Aus der Abteilung Pathologie

(Prof. Dr. med. H.-J. Radzun)

Im Zentrum Pathologie und Rechtsmedizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Die Charakterisierung der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase im murinen RENCA-Nierenzellkarzinommodell unter spezieller Berücksichtigung tumorassoziierter Makrophagen, der Gefäßdichte und Tumorhypoxie

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Juliane Krösel, geb. Buhle

aus

Bad Saarow-Pieskow

Göttingen 2011

Dekan:	Prof. Dr. med. C. Frömmel
I. Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. med. Hemmerlein
II. Berichterstatter/in:	Prof. Dr. med. Alves
III. Berichterstatter/in:	Prof. Dr. rer. nat. Virsik-Köpp
Tag der mündlichen Prüfung:	11. März 2013

1. EINLEITUNG 8

1.1. Das Monozyten-Makrophagen-System 8

1.2. Tumorassoziierte Makrophagen (TAM) 9

1.3. Bedeutung der TAM in verschiedenen Tumorgeweben 9

1.4. Immunhistochemische Marker der Makrophagenpopulationen 10

1.4.1. F4/80 10

1.4.2. CD11b 10

1.4.3. MRP14 (S100A9) 11

1.5. Tumorhypoxie und TAM 11

1.6. Stickstoffmonoxidsynthase (NOS) 12

1.7. Das Nierenzellkarzinom als Modelltumor 13

2. ZIELE DER ARBEIT 15

3. MATERIAL UND METHODEN 16

3.1. Verwendete Reagenzien und Geräte 16

3.1.1. Geräte 16

3.1.2. Reagenzien 17

3.2. RENCA-Zelllinie 19

3.3. Das subkutane RENCA-Mausmodell 20

3.4. Histologische Färbungen 21

3.4.1. HE-Färbung 21

3.4.2. Immunhistochemische Färbungen 21

3.5. Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) 24

3.5.1. Entparaffinieren 24

3.5.2. RNA-Isolierung 24

3.5.3. Bestimmung des RNA-Gehaltes und Reverse Transkription 24

3.5.4. Real-time-PCR 25

3.6. Herstellung von Gewebslysaten für die Griess-Reaktion 26

3.7. Griess-Reaktion 27

3.8. Morphometrische Analysen 27

3.8.1. Quantifizierung der Tumornekrosen 27

3.8.2. Gefäßdichte 27

3.8.3. Makrophagendichte 28

3.8.4. Semiquantitative Analyse von iNOS, eNOS, αActinin-4, anti-Nitrotyrosin und HIF-1α 28

3.9. Statistik 28

4. ERGEBNISSE 30

4.1. Charakterisierung der Hypoxie im Tumorgewebe 30

4.1.1. Messung von Gefäßabständen, Hypoxie und spontanen Tumornekrosen 30

4.1.2. Expression von HIF-1α 33

4.2. Quantifizierung des Makrophageninfiltrats 34

4.2.1. F4/80 34

4.2.2. MRP14 35

4.2.3. CD11b 36

4.3. Stickstoffmonoxid in Tumoren 39

4.3.1 Untersuchung der iNOS-Expression 39

4.3.2 Untersuchung der αActinin-4-Expression 40

4.3.3. Untersuchung der eNOS-Expression 42

4.3.4. Untersuchung von anti-Nitrotyrosin 42

4.4. Griess-Reaktion 43

5. DISKUSSION 46

6. ZUSAMMENFASSUNG 55

7. ANHANG: TABELLEN 8 – 13 **57**

8. LITERATURVERZEICHNIS **60**

Abkürzungsverzeichnis

A. dest.	Wasser destilliert
A. bidest.	zweifach destilliertes Wasser
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	complementary Desoxyribonucleic Acid (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
CO_2	Kohlendioxid
COX-2	Cyclooxygenase 2
eNOS	endothelial Nitric Oxide Synthase (endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase)
FCS	Fetales Kälberserum
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HIF-1α	Hypoxia-Inducible Factor-1α (Hypoxie-induzierter Faktor-1α)
HOPE	Hepes Glutamic Acid Buffer Mediated Organic Solvent Protection Effect
IFN-γ	Interferon-γ
ICH	Immunhistochemie
IL-1, 4, 6, 8, 10	Interleukin 1, 4, 6, 8, 10
iNOS	inducible Nitric Oxide Synthase (induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase)
IRS	Immunreaktiver Score
LPS	Lipopolysaccharid
MCP-1	Macrophage-Chemoattracting-Protein-1
M-CSF	Makrophagen-koloniestimulierenden Faktor
MDCS	Myeloid-Derived Suppressor Cell
MTP	Microtiterplatte
mRNA	messenger Ribonucleic Acid (Messenger-Ribonukleinsäure)
NaCl	Natriumchlorid
NK- Zellen	natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid

NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RENCA	Renal Cancer Cells
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
TAM	Tumorassoziierte Makrophagen
TBS	Tris Buffered Saline
TBST	Tris Buffered Saline plus TWEED®
TGF-ß	Tissue Growth Factor-ß
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-α (Tumornekrosefaktor α)
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
VEGF	Vascular Endothelian Growth Factor

1. EINLEITUNG

1.1. Das Monozyten-Makrophagen-System

Makrophagen sind essentielle zelluläre Komponenten des angeborenen Immunsystems und stammen von CD34-positiven Progenitorzellen des Knochenmarks ab. Nachdem Makrophagen als Promonozyten die Blutbahn verlassen haben und in verschiedene Gewebe eingewandert sind, differenzieren sie dort zu gewebsständigen Makrophagen. Der Phänotyp voll ausdifferenzierter Makrophagen differiert stark in den verschiedenen Gewebetypen und reicht von Mikrogliazellen des Gehirns über Kupffer´sche Sternzellen der Leber bis zu Langerhans-Zellen der Haut. Die Grundfunktionen der Makrophagen sind in allen Geweben gleich und umfassen beispielsweise Infektabwehr, Regulation des Zellumsatzes, Heilung von Gewebsdefekten, Phagozytose sowie Antigen-präsentation an T-Lymphozyten. Des Weiteren sezernieren Makrophagen Wachstumsfaktoren, Zytokine, Komplementfaktoren, Prostaglandine und Enzyme (Murdoch et al. 2004, Lewis CE und Pollard 2006). Makrophagen aus gesundem beziehungsweise inflammatorischem Gewebe sind in der Lage, Tumorzellen zu lysieren, tumorassoziierte Antigene zu präsentieren und immunostimulatorische Zytokine zur Makrophagenproliferation und Stimulation von NK- und T-Zellen in vitro zu sezernieren (Lewis CE und Pollard 2006).

Durch unterschiedliche Aktivierungswege können sich die Eigenschaften von Makrophagen ändern. Mantovani et al. (2002) unterscheiden zwischen M1- und M2-Makrophagen (alternativer Aktivierungsweg). Der Einfluss von IL-4 und IL-10 in Tumoren könnte für die Umwandlung von Makrophagen in M2-Makrophagen verantwortlich sein. M2-Makrophagen haben nur eine geringe Fähigkeit, Antigene zu präsentieren. Stattdessen produzieren sie Faktoren, die die T-Zell-Proliferation und -Aktivität supprimieren, die Angiogenese fördern und am Gewebeumbau von beschädigtem oder verletztem Gewebe beteiligt sind. Diese Eigenschaften stehen in starkem Gegensatz zu denen der klassisch aktivierten M1-Makrophagen, die effiziente Effektorzellen des Immunsystems darstellen und in der Lage sind, Mikroorganismen und Tumorzellen abzutöten, Antigene zu präsentieren und hohe Spiegel an T-Zell stimulierenden Zytokinen zu produzieren (Mantovani et al. 2002).

1.2. Tumorassoziierte Makrophagen (TAM)

Makrophagen bilden in malignen Tumoren einen Großteil der Leukozyteninfiltrate (in manchen Tumoren bis zu 50 % der Tumormasse) (Kelly et al. 1988, Leek et al. 1994). Diese Zellen werden TAM, tumorassoziierte Makrophagen, genannt. Man geht davon aus, dass es sich bei den Ausgangszellen um Monozyten aus der peripheren Blutzirkulation, und nicht um gewebsständige Makrophagen, handelt (Yamashiro et al. 1994).
Rekrutiert werden TAM hauptsächlich durch M-CSF (Walter et al. 1991, Savarese et al. 1998) und MCP-1 (Yoshimura et al. 1989, Bottazzi et al. 1990). Die Wachstumsfaktoren TGF-ß und VEGF werden von Tumorzellen exprimiert und können ebenfalls chemotaktisch auf Monozyten/Makrophagen wirken (Wahl SM et al. 1987, Leek et al. 2000).

TAM sind wichtige Modulatoren der Angiogenese. Sie sind nicht nur an der Bildung neuer Blutgefäße, sondern auch an der Umwandlung schon bestehender Gefäße in ein funktionelles Netzwerk beteiligt. Gerade in hypoxische beziehungsweise nekrotische Areale eines Tumors wandern TAM bevorzugt ein, wodurch die für das Tumorüberleben unabdingbare Vaskularisation unterstützt wird. Dort werden die TAM auch von lokalen Signalen aktiviert (wie zum Beispiel Hypoxie) und synthetisieren proangiogenetische Regulatoren wie zum Beispiel VEGF, TNF-α, IL-8 und bFGF. Aus der Aktivierung resultiert dann die Bildung neuer Gefäße, lokales Tumorwachstum und Überleben der Tumorzellen (Lewis CE und Pollard 2006).

1.3. Bedeutung der TAM in verschiedenen Tumorgeweben

Es ist bekannt, dass bestimmte Zytokine und Wachstumsfaktoren (zum Beispiel M-CSF, IL-6, IL-8, TNF-α), die von den Tumorzellen selbst oder von zum Beispiel TAM sezerniert werden, im Serum von Tumorpatienten nachgewiesen werden können. Das bedeutet, dass TAM im Gegensatz zu normalen Gewebsmakrophagen oft in einem aktivierten Zustand zu finden sind (Valdez et al. 1990). So ist bei gynäkologischen Tumoren, vor allem dem Ovarialkarzinom, der M-CSF-Spiegel ein Marker für den Krankheitsverlauf; er korreliert mit einer schlechten Prognose (Suzuki et al. 1995, Chambers et al. 1997). Ähnlich dem M-CSF bei gynäkologischen

Tumoren ist der IL-6-Spiegel beim Nierenzellkarzinom (Tsukamoto et al. 1992) oder Blasenkarzinom (Seguchi et al. 1992) signifikant erhöht.
Leek et al. (1999) zeigten, dass eine erhöhte fokale Infiltration von Tumormakrophagen mit erhöhter Angiogenese und kürzerer Rezidivfreiheit sowie kürzerer Gesamtüberlebensdauer bei Brustkrebs assoziiert ist.
Die Ergebnisse von Ohno et al. (2004) zeigen deutlich den Zusammenhang zwischen der Anzahl der Makrophagen im Tumorgewebe und dem metastatischen Potential des Tumors. Darüber hinaus existiert eine Vielzahl von Untersuchungen an unterschiedlichen malignen Tumoren, die die Funktion von TAM beschreiben. Es zeigt sich dabei eine Suppression der zytotoxischen Eigenschaften der Makrophagen; stattdessen findet sich eine vermehrte Expression von zum Beispiel VEGF oder COX-2, die die Angiogenese und auch die Metastasierung maligner Tumoren fördern (Hemmerlein et al. 2004).

1.4. Immunhistochemische Marker der Makrophagenpopulationen

1.4.1. F4/80

Der F4/80-Antikörper ist ein Panmakrophagenmarker. Er erkennt das murine F4/80-Antigen, welches auf vielen Gewebsmakrophagen, inklusive Kupffer´sche Zellen und Langerhans-Zellen, exprimiert wird.

1.4.2. CD11b

Der CD11b-Antikörper erkennt das CD11b-Antigen, das während seiner Differenzierung auf Granulozyten, Monozyten, natürlichen Killerzellen und Gewebsmakrophagen exprimiert wird. Die Expression von CD11b erhöht sich während der Monozytenreifung und variiert im Vorkommen auf den Gewebsmakrophagen.

1.4.3. MRP14 (S100A9)

Der MRP14-Antikörper aus der Familie der S100-Proteine wurde zum Markieren von inflammatorischen Makrophagen verwendet. Granulozyten und Makrophagen exprimieren MRP14 besonders in der Frühphase einer Entzündung.

1.5. Tumorhypoxie und TAM

Hypoxische Areale eines Tumors sind gekennzeichnet durch Avaskularität und Nekrose. Sie entstehen bei der Tumorvaskularisation durch oftmals blind endende neu gebildete Gefäße, die eine große Tendenz zum Kollabieren zeigen (Brown JM und Giaccia 1998). Konsequenz daraus ist ein irregulärer Blutfluss mit unzureichender Nährstoffversorgung in vielen Tumorarealen. Ein weiterer Faktor, der eine Hypoxie begünstigt, ist darüber hinaus das schnelle Wachstum und der hohe Sauerstoffverbrauch der Tumorzellen. In den meisten humanen Tumoren, wie zum Beispiel Mamma- und Zervixkarzinom oder auch bei Weichteilsarkomen, konnten hypoxische Areale nachgewiesen werden (Murdoch et al. 2004). Einige Studien haben gezeigt, dass eine hohe Anzahl beziehungsweise großflächige hypoxische Areale in einem Tumor mit einer schlechten Prognose einhergehen (Vaupel et al. 1989). Ein Grund dafür liegt in der Selektion der Tumorzellen durch die Hypoxie, das heißt nur die Zellen, die einen aggressiven Phänotyp aufweisen, können in einem hypoxischen Areal überleben (Brown JM und Giaccia 1998). Ein weiterer Grund für die schlechte Prognose liegt vermutlich darin, dass hypoxische Tumorzellen sich den Effekten einer Radio- und/oder Chemotherapie besser entziehen können als gut oxygenierte Zellen.

TAM reagieren auf Tumorhypoxie durch Hochregulation der Hypoxie-induzierten Faktoren HIF-1 und HIF-2 (Burke et al. 2002). HIF-1α ist ein Heterodimer, bestehend aus einer Alpha- und einer Beta-Untereinheit. Es ist ein Schlüsselfaktor in einer Reihe transkriptioneller Antworten, die durch Hypoxie, Kobaltionen und Eisenchelatkomplexe induziert werden. Das c-terminale Ende von HIF-1α bildet mit p300 einen Komplex und induziert dadurch die Transkription von Hypoxie-induzierten Genen wie zum Beispiel VEGF, iNOS oder Glut-1 (Schmid et al. 2004, Greijer und van der Wall 2004).

Eine Theorie der TAM-Rekrutierung in hypoxischen Tumorarealen geht davon aus, dass durch Hypoxie spezifische chemotaktische Proteine hochreguliert werden und einem so erzeugten Gradienten folgen. Mehrere Studien haben gezeigt, dass Tumorzellen und Makrophagen in gefäßlosen und perinekrotischen humanen Tumorarealen einen erhöhten VEGF-Spiegel aufweisen und dass verschiedene Tumorzelllinien VEGF als Antwort auf die Hypoxie vermehrt exprimieren (Brown LF et al. 1995, Lee et al. 1998, Lewis JS et al. 2000).

In hypoxischen Tumorarealen können Makrophagen ihren Phänotyp und die Expression verschiedener mitotischer und proangiogenetischer Zytokine und Enzyme wie zum Beispiel VEGF, IL-1 oder TNFα verändern (Lewis JS et al. 2000, Murdoch et al. 2004). Dadurch werden das Tumorwachstum, die Tumorangiogenese und die Metastasierung des Tumors gefördert (Murdoch et al. 2004).
Da Makrophagen auch phagozytotische Eigenschaften besitzen, ist es möglich, dass sie in hypoxische, perinekrotische Areale durch nekrotisches Gewebe angelockt werden. Hypoxie scheint dann die Makrophagen in der Migration zu inhibieren und sie damit in diesen Gebieten zu immobilisieren (Lewis CE und Pollard 2006).

1.6. Stickstoffmonoxidsynthase (NOS)

Die Stickstoffmonoxidsynthase (NOS) oxidiert ein Stickstoff-Atom von Arginin und setzt dabei ein Stickstoffmonoxid (NO) als freies Radikal und Citrullin frei. So generiertes NO fungiert als Botenstoff bei verschiedenen biologischen Prozessen wie zum Beispiel Vasodilatation und als Neurotransmitter, aber auch bei anti-tumorösen und anti-pathogenetischen Vorgängen. Es existieren drei Isoenzyme der Stickstoffmonoxidsynthase: die endotheliale NOS (eNOS), die induzierbare NOS (iNOS) und die neuronale NOS (nNOS). nNOS wird unter anderem von Neuronen im Kortex und Striatum, aber auch im Hippokampus und Kleinhirn exprimiert. Das dadurch entstehende NO spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation der Gefäßversorgung des Gehirns und ist ein wichtiger Neurotransmitter zum Beispiel bei der Übertragung von Schmerzsignalen sowohl zentral als auch peripher. Neben den physiologischen Funktionen des NO zeigte sich in mehreren Studien eine erhöhte NO-Expression in verschiedenen Tumoren, zum Beispiel in gynäkologischen Tumoren oder in Gehirntumoren (Thomsen et. al 1994, Cobbs et. al 1995). Daraus

kann gefolgert werden, dass NO ebenfalls eine entscheidende Rolle in der Tumorangiognese und Metastasierung spielt. So konnten Ziche et. al (1997) zeigen, dass durch eine erhöhte NO-Konzentration die Sekretion proangiogenetischer Faktoren (zum Beispiel VEGF) stimuliert wird.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde das Expressionsmuster von eNOS und iNOS untersucht. Die kalziumabhängige eNOS produziert in geringen Mengen NO. eNOS besteht aus einem heterogenen Tetramer aus zwei Monomeren eNOS-Molekülen und zwei Calcium/Kalmodulinkomplexen.
iNOS (oder auch Makrophagen-NOS) wird auf aktivierten Makrophagen und glialen Zellen calciumunabhängig exprimiert. Es wurde berichtet, dass iNOS durch αActinin-4 am Zytoskelett fixiert wird und so Protein-Komplexe generiert, die ihre Aktivität erlauben. αActinin-4 wird von nicht-Muskelzellen exprimiert. Es vernetzt Aktin-Filamente zu Parallelfasern. Das impliziert eine zusätzliche Rolle von αActinin-4 als ein regulierendes Signalprotein und erlaubt Rückschlüsse auf eine regulierende Rolle bei der iNOS-Aktivität (Daniliuc et al. 2003).

Die NOS-Aktivität selbst kann über eine Nitritmessung in Geweben und in der Zellkultur gemessen werden. Des Weiteren kann die indirekte nitrifizierende Wirkung auf Proteine mit Hilfe immunhistochemischer Verfahren dargestellt werden. Durch die zelluläre Produktion von hoch reaktiven Stickstoffradikalen aus Stickstoffmonoxid kommt es zur Nitrifizierung von Tyrosin-Resten in Gewebeproteinen. Das Ausmaß an Protein-Tyrosin-Komplexen liefert einen Anhaltspunkt für die Produktion von reaktiven Stickstoffmonoxiden und potentiellen Zellschäden über einen definierten Zeitraum. Nitrotyrosin kann in Geweben immunhistochemisch durch den Einsatz von beispielsweie anti-Nitrotyrosin nachgewiesen werden.

1.7. Das Nierenzellkarzinom als Modelltumor

Das Nierenzellkarzinom ist ein maligner epithelialer Tumor des Nierenparenchyms, ausgehend von den proximalen Tubuli oder den Sammelrohren. Es tritt sporadisch oder familiär gehäuft, zum Beispiel im Rahmen des von-Hippel-Lindau-Syndroms auf und macht circa 3 Prozent aller malignen Tumore aus. Ein Altersgipfel ist um das 60. Lebensjahr zu finden. Etwa 60 Prozent der Malignome sind asymptomatisch und

werden lediglich als Zufallsbefunde im Rahmen von sonographischen Untersuchungen gefunden. Das Nierenzellkarzinom metastasiert früh. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung sind bei 25 Prozent der Patienten Metastasen lymphogen und hämatogen in Lunge, Leber, Knochen und Gehirn nachweisbar.

Histopathologisch wurden die Hauptformen der Nierenzellkarzinome nach Störkel et al. (1997) wie folgt eingeteilt:

Klarzelliger Typ (circa 70 % aller Karzinome)
Papillärer Typ (circa 15 %)
Chromophober Typ (circa 5 %)
Karzinome der Sammelrohre (unter 1 %).

Das Nierenzellkarzinom eignet sich als Modelltumor, da im humanen Gewebe dichtes Immuninfiltrat gut gegen Normalgewebe abgrenzbar ist. Des Weiteren lässt sich am Nierenzellkarzinom die Neoangiogenese im Bezug zur Tumornekrose gut nachvollziehen. Je größer der Tumor ist, desto geringer ist die Gefäßdichte. Bei geringer Tumordifferenzierung zeigt sich eine geringere Gefäßdichte als bei guter Differenzierung des Tumors.
Das subkutane syngene RENCA-Mausmodell, das erstmalig 1973 von Hrushesky und Murphy beschrieben wurde, zeichnet sich durch gute Steuerbarkeit aus. Es werden Balb/c-Mäusen in vitro kultivierte RENCA-Zellen subkutan appliziert, um einen lokalen Tumor zu erzeugen. Ein weiterer Vorteil dieses Modells ist, dass die Balb/c-Mäuse über ein intaktes Immunsystem verfügen und sich so die murine Tumorentwicklung mit dem Verlauf des humanen Nierenzellkarzinoms vergleichen lässt (Hillman et al. 1994).

2. ZIELE DER ARBEIT

Die Ziele der hier vorliegenden Arbeit werden wie folgt benannt:

1.) Etablierung des subkutan syngenen RENCA-Nierenzell-Karzinommodells.

2.) Darstellung der Beziehung von Tumorgröße, Gefäßdichte und hypoxischen Nekrosen.

3.) Charakterisierung des Makrophageninfiltrates.

4.) Charakterisierung der Expression von iNOS und seiner Funktion unter Berücksichtigung des Auftretens hypoxischer Tumornekrosen.

5.) Charakterisierung der iNOS-Aktivität mit dem Maustumormodell.

Anhand des murinen RENCA-Tumormodells sollen die Tumorentstehung und die Tumorentwicklung des murinen Nierenzellkarzinoms besser verstanden werden sowie Rückschlüsse auf den Verlauf der humanen Nierenzellkarzinomentwicklung möglich sein.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Verwendete Reagenzien und Geräte

3.1.1. Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte und Hersteller

Gerätebezeichnung	*Hersteller*
Vortex genie 2	Bender & Hohbein AG, Zürich
pH-Meter CG 84	Schott Geräte, Ludwigshafen
Feinwaage und Oberschalenwaage	Sartorius Göttingen
Kühl- und Gefrierkombination (+4°C und -20°C)	Liebherr, Deutschland
Comfort-Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr, Deutschland
Gefrierschrank (-80°C)	GFL, Burgwedel
Echtzeitthermocycler	Bio-Rad Laboratories, München
Tpersonal Thermocycler	Biometra, Göttingen
Magnetrührer (mit Heizschüttler) MAG RET	IKA-Kombi, Jahnke + Kunkel, Stauffen
Biofuge stratos und fresco	Heraeus instruments, Düsseldorf
Eppendorf-Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
OV 5 (Wärmeschrank und Schüttler)	Biometra, Göttingen
Agilent Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies, Böblingen
Ultraschallhomogenisator Sonopuls HD70	Bandelin Technologies, Berlin
Schlittenmikrotom Typ HN 40	Reichert & Jung Heidelberg
Trockensterilisator	Memmert, Schwabach
Zytozentrifuge Shandon Cytospin3	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Dampfgarer Braun FS 20	Braun GmbH, Kronberg im Taunus
Schüttelinkubator	IKA-Vibrax VXR, Jahnke + Kunkel, Stauffen

XCellSureLock Mini-Cell-Kammer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad laboratories, München
Brutschrank (+ 40°C)	Heraeus Instruments, Düsseldorf

3.1.2. Reagenzien

Tabelle 2: Verwendete Reagenzien und Hersteller

IHC:	Aceton (FA. Merck) 3-Aminopropyltritoxy-Silan (FA. Sigma und Aldrich) Formalin, 4 %, gepuffert HOPE-Lösung I (Hepes Glutamic Acid Buffer Mediated Organic Solvent Protection Effect, FA. Innovative Diagnostik Systeme) Low melting paraffin for HOPE-fixation (FA. DCS – Innovative Diagnostik-Systeme) *TBST-Puffer:* NaCl (Natriumchlorid, FA. Merck) TRIS $C_4H_{11}NO$ (TRIS-Pufferan > 99,9 %, FA. Roth) ad 1000 ml A. dest. + HCl (Salzsäure, FA. Merck) zur pH-Einstellung 0,5 ml TWEEN® zur Herabsetzung der Oberflächenspannung (FA. Calbiochem) Hämatoxylin, $C_{16}H_{14}O_6$ (FA. Merck) Kaliumaluminiumsulfat-Dodecahydrat, $KAl(SO_4)_2$ x $12H_2O$ (FA. Merck) Natriumjodat, $NaJO_4$ (FA. Merck) Chloralhydrat, $C_2H_3Cl_3O_2$ (FA. Merck) Eosin G, $C_{20}H_6Br_4Na_2O_5$ (FA. Merck) Essigsäure (Eisessig), CH_3COOH, 100% (FA. Merck) Aluminiumsulfat-18-Hydrat, $Al_2O_{12}S_3$ x 18 H_2O (FA. Merck) Kernechtrot, $C_{14}H_8NNaO_7S$ (FA. Merck)
	Citratpuffer: Lösung A: 0,1 m Zitronensäure-Monohydrat $C_6H_8O_7$ x H_2O (FA. Merck)

	Lösung B: 0,1 m tri-Natrium-Citrat-Dihydrat $C_6H_5O_7Na_3$ x $2H_2O$ (FA. Merck) im Verhältnis A:B = 9 ml:41 ml ad 450 ml A. bidest.
	Protease XXIV: 12,5 mg Protease XXIV (FA. Sigma) ad 30 ml (vorgewärmtes) A. dest. *FCS/BSA (*fetales Kälberserum/bovines Serumalbumin*):* 10 g BSA, Fraktion V (FA. Paesel + Lorei GmbH) 5 ml FCS (unsteril) ad 100 ml TBS *DAB-Chromogen:* 3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid in organischem Lösungsmittel Substrat-Puffer: Wasserstoffperoxid und Konservierungsmittel (ChemMate™, FA. DakoCytomation) *VIP-Chromogen:* VIP Substrat-Kit für Peroxidase (FA. Vector Laboratories): Reagenz 1 (PBS), Reagenz 2, Reagenz 3, Hydrogenperoxidase *3% Wasserstoffperoxid :* 10 ml Wasserstoffperoxid (FA. Merck) ad 40 ml A. dest.
PCR:	*Buffer RLT (Lysis buffer)* ß-Mercaptoethanol (2-Mercaptoethanol) (FA. Sigma) Buffer RLT Lysis Buffer (Qiagen)
	RNeasy® Mini-Kit (FA. Qiagen) Omniscript® Kit für Reverse-Transkription(FA. Qiagen) Random Primer (FA. Invitrogen) RNase-Inhibitor (FA. Fermentos) Agilent RNA 6000 Nano Kit (FA. Agilent Technologies) *Real-Time PCR:* Sybr-Green Supermix (FA. BioRad) RNAse free water (FA. Sigma)

	Oligonukleotid-Primer (FA. MWG-Biotech AG)
Griess-Reaktion:	Griess Reagent System (FA. Promega) *Lysis Puffer*: Triton X100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol) (FA. Sigma) PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) (FA. Sigma) Aprotinin (FA. Roche Diagnostics, Indianapolis, USA) Leupeptin (FA. Roche Diagnostics, Indianapolis, USA)
Zellkulturen:	Accutase (FA. PAA Laboratories GmbH) HEPES Buffer-solution 1 M (FA. PAA Laboratories GmbH) RPMI 1640 Amino Acids Solution (FA. Sigma) 10.000 µl/ml Streptomycin Sulfat in 0,85 % Saline (In Vitrogen Corporation, GIBCO™) Trypsin EDTA 0,5 % (In Vitrogen Corporation, GIBCO®) S-Nitroso-N-Acetylpenicillamine (SNAP), $C_7H_{12}N_2O_4S$ (FA. Sigma) Trypan-Blau, 0,4% (FA. Sigma) *PBS-Puffer:* Natriumdihydrogenphosphat x H_2O (FA. Merck) Dinatriumhydrogenphosphat x 2 H_2O (FA. Merck) NaCl (Natriumchlorid, FA. Merck) ad 1000 ml A. dest.

3.2. RENCA-Zelllinie

Die RENCA-Zelllinie von Balb/c-Mäusen wurde freundlicherweise von Prof. Dr. med. Jocham aus der Abteilung Urologie der Universitätsklinik Lübeck zur Verfügung gestellt.

Die Zellen wurden über 24 Stunden bei 37°C und 5 % CO_2 im Inkubator in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre kultiviert. Einmal wöchentlich wurden die Zellen passagiert, in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 1200 rpm und 15°C für vier Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen mit 10 ml PBS-Puffer gewaschen. Nach Resuspension wurde die Lösung erneut bei 1200 rpm und 15°C für vier Minuten zentrifugiert. Mit Medium wurden die Zellen resuspensiert, auf etwa $1x10^4$ Zellen/ml verdünnt und in einer Zellkulturflasche (Volumen 15 ml) weiter kultiviert.

3.3. Das subkutane RENCA-Mausmodell

Die histologischen Präparate für die vorliegende Arbeit wurden aus weiblichen Balb/c-Mäusen gewonnen, die von Charles River, Sulzfeld/Deutschland für Experimente gezüchtet wurden. Bei Erhalt waren die Mäuse sieben Wochen alt und bekamen zur Fütterung Wasser und Standardtrockenfutter ohne Zusätze ad libitum. Nach circa 14 Tagen wurden den Tieren $2x10^6$ RENCA-Zellen in 200 µl RPMI-Puffer/50 % Matrigel (BD) (RPMI 1640 Amino Acids Solution, FA. Sigma) subkutan in die rechte Flanke injiziert. Vor dem Experiment wurden die Zellen nochmals immer in gleicher Konzentration (10.000/ml - 150.000/Flasche) ausgesät und subkonfluent (circa 75 % bewachsene Oberfläche) geerntet. Um Variabilität zu vermeiden beziehungsweise zu mindern wurden aus einer Box Injektionskanülen (20 Gauge) und Kulturflaschen für die Serie genommen. Die Mäuse 1 bis 6 entstammten einer Injektionsserie, die Mäuse 7 bis 15 und die Mäuse 16 bis 20 jeweils einer anderen. Hierbei wurden die Mäuse willkürlich für die unterschiedlichen Sitzzeiten ausgewählt. Nach spätestens 28 Tagen (siehe Anhang Tabelle 8) erfolgte die Tötung der Mäuse in einer CO_2-Atmosphäre und die anschließende Obduktion der Mäuse.

Für die Bestimmung der Tumorgröße wurde nach Tumorresektion zum einen das Tumorgewicht abgewogen (in mg) und zum anderen das Volumen (in ml) gemessen. Es erfolgte die Definition der Tumoren in junge Tumoren mit einem Tumoralter von 12-19 Tagen sowie alte Tumoren mit einem Tumoralter von 28 Tagen (siehe Anhang Tabelle 8).

Ziel dieses Ansatzes war es, Tumore mit und ohne spontane Nekrosen zu induzieren und dies allein über die Tumorgröße und Zeitachse zu bewerkstelligen.

Für die Durchführung der Experimente wurden die Tumorproben und die Organe Lunge, Leber, Milz und Niere zum einen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zum anderen in HOPE™-Lösung und in 4%ig gepufferter Formalin-Lösung asserviert. Die Einbettung der HOPE™-Proben erfolgte in „low-melting“ Paraffin, die der Formalin-Proben in Standardparaffin. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Paraffin-Blöcke bei 4°C gelagert.

3.4. Histologische Färbungen

Für die immunhistologischen Untersuchungen wurden die Formalin- bzw. HOPE-fixierten Tumorpräparate in einer Dicke von etwa drei bis vier Mikrometer auf einem Schlittenmikrotom geschnitten und auf mit 2%igem 3-Aminopropyltritoxy-Silan beschichteten Objektträger aufgezogen. Über Nacht wurden die Schnittpräparate bei 37°C getrocknet.

3.4.1. HE-Färbung

Von allen Tumorpräparaten wurde zu Beginn eine Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE) angefertigt. Dazu wurden die Objektträger für circa 20 Minuten in den Trockensterilisator gestellt (80°C) und anschließend entparaffiniert. Die Kerndarstellung erfolgte für 10 Minuten in Hämatoxylin (Meyers Hämalaun). Nach gründlichem Bläuen in Leitungswasser wurde die zytoplasmatische Gegenfärbung für circa 30 Sekunden in Eosin durchgeführt. Nach erneutem Spülen in zweifach destilliertem Wasser konnten die Schnitte anschließend in der aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 2 x 96 %, 2 x 100 %) dehydriert und über Xylol permanent eingedeckt werden.

3.4.2. Immunhistochemische Färbungen

Die Formalin-fixierten Präparate wurden in Xylol entparaffiniert und anschließend in absteigender Alkoholreihe (2 x 100%, 2 x 96%, 1 x 70% Äthanol) rehydriert. Die HOPE-fixierten Präparate wurden in Isopropanol (zwei mal 15 Minuten) entparaffiniert und anschließend in 75% Äthanol (fünf Minuten) rehydriert. Die genauen Zeiten und Konzentrationen der nachfolgend beschriebenen Protokollschritte sowie die Daten der verwendeten Antikörper können den nachfolgenden Tabellen drei und vier entnommen werden. Nach Spülen in zweifach destilliertem Wasser und Blocken der gewebeeigenen Peroxidase-Aktivitäten mit 3%igem Wasserstoffperoxid erfolgte ein FCS/BSA-Block (fetales Kälberserum / bovines Serumalbumin). Danach konnte der Primärantikörper aufgetragen werden. Nach entsprechender Inkubationszeit wurden die Schnitte in TBST pH 7,4 zweimal

gespült und anschließend mit oder ohne zusätzlichen Brückenantikörper und ein Peroxidase konjugiertes Polymer (EnVision POD, FA. Dako Cytomation) inkubiert.
Zur Sichtbarmachung der Reaktion wurden die Schnitte mit DAB-Chromogen (Diaminobenzidin-Chromogen, FA. DakoCytomation) bzw. VIP-Chromogen (Reagenz 1-3 und Wasserstoffperoxid-Lösung, FA. Vector Laboratories) bei Raumtemperatur im Dunklen gefärbt. Nach Waschen mit TBST und zweifach destilliertem Wasser wurden die Kerne mit Hämalaun gegengefärbt. Nach abschließendem Bläuen in warmen Leitungswasser wurden die Schnitte in der aufsteigenden Alkoholreihe (1x70%, 2x96%, 3x100% Äthanol) dehydriert und über Xylol permanent eingedeckt.

Tabelle 3: verwendete Antikörper

Primärantikörper	mono-/polyklonal	Quelle	Firma
F4/80	Monoklonal	Ratte anti-Maus	AbD Serotec
CD11b	Monoklonal	Ratte anti-Maus	AbD Serotec
MRP14	Monoklonal		(1)
CD31	Monoklonal	Ratte anti-Maus	Acris Antibodies
HIF-1α	Monoklonal	Maus anti-Ratte	Lab Vision
αActinin-4	Polyklonal	Kaninchen anti-Maus	Alexis Biochemicals
eNOS	Epitopspezifisch	Kaninchen anti-Maus	Lab Vision
iNOS	Epitopspezifisch	Maus anti-Maus	Sigma
Anti-Nitrotyrosin	Polyklonal	Kaninchen anti-Maus	Chemicon International

(1) freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Sorg, Institut für experimentelle Dermatologie der Universität Münster

Tabelle 4: Konzentrationen und Inkubationszeiten

Primäranti-körper	Verdün-nung	Inkubation in Stunden [h]	Brückenantikörper (Kaninchen-anti-Ratte)	Detektionssystem
F4/80	1:500	1h, RT (1)	1:100; 1h, RT	(3)
CD11b	1:600	1h, RT (1)	1:100; 1h, RT	(3)
MRP14	1:3000	1h, RT (1)	Nein	(3)
CD31	1:50	über Nacht, 4°C; Protease XXIV (Formalin), 10 Min; (1)	1:100; 1h, RT	EnVision POD, 30 Min, RT VIP-Chromogen, 30 Min
HIF-1α	1:50	über Nacht, 4°C (1); (2)	1:100; 1h, RT	EnVision POD, 1h, RT VIP-Chromogen, 20 Min
αActinin-4	1:50	2h, RT (1)	Nein	EnVision POD, 30 Min, RT DAB-Chromogen nach Sicht
eNOS	1:50	2h, RT (1); (2)	Nein	(3)
iNOS	1:200	2h, RT (1); (2)	Nein	(3)
Anti-Nitrotyrosin	1:50	1h, RT (1); (2)	Nein	(3)

(1) Blockierung endogener Peroxidase und unspezifischer Proteinbindung durch 3% Wasserstoffperoxid, 10 Min, FCS/BSA, 10 Min

(2) Antigendemaskierung unter Hitze in Zitratpuffer (pH 6) für 40 Min

(3) EnVision POD, 1h, RT (Raumtemperatur) und DAB-Chromogen, 20 Min

3.5. Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

3.5.1. Entparaffinieren

In sterile Einmalgefäße (Volumen 1,5 ml) wurden jeweils acht circa 5 µm dicke HOPE-fixierte Gewebeschnitte eines Falles eingefüllt. Die Entparaffinierung erfolgte mit 1000 µl vorgewärmtes Isopropanol (viermal für jeweils 30 Minuten) bei 60°C. Anschließend wurden 1000 µl vorgewärmtes Äthanol (100 %, je nach Menge des noch vorhandenen Paraffins zwei bis dreimal) zugegeben, um das bis dahin noch verbliebene Paraffin komplett aufzulösen.

3.5.2. RNA-Isolierung

Für die Gewebelyse der entparaffinierten Proben wurden 1000 µl RLT-Puffer pro Reaktionsgefäß hinzugegeben. Die RNA-Isolierung erfolgte mit Hilfe des RNeasy® Mini-Kits der Firma Qiagen entsprechend den Angaben des Herstellers. Die isolierte RNA wurde in ein nukleasefreies Einmalgefäß überführt und bei -80°C aufbewahrt.

3.5.3. Bestimmung des RNA-Gehaltes und Reverse Transkription

Für das Umschreiben der RNA in cDNA erfolgte das Verdünnen der mit Hilfe des Agilent RNA 6000 Nano Kit gemessenen RNA-Konzentration. Je nach RNA-Konzentration wurde die Verdünnung auf 500 ng/20 µl bzw. 250 ng/20 µl eingestellt. Der benötigte RT-Master-Mix wurde nach dem folgenden Pipettierschema angesetzt:

Tabelle 5: Volumen pro Ansatz

Puffer	2 µl
dNTPs	2 µl
HexaPrimer	1 µl
RNase Inhibitor	1 µl
RT	1 µl

(HexaPrimer Gebrauchslösung: 6,8 µl Wasser + 13,2 µl Primer)

Nach der Herstellung des Master-Mix wurden die RNA-Cups im Thermocycler 5 Minuten bei 70°C inkubiert. Anschließend wurde das Programm kurz unterbrochen, um 7 µl Master-Mix pro Cup hinzugeben zu können. Danach wurde die Inkubation für 1 Stunde bei 37°C und 5 Minuten bei 95°C fortgesetzt. Die umgeschriebene cDNA konnte nach einer kurzen Abkühlphase entnommen und auf 5 ng/µl eingestellt werden (entweder in einer 1:5 Verdünnung bei 500 ng/20 µl oder in einer 1:2,5 Verdünnung bei 250 ng/20 µl). Die fertige cDNA wurde bei -20°C aufbewahrt.
Die Genexpression in den cDNA-Proben wurde in Doppelansätzen bestimmt. Pro Ansatz wurden 25 ng cDNA gemessen. Die spezifische Genexpression von iNOS und αActinin-4 wurde mittels der Δct-Methode in Referenz zum in allen Tumoren konstant exprimierten „Housekeeping-Gen“ PBGD mit Hilfe der Formeln
$y = 2^{\Delta ct\ PBGD\text{-}iNOS}$ und $y = 2^{\Delta ct\ PBGD\ -\ \alpha ACTN4}$ bestimmt.

3.5.4. Real-time-PCR

Tabelle 6: Verwendete PCR-Primer

Primer		Sequenz	T_m	Produkt-größe (bp)
iNOS	AS	5´-TGG GAA TGG AGA CT TCC CAG-3´	55°C	144
	S	5´-GGG ATC TGA ATG TGA TGT TTG-3´		
αActinin -4	AS	5´-CAG CTT CTA CCA TGC CTT TTC-3´	55°C	107
	S	5´-TAG TCT TCC ATC AGG TGC TC-3´		
PBGD	AS	5´-ACA GAG AAA GTT CCC CCA C-3´	56°C	105
	S	5´-GAC GAT GGC ACT GAA TTC C-3´		

Der für die PCR benötigte Mastermix wurde nach dem folgenden Pipettierschema angesetzt:

Tabelle 7: Ansatz entsprechend einer Probe

BioRad MasterMix 2x	10 µl
Primer forward	0,15 µl
Primer reverse	0,15 µl
H_2O	4,7 µl

In entsprechend beschriftete PCR-Cups wurden je 15 µl Mastermix + 5 µl cDNA pipettiert und kurz in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Anschließend durchliefen die Proben im iCycler circa 40 Zyklen mit den unten aufgeführten Cycler-Profilen (entsprechend den unterschiedlichen Primern).

mPBGD	
1. 95°C	15 Min
2. 95°C	30 Sec
3. 56°C	30 Sec
4. 72°C	30 Sec
5. 72°C	7 Min

miNOS	
1. 95°C	15 Min
2. 95°C	30 Sec
3. 55°C	30 Sec
4. 72°C	30 Sec
5. 72°C	7 Min

mα–Actinin4	
1. 95°C	15 Min
2. 95°C	30 Sec
3. 55°C	30 Sec
4. 72°C	30 Sec
5. 72°C	7 Min

3.6. Herstellung von Gewebslysaten für die Griess-Reaktion

Das bei der Tumorgewinnung schockgefrostete Gewebe wurde auf Eis aufgetaut und die benötigte Gewebemenge (circa 20 mg) mit einem Einmalskalpell entnommen. Das abgewogene Gewebe wurde anschließend in sterile Reaktionsgefäße (Volumen 1,5 ml) gegeben und mit 500 µl (bzw. 250 µl) Lysispuffer versehen. Das Gewebe wurde dann vorsichtig homogenisiert und anschließend die Zellen mit Ultraschall aufgeschlossen (für 3 x 20 Sekunden). Danach wurden die Proben für 15 Minuten bei 12.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der aus der Zentrifugation resultierende Überstand wurde für die Proteinbestimmung verwendet.

Die Proteine wurden mit dem BioRad-Proteinassay nach Bradford in einer Microtiterplatte (MTP) mit einem MTP-Lesegerät quantifiziert. Jeweils 4 µl der Proben wurden in eine MTP pipettiert. Dazu wurden je 196 µl verdünntes BioRad-Proteinassay zu den Proben gegeben und über eine Standardverdünnungsreihe mit BSA (10 mg/ml, bei -20°C) und A. bidest. (1,0; 0,5; 0,25; 0,125) wurden die Proben bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen.

3.7. Griess-Reaktion

Mit Hilfe der Griess-Reaktion wurde der Nitrit-Gehalt (als Abbauprodukt von NO) der Tumorproben bestimmt. Die Griess-Analyse beruht auf einer chemischen Reaktion, welche Sulfanilamide und N-1-Naphthylethylendiamin-Dihydrochlorid (NED) unter sauren Bedingungen nutzt und den Nitritgehalt verschiedener in-vitro-Gewebe durch einen Farbumschlag anzeigt.
Für die Griess-Reaktion wurden dann jeweils 50 µl der Probe in eine Microtiterplatte pipettiert, zur Quantifizierung wurde ferner eine Nitrit-Verdünnungsreihe mitgeführt. Nach Zugabe der Reaktionslösungen und den Inkubationen erfolgte die Messung der Probe bei einer Wellenlänge von 540 nm.

3.8. Morphometrische Analysen

3.8.1. Quantifizierung der Tumornekrosen

Die HE-gefärbten Übersichtspräparate wurden mit Hilfe des Histolab-Programms von Microvision Instruments hinsichtlich der Relation von Tumorgröße zu Nekrose ausgewertet. Dazu wurde zuerst ein Übersichtsscan in vierfacher Vergrößerung an einem Mikroskop der Firma Olympus, Corporation Model 4-MDO B3, angefertigt. Anschließend erfolgte die manuelle Abgrenzung und Markierung vitaler und nekrotischer Areale. Aus den so gewonnenen Daten wurde anschließend mit Hilfe des Histolab-Programms ein Quotient gebildet, der den Nekroseanteil eines jeden Tumors angibt.

3.8.2. Gefäßdichte

Die mit Hilfe des CD31-Antikörpers angefärbten Gefäße der Tumorpräparate wurden mit dem Histolab-Programm von Microvision Instruments am Computer ausgewertet. Dazu wurde zuerst ein Übersichtsscan in zweifacher Vergrößerung angefertigt. Anschließend wurden in 10facher Vergrößerung einzelne Felder im ganzen Tumor randomisiert (perinekrotisch, nekrosefern und am Tumorrand) und insgesamt 500 Gefäßabstände pro Fall gemessen.

3.8.3. Makrophagendichte

Die immunhistochemischen Färbungen der Makrophagen mit den Antikörpern F4/80, CD11b und MRP14 wurden quantitativ am Mikroskop ausgewertet. Zum manuellen Zählen der Makrophagen pro mm^2 wurde ein Diagnostiklichtmikroskop der Firma Zeiss verwendet. Es wurden nur Zellen gezählt, die eindeutig definierten Kriterien einer Makrophagenpopulation zugeordnet werden konnten und sich innerhalb eines Zählgitters befanden. Die morphologischen Kriterien umfassten den sichtbaren Zellkern mit zellgebundenen Signalen, die Größenrelation der Makrophagen zu den Tumorzellen und die Lage im vitalen Gewebe. Das Zählgitter hatte eine Kantenlänge von 5 mm mit 10 x 10 Feldern und wurde mit einem Kalibrierungsobjektträger der Firma Olympus am Mikroskop in vierzigfacher Vergrößerung eingestellt. Es wurde ein Randsaum von 1,5 mm um die Tumornekrosen als perinekrotische Zone festgelegt, die Areale größer als 1,5 mm galten als nekrosefern.

3.8.4. Semiquantitative Analyse von iNOS, eNOS, αActinin-4, anti-Nitrotyrosin und HIF1-α

Die Auswertung der Hypoxie-induzierten Faktoren iNOS, eNOS, αActinin-4, anti-Nitrotyrosin und HIF-1α erfolgte manuell am Diagnostikmikroskop (Carl Zeiss) in zwanzigfacher Vergrößerung mit Hilfe des semiquantitativen immunreaktiven Score (IRS) (Tabelle 9, 10, 11 und 12 siehe Anhang). Der IRS ist ein Mittel zur Quantifizierung der Zellsignale, die durch die immunhistochemischen Färbungen entstehen und setzt sich aus der Färbeintensität und aus der prozentualen Anzahl positiver Zellkerne zusammen und wurde jeweils sowohl perinekrotisch als auch nekrosefern angewandt. Man unterscheidet vier verschiedene Stufen: 0 = keine Signale, 1 = Signale an der Nachweisgrenze in wenigen Zellen, 2 = Signale in mehr als 10 % der Zellen, 3 = starke Signale in mehr als 50 % der Zellkerne.

3.9. Statistik

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms GraphPad Prism und des Mann-Whitney-Tests (parameterfreier, statistischer Test zur Überprüfung der Signifikanz zweier

Verteilungen). Als Signifikanzniveau wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von fünf Prozent ($p < 0,05$) vorgegeben.

4. ERGEBNISSE

4.1. Charakterisierung der Hypoxie im Tumorgewebe

4.1.1. Messung von Gefäßabständen, Hypoxie und spontanen Tumornekrosen

Die Wahrscheinlichkeit, dass sich in einem bestimmten Gewebe ein Sauerstoffgradient aufbaut, ist umso größer, je größer die Distanz zwischen zwei Gefäßen ist. In 18 experimentellen Tumoren unterschiedlicher Größe wurde diese Distanz bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass Tumore ohne Nekrose einen signifikant geringeren Gefäßabstand aufweisen als Tumore mit Nekrose und dass die Gefäßabstände positiv mit dem Tumorvolumen bzw. mit dem Tumorgewicht korrelieren.

Die Abbildungen 1 und 2 zeigen, dass die Gefäßabstände mit der Größe des Tumors korrelieren. In alten Tumoren ist die Gefäßdistanz signifikant größer als in jungen Tumoren. Unter alten Tumoren wird in dieser Arbeit ein Tumoralter von 28 Tagen, unter jungen Tumoren ein Tumoralter zwischen 12 und 19 Tagen verstanden.

Abbildungen 1 A-B

A: Darstellung der durchschnittlichen Gefäßdistanz pro untersuchten Fall mit Angabe der Standardabweichung. **B:** Vergleichende Darstellung der durchschnittlichen Gefäßdistanz in Tumoren mit und ohne Nekrose. In Tumoren ohne Nekrose ist die Gefäßdistanz signifikant geringer (★) als in Tumoren mit Nekrose ($p = 0{,}0043$; Mann-Whitney-Test). **C:** Vergleichende Darstellung der durchschnittlichen Gefäßdistanz in alten und jungen Tumoren. Auch hier ist ersichtlich, dass die Gefäßdistanz in jungen Tumoren signifikant geringer (★) ist als in alten Tumoren ($p = 0{,}0001$).

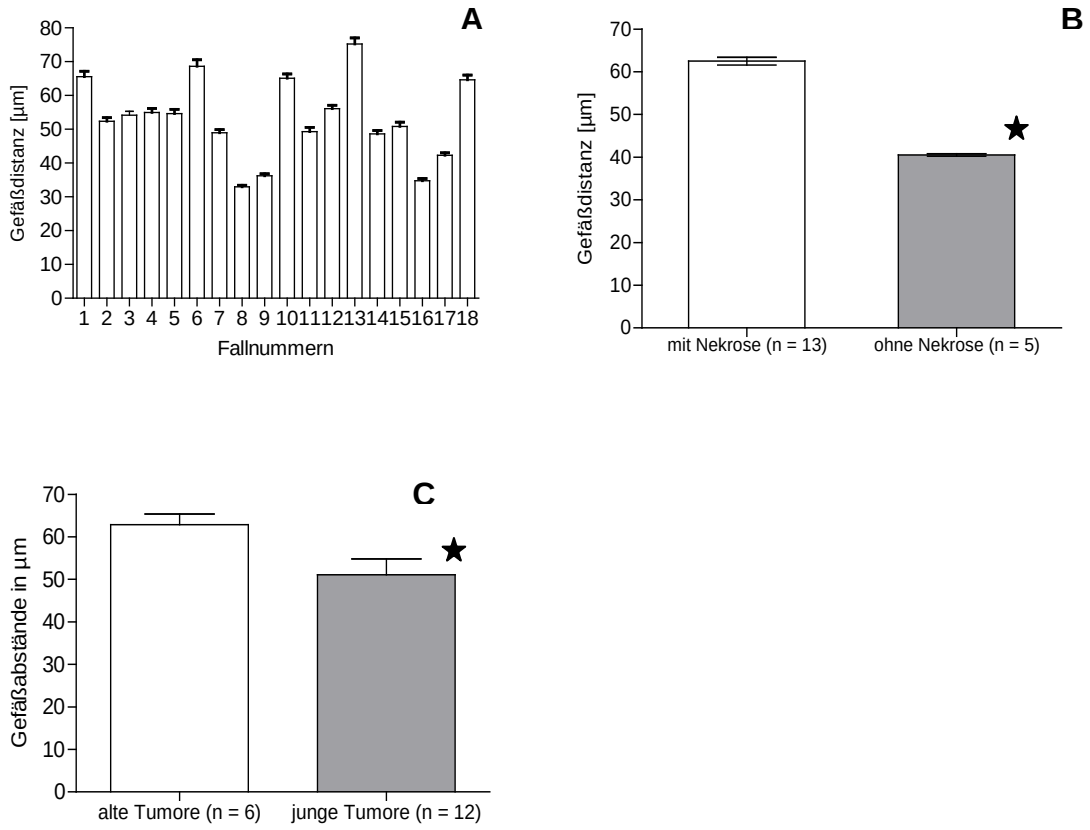
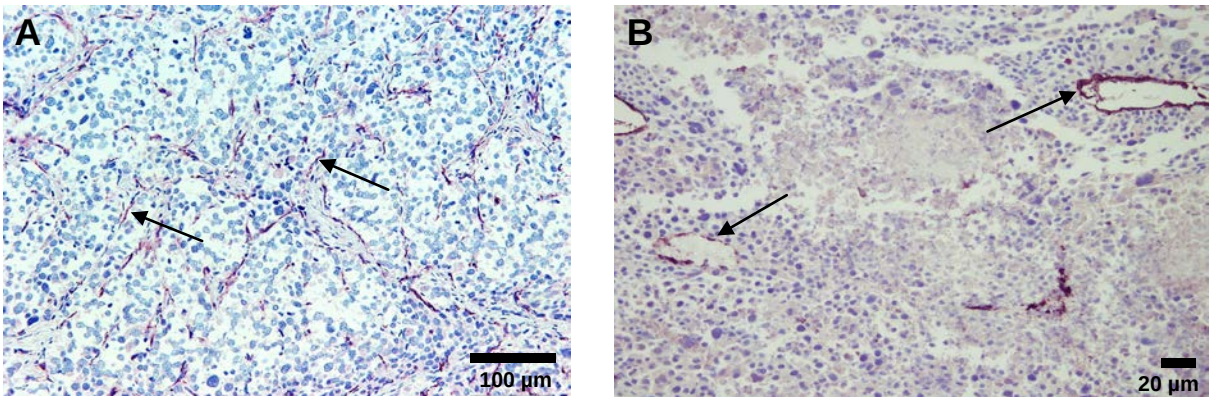


Abbildung 2 A-B

A: CD31 Immunhistochemie; Peroxidase-Färbung mit VIP-Chromogen; Fall 7 und **B:** Fall 5. Maus 5 zeigt eine signifikant höhere durchschnittliche Gefäßdistanz (55 µm) im Vergleich zu Maus 7 (49 µm).



In Tabelle 8 (siehe Anhang) werden die Tumordaten des untersuchten Mauskollektivs bezüglich Gewicht, Volumen und Nekrose dargestellt. Es zeigt sich, dass sowohl Gewicht und Volumen als auch der Anteil der Nekrosen im Tumor mit dem Alter der Tumoren korrelieren. Anhand der dargestellten Daten ist aber auch

ersichtlich, dass keine direkte Linearität zwischen Alter der Tumoren und Auftreten von Nekrosen besteht, da auch junge Tumoren bereits Nekroseareale aufweisen können.

Abbildung 3

Korrelation von Größe der Nekrose zur durchschnittlichen Gefäßdichte. Es konnte gezeigt werden, dass eine signifikante (p = 0,0005) Korrelation besteht. Je mehr Nekrose in einem Tumor vorhanden ist, desto geringer wird die Gefäßdichte.

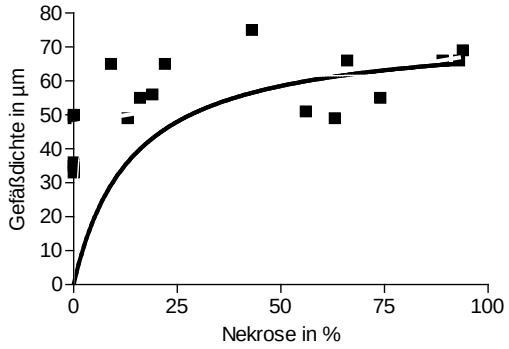
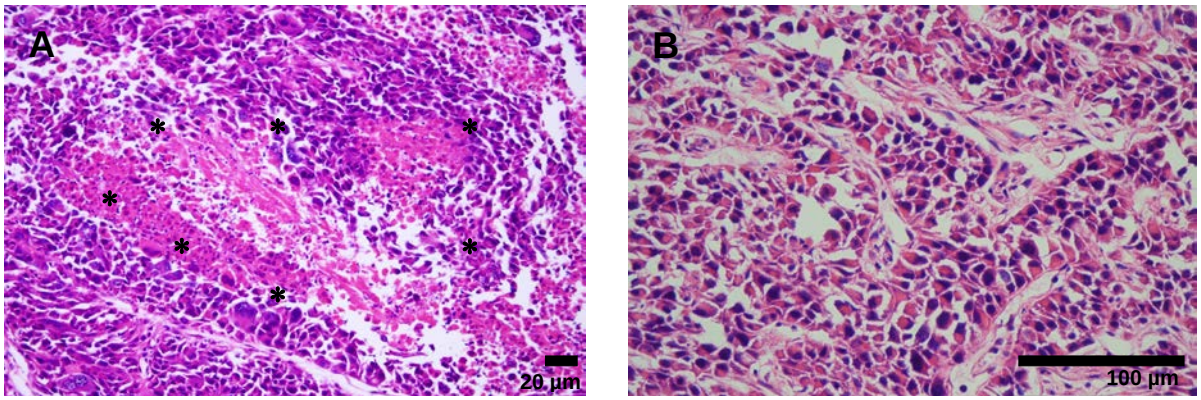


Abbildung 4 A-B

Immunhistochemie, HE-Färbungen. **A:** Fall 5 repräsentiert einen alten Tumor mit einem hohen Nekroseanteil. Der Nekroserand ist mit * markiert. **B:** Fall 7 zeigt einen jungen Tumor ohne Nekrose.



4.1.2. Expression von HIF-1α

Die HIF-1α-Expression ist in jungen Tumoren niedriger als in alten Tumoren. In jenen alten Tumoren, in denen hohe Anteile an Nekrose und damit auch hypoxische Areale vorhanden sind, wird HIF-1α vor allem perinekrotisch exprimiert. Perinekrotische Areale wurden in Tumoren mit Nekrosezone unabhängig vom Tumoralter ausgewertet. Nekroseferne Areale wurden in allen Tumoren unabhängig vom Tumoralter ausgewertet.

Abbildung 5

Graphische Darstellung der HIF-1α-Expression im Vergleich nekrosefern und perinekrotisch. Dargestellt sind alle Tumoren mit Nekrose unabhängig vom Alter. Die HIF-1α-Expression ist perinekrotisch signifikant höher (★) (p = 0,0003; Mann-Whitney-Test) als nekrosefern.

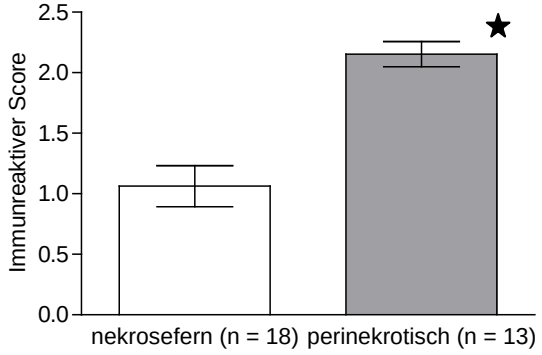
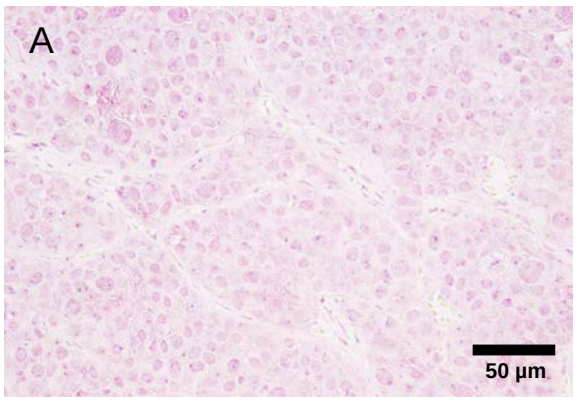
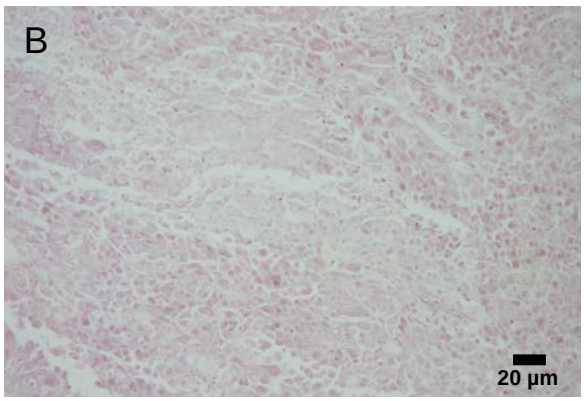


Abbildung 6 A-B

HIF-1α Immunhistochemie; Peroxidase-Färbung mit VIP-Chromogen; Fall 7 **(A)** und Fall 5 **(B)**. Unter hypoxischen Bedingungen, wie sie in alten Tumoren vorherrschen (B) sieht man, dass HIF-1α hochreguliert ist.





4.2. Quantifizierung des Makrophageninfiltrats

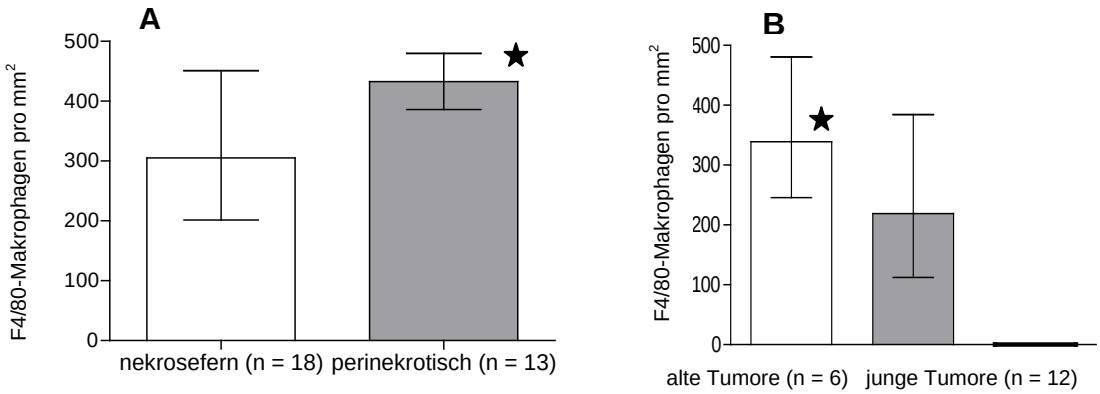
Die Auswertung der Makrophageninfiltration erfolgte anhand der immunhistochemischen Färbungen der F4/80-, CD11b- und MRP14-Antikörper. Unterschieden wurden dabei junge Tumoren sowie alte Tumoren und die sich daraus ergebenden nekrosefernen und perinekrotischen Areale. Perinekrotische Areale wurden in Tumoren mit Nekrosezone unabhängig vom Tumoralter ausgewertet. Nekroseferne Areale wurden in allen Tumoren unabhängig vom Tumoralter ausgewertet. Es konnte gezeigt werden, dass alte Tumoren eine stärkere Makrophageninfiltration im Vergleich zu den jungen Tumoren zeigen. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Makrophagen vor allem im perinekrotischen Bereich akkumulieren.

4.2.1. F4/80

Das F4/80-Antigen als Panmakrophagenmarker wird vor allem von Makrophagen im perinekrotischen Bereich exprimiert. Abbildung 7 zeigt, dass die Makrophageninfiltration im perinekrotischen Bereich signifikant höher ist als im nekrosefernen Bereich.

Abbildung 7 A-B

A: Verteilung der F4/80-Makrophagen in alten Tumoren. Die graphische Darstellung zeigt, dass die perinekrotische Makrophageninfiltration signifikant höher (★) ist ($p = 0{,}0039$; Mann-Whitney-Test) als die nekroseferne Makrophageninfiltration. **B:** Vergleichende Darstellung der F4/80-Makrophagen in jungen und in alten Tumoren. F4/80-Makrophagen akkumulieren in alten Tumoren signifikant mehr (★) ($p = 0{,}0131$; Mann-Whitney-Test) als in jungen Tumoren.



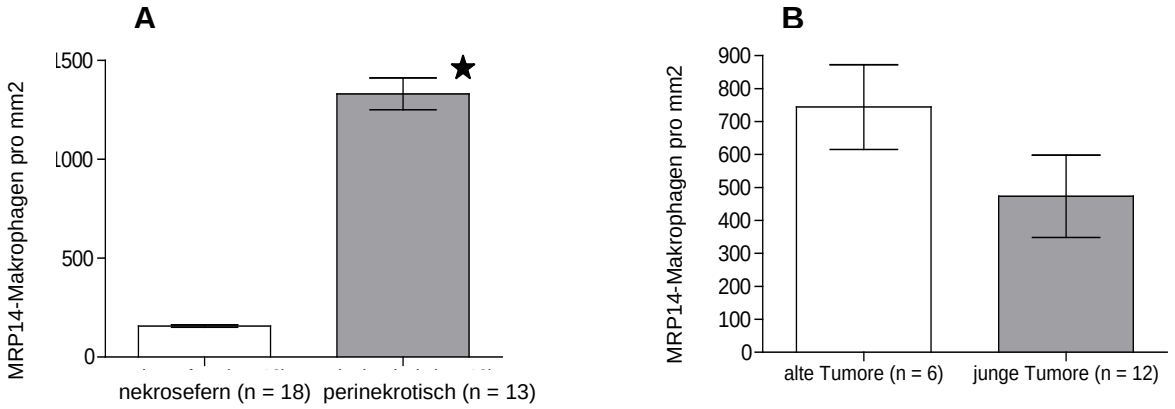
4.2.2. MRP14

Der MRP14-Antikörper gehört zur Familie der S100-Proteine und markiert vor allem inflammatorische Makrophagen.

Abbildung 8 zeigt die Verteilung der Makrophagen in allen untersuchten Tumoren in perinekrotischen und nekrosefernen Arealen sowie den Vergleich der Makrophageninfiltration in alten und jungen Tumoren. Wie bereits bei der immunhistochemischen Färbung mit dem F4/80-Antikörper gezeigt werden konnte, akkumulieren auch die inflammatorischen Makrophagen signifikant im perinekrotischen Bereich. Tendenziell kann eine höhere Makrophageninfiltration in alten Tumoren verglichen mit jungen Tumoren beobachtet werden. Ein signifikanter Unterschied konnte jedoch nicht gezeigt werden.

Abbildung 8 A-B

A: Verteilung der MRP14-Makrophagen in allen Tumoren unabhängig vom Alter. Die graphische Darstellung zeigt, dass die perinekrotische Makrophageninfiltration signifikant höher (★) ist (p = 0,0001; Mann-Whitney-Test) als die nekroseferne Makrophageninfiltration. **B:** Vergleichende Darstellung der MRP14- Makrophagen in jungen und in alten Tumoren. Es ist zu erkennen, dass alte Tumoren tendenziell eine größere Makrophageninfiltration zeigen.

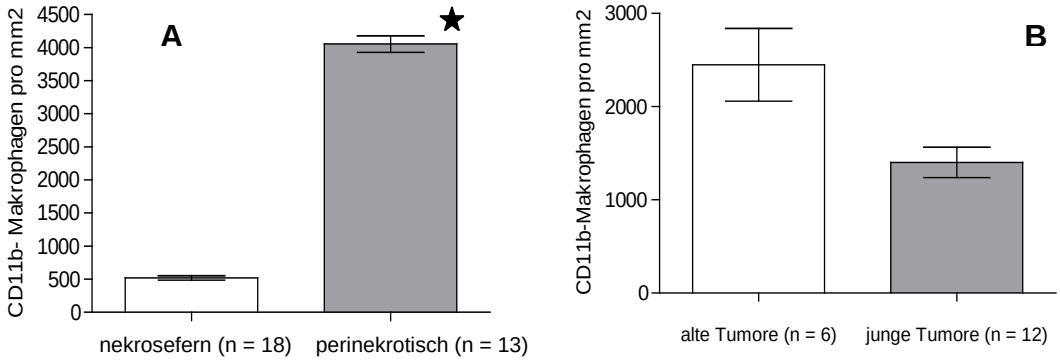


4.2.3. CD11b

Um eine weitere Subpopulation der Makrophagen zu untersuchen, wurde die immunhistochemische Färbung mit dem CD11b-Antikörper durchgeführt. Die Expression von CD11b auf Makrophagen erhöht sich während der Monozytenreifung und variiert auf Gewebsmakrophagen. Abbildung 9 zeigt die Makrophageninfiltration aller Tumoren in nekrosefernen und perinekrotischen Arealen. Auch hier zeigt sich eine deutlich signifikante Akkumulation der Makrophagen im perinekrotischen Bereich. Wie bei den MRP14-Makrophagen schon gezeigt werden konnte, können die CD11b-Makrophagen im Vergleich tendenziell mehr in alten Tumoren nachgewiesen werden als in jungen Tumoren.

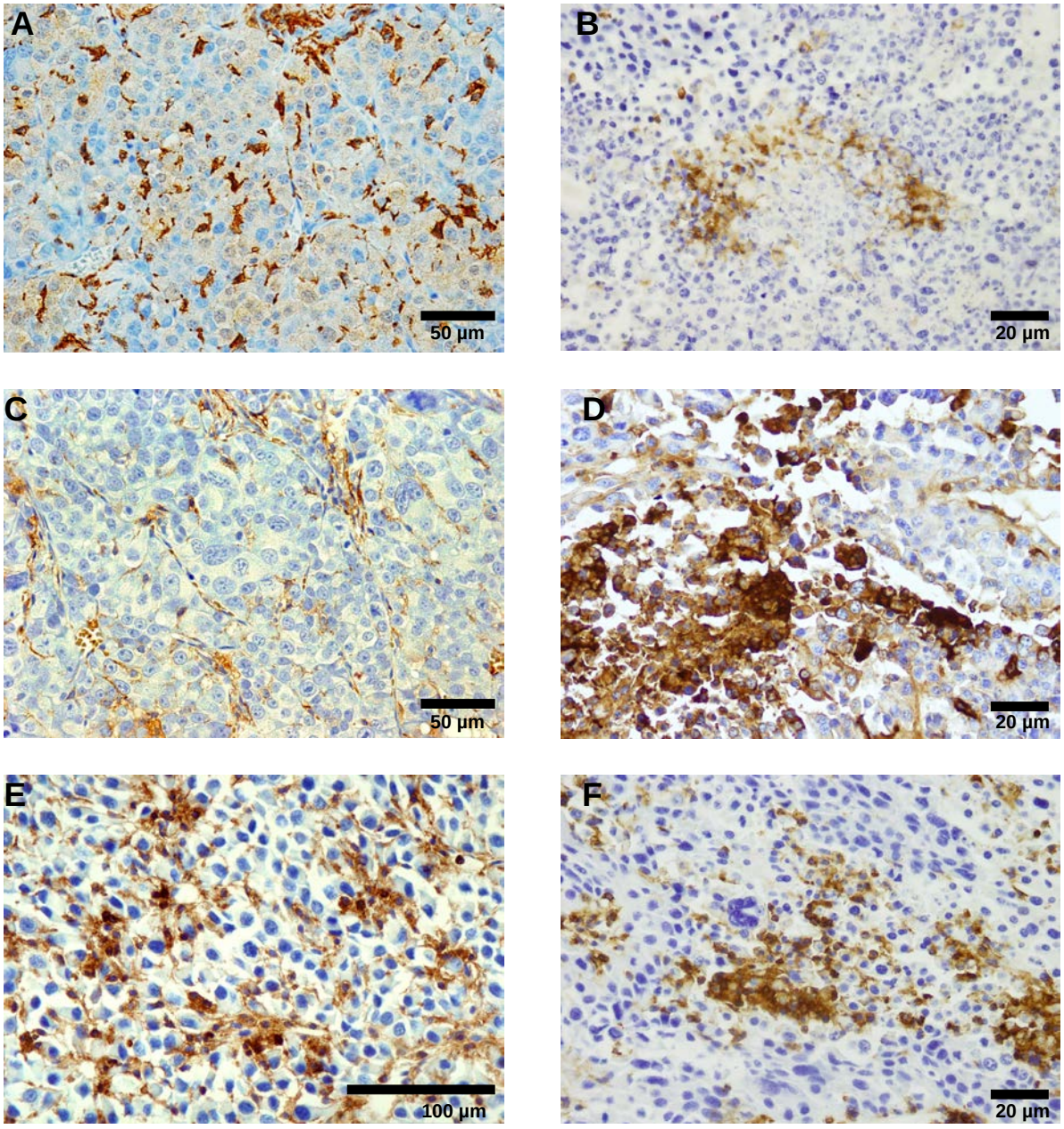
Abbildung 9 A-B

A: Verteilung der CD11b-Makrophagen in allen untersuchten Tumoren. Die graphische Darstellung zeigt, dass die perinekrotische Makrophageninfiltration signifikant höher (★) ist (p = 0,0001; Mann-Whitney-Test) als die nekroseferne Makrophageninfiltration. **B:** Vergleichende Darstellung der CD11b-Makrophagen in jungen und in alten Tumoren. In alten Tumoren ist eine tendenziell größere Infiltration von CD11b-Makrophagen zu erkennen.


A
CD11b- Makrophagen pro mm2
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
nekrosefern (n = 18)
perinekrotisch (n = 13)
B
CD11b-Makrophagen pro mm2
3000
2000
1000
0
alte Tumore (n = 6)
junge Tumore (n = 12)

Abbildungen 10 A-F

Immunhistochemie der Makrophageninfiltrate; Peroxidase-Färbung mit DAB-Chromogen. **A, B.** Vergleich der F4/80-Expression im jungen (A, Fall 7) und im alten (B, Fall 5) Tumor. Deutlich zu erkennen ist die perinekrotische Akkumulation der Makrophagen. Im jungen Tumor ist die Verteilung der Makrophagen nahezu homogen. **C, D:** Vergleich der MRP14-Expression im jungen (C, Fall 7) und im alten (D, Fall 5) Tumor. Auch hier ist die perinekrotische Akkumulation der Makrophagen im alten Tumor deutlich zu erkennen. **E, F:** Vergleich der CD11b-Expression im jungen (E, Fall 7) und im alten (F, Fall 5) Tumor.



4.3. Stickstoffmonoxid in Tumoren

4.3.1 Untersuchung der iNOS-Expression

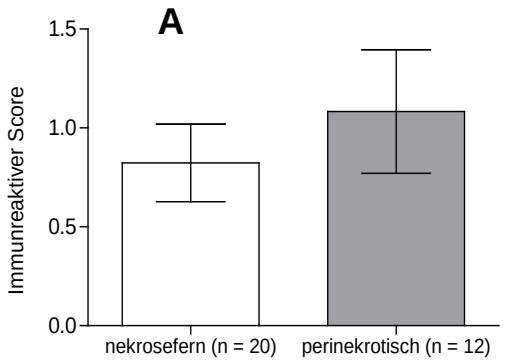
Immunhistochemie

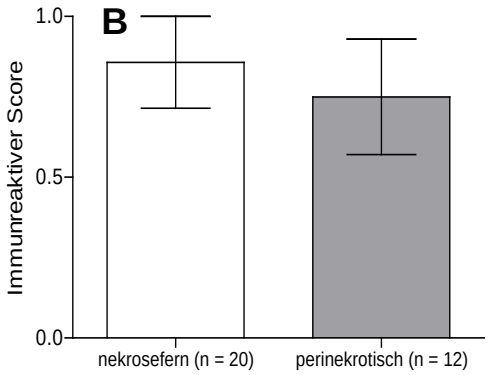
Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte anhand des immunreaktiven Scores. Dabei wurde die iNOS-Expression der Tumorzellen, der Makrophagen und der Endothelien getrennt betrachtet. Zur genaueren Auswertung der Ergebnisse wurden hier zwei weitere Fälle (junge Tumoren primär ohne Nekrose) hinzugenommen.

Auf Proteinebene konnte kein signifikanter Unterschied in der iNOS-Expression gesehen werden. Die Makrophagen exprimieren iNOS sowohl in jungen Tumoren als auch in alten Tumoren in gleicher Stärke. Auch bei den Tumorzellen und Endothelzellen konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Expression gezeigt werden, jedoch exprimieren perinekrotische Zellen tendenziell mehr iNOS als die nekrosefernen Zellen beziehungsweise Zellen in Tumoren ohne Nekrose.

Abbildung 11 A-B

Graphische Darstellung des Immunreaktiven Scores. Die iNOS-Expression ist sowohl bei Makrophagen als auch bei Tumor- und Endothelzellen gleich. **A:** Bei der Auswertung der Tumorzellen zeigte sich eine etwas höhere Expression perinekrotisch (p = 0,6387; Mann-Whitney-Test). **B:** Bei der Auswertung der Endothelien zeigte sich eine höhere Expression nekrosefern (p = 0,6745; Mann-Whitney-Test).



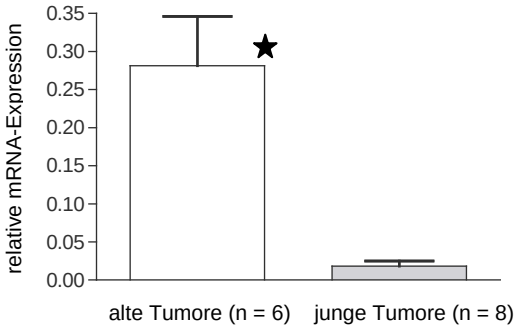


RT-PCR

Die Auswertung der RT-PCR zeigt, dass die iNOS-Expression auf mRNA-Ebene in alten Tumoren signifikant erhöht ist, was darauf zurückzuführen ist, dass die Anzahl der Makrophagen, die sich perinekrotisch akkumulieren, in alten Tumoren höher ist.

Abbildung 12

Graphische Darstellung der relativen mRNA-Expression bei Anwendung der Δct-Methode ($y = 2^{\Delta ct\ PBGD\text{-}iNOS}$). Auf mRNA-Ebene ist die iNOS-Expression in alten Tumoren signifikant erhöht (★) ($p = 0{,}002$; Mann-Whitney-Test).



4.3.2 Untersuchung der αActinin-4-Expression

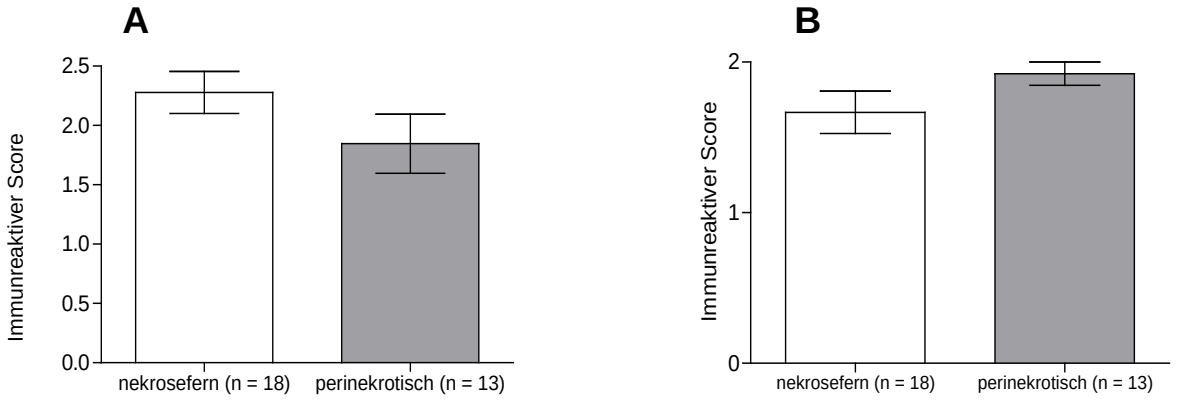
Immunhistochemie

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte anhand des immunreaktiven Scores. Dabei wurde die αActinin-4-Expression der Tumorzellen und der Endothelien betrachtet. Auf Proteinebene konnte weder im Vergleich von Tumorzellen zu Endothelzellen noch im Vergleich perinekrotisch zu nekrosefern ein signifikanter Unterschied der αActinin-4-Expression gesehen werden.

Abbildung 13 A-B

Graphische Darstellung des Immunreaktiven Scores. Die αActinin-4-Expression ist sowohl bei Makrophagen als auch bei Tumor- und Endothelzellen gleich. **A:** Bei der Auswertung der Tumorzellen zeigte sich eine etwas höhere Expression nekrosefern.

B: Bei der Auswertung der Endothelien zeigte sich kein Unterschied zwischen nekrosefern und perinekrotisch.

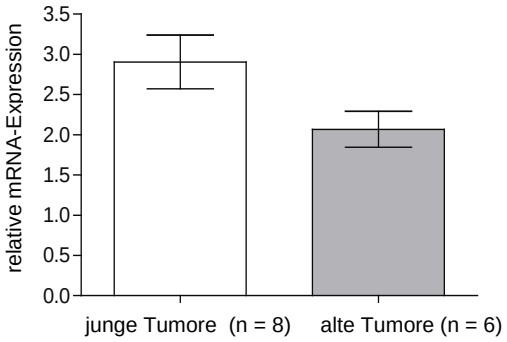


RT-PCR

Die Auswertung der RT-PCR zeigt, dass die αActinin-4-Expression auf mRNA-Ebene wie auf Proteinebene weder in alten Tumoren noch in jungen Tumoren signifikant erhöht ist.

Abbildung 14

Graphische Darstellung der relativen mRNA-Expression (Δct-Methode, $y = 2^{\Delta ct\ PBGD-\alpha ACTN4}$). Auf mRNA-Ebene konnte kein signifikanter Unterschied (p = 0,1007; Mann-Whitney-Test) in der αActinin-4-Expression in alten und in jungen Tumoren gesehen werden.

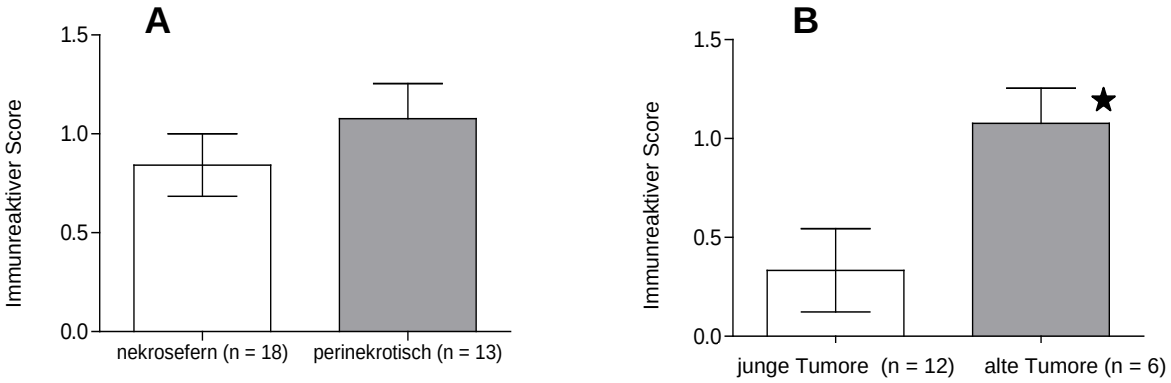


4.3.3. Untersuchung der eNOS-Expression

In alten Tumoren ist die eNOS-Expression der Endothelzellen signifikant höher als in jungen Tumoren. Im Vergleich nekrosefern zu perinekrotisch konnte allerdings kein signifikanter Unterschied gesehen werden. Tendenziell ist die eNOS-Expression perinekrotisch höher als nekrosefern.

Abbildung 15 A-B

A: Die statistische Auswertung zeigt, dass in Endothelzellen tendenziell im perinekrotischen Bereich mehr eNOS exprimiert wird. **B:** In alten Tumoren wird signifikant mehr (★) eNOS exprimiert als in jungen Tumoren (p = 0,0454; Mann-Whitney-Test).

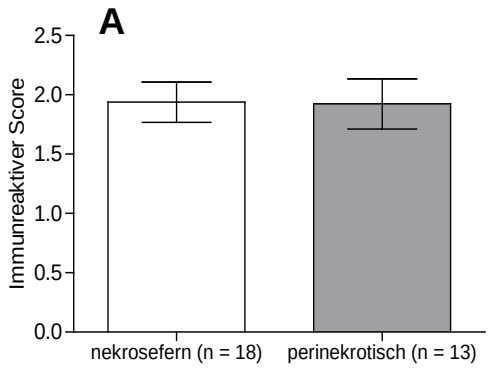


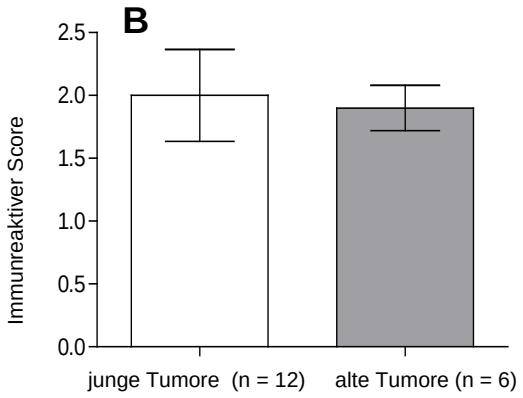
4.3.4. Untersuchung von anti-Nitrotyrosin

Bei der Auswertung der anti-Nitrotyrosin-Färbungen konnte weder im Vergleich nekrosefern zu perinekrotisch noch im Vergleich junger versus alter Tumor ein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Abbildung 16 A-B

A: Sowohl perinekrotisch als auch nekrosefern konnte anti-Nitrotyrosin in gleicher Menge nachgewiesen werden. **B:** Es konnte auch kein signifikanter Unterschied im Vergleich junge versus alte Tumoren gesehen werden.



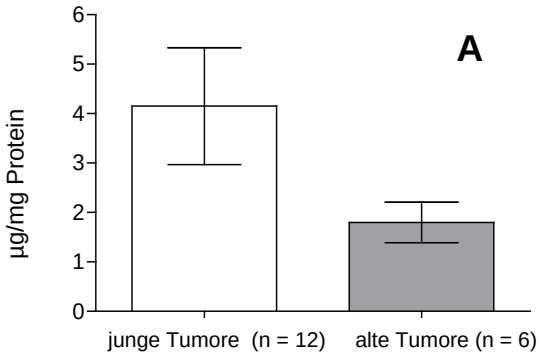


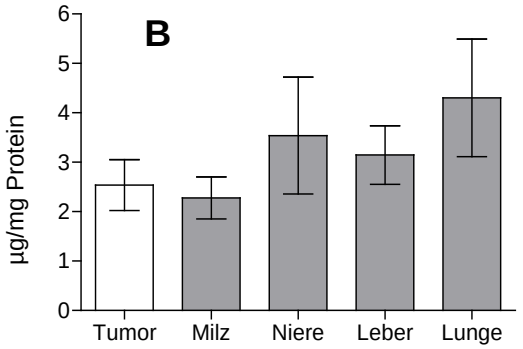
4.4. Griess-Reaktion

Die Auswertung der Griess-Reaktion erfolgte zum einen im Vergleich des Nitritgehaltes von alten und jungen Tumoren und zum anderen im Vergleich der Nitritmenge zwischen Tumor und anderen Organsystemen wie zum Beispiel Milz, Niere, Leber und Lunge. Es zeigte sich, dass in jungen Tumoren mehr Nitrit gebildet wurde als in alten Tumoren. Ein Unterschied zwischen Tumor und anderen Organsystemen konnte hingegen nicht gezeigt werden.

Abbildung 17 A-B

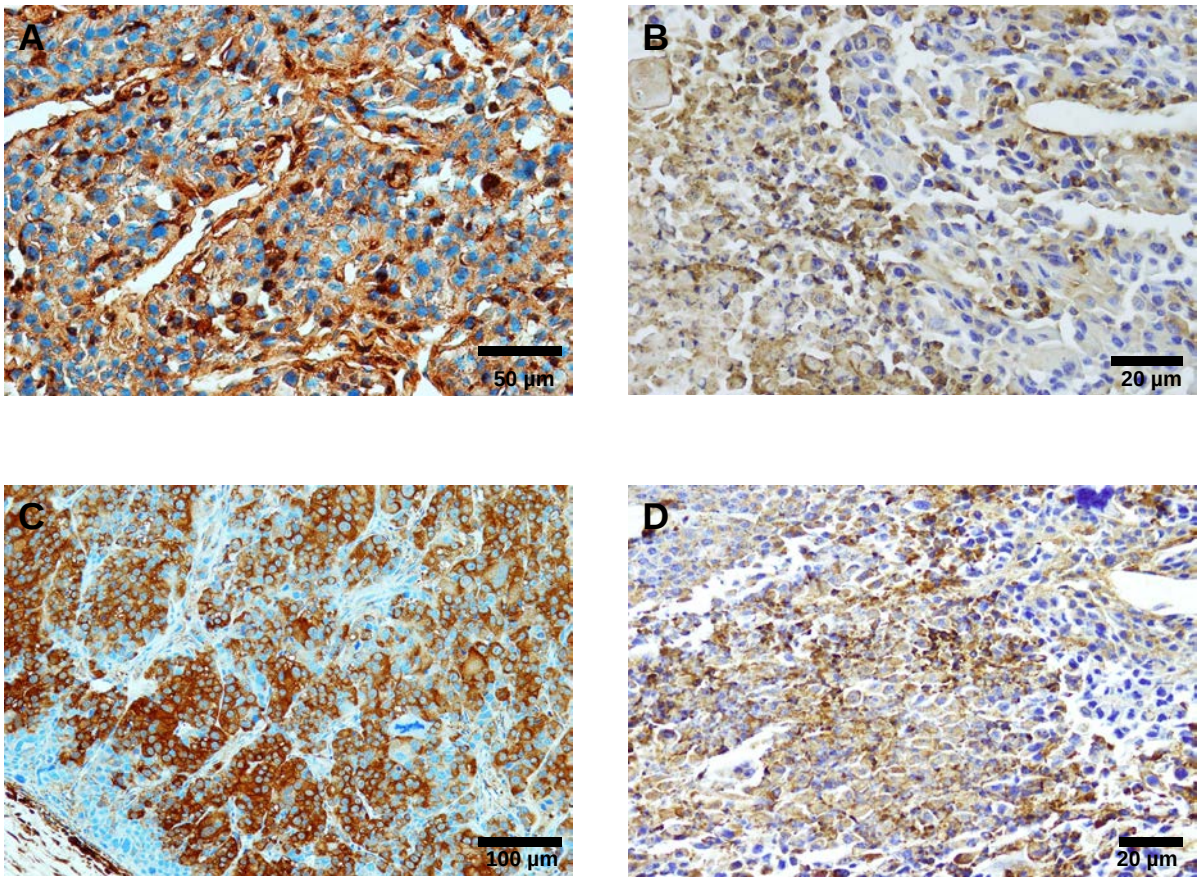
A: Vergleich des Nitritgehaltes zwischen jungen und alten Tumoren. Der Nitritgehalt ist in jungen Tumoren höher als in alten Tumoren (p = 0,0873; Mann-Whitney-Test).
B: Der Nitritgehalt zwischen Tumoren, Milz, Niere, Leber und Lunge zeigt im Wesentlichen keinen signifikanten Unterschied.

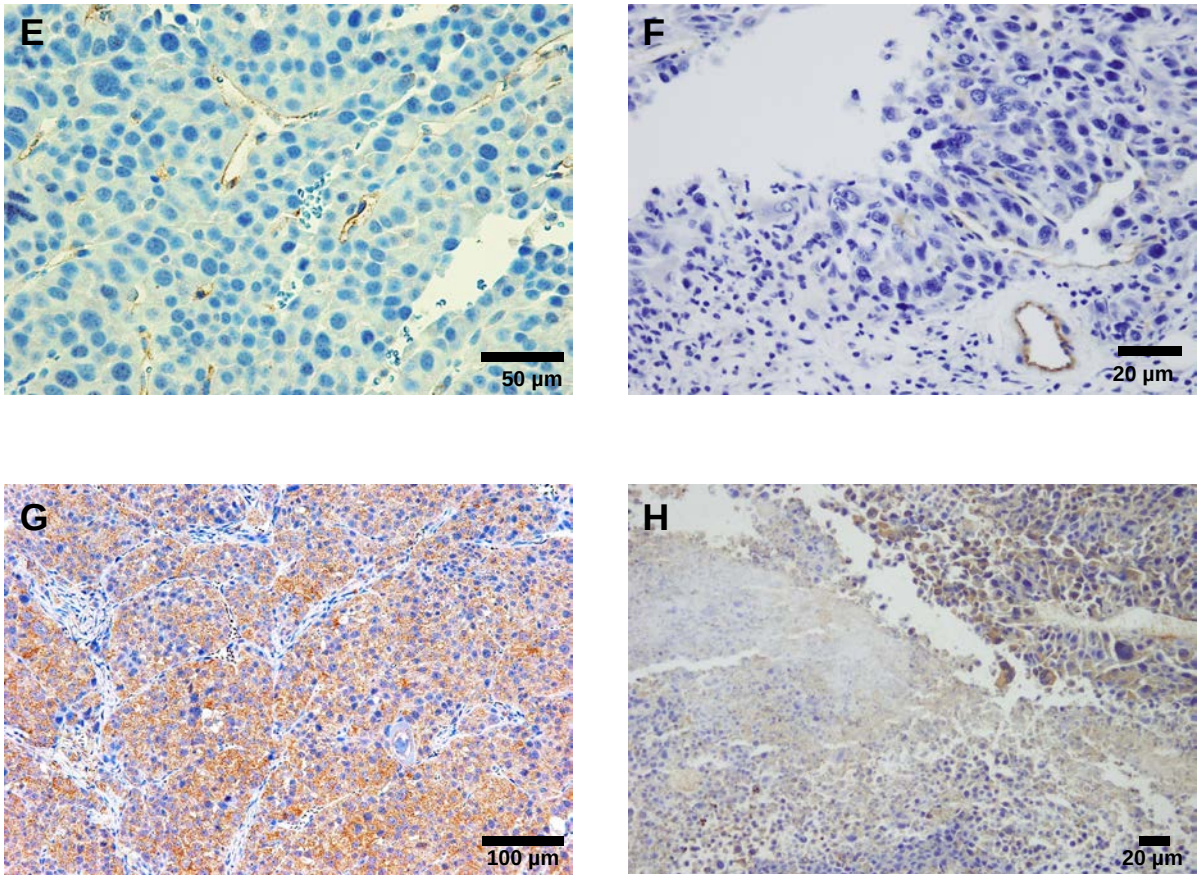




Abbildungen 18 A-H

Immunhistochemie Färbungen; Peroxidase-Färbung mit DAB-Chromogen. **A:** iNOS-Expression im jungen Tumor (Fall 7). Es zeigte sich eine homogene Intensität der Zellsignale. **B:** iNOS-Expression im alten Tumor (Fall 5). Die iNOS-Expression ist perinekrotisch am stärksten ausgeprägt. **C:** αActinin4-Expression im jungen Tumor (Fall 7). Es zeigte sich auch hier eine homogene Intensität der Zellsignale. **D:** αActinin4-Expression im alten Tumor (Fall 5). **E:** eNOS-Expression im jungen Tumor (Fall 7). **F:** Die eNOS-Expression im alten Tumor (Fall 5) ist signifikant höher als im jungen Tumor. Ein signifikanter Unterschied zwischen nekrosefern und perinekrotisch konnte nicht gesehen werden. **G:** Darstellung des anti-Nitrotyrosin-Anteils im jungen Tumor (Fall 7). **H:** Im alten Tumor (Fall 5) ist der anti-Nitrotyrosin-Anteil immunhistochemisch nicht wesentlich deutlicher ausgeprägt. Ein signifikanter Unterschied zwischen nekrosefern und perinekrotisch konnte ebenfalls nicht beobachtet werden.




E
50 µm
F
20 µm
G
100 µm
H
20 µm

5. DISKUSSION

In dieser Arbeit wurden anhand des RENCA-Tumormodells Gefäßdichte, Makrophageninfiltration und Hypoxie untersucht. Dadurch sollen die murine Tumorentwicklung und der Tumorverlauf besser verstanden werden und Rückschlüsse auf das humane Nierenzellkarzinom gezogen werden. Die Makrophageninfiltration und Hypoxie wurden mittels spezifischer Marker histochemisch untersucht und quantifiziert. Zusätzlich erfolgte ein Nitritnachweis mittels Griess-Reaktion.

Die Gefäßdichte ist in jungen Tumoren höher als in alten Tumoren. Alte Tumoren haben einen höheren Nekroseanteil.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Alter der Tumoren mit der Tumorgröße, dem Anteil der Nekrosen sowie mit der Gefäßdichte korreliert. Alte Tumoren haben einen höheren Nekroseanteil als junge Tumoren. Da eine direkte Korrelation des Tumoralters mit dem Auftreten von Nekrosen jedoch nicht gesehen werden konnte, schließen wir daraus, dass es für das Auftreten und die Ausdehnung von Tumornekrosen noch weitere Faktoren geben muss. Unsere Ergebnisse zeigen, dass auch einige junge Tumoren bereits Nekroseareale aufweisen.
Die Gefäßdichte ist in jungen Tumoren signifikant höher als in alten Tumoren. Das zeigt, dass die Induktion von Tumornekrosen mit einem höheren Gefäßabstand einhergeht.
Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit diversen Studien, die unter anderem beim humanen Nierenzellkarzinom gezeigt haben, dass hypoxische Tumornekrosen mit einer signifikant erniedrigten Gefäßdichte und einem niedrigen histologischen Differenzierungsgrad assoziiert sind (Hemmerlein et al. 2001, Yildiz et al. 2008, Imao et al. 2004). Hypoxische Areale resultieren aus meist schlecht organisierten, blind endenden Gefäßen mit inkompletter Endothelschicht, die eine Tendenz zum Kollabieren zeigen (Brown JM und Giaccia 1998, Blood und Zetter 1990). Die Versorgung des Tumors kann nicht mehr aufrecht erhalten werden, da der erhöhte Gefäßabstand einen höheren Diffusionsgradienten bedingt. Es kommt zur Hypoxie mit nachfolgenden Tumornekrosen. Die Gründe für die erhöhten Gefäßabstände beim Nierenzellkarzinom können zum einen in einem generellen Wachstum der

Tumorzellen durch Einlagerung diverser Proteine, zum anderen aber auch in der Hemmung proangiogenetischer Faktoren, zum Beispiel durch vermehrte NO-Anreicherung, liegen. NO ist in hohen Konzentrationen toxisch, so dass es in alten Tumoren zur Hemmung der Angiogenese kommen könnte. Denkbar wäre auch, dass es im Tumorgewebe zu einer physiologischen Gefäßregression kommt. Die hier vorliegenden Ergebnisse spiegeln die Daten einer randomisierten Erhebung der Gefäßabstände in allen Tumoren wider, so dass daraus nicht hervorgeht, ob es in bestimmten Tumorbereichen, zum Beispiel in der perinekrotischen Infiltrationszone, Areale besonders niedriger Gefäßabstände gibt. Anhand der geringen Standardabweichung lässt sich allerdings ein sehr homogenes Muster der Randomisierung erkennen.

Die in dieser Arbeit erlangten Ergebnisse bezüglich des murinen Nierenzellkarzinoms stehen im Gegensatz zu Studien anderer Malignome, die eine erhöhte Gefäßdichte mit fortschreitendem Tumorstadium beobachtet haben. So konnten zum Beispiel Rasheed et al. (2008) nachweisen, dass beim Rektumkarzinom die Gefäßdichte mit steigendem Malignitätsgrad und zunehmender Größe der Tumoren zunimmt. Somit kann die Gefäßdichte ein Marker für eine frühzeitige Tumorprogression zum Beispiel beim Mammakarzinom (Weidner et al. 1991, Gasparini et al. 1995), Kolonkarzinom (Choi et al. 1998, Vermeulen et al. 1995) oder Prostatakarzinom (Weidner et al. 1993) sein. Ein Zusammenhang mit einer frühen Metastasierung konnte jedoch bislang nicht gezeigt werden (MacLennan und Bostwick 1995, Slaton et al. 2001). Man geht aber davon aus, dass die Ausdehnung der Tumornekrosen ein wichtiger prognostischer Faktor für den Verlauf maligner Erkrankungen, zum Beispiel dem Mammakarzinom, ist. Somit können Nekrosen als ein Zeichen für Tumoren mit aggressivem Phänotyp (Leek et al. 1999) gewertet werden.

HIF-1α wird in alten Tumoren vor allem perinekrotisch exprimiert

Der Hypoxie-induzierte Faktor-1α (HIF-1α) ist ein Heterodimer mit einer α- und einer β-Untereinheit, das die Fähigkeit besitzt, sich an DNA zu binden. HIF-1α spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Angiogenese, der Tumorprogression sowie der Tumormetastasierung als Transkriptionsfaktor der verschiedenen Schlüsselproteine (zum Beispiel VEGF) und wird von normoxischen Zellen kontinuierlich produziert. Unter Sauerstoffzufuhr wird HIF-1α durch eine Prolinhydroxylase hydroxyliert und

anschließend über die Ubiquitinylierung im Proteasom abgebaut. Unter hypoxischen Bedingungen vermindert sich allerdings die Ubiquitinylierung, so dass die HIF-1α-Konzentration in der Zelle zunimmt.

In Übereinstimmung mit zum Beispiel Yu A et al. (1998), die herausfanden, dass Alveolarmakrophagen in vitro ihre HIF-1α-Expression unter hypoxischen Bedingungen hochregulieren, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die nukleäre HIF-1α-Expression der Tumorzellen in alten Tumoren signifikant höher ist als in jungen Tumoren. Dabei findet sich eine höhere Expression vor allem in den perinekrotischen Bereichen, woraus geschlossen werden kann, dass die perinekrotische Gewebszone eine hypoxische Zone ist. Die Expression von nukleär lokalisiertem HIF-1α ist auch in kolorektalen Tumoren signifikant höher als in nicht-neoplastischer kolorektaler Schleimhaut. Dabei korreliert die Expression von HIF-1α mit der Infiltrationstiefe, dem Dukes Staging und der Gefäßdistanz (Yu J et al. 2006). Hypoxie resultiert aus einem Missverhältnis von Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf. Dieses Missverhältnis kann sich nicht nur in malignen Tumoren, sondern auch in entzündlich verändertem Gewebe ausbilden. Auch bei anderen Erkrankungen wie der rheumathoiden Arthritis (RA) konnte ein Zusammenhang zwischen der HIF-1α-Expression von Makrophagen und Hypoxie beobachtet werden. Es fand sich eine hohe HIF-1α-Expression in Gebieten mit hoher Makrophageninfiltration. Eine Makrophagenakkumulation kann auch bei der RA in hypoxischen Arealen gefunden werden (Hollander et al. 2001). Durch die vermehrte Präsenz von HIF-1α kommt es bei der RA zur vermehrten Ausschüttung von VEGF durch die akkumulierten Makrophagen. Dies führt wiederum zu vermehrter Angiogenese im entzündeten Gewebe und zu vermehrtem Auftreten von mikrovaskulären Strukturen (Giatromanolaki et al. 2001).

In chronisch entzündetem Gewebe, wie es bei der RA der Fall ist, finden sich ähnliche Eigenschaften wie im tumorösen Gewebe. Dazu gehören ein hypoxisches Milieu, eine verstärkte Rekrutierung von Makrophagen, eine verstärkte Angiogenese sowie die Infiltration in Nachbargewebe hinein (Falchuk et al. 1970, Hitchon und el-Gabalawy 2003). Ähnlich den TAM im Tumorgewebe können Fibroblasten in chronisch entzündetem Gewebe ihren Phänotyp ändern und somit die Angiogenese durch Überexpression von zum Beispiel VEGF fördern oder myeloide Vorläuferzellen aktivieren (Du et al. 2008; Del Rey et al. 2009).

HIF-1α wird zusätzlich als prognostischer Faktor für solide Tumoren diskutiert.
Birner et al. (2001) beschrieben zum Beispiel für das Ovarialkarzinom, dass a) eine erhöhte HIF-1α-Expression in Tumorzellen stattfindet und b) die Höhe der Expression mit einer signifikant erhöhten Mortalität korreliert.

Die Makrophageninfiltration ist in alten Tumoren perinekrotisch höher als nekrosefern.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde mittels Immunhistochemie die Infiltrationsdichte von F4/80-, CD11b- und MRP14-positiven Makrophagen quantitativ untersucht. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die Makrophageninfiltration aller Subpopulationen mit Ausnahme der inflammatorischen MRP14-Makrophagen in jungen Tumoren geringer ist als in alten Tumoren. In alten Tumoren werden vor allem perinekrotisch vermehrt Makrophagen gesehen. Daraus könnte geschlossen werden, dass es bei fortgeschrittenen oder aggressiven Tumoren zu einer vermehrten Makrophagenrekrutierung kommt. Durch die Hypoxie werden vermehrt chemotaktische Substanzen freigesetzt, die Makrophagen in die perinekrotischen Areale „locken“ (Turner et al. 1999, Negus et al. 1998, Leek et al. 1996). Da sie dort allerdings immobilisiert zu sein scheinen, kommt es zu einer erhöhten Dichte an TAM in Tumoren (Lewis CE und Pollard 2006).
In diversen Studien wurde bisher gezeigt, dass es in avaskulären, nekrotischen Geweben (zum Beispiel Mamma- oder Ovarialkarzinom, aber auch bei anderen Erkrankungen wie zum Beispiel der Rheumathoiden Arthritis) zu einer vermehrten Makrophageninfiltration kommt (Lewis J et al. 1999, Leek et al. 1996, Leek et al. 1999, Lewis et al. 1999, Negus et al. 1998), ohne jedoch die speziellen Makrophagen-Subtypen zu berücksichtigen.
Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten spezieller Makrophagen-Subtypen und der Entwicklung von Tumornekrosen wurde bislang noch nicht beschrieben. Da die Makrophageninfiltration jedoch mit dem Alter und der Größe der Tumoren korreliert, handelt es sich vermutlich nicht um eine tumorzytotoxische Aktivität der Makrophagen, sondern um eine Reaktion auf die Nekrosen und die Hypoxie. Tumorzytotoxische Eigenschaften der Makrophagen scheinen durch Tumorsekretion wie zum Beispiel von Prostaglandin E2 und/oder diverse Interleukine (zum Beispiel IL-4) blockiert zu werden (Wahl LM und Kleinan 1998).

Bei den MRP14-positiven Makrophagen handelt es sich um proinflammatorische Makrophagen, die bei einem akuten Geschehen sehr früh an den Ort der Verletzung beziehungsweise des Gewebeschadens einwandern (Kerkhoff et al. 1998). Passend zu den Beobachtungen, dass die MRP14-Makrophagen sehr früh einwandern, konnte kein signifikanter Unterschied zwischen jungen und alten Tumoren festgestellt werden. Proinflammatorische MRP14-Makrophagen wurden hier bereits in jungen Tumoren gefunden. Eine andere Erklärung wäre, dass die MRP14-positiven Makrophagen in ihrer Zytotoxizität zum Beispiel durch Hypoxie oder andere Tumorzytokine blockiert werden.

CD11b gehört zur Familie der Leukozyten-Integrine. Wichtig sind diese Adhäsionsmoleküle für eine spezifische Immunabwehr, da eine enge Verbindung zu T-Lymphozyten besteht. Weitere wichtige Funktionen sind zum Beispiel Phagozytose, Zellmigration sowie Extravasion von Monozyten und Lymphozyten in ein Entzündungsgebiet. Hoshino et al. (1993) konnten zeigen, dass es in verschiedenen Organen eine unterschiedliche Verteilung von CD11b-positiven Zellen gibt. Dies hat dahingehend Bedeutung, dass man in verschiedenen Studien zu Malignomen gesehen hat, dass so genannte MDSC-Zellen, die CD-11b exprimieren, die T-Zell-Funktion unterdrücken (Ochoa et al. 2007) und somit das Tumorwachstum fördern. MDSC-Zellen werden in Abhängigkeit der vom Tumor sezernierten Faktoren wie zum Beispiel GM-CSF oder M-CSF zu ausgereiften Makrophagen (Gabrilovich et al. 2004). Die in dieser Arbeit erlangten Ergebnisse zeigen eine erhöhte CD11b-positive Makrophagendichte perinekrotisch und tendenziell in alten Tumoren eine höhere Akkumulation als in jungen Tumoren. Die Rekrutierung von CD11b-Makrophagen kann daher gut mit der Suppression der Immunabwehr und damit mit der Förderung des Tumorwachstums einhergehen.

Stickstoffmonoxid in Tumoren

Stickstoffmonoxid (NO) spielt eine wichtige Rolle bei Wachstum, Metastasierung und Vaskularisierung von Tumoren (Gallo et al. 1998, Brennan et al. 2001) und ist ein bedeutsamer Trigger für VEGF (Hood et al. 1998). NO wird durch die Stickstoffmonoxidsynthase (NOS) in drei verschiedenen Isoformen gebildet:

neuronale NOS (nNOS), induzierbare NOS (iNOS) und endotheliale NOS (eNOS) (Brennan et al. 1999). In dieser Arbeit wurde mittels Immunhistochemie und RT-PCR die Expression von iNOS in alten und in jungen Tumoren untersucht. Ferner wurde die eNOS-Expression mittels Immunhistochemie im Vergleich alte versus junge Tumoren untersucht.

Alte Tumoren zeigen eine höhere mRNA-Expression von iNOS, wohingegen die Expression von αActinin-4 nicht verändert ist. Auf Proteinebene werden iNOS und αActinin-4 unabhängig von Größe und Nekrose in allen Tumoren ähnlich exprimiert.

In den immunhistochemischen Färbungen konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Expression von iNOS und αActinin-4 im Tumorgewebe nachgewiesen werden. In allen Tumorproben wurden iNOS und αActinin-4 unabhängig von Tumorgröße und Nekrosenanteil der Tumoren etwa gleich exprimiert. Mittels RT-PCR konnte jedoch eine signifikant erhöhte mRNA-Expression von iNOS nachgewiesen werden. Dies steht im Einklang mit den Daten, die Melillo et al. (1996) bezüglich der iNOS-Expression unter hypoxischen Bedingungen erhoben haben. Hier zeigte sich ebenfalls eine Induktion von iNOS-Genen, aber auch eine Hemmung der enzymatischen Aktivität.

Eine Erklärung für den Nachweis signifikant höherer iNOS-Expression in alten Tumoren auf mRNA-Ebene könnte in der perinekrotischen Akkumulation von Makrophagen, die in größeren Tumoren zu finden ist, liegen. Da Makrophagen einen erheblichen Anteil an der Expression von iNOS-Genen beitragen, ist es denkbar, dass die nachgewiesene erhöhte mRNA-Expression in den hier durchgeführten Versuchen aufgrund der erhöhten Makrophagendichte nachweisbar ist.

Daniliuc et al. (2003) konnten zeigen, dass IFN-γ und LPS die iNOS-Expression in murinen Makrophagen induzieren. Sie konnten auch zeigen, dass es zur Hemmung der iNOS-Aktivität unter hypoxischen Bedingungen kommt ohne die Proteinexpression zu beeinflussen. Verantwortlich dafür zeigte sich die Trennung der Protein-Protein-Interaktion zwischen αActinin-4 und iNOS durch Hypoxie und Verschiebung der iNOS in den Intrazellularraum.

LeCras et al. (1996) fanden in hypoxischem Lungengewebe von Ratten ebenfalls eine signifikant erhöhte mRNA-Expression von iNOS, konnten aber ebenfalls auf Proteinebene keinen Nachweis einer erhöhten iNOS-Expression finden.
In anderen Tumoren, wie zum Beispiel dem Blasenkarzinom oder dem Adenokarzinom des Magens konnte eine signifikant erhöhte iNOS-Expression nachgewiesen werden, die zum Teil auch mit dem histologischen Differenzierungsgrad korrelierte (Klotz et al. 1999, Li et al. 2005).
Auch wenn im Nierenzellkarzinom in vivo und auch in vitro bislang keine erhöhte iNOS-Expression beobachtet werden konnte, so hat man doch in Studien zum Magenkarzinom gesehen, dass die iNOS-Expression prognostische Bedeutung hat. So zeigen zum Beispiel Patienten mit Magenkarzinom und hoher iNOS-Aktivität ein signifikant geringeres Überleben als Patienten mit nur geringer oder keiner iNOS-Aktivität (Chen et al. 2006).

Eine vermehrte Expression von αActinin-4 konnten wir weder auf mRNA noch auf Proteinebene beobachten. Dies steht im Gegensatz zu diversen anderen Malignomen, wie zum Beispiel dem Ovarialkarzinom (Yamamoto et al. 2009, Barbolina et al. 2008), dem Mammakarzinom (Honda et al. 1998) oder dem Plattenepithelkarzinom des Ösophagus (Fu et al. 2007), bei denen eine erhöhte αActinin-4-Konzentration im tumorösen Gewebe nachgewiesen werden konnte und mit einem signifikant schlechteren Überleben beziehungsweise einem histologisch weit fortgeschrittenen Tumor der Patienten korreliert werden konnte. Honda et al. (2005) konnten zeigen, dass eine erhöhte αActinin-4-Konzentration bei kolorektalen Karzinomen mit der lymphatischen, nicht jedoch mit der Organmetastasierung korreliert.
In murinen Makrophagen konnte gezeigt werden, dass αActinin-4 unter normoxischen Bedingungen an iNOS zytoskelettal gebunden ist (Daniliuc et al. 2003), was eine Voraussetzung für die NO-Produktion zu sein scheint. Die Trennung unter Hypoxie scheint nicht nur die iNOS- sondern auch die αActinin-4-Aktivität zu inhibieren.

Die Griess-Reaktion zeigt, dass in jungen Tumoren der Nitritgehalt höher ist als in alten Tumoren.

Nitrit entsteht als Abbauprodukt von Stickstoffmonoxid durch die Stickstoffmonoxidsynthasen. Die Griess-Reaktion hat gezeigt, dass in jungen Tumoren mehr Nitrit vorhanden ist als in alten Tumoren. Daraus ergibt sich eine erhöhte NO-Synthaseaktivität in jungen Tumoren, die im Durchschnitt weniger Nekrosen aufwiesen als die alten Tumoren.

In alten Tumoren ist die eNOS-Expression höher als in jungen Tumoren.

Bei der immunhistochemischen Untersuchung der eNOS-Expression von Endothelzellen im murinen Nierenzellkarzinom wurde das Expressionsmuster von alten und jungen Tumoren verglichen. Die Expression im Tumorgewebe war in alten Tumoren höher als in jungen Tumoren, ein signifikanter Unterschied zwischen perinekrotisch und nekrosefern konnte jedoch nicht gesehen werden.
Auch in anderen Geweben, wie zum Beispiel dem Lungengewebe konnte unter hypoxischen Bedingungen eine Hochregulation von eNOS sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene beobachtet werden (LeCras et al. 1996).
Diese Beobachtung konnte auch für andere maligne Erkrankungen, wie zum Beispiel dem Tonsillenkarzinom gemacht werden. Dort fand sich eine signifikant erhöhte eNOS-Expression in sehr gut vaskularisiertem Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe (Lukeš et al. 2008). Im Gegensatz dazu stehen jedoch die Beobachtungen von Yu JX et al. (2006), die zeigten, dass in kolorektalen Karzinomen die eNOS-Expression signifikant niedriger ist im Vergleich zum Normalgewebe.

eNOS ist als einzige Isoform in der Lage Stickstoffmonoxid sowohl unter normoxischen als auch unter komplett anoxischen Bedingungen zu bilden (Mikula et al. 2009). NO, welches durch eNOS produziert wird, spielt eine entscheidende Rolle in der Zellregulation und Aktivierung proinflammatorischer Zellen. Der Regulationsmechanismus ist allerdings noch nicht vollständig geklärt. Es gibt Hinweise darauf, dass die Aktivierung über die Stimulation von löslicher Guanylatzyklase (sGC) und erhöhte cGMP-Spiegel stattfindet (Connelly et al. 2003).

Hood et al. (1998) konnten zeigen, dass die eNOS-Expression und eNOS-Aktivität vor allem durch VEGF reguliert wird. Die Anwesenheit von VEGF führt zu einer dosisabhängigen Hochregulation der eNOS-Expression in humanen Endothelzellen. Dies führt wiederum dazu, dass das daraus resultierende NO die Endothelzellproliferation und Gefäßpermeabilität erhöht und so die Angiogenese fördert.

Nitrotyrosin ist unabhängig von Tumoralter und Tumorgröße in etwa gleicher Menge nachweisbar.

Die Reaktion von Stickstoffmonoxid und Superoxiden führt zur Bildung von Peroxynitrit. Eine Überproduktion solcher reaktiven Moleküle führt zu DNA- und Zellschäden. Nitrotyrosin entsteht durch die Nitrierung von Tyrosinresten in Proteinen und kann als Marker für eine entsprechende Zellschädigung eingesetzt werden. Ein Nachweis von Nitrotyrosin spricht nur dafür, dass NO im Gewebe vorhanden war, es sagt allerdings nichts zu Konzentration, Halbwertszeit oder Funktionalität aus.
Immunhistochemisch konnte in der hier vorliegenden Arbeit hinsichtlich nitrifizierter Proteine weder ein Unterschied zwischen alten und jungen Tumoren noch zwischen perinekrotischen und nekrosefernen Arealen gesehen werden. Für den Nachweis von Zellschädigungen mittels anti-Nitrotyrosin-Immunhistochemie gibt es divergente Ergebnisse. Bei Tumoren des Pankreas, des Ösophagus und auch des Nierenzellkarzinoms konnte Nitrotyrosin vermehrt nachgewiesen und mit aggressivem Phänotyp, Metastasierung und Staging korreliert werden (Kato et al. 2000, Soini et al. 2006). Im Gegensatz dazu konnte keine signifikante Korrelation bezüglich Invasivität und Metastasierung und dem Nachweis von Nitrotyrosin beim Adenokarzinom des Magens gefunden werden (Bancel et al. 2006).
Die Nitrierung von Tyrosinresten kann auch während der Tumorgenese stattfinden, wie etwa MacMillan-Crow et al. (2000) am Beispiel des Pankreaskarzinoms zeigen konnten. Dies könnte ein Hinweis auf beschleunigtes Zellwachstum und Aggressivität des Tumors sein. Bezüglich der Ergebnisse dieser Arbeit scheint das Auftreten von Nitrotyrosin nicht mit dem Auftreten und Ausmaß von Nekrosen und den damit einhergehenden hypoxischen Arealen zu korrelieren.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, das RENCA-Tumormodell anhand der Hypoxie-induzierten Nekrosen, der Makrophageninfiltration sowie der iNOS-Expression und -aktivität zu charakterisieren. Folgende Beobachtungen konnten gemacht werden:

1. Spontane hypoxische Tumornekrosen sind assoziiert mit einer signifikant geringeren Gefäßdichte. Das Ausmaß der Nekrosen korreliert mit dem Alter der Tumoren.

2. Die Gefäßdichte nimmt mit Zunahme der Tumorgröße ab.

3. Alte Tumoren (28 Tage) zeigen eine höhere Makrophageninfiltration als junge Tumoren (12 bis 19 Tage). Dabei zeigt sich in alten Tumoren eine perinekrotische Akkumulation der Makrophagen.

4. MRP14-positive und CD11b-positive Makrophagen akkumulieren vor allem perinekrotisch.

5. Obwohl die iNOS-Expression auf Proteinebene keinen signifikanten Unterschied zwischen alten und jungen Tumoren ergab, findet sich auf mRNA-Ebene eine signifikant erhöhte iNOS-Expression in alten Tumoren. Hinsichtlich der αActinin-4-Expression konnte kein signifikanter Unterschied gesehen werden.

6. eNOS wird in alten Tumoren vermehrt in den Endothelzellen exprimiert.

7. Junge Tumoren haben einen höheren Nitritgehalt als alte Tumoren. Daraus ergibt sich eine erhöhte NO-Synthaseaktivität in jungen Tumoren, die normalerweise keine Nekrose haben.

8. Der Nachweis von Nitrotyrosin ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen jungen und alten Tumoren.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass bei annähernd gleicher iNOS- und αActinin-4-Expression beziehungsweise erhöhter iNOS-mRNA-Expression die Konzentration an Nitrit in Tumoren mit hypoxischer Nekrose reduziert ist. Wir schließen daraus, dass die Aktivität der NO-Synthase unter hypoxischen Bedingungen reduziert ist. Die Befunde stützen die von Daniliuc et al. (2003) erhobenen in-vitro-Daten einer die iNOS-Aktivität steuernden normoxie-abhängigen Assoziation von αActinin-4 und iNOS. Somit könnte die Aktivitätsinhibition der iNOS ein Mechanismus sein, durch den Hypoxie die Zytotoxizität von TAM inhibiert.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Gefäßdichte mit zunehmendem Alter der Tumoren abnimmt. Dies ist möglicherweise auf eine Regression der Tumorgefäße zurückzuführen, da durch Hypoxie die Angiogenese durch Hochregulation von zum Beispiel HIF-1α oder VEGF stimuliert werden sollte. Denkbar wäre, dass die Gefäßregression durch makrophagenabhängige Zytokine (zum Beispiel TNF-α) begünstigt wird.

7. ANHANG: TABELLEN 8 – 13

Tabelle 8: Quantifizierung der Nekrose im Bezug zu Tumorgewicht und Tumorvolumen sowie zur durchschnittlichen Gefäßdichte

Fall	Alter in Tagen	Volumen in ml	Gewicht in g	Nekrose in %	durchschnitt-liche Gefäß-dichte in µm
1 Tu	28	1,25	2,4	92,61	65,5
2 Tu	28	3,5	3,75	88,92	52,4
3 Tu	28	0,4	1,7	66,42	54,2
4 Tu	28	0,3	0,81	16,28	55,0
5 Tu	28	0,57	0,83	74,05	54,7
6 Tu	28	5,7	7,1	93,91	68,6
7 Tu	12	0,18	0,11	0	49,0
8 Tu	12	0,5	0,2	0	33,0
9 Tu	12	0,28	0,98	0	36,2
10 Tu	17	0,37	0,366	22,24	65,1
11 Tu	17	0,58	0,257	63,37	49,3
12 Tu	17	0,737	0,576	19,15	56,1
13 Tu	19	0,812	1,36	43,26	75,2
14 Tu	19	0,583	0,26	12,93	48,6
15 Tu	19	0,34	0,35	56,16	50,8
16 Tu	14	0,03	0,028	0	34,7
17 Tu	14	0,35	0,138	0	42,3
18 Tu	19	0,28	0,26	8,59	64,6

Tabelle 9: Auswertung von iNOS anhand des IRS

Fall	*Makrophagen*		*Tumorzellen*		*Endothelien*	
	peri-nekrotisch	nekrose-fern	peri-nekrotisch	nekrose-fern	peri-nekrotisch	nekrose-fern
1 Tu	3	n. a.	2	n. a.	2	n. a.
2 Tu	3	n. a.	0	n. a.	0	n. a.
3 Tu	3	3	3	3	0	1
4 Tu	3	3	3	0	0	0
5 Tu	3	3	0	0	0	0
6 Tu	3	3	0	0	1	1
7 Tu	n. a.	3	n. a.	0	n. a.	2
8 Tu	n. a.	3	n. a.	1	n. a.	0
9 Tu	n. a.	3	n. a.	1	n. a.	1
10 Tu	3	3	1	1	1	1
11 Tu	3	3	1	1	1	1
12 Tu	3	3	0	0	1	1
13 Tu	3	n. a.	1	n. a.	1	n. a.
14 Tu	3	3	1	1	1	1
15 Tu	n. a.	3	n. a.	1	n. a.	1
16 Tu	n. a.	3	n. a.	2	n. a.	1

17 Tu	3	3	1	0	1	1
18 Tu	n. a.	3	n. a.	1	n. a.	1
19 Tu	n. a.	3	n. a.	1	n. a.	2
20 Tu	n.a.	3	n. a.	1	n. a.	1

(n. a. = nicht auswertbar, da entsprechende Zonen im Tumor nicht vorhanden sind)

Tabelle 10: Auswertung von eNOS anhand des IRS

Fall	Endothelien	
	perinekrotisch	nekrosefern
1 Tu	0	0
2 Tu	0	0
3 Tu	1	1
4 Tu	1	1
5 Tu	1	1
6 Tu	1	1
7 Tu	n.a.	0
8 Tu	n.a.	0
9 Tu	n.a.	0
10 Tu	1	1
11 Tu	2	2
12 Tu	1	1
13 Tu	2	2
14 Tu	2	2
15 Tu	1	1
16 Tu	n.a.	1
17 Tu	n.a.	1
18 Tu	1	1

Tabelle 11: Auswertung von αActinin-4 anhand des IRS

Fall	Tumorzellen		Endothelien	
	perinekrotisch	Nekrosefern	perinekrotisch	nekrosefern
1 Tu	2	2	2	2
2 Tu	3	3	2	2
3 Tu	2	3	2	2
4 Tu	3	3	2	2
5 Tu	3	3	2	2
6 Tu	3	3	2	2
7 Tu	n.a.	3	n.a.	1
8 Tu	n.a.	2	n.a.	1
9 Tu	n.a.	3	n.a.	2
10 Tu	1	2	2	2
11 Tu	1	1	2	2
12 Tu	1	1	2	2
13 Tu	1	2	2	2
14 Tu	1	2	2	2
15 Tu	1	2	2	2
16 Tu	n.a.	1	n.a.	0

17 Tu	n.a.	3	n.a.	1
18 Tu	2	2	1	1

Tabelle 12: Auswertung von anti-Nitrotyrosin anhand des IRS

Fall	Tumorzellen		Endothelien	
	perinekrotisch	Nekrosefern	perinekrotisch	nekrosefern
1 Tu	2	n.a.	0	n.a.
2 Tu	2	2	0	0
3 Tu	3	n.a.	1	n.a.
4 Tu	2	2	1	1
5 Tu	2	2	1	1
6 Tu	3	n.a.	1	n.a.
7 Tu	n.a.	2	n.a.	1
8 Tu	n.a.	1	n.a.	0
9 Tu	n.a.	1	n.a.	0
10 Tu	2	2	2	2
11 Tu	1	2	3	3
12 Tu	1	1	2	2
13 Tu	1	1	2	2
14 Tu	2	2	2	2
15 Tu	1	2	1	1
16 Tu	n.a.	3	n.a.	0
17 Tu	n.a.	3	n.a.	1
18 Tu	3	3	2	2

Tabelle 13: Auswertung von HIF-1α anhand des IRS

Fall	Tumorzellen	
	perinekrotisch	nekrosefern
1 Tu	2	0
2 Tu	3	n.a.
3 Tu	2	2
4 Tu	2	1
5 Tu	2	1
6 Tu	2	n.a.
7 Tu	n.a.	2
8 Tu	n.a.	2
9 Tu	n.a.	2
10 Tu	2	1
11 Tu	3	1
12 Tu	2	1
13 Tu	2	1
14 Tu	2	1
15 Tu	2	1
16 Tu	n.a.	1
17 Tu	n.a.	0
18 Tu	2	0

8. LITERATURVERZEICHNIS

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

Barbolina MV, Adley BP, Kelly DL, Fought AJ, Scholtens DM, Shea LD, Stack MS (2008): Motility-related actinin alpha-4 is associated with advanced and metastatic ovarian carcinoma. Lab Invest; 88(6):602-14

Birner P, Schindl M, Obermair A, Breitenecker G, Oberhuber G (2001): Expression of hypoxia-inducible factor 1α in epithelial ovarian tumors: Its impact on prognosis and on response to chemotherapy. Clin Cancer Res; 7(6):1661-8

Blood CH, Zetter BR (1990): Tumor interactions with the vasculature: Angiogenesis and tumor metastasis. Biochim Biophys Acta; 1032(1):89-118

Bottazzi B, Colotta F, Sica A, Nobili N, Mantovani A (1990): A chemoattractant expressed in human sarcoma cells (tumor-derived chemotactic factor, TDCF) is identical to monocyte chemoattractant protein-1/monocyte chemotactic and activating factor (MCP-1/MCAF). Int J Cancer; 45(4):795-7

Brennan PA, Downie IP, Langdon JD, Zaki GA (1999): Emerging role of nitric oxide in cancer. Review. Br J Oral Maxillofac Surg; 37(5):370-3

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):129-34

Brown JM, Giaccia AJ (1998): The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. Review. Cancer Res; 58(7):1408-16

Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Guidi AJ, Dvorak HF, Senger DR, Connolly JL, Schnitt SJ (1995): Expression of vascular permeability factor (vascular

endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer. Hum Pathol; 26(1):86-91

Burke B, Tang N, Corke KP, Tazzyman D, Ameri K, Wells M, Lewis CE (2002): Expression of HIF-1alpha by human macrophages: Implications for the use of macrophages in hypoxia-regulated cancer gene therapy. J Pathol; 196(2):204-12

Chambers SK, Kacinski BM, Ivins CM, Carcangiu ML (1997): Overexpression of epithelial macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) and CSF-1 receptor: A poor prognostic factor in epithelial ovarian cancer, contrasted with a protective effect of stromal CSF-1. Clin Cancer Res; 3(6):999-1007

Chen CN, Hsieh FJ, Cheng YM, Chang KJ, Lee PH (2006): Expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in angiogenesis and clinical outcome of human gastric cancer. J Surg Oncol; 94(3):226-33

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):575–81

Cobbs CS, Brenman JE, Aldape KD, Bredt DS, Israel MA (1995): Expression of nitric oxide synthase in human central nervous system tumors. Cancer Res; 55(4):727–30

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):26480-7

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 α-Actinin 4. J Immunol; 171(6):3225-32

Del Rey MJ, Izquierdo E, Caja S, Usategui A, Santiago B, Galindo M, Pablos J (2009): Human inflammatory synovial fibroblasts induce enhanced myeloid cell recruitment and angiogenesis through a hypoxia-inducible transcription factor

1alpha/vascular endothelial growth factor-mediated pathway in immunodeficient mice. Arthritis Rheum; 60(10):2926-34

Du R, Lu KV, Petritsch C, Liu P, Ganss R, Passegué E, Song H, Vandenberg S, Johnson RS, Werb Z, Bergers G (2008): HIF1alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. Cancer Cell; 13(3):206-20

Falchuk KH, Goetzl EJ, Kulka JP (1970): Respiratory gases of synovial fluids. An approach to synovial tissue circulatory-metabolic imbalance in rheumatoid arthritis. Am J Med; 49(2):223-31

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):2672-81

Gabrilovich D (2004): Mechanisms and functional significance of tumor-induced dendritic-cell defects. Nat Rev Immunol; 4(12):941-52

Gallo O, Masini E, Morbidelli L, 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):587-96

Gasparini G, Barbareschi M, Boracchi P, Verderio P, Caddo O, Meli S, Palma OPD, Marubini E, Bevilacqua P (1995): Tumor angiogenesis predicts clinical outcome of node-positive breast cancer patients treated with adjuvant hormone therapy or chemotherapy. Cancer J Sci Am; 1(2):131-41

Giatromanolaki A, Sivridis E, Athanassou N, Zois E, Thorpe PE, Brekken RA, Gatter KC, Harris AL, Koukourakis IM, Koukourakis MI (2001): The angiogenic pathway "vascular endothelial growth factor/flk-1(KDR)-receptor" in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. J Pathol; 194(1):101-8

Greijer AE, van der Wall E (2004): The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. J Clin Pathol; 57:1009-14.

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(5): 645-52

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(6): 603-11

Hillman GG, Droz JP, Haas GP (1994): Experimental animal models for the study of therapeutic approaches in renal cell carcinoma. In Vivo; 8(1):77-80

Hitchon CA, el-Gabalawy HS (2003): The histopathology of early synovitis. Clin Exp Rheumatol; 21(5 Suppl 31):28-36

Hollander AP, Corke KP, Freemont AJ, Lewis CE (2001): Expression of Hypoxia-Inducible Factor 1α by Macrophages in the Rheumatoid Synovium. Implications for Targeting of Therapeutic Genes to the Inflamed Joint. Arthritis Rheum; 44(7):1540-4

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):1383-93

Honda K, Yamada T, Hayashida Y, Idogawa M, Sato S, Hasegawa F, Ino Y, Ono M, Hirohashi S (2005): Actinin-4 Increases Cell Motility and Promotes Lymph Node Metastasis of Colorectal Cancer. Gastroenterology; 128(1):51-62

Hood JD, Meininger CJ, Ziche M, Granger HJ (1998): VEGF upregulates ecNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. Am J Physiol; 274(3 Pt 2):1054-8

Hoshino T, Yamada A, Honda J, Imai Y, Nakao M, Inoue M, Sagawe K, Yokoyama MM, Oizumi K, Ioh K (1993): Tissue-specific distribution and age-dependent increase of human CD11b+ T cells. J Immunol; 151(4):2237-2248

Hrushesky WJ, Murphy GP (1973): Investigation of a new renal tumor model. J Surg Res; 15(5):327-36

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(11):948-53

Kato H, Miyazaki T, Yoshikawa M, Nakajima M, Fukai Y, Tajima K, Masuda N, Tsutsumi S, Tsukada K, Nakajima T, Kuwano H (2000): Nitrotyrosine in esophageal squamous cell carcinoma and relevance to p53 expression. Cancer Lett; 153(1-2):121-7

Kelly PM, Davison RS, Bliss E, McGee JO (1988): Macrophages in human breast disease: a quantitative immunohistochemical study. Br J Cancer; 57(2):174-7

Kerkhoff C, Klempt M, Sorg C (1998): Novel insights into structure and function of MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9). Biochim Biophys Acta. 10; 1448(2):200-11

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):416-9

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 Pt 1):164-70

Lee AH, Dublin EA, Bobrow LG, Poulsom R (1998): Invasive lobular and invasive ductal carcinoma of the breast show distinct patterns of vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis. J Pathol; 185(4):394-401

Leek RD, Harris AL, Lewis CE (1994): Cytokine networks in solid human tumors: Regulation of angiogenesis. J Leukoc Biol; 56(4):423-35

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(20):4625-9

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):991-5

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):430-6

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

Lewis CE, Pollard JW (2006): Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. Cancer Res; 66(2):605-12

Lewis JS, Landers RJ, Underwood JC, Harris AL, Lewis CE (2000): Expression of vascular endothelial growth factor by macrophages is up-regulated in poorly vascularized areas of breast carcinomas. J Pathol; 192(2):150-8

Li LG, 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): 2539-44

Lukes P, Pácová H, Kucera T, Veselý D, Martínek 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):141-5

MacLennan GT, Bostwick DG (1995): Microvessel density in renal cell carcinoma: lack of prognostic significance. Urology; 46:27–30

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):350-6

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(11):549-55

Melillo G, Taylor LS, Brooks A, Cox GW, Varesio L (1996): Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in IFN-γ-Treated Murine Macrophages Cultured Under Hypoxic Conditions. J Immunol; 157(6):2638-2644

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. Biochem J; 418(3):673-82

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):2224-34

Negus RP, Turner L, Burke F, Balkwill FR (1998): Hypoxia down-regulates MCP-1 expression: implications for macrophage distribution in tumors. J Leukoc Biol; 63(6):758-65

Ochoa AC, Zea AH, Hernandez C, Rodriguez PC (2007): Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma. Review. Clin Cancer Res; 13(2 Pt 2):721-726

Ohno S, Ohno Y, Suzuki N, Kamei T, Koike K, Inagawa H, Kohchi C, Soma G, Inoue M (2004): Correlation of histological localization of tumor-associated macrophages

with clinicopathological features in endometrial cancer. Anticancer Res; 24(5C):3335-42

Rasheed S, Harris AL, Tekkis PP, Turley H, Silver A, McDonald PJ, Talbot IC, Glynne-Jones R, Northover JM, Guenther T (2008): Assessment of microvessel density and carbonic anhydrase-9 (CA-9) expression in rectal cancer. Pathol Res Pract; 205(1):1-9

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

Schmid T, Zhou J, Brune B (2004): HIF-1and p53: communication of transcription factors under hypoxia. J Cell MolMed; 8:423-31.

Seguchi T, Yokokawa K, Sugao H, Nakano E, Sonoda T, Okuyama A (1992): Interleukin-6 activity in urine and serum in patients with bladder carcinoma. J Urol; 148(3):791-4

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(2):735-43

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):329-37

Störkel S, Eble JN, Adlakha K, Amin M, Blute ML, Bostwick DG, Darson M, Delahunt B, Iczkowski K (1997): Classification of renal cell carcinoma: Workgroup No. 1. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). Cancer; 80(5):987-9.

Suzuki M, Ohwada M, Sato I, Nagatomo M (1995): Serum level of macrophage colony-stimulating factor as a marker for gynecologic malignancies. Oncology; 52(2):128-33

Thomsen LL, Lawton FG, Knowles RG, Beesley JE, Riveros-Moreno V, Moncada S (1994): Nitric oxide synthase activity in human gynecological cancer. Cancer Res; 54:1352–4

Tsukamoto T, Kumamoto Y, Miyao N, Masumori N, Takahashi A, Yanase M (1992): Interleukin-6 in renal cell carcinoma. J Urol; 148(6):1778-81

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

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):276-87

Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P (1989): Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. Cancer Res; 49(23):6449-65

Vermeulen PB, Verhoeven D, Hubens G, Van Marck E, Goovaerts G, Huyghe M, De Bruijn EA, Van Oosterom AT, Dirix LY (1995): Microvessel density, endothelial cell proliferation and tumor cell proliferation in human colorectal adenocarcinoma. Ann Oncol; 6:59-64

Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM, McCartney-Francis N, Wahl LM, Roberts AB, Sporn MB (1987): Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. Proc Natl Acad Sci U S A; 84(16):5788-92

Wahl LM, Kleinan HK (1998): Tumor-associated macrophages as targets for cancer therapy. Natl Cancer Inst; 90(21):1583-4

Walter S, Bottazzi B, Govoni D, Colotta F, Mantovani A (1991): Macrophage infiltration and growth of sarcoma clones expressing different amounts of monocyte chemotactic protein/JE. Int J Cancer; 49(3):431-5

Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J (1991): Tumor angiogenesis and metastasis correlation in invasive breast carcinoma. N Engl J Med; 324:1– 8 57

Weidner N, Carroll PR, Flax J, Blumfeld W, Folkman J (1993): Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. Am J Pathol; 143:401-9

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):856-67

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):758-64

Yoshimura T, Yuhki N, Moore SK, Appella E, Lerman MI, Leonard EJ (1989): Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE. FEBS Lett; 244(2):487-93

Yu AY, Frid MG, Shimoda LA, Wiener CM, Stenmark K, Semenza GL (1998): Temporal, spatial and oxygen-regulated expression of hypoxia-inducible factor-1 in the lung. Am J Physiol; 275(4 Pt 1):818-26

Yu JX, Cui L, Zhang QY, Chen H, Ji P, Wei HJ, Ma HY (2006): Expression of NOS and HIF-1alpha in human colorectal carcinoma and implication in tumor angiogenesis. World J Gastroenterol; 12(29):4660-4

Ziche M, Morbidelli L, Choudhuri R, Zhang HT, Donnini S, Granger HJ (1997): Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. J Clin Invest; 99:2625–34

Danksagung

Mein Dank geht an Herrn Prof. Dr. med. H.-J. Radzun, Leiter des Zentrums Pathologie und Rechtsmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen, für die Möglichkeit, in der Abteilung Pathologie zu promovieren. Ich bedanke mich auch bei meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. med. B. Hemmerlein, für die Betreuung und Anleitung während der Entstehung dieser Promotionsarbeit.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Dr. med. C. Perske, die als Ansprechpartnerin sowohl bei der experimentellen Arbeit als auch in der Schreibphase einen wesentlichen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit leistete.

Ein besonderer Dank geht an das Laborteam der Abteilung Pathologie, dort im Besonderen an die Herren R. Kleinhans und A. Stange, die mir bei der experimentellen Durchführung mit Rat und Tat zur Seite standen.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei allen, die mir mit Unterstützung und Korrekturvorschlägen zur Seite standen, vor allem meiner Co-Doktorandin Frau Tanja Hümmer, die mit mir die Freuden und Leiden des experimentellen Arbeitens und des Anfertigens der Promotionsarbeit geteilt hat.

Curriculum vitae

Ich, Juliane Franziska Krösel, geb. Buhle, wurde am 18. Januar 1981 als drittes von vier Kindern meiner Eltern Jürgen und Christiane Buhle in Bad Saarow-Pieskow geboren. Eingeschult wurde ich 1987 in Dresden, wo ich im Juli 1999 mein Abitur am Gymnasium Dreikönigschule ablegte. Nach dem Abitur begann ich eine Ausbildung zur Fremdsprachenkorrespondentin (Englisch/Französisch), die ich im Juli 2001 erfolgreich als „Staatlich geprüfte Fremdsprachenkorrespondentin und Wirtschaftsassistentin“ beendete. Von Oktober 2001 bis September 2002 arbeitete ich in diesem Beruf als Angestellte in dem medizinisch-pharmazeutischen Übersetzungsbüro „Landry & Associates“ in Göttingen.

Zum Sommersemester 2003 nahm ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen auf, das ich im Dezember 2009 mit Bestehen des 2. Abschnitts der Ärztlichen Prüfung erfolgreich abgeschlossen habe. Mein Praktisches Jahr absolvierte ich an der Universitätsmedizin Göttingen in den Abteilungen Nephrologie und Rheumathologie des Zentrums Innere Medizin, Thorax-Herz-Gefäß-Chirurgie und Orthopädie.

Nach Erhalt der Approbation nahm ich meine Tätigkeit als Weiterbildungsassistentin in der Orthopädie und Unfallchirurgie im Januar 2010 auf.

Seit dem 28.03.2002 bin ich verheiratet. Mein Sohn wurde am 23.04.2008 in Göttingen geboren.