Somit könnte folgendes Modell postuliert werden: insbesondere immunogen wirkende Tumoren, wie das Nierenzellkarzinom, weisen per se eine höhere Infiltrationsdichte an Leukozyten, speziell Makrophagen, auf, die perinekrotisch akkumulieren. Hypoxie inaktiviert iNOS, wodurch die Sekretion zytotoxischer Konzentrationen von Stickstoffmonoxid verhindert wird. Die reduzierte Gefäßdichte im Tumorprogress ist möglicherweise auf eine Regression von Tumorgefäßen zurückzuführen, da Hypoxie und die im Von-Hippel-Lindau-Gen mutierten Nierenzellkarzinome über HIF-1 α und VEGF die Angiogenese stimulieren müssten.

Möglicherweise wird diese Regression durch makrophagenabhängige Zytokine, wie beispielsweise $\text{TNF-}\alpha$, begünstigt. Hypoxie und hypoxische Nekrosen rekrutieren weitere Makrophagen, die in ihrer Tumorzytotoxizität blockiert sind. Durch Wachstumsfaktoren wird das Überleben der Tumorzellen gestützt und die Entwicklung hypoxiestabiler metastasierungsfähiger Zellklone gefördert.

Ziel weiterer Untersuchungen muss es sein, die Hypothese der Gefäßregression experimentell-morphologisch zu untermauern und die Induktoren der Regression zu identifizieren.

7 ANHANG: TABELLEN 1, 2, 8, 10

Antikörper	CD68	CD31	HIF-1 α	eNOS	iNOS	α -Actinin-4	Nitrotyrosin
Klon	monoklonal	monoklonal	monoklonal	polyklonal	polyklonal	polyklonal	polyklonal
Spezies	Maus anti-human	Maus anti-human	Maus anti-human	Kaninchen anti-human	Kaninchen anti-Maus	Kaninchen anti-human	Kaninchen anti-Maus
Lokalisation	Zytoplasma	Zellmembran	Nukleus	Zytoplasma	Zytoplasma	Zytoplasma	Zytoplasma
Hersteller	Dako, Hamburg	Dako, Hamburg	Lab Vision Corporation, Westinghouse	Lab Vision Corporation, Westinghouse	Lab Vision Corporation, Westinghouse	Alexis [®] Biochemicals, San Diego	Chemicon [®] International, Temecula

Tabelle 1: Verwendete Antikörper.

Primärantikörper	CD68	CD31	HIF-1 α	eNOS	iNOS	α -Actinin-4	Nitrotyrosin
	1/10.000 1 h	1/50 1 h	1/50 24 h bei 4°C	1/100 2 h	1/100 2 h	1/50 2 h	1/100 1 h
Hitzevorbehandlung	-	-	1 h (1)	-	-	-	-
H ₂ O ₂ (3 %)	20 min (2)	20 min (2)	10 min (2)	20 min (2)	20 min (2)	20 min (2)	10 min (2)
FCS-BSA (0,5 %)	20 min (3)	15 min (3)	10 min (3)	20 min (3)	20 min (3)	20 min (3)	10 min (3)
EnVision Peroxidase™	1 h (4)	1 h (4)	1 h (4)	1 h (4)	1 h (4)	30 min (4)	1 h (4)
Chromogen	DAB 20 min (4)	VIP 20 min (4)	VIP 20 min (4)	DAB 20 min (4)	DAB 20 min (4)	DAB nach Sicht (4)	DAB 20 min (4)
Mayer`s Hämlaun	3 min	3 min	-	3 min	3 min	3 min	3 min

Tabelle 2: Färbekurzprotokoll für die Immunhistochemie. (1) Antigendemaskierung im kochenden Citrat-Puffer. (2) Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität und (3) unspezifischer Antikörperbindungen. (4) Detektion des Primärantikörpers mittels EnVision Peroxidase™, anti-Kaninchen (Dako, Hamburg) und DAB- beziehungsweise VIP-Chromogen.

Fall	Geschlecht	Alter (Jahre)	Tumorgroße (cm)	pT	pN	pM	Organstadium	Malignitätsgrad	Nekrose	Tumortyp
1	m	48	5,5	1b	x	x	lokalisiert	1	nein	klarzellig
2	m	57	5,5	1b	x	x	lokalisiert	1	nein	klarzellig
3	m	76	6	1b	x	x	lokalisiert	1	nein	klarzellig
4	m	48	3,8	3b	x	x	fortgeschritten	2	nein	klarzellig
5	m	76	3,5	3b	x	x	fortgeschritten	2	nein	klarzellig
6	m	66	8,5	2	x	x	lokalisiert	2	ja	klarzellig
7	w	69	4,5	1b	x	x	lokalisiert	2	nein	klarzellig
8	w	74	8	3a	0	x	fortgeschritten	2	nein	klarzellig
9	w	64	8	3b	2	1	fortgeschritten	2	nein	chromophob
10	m	74	10	2	x	x	lokalisiert	2	nein	papillär
11	m	78	5,5	3a	x	x	fortgeschritten	2	nein	klarzellig
12	m	83	12	3b	x	x	fortgeschritten	3	nein	klarzellig
13	w	53	12	3b	2	x	fortgeschritten	3	ja	Duct-Bellini
14	m	70	8,5	3b	x	1	fortgeschritten	3	ja	klarzellig
15	m	60	7,5	3b	x	x	fortgeschritten	3	ja	klarzellig
16	w	68	6	3b	x	x	fortgeschritten	3	ja	klarzellig
17	m	79	13	3b	x	x	fortgeschritten	3	ja	klarzellig
18	m	68	7	2	x	x	lokalisiert	3	nein	klarzellig
19	w	46	12	3a	2	x	fortgeschritten	3	ja	klarzellig
20	m	59	9	2	0	x	lokalisiert	3	ja	klarzellig
21	m	76	6,5	3b	x	x	fortgeschritten	3	nein	klarzellig
22	m	74	16	4	x	x	fortgeschritten	4	ja	klarzellig
23	w	69	7,5	3a	2	x	fortgeschritten	4	ja	sarkomatös

Tabelle 8: Falldaten Patientenkollektiv.

Fall	mittlere Gefäßabstände (µm)	Organstadium	Nekrose (%)	Tumorgröße (cm)
1	23,03	lokalisiert	-	5,50
2	35,04	lokalisiert	-	5,50
3	29,41	lokalisiert	-	6,00
4	32,52	fortgeschritten	-	3,80
5	31,37	fortgeschritten	-	3,50
6	78,76	lokalisiert	21,08	8,50
7	34,20	lokalisiert	-	4,50
8	45,81	fortgeschritten	-	8,00
9	58,00	fortgeschritten	-	8,00
12	42,64	fortgeschritten	-	12,00
14	49,27	fortgeschritten	16,96	8,50
15	42,20	fortgeschritten	50,32	7,50
16	51,12	fortgeschritten	0,11	6,00
17	49,86	fortgeschritten	8,02	13,00
18	39,59	lokalisiert	-	7,00
19	53,21	fortgeschritten	11,80	12,00
21	80,11	fortgeschritten	-	6,50
22	112,20	fortgeschritten	0,10	16,00

Tabelle 10: Quantifizierung der Gefäßabstände.

8 LITERATURVERZEICHNIS

Anglard P, Tory K, Brauch H, Weiss GH, Latif F, Merino MJ, Lerman MI, Zbar B, Linehan WM (1991): Molecular analysis of genetic changes in the origin and development of renal cell carcinoma. *Cancer Res*; 51(4):1071-1077

Auger MJ and Ross JA: The biology of the macrophage; in: "The Macrophage", von Lewis CE and McGee JO`D. Oxford University Press, New York 1992; 1-74

Balch CM, Riley LB, Bae YJ, Salmeron MA, Platsoucas CD, von Eschenbach A, Itoh K (1990): Patterns of human tumor-infiltrating lymphocytes in 120 human cancers. *Arch Surg*; 125(2):200-205

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

Bancel B, Esteve J, Souquet JC, Toyokuni S, Ohshima H, Pignatelli B (2006): Differences in oxidative stress dependence between gastric adenocarcinoma subtypes. *World J Gastroenterol*; 12(7):1005-1012

Banner BF, Burnham JA, Bahnson RR, Ernstoff MS, Auerbach HE (1990): Immunophenotypic markers in renal cell carcinoma. *Mod Pathol*; 3(2):129-134

Brennan PA, Palacios-Callender M, Zaki GA, Spedding AV, Langdon JD (2001): Type II nitric oxide synthase (NOS2) expression correlates with lymph node status in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*; 30(3):129-134

Brown JM (2000): Exploiting the hypoxic cancer cell: mechanisms and therapeutic strategies. *Mol Med Today*; 6(4):157-162

Brown JM and Giaccia AJ (1998): The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Res*; 58(7):1408-1416

Chiarugi V, Magnelli L, Chiarugi A, Gallo O (1999): Hypoxia induces pivotal tumor angiogenesis control factors including p53, vascular endothelial growth factor and the NFkappaB-dependent inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2. *J Cancer Res Clin Oncol*; 125(8-9):525-528

Choi HJ, Hyun MS, Jung GJ, Kim SS, Hong SH (1998): Tumor angiogenesis as a prognostic predictor in colorectal carcinoma with special reference to mode of metastasis and recurrence. *Oncology*; 55(6):575-581

Connelly L, Jacobs AT, Palacios-Callender M, Moncada S, Hobbs AJ (2003): Macrophage endothelial nitric-oxide synthase autoregulates cellular activation and pro-inflammatory protein expression. *J Biol Chem*; 278(29):26480-26487

Daniliuc S, Bitterman H, Rahat MA, Kinarty A, Rosenzweig D, Lahat N (2003): Hypoxia inactivates inducible nitric oxide synthase in mouse macrophages by disrupting its interaction with alpha-actinin-4. *J Immunol*; 171(6):3225-3232

Davidson B, Goldberg I, Gotlieb WH, Lerner-Geva L, Ben-Baruch G, Agulansky L, Novikov I, Kopolovic J (1999): Macrophage infiltration and angiogenesis in cervical squamous cell carcinoma-clinicopathologic correlation. *Acta Obstet Gynecol Scand*; 78(3):240-244

Dulak J, Jozkowicz A, Dembinska-Kiec A, Guevara I, Zdzienicka A, Zmudzinska-Grochot D, Florek I, Wojtowicz A, Szuba A, Cooke JP (2000) : Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 20(3):659-666

Elgert KD, Alleva DG, Mullins DW (1998): Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection. *J Leukoc Biol*; 64(3):275-290

Endress H, Freudenberg N, Fitzke E, Grahmann PR, Hasse J, Dieter P (1997): Infiltration of lung carcinomas with macrophages of the 27E10-positive phenotype. *Lung Cancer*; 18(1):35-46

Folkman J (1971): Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*; 285(21):1182-1186

Fox SB, Gatter KC, Leek RD, Harris AL, Chew KL, Mayall BH, Moore DH (2000): More about: Tumor angiogenesis as a prognostic assay for invasive ductal breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*; 92(2):161-162

Fu L, Qin YR, Xie D, Chow HY, Ngai SM, Kwong DL, Li Y, Guan XY (2007): Identification of alpha-actinin-4 and 67 kDa laminin receptor as stage-specific markers in esophageal cancer via proteomic approaches. *Cancer*; 110(12):2672-2681

Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C (1982): Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*; 6(7):655-663.

Gallo O, Masini E, Morbidelli LJ, Franchi A, Fini-Storchi I, Vergari WA, Ziche M (1998): Role of nitric oxide in angiogenesis and tumor progression in head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst*; 90(8):587-596

Gnarra JR, Tory K, Weng Y, Schmidt L, Wei MH, Li H, Latif F, Liu S, Chen F, Duh FM (1994): Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet*; 7(1):85-90

Grabmaier K, Vissers JL, De Weijert MC, Oosterwijk-Wakka JC, Van Bokhoven A, Brakenhoff RH, Noessner E, Mulders PA, Merks G, Figdor CG, Adema GJ and Oosterwijk E (2000): Molecular cloning and immunogenicity of renal cell carcinoma-associated antigen G250. *Int J Cancer*; 85(6):865-870

Gray LH, Conger AD, Ebert M, Hornsey S, Scott OC (1953): The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Br J Radiol*; 26(312):638-648

Harris AL (2002): Hypoxia - a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer*; 2(1):38-47

Hauptmann S, Zwadlo-Klarwasser G, Hartung P, Klosterhalfen B, Kirkpatrick CJ, Mittermayer C (1994): Association of different macrophage phenotypes with infiltrating and non-infiltrating areas of tumor-host interface in colorectal carcinoma. *Pathol Res Pract*, 190(2):159-167

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(9): 485-492

Hemmerlein B, Kugler A, Ozisik R, Ringert R H, Radzun H J, Thelen P (2001): Vascular endothelial growth factor expression, angiogenesis, and necrosis in renal cell carcinoma. *Virchows Arch*; 439(5):645-652

Hockel M and Vaupel P (2001): Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst*; 93(4):266-276

Honda K, Yamada T, Endo R, Ino Y, Gotoh M, Tsuda H, Yamada Y, Chiba H, Hirohashi S (1998): Actinin-4, a novel actin-bundling protein associated with cell motility and cancer invasion. *J Cell Biol*; 140(6):1383-1393

Hood JD, Meininger CJ, Ziche M, Granger HJ (1998): VEGF upregulates eNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. *Am J Physiol*; 274(3):1054-1058

Klotz T, Bloch W, Jacobs G, Niggemann S, Engelmann U, Addicks K (1999): Immunolocalization of inducible and constitutive nitric oxide synthases in human bladder cancer. *Urology*; 54(3):416-419

Kovacs G, Wilkens L, Papp T (1988): Nondisjunction reduplication of chromosome 3 is not a common mechanism in the development of human renal cell tumors. *Cytogenet Cell Genet*; 48(4):242-243

Le Cras TD, Xue C, Rengasamy A, Johns RA (1996): Chronic hypoxia upregulates endothelial and inducible NO synthase gene and protein expression in rat lung. *Am J Physiol*; 270(1):164-170

Lee VY, McClintock DS, Santore MT, Budinger GRS, Chandel NS (2002): Hypoxia sensitizes cells to nitric oxide-induced apoptosis. *J Biol Chem*; 277(18):16067-16074

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(5-6):991-995

Leek RD, Hunt NC, Landers RJ, Lewis CE, Royds JA, Harris AL (2000): Macrophage infiltration is associated with VEGF and EGFR expression in breast cancer. *J Pathol*; 190(4):430-436

Lewis CE and Pollard JW (2006): Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res*; 66(2):605-612

Lewis JS, Lee JA, Underwood JC, Harris AL, Lewis CE (1999): Macrophage responses to hypoxia: relevance to disease mechanisms. *J Leukoc Biol*; 66(6):889-900

Li LG and Xu HM (2005): Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine and apoptosis in gastric adenocarcinomas and their correlation with a poor survival. *World J Gastroenterol*; 11(17):2539-2544

Lissbrant IF, Stattin P, Wikstrom P, Damber JE, Egevad L, Bergh A (2000): Tumor associated macrophages in human prostate cancer: relation to clinicopathological variables and survival. *Int J Oncol*; 17(3):445-451

Lukes P, Páková H, Kucera T, Veselý D, Martinek J, Astl J (2008): Expression of endothelial and inducible nitric oxide synthase and caspase-3 in tonsillar cancer, chronic tonsillitis and healthy tonsils. *Folia Biol (Praha)*; 54(5):141-145

MacMillan-Crow LA, Greendorfer JS, Vickers SM, Thompson JA (2000): Tyrosine nitration of c-SRC tyrosine kinase in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Arch Biochem Biophys*; 377(2):350-356

Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L (1992): The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunology Today*; 13(7):265-270

Mikula I, Durocher S, Martasek P, Mutus B, Slama-Schwok A (2009): Isoform-specific differences in the nitrite reductase activity of nitric oxide synthases under hypoxia. *J Biochem*; 418(3):673-682

Murdoch C, Giannoudis A, Lewis CE (2004): Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood*; 104(8):2224-2234

Newman PJ, Berndt MC, Gorski J, White GC, Lyman S, Paddock C, Muller WA (1990): PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science*; 247:1219-1222

Nishihara K, Barth RF, Wilkie N, Lang JC, Oda Y, Kikuchi H, Everson MP, Lotze MT (1995): Increased in vitro and in vivo tumoricidal activity of a macrophage cell line genetically engineered to express IFN-gamma, IL-4, IL-6, or TNF-alpha. *Cancer Gene Ther*; 2(2):113-124

Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Madri JA, Sessa WC (1997): Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest*; 100(12):3131-3139

Raleigh JA, Chou SC, Bono EL, Thrall DE, Varia MA (2001): Semiquantitative immunohistochemical analysis for hypoxia in human tumors. *Int J Oncol Biol Phys Radiat*; 49(2):569-574

Rasheed S, Harris AL, Tekkis PP, Turley H, Silver A, McDonald PJ, Talbot IC, Glynne-Jones R, Northover JM, Guenther T (2009): Assessment of microvessel density and carbonic anhydrase-9 (CA-9) expression in rectal cancer. *Pathol Res Pract*; 205(1):1-9

Rees RC and Parry H: Macrophages in tumor immunity; in: "The Macrophage", von Lewis CE and McGee JO`D. Oxford University Press, New York 1992; 315-358

Roitt IM, Vrostoff J, Male DK: Kurzes Lehrbuch der Immunologie, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York 1991

Salvesen HB and Asklen LA (1999): Significance of tumor-associated macrophages, vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 expression for tumor angiogenesis and prognosis in endometrial carcinomas. *Int J Cancer*; 84(5):539-543

Savarese DM, Valinski H, Quesenberry P, Savarese T (1998): Expression and function of colony-stimulating factors and their receptors in human prostate carcinoma cell lines. *Prostate*; 34(2):80-91

Semenza G (2002): HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med*; 8(4):62-67

Shih S and Claffey KP (1998): Hypoxia-mediated regulation of gene expression in mammalian cells. *Int J Exp Pathol*; 79(6):347-357

Sica A, Saccani A, Mantovani A (2002): Tumor-associated macrophages: a molecular perspective. *Int Immunopharmacol*; 2(8):1045-1054

Slaton JW, Inoue K, Perrotte P (2001) : Expression levels of genes that regulate metastasis and angiogenesis correlate with advanced pathological stage of renal cell carcinoma. *Am J Pathol*; 158(2):735-743

Soini Y, Kallio JP, Hirvikoski P, Helin H, Kellokumpu-Lehtinen P, Kang SW, Tammela TL, Peltoniemi M, Martikainen PM, Kinnula VL (2006): Oxidative/nitrosative stress and peroxiredoxin 2 are associated with grade and prognosis of human renal carcinoma. *APMIS*; 114(5):329-337

Turner L, Scotton C, Negus R, Balkwill F (1999): Hypoxia inhibits macrophage migration. *Eur J Immunol*; 29(7):2280-2287

van den Hove LE, van Gool SW, van Poppel H, Baert L, Coorevits L, van Damme B, Ceuppens JL (1997): Phenotype, cytokine production and cytolytic capacity of fresh (uncultured) tumour-infiltrating T lymphocytes in human renal cell carcinoma. *Clin Exp Immunol*; 109(3):501-509

Valdez JC, de Alderete N, Meson OE, Sirena A, Perdigon G (1990): Comparative activation states of tumor-associated and peritoneal macrophages from mice bearing an induced fibrosarcoma. *Immunobiology*; 181(4-5):276-287

Vaupel P and Hockel M (2000): Blood supply, oxygenation status and metabolic micromilieu of breast cancers: characterization and therapeutic relevance. *Int J Oncol*; 17(5):869-879

Vaupel P, Kelleher DK, Hockel M (2001): Oxygenation status of malignant tumors: Pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy. *Semin Oncol*; 28:29-35

Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J (1991): Tumor angiogenesis and metastasis - correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med*; 324(1):1-8

Weidner N, Carroll PR, Flax J, Blumfeld W, Folkman J (1993): Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol*; 143(2):401-409

Wittekind CH, Meyer H-J, Bootz F: UICC: TNM Klassifikation maligner Tumoren, 6. Auflage, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 2002

Wykoff CC, Beasley NJ, Watson PH, Turner KJ, Pastorek J, Sibtain A, Wilson GD, Turley H, Talks KL, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ and Harris AL (2000): Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res*; 60(24):7075-7083

Xu W, Liu LZ, Loizidou M, Ahmed M, Charles IG (2002): The role of nitric oxide in cancer. *Cell Res*; 12(5-6):311-320

Yamamoto S, Tsuda H, Honda K, Onozato K, Takano M, Tamai S, Imoto I, Inazawa J, Yamada T, Matsubara O (2009): Actinin-4 gene amplification in ovarian cancer: a candidate oncogene associated with poor patient prognosis and tumor chemoresistance. *Mod Pathol*; 22(4):499-507

Yamashiro S, Takeya M, Nishi T, Kuratsu J, Yoshimura T, Ushio Y, Takahashi K (1994): Tumor-derived monocyte chemoattractant protein-1 induces intratumoral infiltration of monocyte-derived macrophage subpopulation in transplanted rat tumors. *Am J Pathol*; 145(4):856-867

Yildiz E, Ayan S, Goze F, Gokce G, Gultekin EY (2008): Relation of microvessel density with microvascular invasion, metastasis and prognosis in renal cell carcinoma. *BJU Int*; 101(6):758-764

Yu JX, Cui L, Zhang QY, Chen H, Ji P, Wei HJ, Ma HY (2006): Expression of NOS and HIF-1 α in human colorectal carcinoma and implication in tumor angiogenesis. *World J Gastroenterol*; 12(29):4660-4664

Zhong H, de Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs W B, Semenza GL and Simons JW (1999): Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α in common human cancers and their metastases. *Cancer Res*; 59(22):5830-5835

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Privatdozent Dr. med. Bernhard Hemmerlein, der mir das Thema bereitstellte und mich während meiner Promotionsarbeit betreute und anleitete. Herzlichen Dank für die Geduld und Unterstützung auch in schwierigen Situationen.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Professor Dr. med. Heinz-Joachim Radzun, der mir die Möglichkeit einräumte, meine Promotionsarbeit im pathologischen Institut zu absolvieren.

Bei Frau Dr. med. Christine Perske möchte ich mich herzlich für die Zusammenarbeit bedanken. Sie leistete insbesondere beim experimentellen Teil einen wesentlichen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit.

Weiterer Dank gebührt dem gesamten Laborteam, insbesondere Herrn Rolf Kleinhans und Herrn Axel Stange, die mir bei der experimentellen Durchführung mit Rat und Tat zur Seite standen.

Zudem gilt mein Dank der Urologischen Klinik der Georg-August-Universität Göttingen für die Bereitstellung der Nephrektomiepräparate.

Zu guter Letzt bedanke ich mich von ganzem Herzen bei allen, die mir mit Anregung, Rat und Korrektur hilfreich zur Seite standen, allen voran bei meiner Co-Doktorandin Frau Juliane Krösel, mit der ich die Freuden und Leiden des experimentellen Arbeitens geteilt habe.