

**Aus der Orthopädischen Universitätsklinik mit Poliklinik
Tübingen**

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. N. Wülker

**Korrelation der Bone Sialoprotein-Expression
mit dem Metastasierungsgrad
von Nierenzellkarzinomen
- eine immunhistochemische Analyse**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Lena Christine Ursula Minkley

aus Berlin

2012

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. N. Wülker

2. Berichterstatter:

Privatdozent Dr. B. Rolauffs

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung	6
1.1 Nierentumoren	6
1.2 Tumormetastasierung	16
1.3 Knochenmetastasen und deren Folgen	19
1.4 Bone Sialoprotein	23
1.5 Fragestellung	28
2. Material und Methoden	31
2.1 Material	31
2.1.1 Geräte und Verbrauchsgüter	
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien	
2.1.3 Gewebematerial und Patientengut	
2.2 Methoden	36
2.2.1 Vorbereiten der Lösungen und Reagenzien	
2.2.2 Studienaufbau	
2.2.3 Herstellung der Paraffinschnitte	
2.2.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	
2.2.5 Prinzipien der Immunhistochemie	
2.2.6 Etablierung der BSP-Färbung	
2.2.7 Immunhistochemische Darstellung von BSP	
2.2.8 Fluoreszenzmikroskopie und Auswertung der Schnitte	
2.2.9 Statistik	
3. Ergebnisse	58
3.1 Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse	58
3.2 Unterschiede innerhalb der Patientenkollektive	65
3.2.1 Intraindividuelle Trends	
3.2.2 Statistische Signifikanz	

3.3 Unterschiede zwischen den Patientenkollektiven	68
3.3.1 Interindividuelle Trends	
3.3.2 Statistische Signifikanz	
3.4 Gruppeninteraktion	71
3.5 Unterschiede in Abhängigkeit von der Tumorgröße	75
4. Diskussion	78
4.1 Studienaufbau, Gewebematerial und Patientengut	78
4.2 Etablierung der BSP-Färbung	80
4.3 Immunhistochemische Darstellung von BSP und Scoring	81
4.4 Ergebnisse der immunhistochemischen Auswertung	83
4.5 Conclusio	85
5. Zusammenfassung	90
6. Literaturverzeichnis	93
7. Veröffentlichungen	101
8. Anhang	102
8.1 Patientendaten	102
8.2 Vorbereitung der Lösungen und Reagenzien	106
8.3 Abkürzungsverzeichnis	107
8.4 Abbildungsverzeichnis	109
8.5 Tabellenverzeichnis	112
8.6 Danksagung	114
8.7 Lebenslauf	116

1. Einleitung

1.1 Nierentumoren

Unter Nierentumoren im engeren Sinne versteht man bösartige Neubildungen, welche aus Tubulusepithelzellen der Niere hervorgehen und auch als Nierenzellkarzinome (renal cell carcinoma = RCC) bezeichnet werden.

Hiervon unterscheidet man Tumoren, deren Lokalisation zwar die Niere ist, die jedoch nicht dem Nierenparenchym selbst entspringen. Diese versteht man als Nierentumoren im weiteren Sinne und fasst hierunter beispielsweise das Nierenbeckenkarzinom (Ursprungsgewebe: Urothel) oder das Nephroblastom (Ursprungsgewebe: metanephrogenes Blastem) zusammen.

Nierenzellkarzinome machen dabei etwa 85% aller in der Niere auftretenden Tumoren aus und werden weiter nach der Lokalisation innerhalb der Tubuluszellen und dem Wachstumsmuster unterteilt.

Karzinomtyp	Wachstumsmuster	Ursprung	Häufigkeit	Malignität	Genetik
Klarzelliger Typ	Azinös, sarkomatoid, solide, tubuläre und lobuläre Formen	Proximaler Tubulus	80%	+ +	Deletion 3p
Chromophiler Typ	Papillär, sarkomatoid, eosinophile und basophile Zellen	Proximaler Tubulus	12%	+ +	+7, +17, Verlust des Y-Chromosoms
Chromophober Typ	Solid, tubulär, sakomatoid	Sammel-tubulus (kortikal)	5%	(+)	Chromosomenverluste
Onkozytischer Typ	Tumornester	Sammel-tubulus (kortikal)	3%	+ +	-
Ductus-Bellini-Typ	Papillär, sarkomatoid	Sammel-tubulus (medullär)	<1%	+ + +	-

Tabelle 1: Klassifikation der Nierenzellkarzinome (modifiziert aus: Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pathologie, Elsevier 2004)

Epidemiologie:

Die Inzidenz des Nierenzellkarzinoms liegt bei etwa 7,5 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr in Deutschland.

Etwa 3% aller Malignome des Erwachsenen sind Nierenzellkarzinome. Auffällig ist hierbei eine geschlechtsspezifische Verteilung des RCC im Verhältnis ♂ : ♀ = 3 : 2, was sich auch im Stellenwert dieser Tumoren als

sechsthäufigster Tumor beim Mann und elfthäufigster Tumor bei der Frau widerspiegelt (7).

Der Erkrankungsgipfel liegt in der sechsten Lebensdekade, wobei sich 80% der Erkrankungen in der Zeitspanne zwischen dem 40. und 69. Lebensjahr manifestieren (53).

Die Anzahl der weltweiten Neuerkrankungen ist seit 1930 insgesamt steigend, allerdings ist in den letzten Jahren eine Abflachung dieser Tendenz zu beobachten. Bei den Männern stieg die Inzidenz in diesem Zeitraum von 1,6 auf 9,6 und bei den Frauen zeigte sich ein vergleichbarer Anstieg von 0,7 auf 4,2 pro 100.000 Einwohner pro Jahr. Die Mortalität ist hingegen trotz steigender Inzidenz stabil, so dass aktuell durchschnittliche 5-Jahresüberlebensraten von 54% bei den männlichen und 57% bei den weiblichen Patienten angegeben werden können (53).

Auffällig ist auch eine weltweit stark differierende Häufigkeit der Nierenzellkarzinome. So treten sie in industrialisierten Ländern, wie beispielsweise Nordamerika oder Skandinavien deutlich häufiger auf, als in Asien oder Afrika (53).

Ätiologie/ Risikofaktoren:

Die Entstehung von Nierenzellkarzinomen weist keine definierte, klare Ätiologie auf, wird jedoch von verschiedenen Faktoren begünstigt. Einen wesentlichen Risikofaktor stellt hierbei das Rauchen dar, ebenso wie der regelmäßige Kontakt mit anderen karzinogenen Substanzen, wie Cadmium, Halogenkohlenwasserstoffen oder Blei - beispielsweise im Rahmen einer beruflichen Exposition (53).

Darüber hinaus spielen ein erhöhtes Alter, sowie das männliche Geschlecht eine wesentliche Rolle und auch ein Zusammenhang zwischen Übergewicht und Ernährung mit dem vermehrten Auftreten von RCC wird kontrovers diskutiert.

Hinsichtlich des Einflusses von Ernährungsgewohnheiten auf die Entstehung von Nierenzellkarzinomen, konnte ein Zusammenhang zwischen dem Konsum von Fett, Proteinen oder bestimmten Fleischsorten in mehreren Studien bislang jedoch nicht nachgewiesen werden. Vielmehr spiegelte sich in den Ernährungsgewohnheiten ein anderer Risikofaktor, die Adipositas wieder, welche nachweislich das RCC-Risiko erhöht (43).

Auch chronische Erkrankungen der Nieren, wie beispielsweise die chronische Niereninsuffizienz, ebenso wie angeborene Nierenerkrankungen und familiäre Tumorerkrankungen (z.B. Morbus Hippel-Lindau, Tuberöse Sklerose) erhöhen das Risiko an Nierentumoren zu erkranken (53).

Beim Morbus Hippel-Lindau treten beispielsweise mit einer Häufigkeit von 25-70% Nierenzellkarzinome auf, oft multifokal und deutlich früher als bei Patienten ohne genetische Disposition.

Einen weiteren Risikofaktor stellt die jahrelange oder missbräuchliche Einnahme von Analgetika dar, wobei dies besonders phenacetinhaltige Präparate betraf, welche seit 1986 nicht mehr im Handel sind, jedoch auch in geringerem Umfang auf andere Schmerzmedikamente, wie NSAR oder Paracetamol zutrifft, die ebenfalls eine Analgetika-Nephropathie bis hin zur terminalen Niereninsuffizienz verursachen können (53).

Die folgende Tabelle fasst die Risikofaktoren hinsichtlich der Entstehung von Nierenzellkarzinomen, für welche es eine sichere Datenlage gibt zusammen:

Risikofaktor:	Relatives Risiko (95% Konfidenzintervall)
Von Hippel-Lindau-Syndrom	100 (nicht verfügbar)
Dauerhafte Dialyse	32 (nicht verfügbar)
Übergewicht	3,6 (2,3-5,7)
Rauchen	2,3 (1,1-5,1)
Verwandter ersten Grades mit RCC	1,6 (1,1-2,4)
Arsenexposition	1,6 (2,3-4,1)
Hypertonie	1,4 (1,2-1,7)
Chemische Reinigungsmittel	1,4 (1,1-1,7)
Diuretika	1,3 (1,07-1,52)
Strahlentherapie	1,1 (3,2-8,1)
Phenacetin	1,1 (2,6-5)
Asbestexposition	1,1 (1,4-1,8)
Trichloroethylen	1 (0,7-9,66)
Cadmiumexposition	1 (2-3,9)
Polyzystische Nieren	0,8 (2-4,5)

Tabelle 2: Einige Risikofaktoren und deren relatives Risiko für das RCC
(aus: Pascual, D., Borque, A., Epidemiology of Kidney Cancer, Advances in Urology 2008)

Symptome:

Nierenzellkarzinome bleiben meist lange Zeit völlig asymptomatisch. Typische Frühsymptome gibt es praktisch nicht und auch die häufig angeführte Trias von Flankenschmerz, Hämaturie und palpablem Nierentumor tritt in lediglich 5-10% auf und kennzeichnet bereits ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium (5).

So ist es kaum verwunderlich, dass ca. 60% aller diagnostizierten RCC als Zufallsbefunde im Rahmen einer aus anderen Gründen durchgeführten Bildgebung, meist einer Sonographie oder Computertomographie, auffallen und

zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits in 25-30 % Fernmetastasen ausgebildet haben (5, 19, 57).

Das RCC neigt hierbei dazu früh in die Vena renalis einzubrechen und hämatogen in Lunge, Knochen, Leber und Gehirn zu metastasieren.

Folgende Symptome können im Verlauf der Erkrankung auftreten, sind jedoch in der Regel Spätsymptome (5, 34):

- Hämaturie (60%) durch Invasion des Tumors in das Sammelrohrsystem/ Nierenbeckens, zum Teil mit kolikartigen Schmerzen
- BSG-Erhöhung (60%)
- Palpable abdominelle Masse (45%)
- Hypertonie (30-40%)
- Gewichtsverlust (30%)
- Intermittierendes malignes Fieber (20%)
- Anämie (30-40%) renal durch verminderte Erythropoetinproduktion, sekundär durch Hämolyse, Knochenmarksinfiltration und Hämaturie
- Erythrozytose/Polyglobulie (5%) durch vermehrte Erythropoetinbildung
- Hyperkalzämie (10-15%) durch ossäre Metastasierung oder paraneoplastisch

TNM-Klassifikation, Grading und Stadieneinteilung:

Zur möglichst exakten Beschreibung der Tumorausdehnung und um über eine international vergleichbare Klassifikation bezüglich sinnvoller Therapieoptionen, Krankheitsverlauf und Prognose zu verfügen, existiert für die meisten Tumorerkrankungen eine sogenannte TNM-Klassifikation, welche die Tumorausdehnung (**T**), die Lymphknotenbeteiligung (**N**) und die Metastasierung (**M**) beschreibt.

T1	Tumor begrenzt auf die Niere, < 7 cm
T1a	Tumor ≤ 4 cm
T1b	Tumor > 4 cm, ≤ 7 cm
T2	Tumor begrenzt auf die Niere, > 7 cm
T2a	Tumor >7cm, ≤ 10cm
T2b	Tumor > 10cm
T3	Tumor infiltrierte das perirenale Fettgewebe, Venen oder Nebenniere, noch begrenzt innerhalb der Gerota-Faszie
T3a	Fettgewebeeinfiltration peripelvin und/oder perirenal, Infiltration der Vena renalis oder muskelstarker Segmentvenen
T3b	Infiltration Vena Cava unterhalb des Zwerchfells
T3c	Infiltration von Vena Cava oberhalb des Zwerchfells, Infiltration der Wand der Vena cava
T4	Tumorinfiltration Gerota-Faszie, Nachbarorgane, direkte ipsilaterale Nebenniereninfiltration
N0	Keine Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in einem Lymphknoten
N2	Metastasen in mehr als einem Lymphknoten
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 3: TNM-Klassifikation des Nierenzellkarzinoms, 7. Auflage
(aus: Sobin, L.H., Gospodarowicz M.K., Wittekind C. TNM classification of malignant tumours, International Union against Cancer -UICC 2010)

Ergänzt wird diese Klassifikation durch das Grading (**G**), welches den Differenzierungsgrad des Tumorgewebes beschreibt, also wie stark das Tumorgewebe in der histopathologischen Beurteilung vom Ausgangsgewebe abweicht.

Dies ist insoweit relevant für Prognose und Therapie, als gut differenzierte Tumore, welche eine relativ hohe Übereinstimmung mit dem Ursprungsgewebe aufweisen, zumeist einen günstigeren Verlauf haben, als schlecht differenzierte oder undifferenzierte.

G1	Gut differenziert („low-grade“)
G2	Mäßig differenziert
G3	Schlecht differenziert
G4	Undifferenziert („high-grade“) -eine Zuordnung zu einem Ausgangsgewebe gelingt nicht oder nur indirekt anhand immunhistochemischer Marker

Tabelle 4: Grading des Nierenzellkarzinoms (UICC 2009)

Darüber hinaus gibt es für die Nierenzellkarzinome eine weitere Einteilung in Tumorstadien, welche auch heutzutage noch breite klinische Anwendung findet.

Stadium I	T1 N0 M0
Stadium II	T2 N0 M0
Stadium III	T3 N0 oder T1-3 N1 M0
Stadium IV	T4 N0, N1 M0 oder jedes T N2 M0 oder jedes T jedes N M1

Tabelle 5: Stadieneinteilung des Nierenzellkarzinoms (UICC 2010) (aus: Innere Medizin, G. Herold, 2012)

Diagnostik:

Die Methoden der Wahl für die Diagnostik des Primärtumors sind die Sonographie und die Computertomographie (CT). Ergänzend sollte bei positivem Befund eine Metastasensuche mittels Abdomen-Sonographie, Röntgen-Thorax (Lungenmetastasen), Skelettszintigrafie (Knochenmetastasen)

und Computertomographie des Abdomens (Lebermetastasen) und des Kopfes (Hirnmetastasen) durchgeführt werden.

Prognose und Therapie:

Die Prognose hängt im Wesentlichen vom Karzinomtyp, dem Stadium, sowie dem Malignitätsgrad, welchen der Tumor bei Erstdiagnose aufweist ab. Überwiegend klarzellige, papillär strukturierte Tumoren haben die günstigste Prognose, die sehr seltenen und besonders aggressiv wachsenden Ductus-Bellini-Karzinome die schlechteste (5).

Je ausgedehnter der Tumor bei Erstdiagnose ist und je mehr er die Grenzen der Nierenkapsel überschritten hat, umso schlechter ist auch hier die 5-Jahresüberlebensrate.

Tumorstadium:	5-Jahresüberlebensrate:
Stadium I und II	bis 90%
Stadium III	Ohne Lymphknotenbefall bis 60% mit Lymphknotenbefall bis 30%
Stadium IV	Bei Entfernung solitärer Metastasen bis 40% ohne Entfernung / multiple Metastasierung <5%

Tabelle 6: 5-Jahres-Überlebensrate in Abhängigkeit von der Stadieneinteilung des Nierenzellkarzinoms (UICC 2010) (aus: Innere Medizin, G. Herold, 2012)

Dabei spielt die Operabilität des RCC eine übergeordnete Rolle, stellt sie doch bisher den einzigen kurativen Ansatz dar (19, 42).

Die radikale Nephrektomie im Sinne einer en-bloc-Resektion mit Entfernung von Tumorgewebe, Niere, perirenal Fettkapsel, Nebenniere, Harnleiter und Spermatika- beziehungsweise Ovarialgefäßen, sowie Ausräumung aller parakavalen und paraaortalen Lymphknoten, ist bei Nierenzellkarzinomen

nachwievor Goldstandard und wird für große Tumoren als Primärtherapie empfohlen, wenngleich weitere Verfahren, wie beispielsweise die nephronschonende Resektion, zum Teil unter Erhalt der Nebenniere, zunehmend an Bedeutung gewinnen (7, 19, 21, 32).

Bei Tumoren $\leq 4\text{cm}$ bis $\leq 7\text{ cm}$ (bei günstiger Lokalisation) und metastasenfreiem Patienten mit unilateralem Tumorbefall wird die nierenerhaltende Operation mittlerweile als Therapie der Wahl angesehen (7). Daneben ist die nierenerhaltende Operation indiziert bei Patienten mit vorbestehenden Nierenerkrankungen, Einzelniere oder bilateralem Tumorbefall, bei denen eine radikale Nephrektomie zu einer dialysepflichtigen Niereninsuffizienz führen würde, weshalb eine strengere Indikationsstellung für ein radikales operatives Vorgehen für dieses Patientenkollektiv notwendig ist (19).

Ergänzend hierzu wird bei solitären Fernmetastasen (Leber, Lunge, Knochen) auch deren operative Entfernung angestrebt, da diese erwiesenermaßen einen Überlebensvorteil bietet (27, 62).

Der hohe Stellenwert des operativen Vorgehens in der Therapie des RCC begründet sich auch in dem insgesamt schlechten Ansprechen dieser Tumoren auf Bestrahlung und Chemotherapie.

Für die Radiotherapie konnten bislang keinerlei kurative oder lebensverlängernde Effekte beim RCC nachgewiesen werden, so dass sie lediglich zur Schmerzreduktion bei Knochenmetastasen Anwendung findet.

Ähnlich verhielt es sich lange Zeit mit dem Ansprechen des RCC auf Chemotherapie, wobei innerhalb der letzten Jahre mehrere neue Medikamente eine Zulassung erhielten und sich weitere Medikamente in der klinischen Erprobung befinden.

Für die postoperative adjuvante Therapie gibt es ebenso wie für ein neoadjuvantes Setting aktuell kein regulär zugelassenes Medikament, für das

ein Vorteil hinsichtlich Gesamtüberleben oder Reduktion eines Rezidivrisikos nachgewiesen werden konnte.

Mehrere Substanzen, namentlich der Angiogeneseinhibitor Bevacizumab, die Tyrosinkinaseinhibitoren Sorafenib, Sunitinib und Pazopanib, sowie die mTOR-Inhibitoren Temsirolimus und Everolimus kommen mittlerweile im Rahmen einer palliativen Chemotherapie bei fortgeschrittenen Nierenzellkarzinomen mit dem Ziel einer Stabilisierung des Krankheitsverlaufes und Symptomlinderung zum Einsatz.

Weitere neue Therapieansätze wie die Behandlung mit Hormontherapie oder autologer Tumorzellen sind derzeit in der klinischen Erprobung mit zum Teil vielversprechenden Ergebnissen hinsichtlich Überlebensverlängerung und Lebensqualität für Patienten in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien (36, 41, 63).

Einen primär kurativen Ansatz wie die operative Therapie, sowie die damit einhergehenden Resultate hinsichtlich Tumorprogress, Rezidivhäufigkeit, Metastasierung und Überlebenszeit, können diese neuen Therapieansätze bislang jedoch nicht erreichen (61, 41).

Inwieweit und in welcher Kombination sich die oben genannten Therapien für Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung hinsichtlich Verträglichkeit und Einflussnahme auf den Krankheitsverlauf in der klinischen Anwendung bewähren, werden die kommenden Jahre zeigen.

1.2 Tumormetastasierung

Der Begriff Metastasierung beschreibt die Absiedelung von Tumorzellen, ausgehend von einem Primärtumor, in entfernte Gewebe. Die Frage ob ein Tumor bereits Metastasen gebildet hat oder nicht, ist für die Therapie und die Prognose, sowie die Frage nach einem kurativen Ansatz von entscheidender Bedeutung.

Dennoch ist bis heute nicht endgültig geklärt, welche Mechanismen die Metastasierung von Tumoren steuern.

Die Entstehung von Metastasen erfolgt grob unterteilt in vier Schritten. Zunächst lösen sich Tumorzellen vom Primarius, werden zu einer bestimmtem Lokalisation (einem bestimmtem Gewebe oder Organ) gesteuert, heften sich dort an die Extrazellulärmatrix und Gewebezellen an und vermehren sich hier in einer ihnen angepassten Mikroumgebung, wobei sie das vorhandene Gewebe infiltrieren und zerstören.

Aufgrund der Beobachtung, dass einige Tumoren typischerweise an bestimmten Orten Metastasen bilden, machte man zunächst die Durchblutung des Organs in dem der Tumor wuchs, als Ursache für die Art der Metastasierung verantwortlich. Sobald der Tumor in Blut- oder Lymphgefäße durchgebrochen war, bewegten sich die Tumorzellen entlang der Blut- und Lymphbahnen zu den „stromabwärts“ gelegenen Organen und bildeten dort Metastasen.

Hieraus wurden die typischen Verteilungswege abgeleitet, wie beispielsweise der „arterielle Typ“ bei Lungentumoren oder der „Pfortadertyp“ bei Darmtumoren.

Allerdings gab es einige Aspekte, welche durch den oben beschriebenen Mechanismus allein nicht zu erklären waren. So bilden sich in manchen Organen, beispielsweise in den Nieren, dem Herzen und der Milz selten Metastasen, obwohl auch diese Organe über eine starke Durchblutung verfügen und auch eine Vielzahl weiterer Organe (Pankreas, Magen, Schilddrüse, Darm) ist seltener von Metastasen befallen als andere Organe (Lunge, Leber, Gehirn, Knochen).

Darüber hinaus zeigte sich, dass auch sehr kleine Tumoren ohne erkennbaren Durchbruch in die Blutbahn bereits Fernmetastasen bildeten und dass einige Tumore für ihre Metastasen bestimmte Organe zu „bevorzugen“ schienen, was man als Organotropie oder auch „tumor homing“ bezeichnet. Dies legte den Schluss nah, dass es eine spezifische Art von Interaktion

zwischen den Tumorzellen und dem Zielgewebe geben musste und die Metastasierung eines Tumors, entgegen früherer Annahmen, keinesfalls lediglich eine Anhäufung von Zufällen ist, sondern durch umschriebene Mechanismen gesteuert wird.

Wie umfassend und genau diese Steuerung ist, lässt sich bisher nur erahnen. Aktuelle Forschungsergebnisse lassen jedoch erkennen, dass noch bevor die Tumorzellen am Zielort eintreffen, dort bereits lokale Veränderungen im Gewebe stattfinden, welche die Anheftung und das Wachstum dieser Tumorzellen dort begünstigen und als „premetastatic niche“ bezeichnet werden (37).

Darüber hinaus zeigen Tumoren ein für sie typisches Muster der Genexpression, welches sie deutlich von gesundem Gewebe unterscheidet, einen regelrechten genetischen Fingerabdruck, der es teilweise bereits erlaubt Aussagen über die Invasivität und das Verhalten der Tumorzellen bezüglich Metastasierung, Wachstumsgeschwindigkeit und Ansprechen auf bestimmte Therapien zu treffen (55, 72).

Die Beobachtung der Organotropie hängt mit diesen Expressionsmustern zusammen, die durch Produktion von Wachstumsfaktoren, angiogenetischen Faktoren und anderen Proteinen, welche die Zellanheftung und Bindung in spezifischen Geweben erleichtern, eine Metastasierung eben in diese Gewebe bevorzugt ermöglichen.

Erste Schritte, diese Expressionsmuster für gezielte Therapieansätze zu nutzen, gibt es bereits für das Mammakarzinom, bei dem bedingt durch ein sehr großes Patientenkollektiv relativ viele Mutationen bekannt sind. Für viele andere Tumoren, wie auch das Nierenzellkarzinom, ist das Wissen um die in ihrer Expression veränderten Gene noch nicht ausreichend genug, um in naher Zukunft mit einer klinischen Anwendbarkeit derartiger Expressionsmuster als Screening- oder Verlaufsparemeter zu rechnen (72).

1.3 Knochenmetastasen und deren Folgen

Einige Tumoren metastasieren besonders häufig und auch schon in relativ frühen Stadien in den Knochen. Hierzu gehören das Bronchialkarzinom, Mammakarzinom, Prostatakarzinom, Schilddrüsenkarzinom, Nierenkarzinom, Magenkarzinom und Uterusmalignome (12).

Dabei stammen beim Mann etwa 60% der Knochenmetastasen aus einem Prostatakarzinom und etwa 25% aus einem Lungenkarzinom. Bei der Frau sind etwa 70% der Knochenmetastasen auf ein Mammakarzinom und etwa 30% auf Nieren-, Uterus- und Schilddrüsenmalignome zurückzuführen (47).

Bevorzugt von Knochenmetastasen betroffen sind vor allem das Achsenskelett und die langen Röhrenknochen, wobei die Wirbelsäule mit über 60% aller Knochenmetastasen die häufigste Lokalisation darstellt (47).

Knochenmetastasen können dabei entweder osteoplastisch, mit verstärkter Knochenneubildung und Hypokalzämie, beispielsweise bei Prostata- oder Blasenkarzinomen, oder aber osteolytisch wachsen, was typischerweise bei Nierenzellkarzinomen zutrifft. Möglich ist auch ein Mischtyp, der sowohl osteoplastische als auch osteolytische Aspekte aufweist.

Mittlerweile weiß man, dass der Primärtumor Botenstoffe produziert, die mit einer Vielzahl an Mechanismen und Signalwegen interagieren und dafür sorgen, dass die Tumorzellen auf ihrem Weg vor Komplement-vermittelter Zellyse geschützt werden und am Zielort bereits „Vorbereitungen“ getroffen werden, die das Einnisten und Weiterwachsen der Tumorzellen im Knochen überhaupt erst möglich machen (37, 38) . So wird beispielsweise im Zielgewebe die Produktion von Wachstumsfaktoren heraufreguliert, die Angiogenese induziert und die lokale Immunantwort unterdrückt oder aber die Produktion von Glykoproteinen, welche direkt für die Zellanheftung verantwortlich sind erhöht. (9, 20, 29).

Auch die Tumorzellen der Metastase selbst setzen dies am Zielort fort und sichern sich damit weiterhin optimale Bedingungen. Es ist bekannt, dass Metastasen selbst beispielsweise PTHrP (Parathormon-related Protein), verschiedene Interleukine und VEGF (vascular endothelial growth factor) produzieren, welche die Osteolyse vorantreiben (14). PTHrP stimuliert darüber hinaus die Osteoklasten dazu TGF- β (transforming growth factor β) zu sezernieren, welches Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose steuert (31, 46).

Während TGF- β in einem frühen Tumorstadium noch als Suppressor wirkt, kehrt sich dies mit zunehmender Progression des Tumors um und es beginnt im Spätstadium paradoxerweise als prometastatischer Faktor zu wirken, wobei es direkt die Migration und Invasion, sowie ein verbessertes Überleben der Tumorzellen bewirkt und indirekt die lokale Immunantwort unterdrückt und die Angiogenese fördert.

Die von den Tumorzellen produzierten Faktoren, besonders TGF- β , wiederum stimulieren die weitere Produktion von PTHrP und es entsteht ein circulus vitiosus, in dem sich die Metastase selbst zunehmend ideale Wachstumsbedingungen schafft und sich mehr und mehr der körpereigenen Immunabwehr und wachstumshemmenden Mechanismen entzieht (14, 20, 29).

Mögliche Folgen osteolytischer Knochenmetastasen für den Patienten sind stärkste Knochenschmerzen, Hyperkalzämie und deren Folgesymptome wie beispielsweise Herzrhythmusstörungen, gastrointestinale Beschwerden oder eine vermehrte Bildung von Kalziumsteinen, pathologische Frakturen sowie Rückenmarks- und Nervenkompressionssyndrome, die nicht selten eine notfallmäßige operative Versorgung erfordern und die Lebensqualität der Patienten durch lange Krankenhausaufenthalte, Immobilisation, Verlust der Selbstständigkeit und dauerhafte Schmerzen erheblich einschränken. Epidemiologische Untersuchungen darüber, wieviele Patienten mit Knochenmetastasen im Verlauf ihrer Erkrankung eine chirurgische Therapie benötigten, gibt es bisher nur wenige.

Wedin zeigte an einem schwedischen Patientenkollektiv, dass etwa 17% aller Patienten mit Knochenmetastasen aufgrund von pathologischen Frakturen oder neurologischen Komplikationen eine chirurgische Versorgung benötigten und von diesen wiederum knapp 20% mehrere interventionsbedürftige Lokalisationen aufwiesen. Zum Zeitpunkt der Operation lagen bei 62% der operierten Patienten bereits Frakturen vor, bei den übrigen 38% konnte einer drohenden Fraktur zugekommen werden (69).

Die Diagnostik der Knochenmetastasen erfolgt durch bildgebende Verfahren, bevorzugt konventionelles Röntgen oder CT, gegebenenfalls ergänzt durch eine MR-Bildgebung und wird, sofern ein unklarer Bildbefund besteht, durch eine Biopsie gesichert. Entscheidet man sich für ein operatives Vorgehen, wird dementsprechend intraoperativ eine Biopsie entnommen und histopathologisch sowie gegebenenfalls immunhistochemisch untersucht, um die Metastase möglichst sicher einem Primärtumor zuordnen zu können, da dies für die Wahl weiterer Therapieoptionen relevant ist.

Die operative Therapie bei Knochenmetastasen unterscheidet sich dabei wesentlich von der Therapie degenerativer oder traumatischer Läsionen. Die wichtigsten Ziele bei der Behandlung von Knochenmetastasen sind Schmerzen zu verringern, pathologische Frakturen zu stabilisieren, die Funktion, Beweglichkeit und Belastbarkeit zu erhalten oder wiederherzustellen und das Überleben zu verlängern.

Auch wenn die operative Therapie von Knochenmetastasen meist eine palliative Maßnahme ist, können einige Patienten auch hinsichtlich einer verlängerten Überlebensdauer profitieren. Besonders betrifft dies Patienten mit solitären Knochenmetastasen, welche radikal entfernt werden können (4).

Insbesondere für das Nierenzellkarzinom konnte gezeigt werden, dass beim Vorliegen solitärer Knochenmetastasen durch eine radikale Nephrektomie in Kombination mit einer radikalen Exzision der Knochenmetastase ein kurativer Therapieansatz verfolgt werden kann (35).

Für die Resektion von solitären Knochenmetastasen beim RCC konnten dabei verbesserte Überlebensraten im Vergleich zu Patienten, die eine nicht-operative Therapie erhielten nachgewiesen werden. Es zeigten sich bei den operierten Patienten mit solitärer Knochenmetastase 1-Jahresüberlebensraten von 83% und 5-Jahresüberlebensraten von 23% (27).

Für das Nierenzellkarzinom sind mehrere Fälle beschrieben, in denen Patienten mit solitärer Knochenmetastase nach Nephrektomie und großflächiger Resektion der Metastase eine krankheitsspezifische Überlebensrate von 100% aufwiesen, bei einem follow-up von durchschnittlich 69 Monaten, so dass die Autoren in diesen Fällen von einer Kuration ausgehen (35).

Grundsätzlich sollte man bei Patienten, deren Primärtumor bezüglich Chemotherapie und Bestrahlung ein sehr schlechtes Ansprechen zeigt, wie dies auch bei Nierenzellkarzinomen der Fall ist, eine chirurgische Entfernung der Knochenmetastasen in Betracht ziehen, da diese sich durch andere Therapieverfahren wenig beeinflussen lassen.

Die operative Versorgung der Knochenmetastasen wird allerdings durch eine Vielzahl von Faktoren erschwert. Hierzu gehören die Morbidität der Patienten selbst, die beispielsweise durch Medikamentennebenwirkungen, Anämie, Tumorkachexie und andere Folgen der Tumorerkrankung bedingt sein kann und für ein operatives Vorgehen oft erhebliche Risiken darstellt aber auch die lokale Situation des Knochens, welcher deutlich schlechter heilt und oft ein Fortschreiten der Knochendestruktion zeigt, wodurch eine stabile dauerhafte Versorgung nicht selten eine Herausforderung darstellt.

Aufgrund der genannten Einschränkungen tendieren die Empfehlungen bezüglich der Operationsmethode zur Endoprothetik, da diese gegenüber der Osteosynthese unmittelbar postoperativ belastbar ist und Stabilität auch bei schlechter oder fehlender Knochenheilung bieten kann, womit das Risiko für Reoperationen möglichst gering gehalten wird (11, 27).

Patienten mit Nierenzellkarzinomen benötigen nach einer operativen Versorgung überdurchschnittlich häufig eine Folgeoperation (69) aufgrund von fehlender Stabilisierung oder erneuter Instabilität durch einen Progress der Knochenmetastase, was für einen ohnehin bereits schwerstkranken Patienten eine enorme Belastung bedeutet. Dies hängt auch damit zusammen, dass ein Teil dieser Patienten postoperativ verhältnismäßig lange überlebt, wodurch das Risiko für eine Reoperation mit der Zeit stetig zunimmt.

Bei etwa der Hälfte aller Patienten mit Nierenzellkarzinom finden sich bei der Erstdiagnose bereits Knochenmetastasen (35), welche im Rahmen des Stagings entdeckt werden. Bei den übrigen Patienten entwickeln sich diese häufig im weiteren Verlauf der Erkrankung und fallen meist erst auf, wenn sie symptomatisch werden.

Leider gibt es bislang nur unzureichende Möglichkeiten der Früherkennung, Risikobewertung oder gar Prävention von Knochenmetastasen bei Tumorpatienten.

Diesen Patienten würde ein prognostischer Marker, anhand dessen sich ein erhöhtes Risiko für eine Knochenmetastasierung ablesen ließe helfen, eine engmaschigere interdisziplinäre Betreuung mit besserer Bildgebung zu etablieren und möglicherweise mit der Gabe von Bisphosphonaten oder neuen Therapien, wie Rezeptorantagonisten oder spezifischen Antikörpern die Knochenmetastasierung und deren Folgen zu verzögern und den Patienten somit eine längere Zeitspanne mit guter Lebensqualität zu bieten (23).

1.4 Bone Sialoprotein

Bone Sialoprotein (BSP) ist ein Protein, welches Bestandteil mineralisierter Gewebe ist und beispielsweise im Knochen, Cementum, Dentin sowie im kalzifizierten Knorpel in größeren Mengen vorkommt (28). Hier stellt es mit einem Anteil von etwa 8%, bezogen auf alle nicht-kollagenösen Proteine, einen wesentlichen Teil der Extrazellulärmatrix dar (28).

Erstmals beschrieben wurde BSP im Jahr 1965 in mehreren Berichten der Forschungsgruppen von Williams & Peacocke (70), sowie 1967 von Andrews & Herring (1), wobei BSP zunächst aus der Kortikalis von Rinderknochen isoliert werden konnte und damals als 23 kDalton Glykopeptid mit hohem Sialinsäuregehalt charakterisiert wurde.

Mittlerweile wird es neben Osteopontin (OPN), Dentin Matrixprotein 1 (DMP1), Dentin Sialophosphoprotein (DSPP) und Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein (MEPE) zu den Proteinen der SIBLING (Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein) -Familie gezählt, welche vielfältige Aufgaben im Knochen aber auch in verschiedenen anderen Geweben wahrnehmen und beispielsweise Einfluss auf Zellinteraktion, Inflammation und Tumormetastasierung nehmen.

Natives Sialoprotein ist in hohem Maße sauer, hat ein Molekulargewicht von 60-80 kDalton und weicht damit wesentlich von dem aufgrund der cDNA-Sequenz vorhergesagten Gewicht von 33 kDalton ab. Dies hat seine Ursache in ausgedehnten posttranslationalen Modifikationen, welche unter anderem N- und O-gebundene Glykosylierung, Tyrosinsulfatierung sowie Serin- und Threoninphosphorylierung beinhalten und so etwa 50% des Gesamtmolekulargewichts ausmachen. Daneben konnte eine RGD-Sequenz nachgewiesen werden, welche für viele Funktionen des BSP entscheidend zu sein scheint (28).

Bekannt ist, dass die Expression des BSP-Gens bei Knochenauf- und umbauprozessen und besonders bei der initialen Mineralisierung von neu entstehendem Knochen heraufreguliert wird (28, 40). Die Regulation der BSP-Expression ist hierbei einem komplexen Netz aus Mechanismen unterworfen, von denen man bisher nur einen Teil kennt und versteht.

Erschwert wird das Verständnis dadurch, dass die Expression von BSP über mehrere verschiedene Signalwege/ Reaktionselemente reguliert wird und dass ein und derselbe Faktor in vitro in unterschiedlichen Kulturmedien induzierende und inhibierende Wirkung auf die BSP-Expression zeigen kann, wie dies am

Beispiel von fibroblast growth factor 2 gezeigt wurde (45), so dass eine direkte Übertragung der Zellkulturergebnisse auf die Regulation im menschlichen Organismus nur eingeschränkt möglich ist.

Das folgende Schema zeigt einige der bisher untersuchten Faktoren, welche die BSP-Expression regulieren.

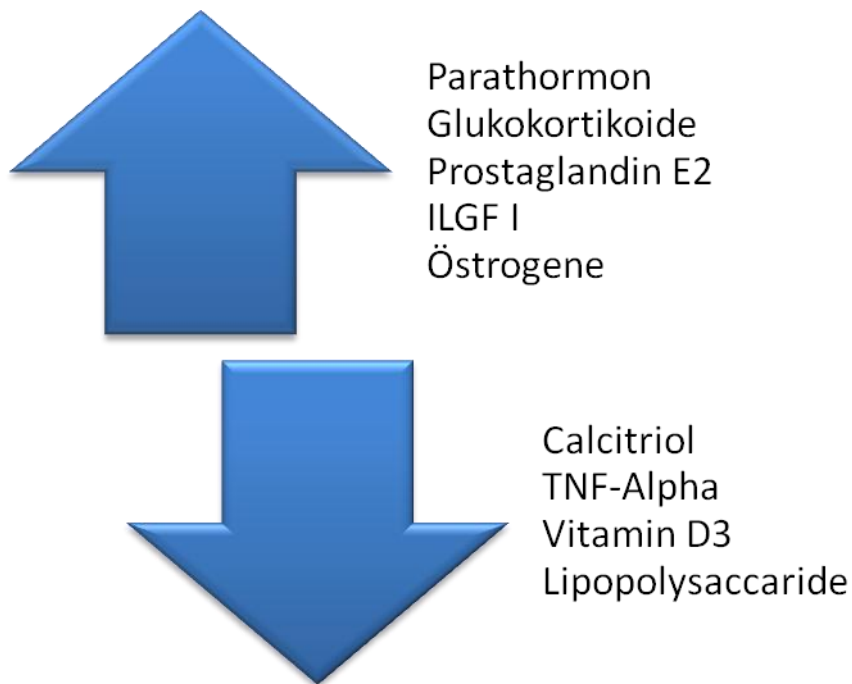


Abbildung1: Bekannte Regulationsmechanismen der BSP-Expression [eigene Zusammenstellung aus (26, 29, 31, 39, 59)]

Entgegen früherer Annahmen, die BSP als spezifisches Protein mineralisierter Gewebe beschrieben, welches ausschließlich von Osteoblasten, Osteoklasten und anderen mit dem Knochen-assoziierten Zelltypen exprimiert und produziert wurde, konnte es mittlerweile auch in trophoblastischem Gewebe und verschiedenen Tumorgeweben (Brust, Kolon, Magen, Rektum, Lunge, Schilddrüse, Prostata) nachgewiesen werden (22, 49, 52).

Es scheint, dass BSP vielmehr ein multifunktionales Protein ist, welches einerseits spezifische Funktionen im mineralisierten Gewebe besitzt und hier die Knochenresorption steuert, indem es direkt Osteoklasten aktiviert,

andererseits jedoch im Bezug auf Zellanheftung, Angiogenese und Zellyse eine besondere Rolle in der Entstehung von Knochenmetastasen spielt (9, 10) und hierzu mit verschiedenen Faktoren, wie TGF-beta, Matrix-Metalloproteinase 2 oder Integrin-Rezeptoren interagiert.

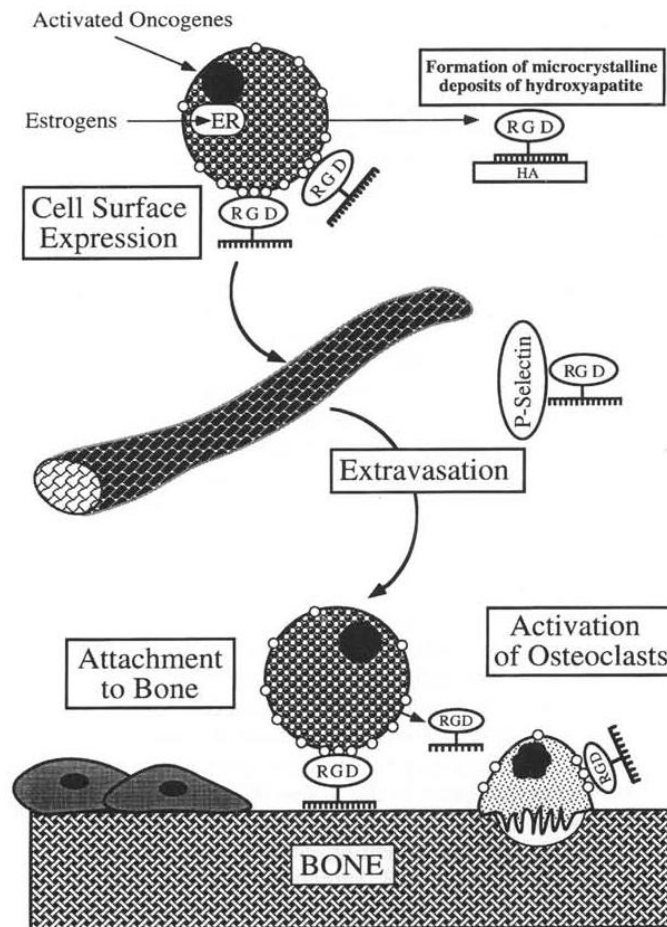


Abbildung 2: Steuerung von metastatischen Tumorzellen in den Knochen durch BSP mittels RGD-Sequenz. Mutmaßlicher Mechanismus des durch BSP vermittelten Targetings des Knochens (aus: Ganss, B., Kim, R.H., Sodek, J., Bone Sialoprotein, Critical Reviews in Oral Biology & Medicine, 1999)

Im Knochen reguliert es als Teil der Extrazellulärmatrix die Mineralisierung und dient hierbei als Kernbildner für die Anlagerung von Hydroxyapatitkristallen, welche sich entlang der Typ I Kollagenfasern der Matrix bilden (39). Darüber

hinaus vermittelt BSP über seine RGD-Sequenz die Zellanheftung und -kommunikation (28).

Diese wird beispielsweise von Osteoklasten über ein $\alpha\beta3$ -Integrin erkannt und induziert eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, interagiert aber auch mit einer Vielzahl anderer Integrine, wie Vitronektin, Fibronektin oder Fibrinogen (48).

Darüber hinaus gibt es mittlerweile einige Anhaltspunkte dafür, dass BSP angiogenetisches Potential besitzt und die Zellmigration fördert (9), indem es mit Endothelzellen über $\alpha\beta3$ -Integrin-Rezeptoren interagiert, welche nach Stimulation für die Proliferation und Migration während der Angiogenese sorgen und während des Prozesses der Angiogenese heraufreguliert werden.

Die Fähigkeit von BSP, Zellanheftung mittels RGD-Sequenz zu vermitteln, weist auf weitere Funktionen von BSP für die Steuerung und mechanische Verankerung von normalen aber auch von metastasierenden Zellen in der Extrazellulärmatrix hin und bietet einen wichtigen Anknüpfungspunkt für die Fragestellung, welche Mechanismen die zielgerichtete Metastasierung von Tumoren steuern könnten.

Die Beobachtung, dass BSP Zellen vor Komplement-vermittelter Zellyse schützen kann, indem es an Faktor H bindet (20), stützt die Vermutung, dass es für die Invasivität von Tumoren, besonders bezüglich der Knochenmetastasierung, eine entscheidende Rolle spielt, zumal in vielen Tumoren eine deutliche Heraufregulation von BSP zu beobachten ist (8, 13, 22, 50, 68).

Bei einer Reihe von Krankheitsbildern findet man erhöhte BSP-Konzentrationen im Serum. Neben dem bereits erwähnten Brustkrebs gehören hierzu auch Morbus Paget, primärer und sekundärer Hyperparathyreoidismus und Osteoporose (39).

Während man beim Brustkrebs von einer paraneoplastischen Produktion des BSP durch den Tumor selbst ausgeht, so ergeben sich die erhöhten BSP-Werte der anderen Erkrankungen wahrscheinlich durch eine vermehrte Produktion im Knochen und dem Übergang von BSP ins Blut. Erste Versuche BSP diagnostisch und therapeutisch zu nutzen erbrachten bisher vielversprechende Ergebnisse (6, 15, 17, 52, 54).

Durch den relativ spezifischen Einfluss von BSP auf Osteoklasten und seine Eigenschaft als Marker der Knochenresorption, können Veränderungen im Knochenmetabolismus, wie sie bei einer Knochenmetastasierung auftreten, folglich sehr früh detektiert werden (15).

So konnte für das Mammakarzinom ein klarer Zusammenhang zwischen der Höhe der BSP-Expression im Serum und dem häufigeren Auftreten von Knochenmetastasen, einhergehend mit einer deutlich verschlechterten Prognose nachgewiesen werden (17) und auch für das multiple Myelom gibt es vergleichbare Studiendaten (15).

Eine klinische Anwendung von BSP als Marker zur Risikobewertung hinsichtlich der Knochenmetastasierung und als Verlaufsparemeter, beziehungsweise als Therapiekontrolle, scheint damit in nahe Zukunft zu rücken. Mittlerweile konnten Normwerte für die Serum-BSP-Konzentration beim Erwachsenen festgelegt werden (39, 71), so dass zukünftig eine Standardisierung der Messverfahren mit daraus resultierender breiterer Anwendbarkeit zu erwarten ist.

1.5 Fragestellung

Entgegen früherer Annahmen ist mittlerweile nachgewiesen, dass BSP abgesehen von Knochen, Knorpel und anderen mineralisierten Geweben auch in einer Vielzahl weiterer Geweben exprimiert wird, sowohl in geringer Menge im gesunden Gewebe, unter anderem auch im Nierenparenchym, als auch in signifikant erhöhten Mengen im Rahmen verschiedener Erkrankungen.

Zu diesen Erkrankungen gehören, neben Osteoporose und Hyperparathyreoidismus auch Tumorerkrankungen (28, 39).

Für mehrere Tumoren, wie das Mammakarzinom und das Bronchialkarzinom, konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der BSP-Serumkonzentration, der BSP-Gewebeexpression und dem Auftreten von Knochenmetastasen bewiesen werden (8, 17, 52, 68).

Von den Nierenzellkarzinomen weiß man, dass sie ebenso wie das Mamma- und Bronchialkarzinom eine bevorzugte Metastasierung in den Knochen mit daraus resultierender wesentlicher Verschlechterung der Prognose im Sinne einer erhöhten Mortalität und Morbidität aufweisen.

Aufgrund des schlechten Ansprechens auf Radiatio und Chemotherapie besteht beim Nierenzellkarzinom, gerade für fortgeschrittene Stadien in denen eine radikale Nephrektomie nicht mehr möglich ist, Bedarf an neuen therapeutischen Konzepten.

Bezüglich Screenings, Früherkennung und Verlaufskontrolle beim RCC gibt es, angesichts der Tatsache, dass mehr als die Hälfte der RCC als Zufallsbefunde und dadurch oft in fortgeschrittenem Stadium, diagnostiziert werden und bis dato gute laborchemische Verlaufsparemeter fehlen, noch Entwicklungsfelder.

Auch die gegenwärtige Diagnostik und Verlaufskontrolle von Knochenmetastasen, unabhängig von der Art des Primärtumors, mittels Röntgen und Knochenszintigraphie ist umständlich und an ein Krankenhaus-Setting gebunden, bringt für den Patienten Strahlenbelastung mit sich und spiegelt die Dynamik der Erkrankung dennoch nur unzureichend wieder, da sie nur eingeschränkt zwischen körpereigenem Reparatonsprozess, Trauma und Progress einer Knochenmetastase unterscheiden kann und erst dann Veränderungen erkennt, wenn die Schädigungen bereits eingetreten sind.

Aus der SIBLING-Proteinfamilie scheint besonders das Bone Sialoprotein vielversprechende Ansätze im Hinblick auf die Anwendung als Marker für Knochenmetastasierung und als Verlaufsparemeter hinsichtlich metastatischer

Knochendestruktion auch im Bezug auf eine frühzeitige orthopädische Intervention zu bieten, sofern sich die Ergebnisse bei anderen Tumorarten auf das Nierenzellkarzinom übertragen lassen.

Daher ergeben sich folgende Fragestellungen:

1. Gibt es einen messbaren Unterschied bezüglich der BSP-Expression beim Nierenzellkarzinom im Nierenparenchym gegenüber der im Tumorgewebe?
2. Findet sich ein Zusammenhang zwischen der Höhe der BSP-Expression und dem Metastasierungsgrad des Nierenzellkarzinoms?
3. Findet sich ein Zusammenhang zwischen der Höhe der BSP-Expression und dem T-Stadium oder dem Grading des Nierenzellkarzinoms?
4. Eignet sich die in dieser Untersuchung verwendete Technik der immunhistochemischen Färbung im Hinblick auf eine mögliche klinische Anwendung der BSP-Bestimmung in Gewebeschnitten?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsgüter

Deckgläser

24X32mm; Langenbrick, Teningen/D

Einbettkassetten

Tissue-Tek III; Miles GmbH Frankfurt/D

Einmalklingen

Microtome Blades stainless steel R35; Feather/USA

Eppendorf-Cups

1,5 ml; Eppendorf, Hamburg /D

Feinwaage

Gewebeeinbettssystem

Tissue Tek III; Miles limited, Slough/GB

Magnetrührer

Mikroskop

Zeiss Axiophot; Zeiss/D

Mikrotom

Schlittenmikrotom HN40; Jung Heidelberg/D

Objektträger

Super Frost plus 25x75x1mm; Langenbrick, Teningen/D

Pap-Pen

Microscope Slide Super Pap Pen; Polysciences Inc. Eppelheim/D

Pipetten

Wasserbad

Daglef Patz KG, Wankendorf/D

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Antikörper

Primärantikörper	Human Bone Sialoprotein (Bone Extrakt) Locus ID 3381 Mouse balb-C clone ID 1.2 IgG1	Immun Diagnostik, Bensheim/D Cat: A 4232.2
Sekundärantikörper	R-PE (Phycoerythrin)- conjugiert Goat anti Mouse IgG	Dianova Cat: 115-116-072

Tabelle 7: Verwendete Primär-und Sekundärantikörper

BSA (Bovines Serum Albumin)

Sigma-Aldrich/USA

DAPI (4',6-Diamine-2'-phenylindole dihydrochloride)

kristallines Pulver; Roche Diagnostics, Mannheim/D

Destilliertes Wasser

Universitätsapotheke Tübingen

Eindeckmittel für HE-Färbung

DePex; Serva electrophoresis GmbH, Heidelberg/D

Eindeckmittel für Immunhistochemie

Elvanol

Eosin

Eosin G; Merck, Darmstadt/D

Ethanol

Universitätsapotheke Tübingen

Formalin 4%

Universitätsapotheke Tübingen

Hämalaun

Mayers Hämalaunlösung für die Mikroskopie; Merck, Darmstadt/D

Paraffin

Paraplast plus Tissue embedding medium; Mc Cormick Scientific/USA

PBS-Puffer

Dulbecco`s Phosphate buffered Saline; Sigma-Aldrich/USA

Xylol

Merck, Darmstadt/D

2.1.3 Gewebematerial und Patientengut

Das untersuchte Gewebematerial stammt von Patienten, die aufgrund eines Nierenzellkarzinoms in der Urologie der Universitätsklinik Tübingen in den Jahren 2004 bis 2007 operiert wurden.

Die Entnahme des Gewebematerials erfolgte intraoperativ, entweder im Rahmen einer totalen Nephrektomie bei 28 Patienten oder einer Teilresektion bei 2 Patienten.

Hierbei wurden randomisiert jeweils 10 Patienten ausgewählt, die entweder keinerlei Metastasen, ausschließlich Weichteilmetastasen oder Knochenmetastasen aufwiesen.

Gruppe 1: Patienten mit Nierenzellkarzinom ohne Metastasen

Gruppe 2: Patienten mit Nierenzellkarzinom, nur Weichteilmetastasen

Gruppe 3: Patienten mit Nierenzellkarzinom mit Knochenmetastasen

Es wurde bei diesen 30 Patienten (8 Frauen und 22 Männer) keinerlei Selektion hinsichtlich Erkrankungsalter oder anderer Begleiterkrankungen getroffen. Ein positives Votum der Ethikkommission Tübingen, für die Verwendung der oben genannten Gewebeproben im Rahmen dieser Arbeit liegt vor.

Das Geschlechterverhältnis männlich: weiblich in den Gruppen war wie folgt verteilt:

Gruppe 1: 8:2

Gruppe 2: 7:3

Gruppe 3: 7:3

Zum Zeitpunkt der Operation betrug das durchschnittliche Patientenalter unterteilt nach Gruppen und Geschlecht:

Gruppenzugehörigkeit	Alter Frauen	Alter Männer
Gruppe 1:	79,5 Jahre (75-84 Jahre)	57 Jahre (41-80 Jahre)
Gruppe 2:	67,7 Jahre (66-77 Jahre)	59,1 Jahre (46-73 Jahre)
Gruppe 3:	60 Jahre ♀ (47-73 Jahre)	58,9 Jahre (47-68 Jahre)

Tabelle 8: Altersverteilung der eingeschlossenen Patienten, unterteilt nach Gruppenzugehörigkeit und Geschlecht; angegeben sind das Durchschnittsalter sowie die Altersspanne

Alle Operationspräparate wurden in der Pathologie der Universitätsklinik Tübingen untersucht und bezüglich Größe, Karzinomtyp, Wachstumsmuster,

Tumorausdehnung (Einbruch in Blutgefäße, Infiltration in umliegendes Gewebe, sowie Nebenniere und Lymphknoten) und Grading beschrieben.

Pro Patient wurde darüber hinaus jeweils einmal Tumorgewebe und einmal benignes Nierengewebe aus den Operationspräparaten als Paraffineinbettung aufbereitet und chronologisch mit Jahreszahl und fortlaufender Nummerierung versehen, um eine spätere eindeutige Zuordnung wieder zu ermöglichen.

In allen untersuchten Geweben fanden sich histologisch klarzellige Nierenzellkarzinome (ccRCC), wobei 3 Tumorgewebeproben zusätzlich auch eosinophile Anteile zeigten.

Der Differenzierungsgrad der untersuchten Nierenzellkarzinome erstreckte sich von G1 (gut differenziert) bis G3 (schlecht differenziert). Keiner der untersuchten Tumore zeigte den Differenzierungsgrad G4.

Grading	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
G1	0	0	1
G2	7	2	5
G2-3	2	0	1
G3	1	8	2
G4	0	0	0

Tabelle 9: Tumorgrading der untersuchten Nierenzellkarzinome, nach Patientengruppen zusammengefasst

Das Tumorstaging erfolgte bei allen Patienten mittels Thorax-Abdomen-Becken-CT.

Die genauen Daten zu allen Patienten finden sich im Anhang 8.1 (Tabelle 24-26), wobei die Patientennamen aus Datenschutzgründen mit einem Dreibuchstaben-Code verschlüsselt wurden.

2.2 Methoden

2.2.1 Vorbereitung der Lösungen und Reagenzien

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird die Herstellung aller im Folgenden genannten Lösungen im Anhang beschrieben.

Im weiteren Verlauf werden diese nur noch namentlich genannt, um die Beschreibung der Arbeitsabläufe nachvollziehbarer und übersichtlicher zu gestalten.

Die verwendeten Fertiglösungen finden sich unter 2.1.2 Chemikalien und Reagenzien.

2.2.2 Studienaufbau

Es handelt sich um eine retrospektive unizentrische Untersuchung von 30 Patienten mit Nierenzellkarzinomen unterschiedlichen Metastasierungsgrades. Es wurden drei Patientenkollektive mit jeweils 10 Patienten mit RCC gebildet, die entweder keine Metastasen (Gruppe 1), Weichteilmetastasen (Gruppe 2) oder Knochenmetastasen (Gruppe 3) aufwiesen.

Von jedem dieser Patienten wurden aus den gewonnenen Nephrektomie- oder Teilresektionspräparaten zwei Gewebeproben aufbereitet, die einmal histopathologisch gesichertes Tumorgewebe (A) und einmal Nierengewebe (B) enthielten.

Diese wurden einerseits zunächst zur Bestätigung der Histologie mit Hämatoxylin-Eosin (HE) und andererseits zum Nachweis der BSP-Expression mittels immunhistochemischer Verfahren angefärbt. Für die immunhistochemische Färbung wurden dafür von jedem Patienten sowohl für Tumor- als auch für Nierengewebe je einmal eine positive Färbung nach standardisiertem immunhistochemischem Färbeschema (siehe Beschreibung weiter unten) und einmal eine Negativkontrolle aufbereitet. Zusätzlich wurden Knorpel- und Knochengewebeproben von Patienten, die an

keiner malignen Erkrankung litten und im Rahmen von Frakturen oder degenerativen Gelenkerkrankungen in der Orthopädie der Universitätsklinik Tübingen eine endoprothetische Versorgung erhalten hatten, ebenfalls einerseits mittels identischem immunhistochemischem Färbeschema und andererseits als Negativkontrolle bei jeder Färbecharge mitgefärbt. Dies sollte als Kontrolle für eine funktionierende, korrekt durchgeführte immunhistochemische Färbung einschließlich Negativ-Kontrolle und als Kontrollmarker hinsichtlich der Fluoreszenzintensität der Tumor- und Nierengewebeprobe dienen, da BSP bekanntermaßen im Knochen stark exprimiert wird und daher eine maximal ausgeprägte Fluoreszenz zu erwarten ist.

Die folgenden beiden Abbildungen fassen den Studienaufbau noch einmal schematisch zusammen.

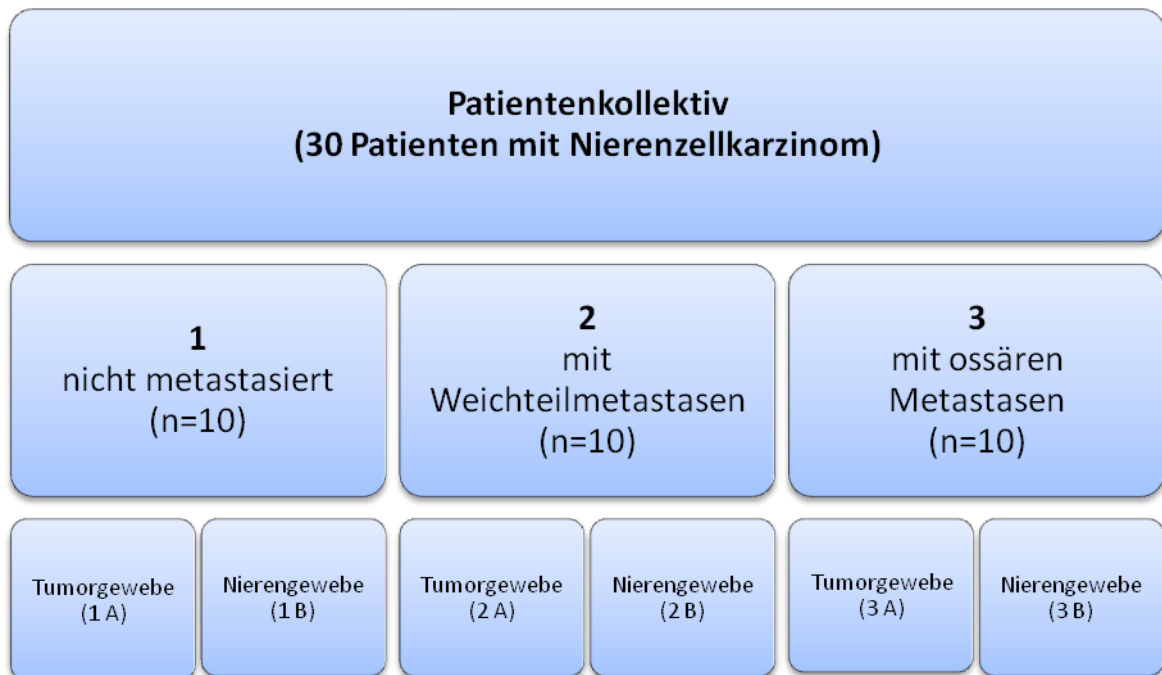


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Studienaufbaus

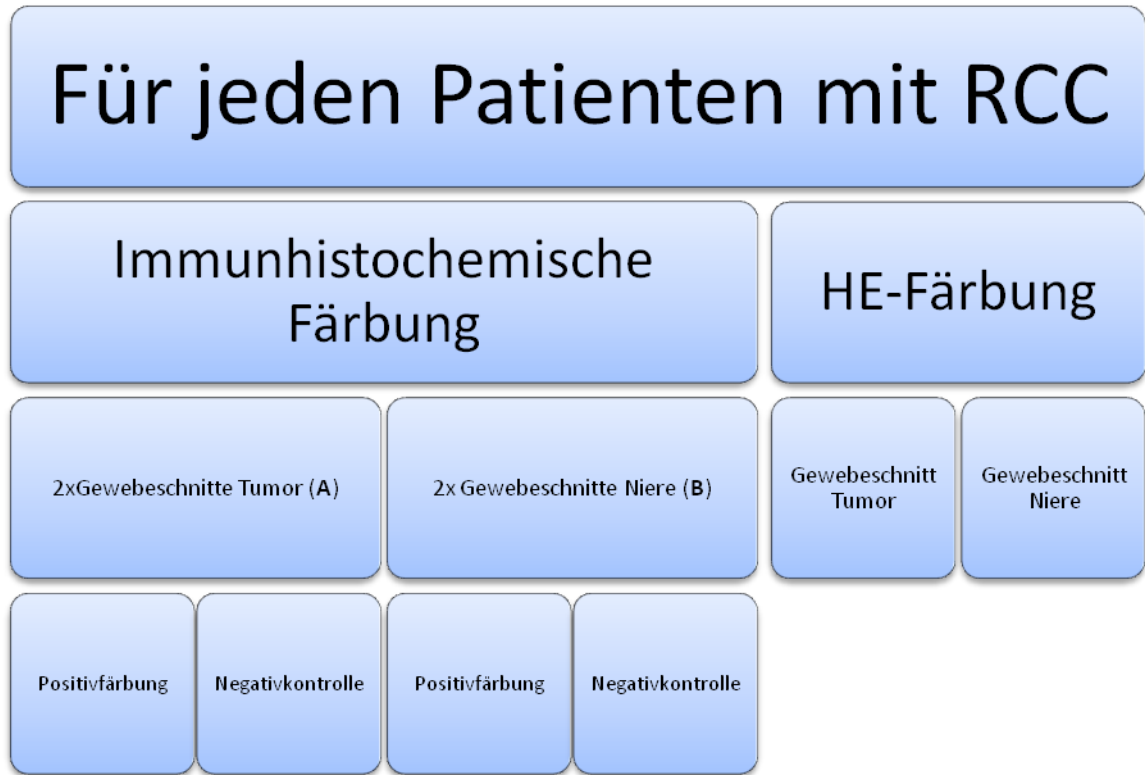


Abbildung 4: Durchgeführte Färbungen für jeden Patient mit RCC (n=30)

2.2.3 Herstellung der Paraffinschnitte

Das Gewebematerial wurde unmittelbar nach der intraoperativen Entnahme in das Schnellschnittlabor der Pathologie der Universitätsklinik Tübingen transportiert.

Hier erfolgte die Einbettung der Gewebeproben in Paraffin mittels eines Einbettautomaten, welcher die Gewebeproben standardisiert für vorher festgelegte Zeiten mit den verschiedenen Medien in Kontakt bringt. Ziel dieser Behandlung ist es, das in den Geweben vorhandene Wasser durch Alkohol zu ersetzen und diese durch das Eingießen in Paraffin für möglichst lange Zeit zu konservieren.

Für die Einbettung mittels Einbettautomaten wurde folgendes Schema verwendet:

Arbeitsschritt	Verwendetes Medium	Konzentration	Temperatur	Einwirkdauer
1	Formalin	4%	37 °C	1 Stunde 30 Minuten
2	Alkohol	70%	37 °C	1 Stunde
3	Alkohol	70%	37 °C	1 Stunde
4	Alkohol	96%	37 °C	1 Stunde
5	Alkohol	96%	37 °C	1 Stunde
6	Alkohol	100%	37 °C	1 Stunde
7	Alkohol	100%	37 °C	1 Stunde
8	Alkohol	100%	37 °C	1 Stunde
9	Xylol		37 °C	1 Stunde
10	Xylol		37 °C	1 Stunde 30 Minuten
11	Paraffin		60 °C	1 Stunde
12	Paraffin		60 °C	2 Stunden

Tabelle 10: Einbettungsschema der Paraffinschnitte

Die konservierten Gewebeproben wurden nun mittels Einbettkassetten in einer Metallform justiert, mit flüssigem Paraffin ausgegossen und auf einer Kühlplatte ausgehärtet.

Anschließend konnten sie bei Raumtemperatur bis zur weiteren Verarbeitung gelagert werden.

Für die Gewinnung der Gewebeschnitte wurden die Paraffinblöckchen bei ca. -5° C auf einer Kühlplatte gekühlt und dann mittels Schlittenmikrotom in 5 µm dünne Scheiben geschnitten, kurz im Wasserbad geglättet und auf beschichtete Superfrost-Objektträger aufgebracht. Danach wurden die Schnitte zunächst 5 Minuten an der Luft getrocknet und anschließend über Nacht bei 37°C in einem Brutschrank weitergetrocknet, um eine optimale Haftung zu erreichen.

Am nächsten Tag erfolgte dann die Entparaffinierung der Schnitte durch das Waschen in Xylol und Ethanol (absteigende Alkoholreihe):

- 3 Mal in Xylol je 5 Minuten
- Xylol kurz abtropfen lassen
- 2 Mal in 100% Ethanol für je 5 Minuten
- 1 Mal in 96% Ethanol für 5 Minuten
- 1 Mal in 80% Ethanol für 5 Minuten
- 1 Mal in 70% Ethanol für 5 Minuten
- in destilliertem Wasser kurz waschen

Nach Abschluss der Entparaffinierung wurde ein Teil der Schnitte direkt weiterbearbeitet und mit HE gefärbt. Die für die immunhistochemische Färbung vorgesehenen Schnitte wurden, um sie vor dem Austrocknen zu schützen, bis zum nächsten Arbeitsschritt in PBS-Puffer gelagert.

2.2.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die wie oben beschrieben vorbereiteten Schnitte wurden nun für 5 Minuten in Hämalun 0,1% eingestellt und dann für 10 Minuten unter fließendem Wasser gebläut.

Im Anschluss erfolgte die Gegenfärbung in Eosin 1% für 15 Sekunden und danach ein kurzes Waschen in destilliertem Wasser.

Nun wurde mittels Ethanol (aufsteigende Alkoholreihe) die überschüssige Farbe ausgewaschen und differenziert:

- kurzes Eintauchen in 80% Ethanol
- kurzes Eintauchen in 96% Ethanol
- 2 Mal in 100% Ethanol für je 2 Minuten
- 3 Mal in Xylol für je 5 Minuten

Danach wurden die gefärbten Schnitte aus dem Xylol genommen und die Ränder des Objektträgers mittels Zellstoff getrocknet, wobei das Gewebe selbst nicht austrocknen durfte.

Dann erfolgte das Eindecken der Schnitte mit DePex, welches über Nacht bei Raumtemperatur trocknete.

2.2.5 Prinzipien der Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbung beruht auf dem Prinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion. Das Antigen, bestehend aus Eiweißstrukturen, seltener auch aus Kohlenhydraten oder Lipiden, welche sich auf der Zellmembran oder innerhalb der Zelle befinden, reagiert hierbei mit dem Antikörper, einem Protein, welches sich spezifisch an das Antigen bindet.

Aufgrund der hohen Spezifität eignet sich dieses Prinzip sehr gut zum Nachweis von bestimmten Proteinen innerhalb eines Gewebes oder einer Zellkultur, vorausgesetzt, dass der Aufbau des Antigens und des entsprechenden Antikörpers bekannt sind und dieser hinreichend spezifisch bindet und keine Kreuzreaktionen mit anderen Epitopen aufweist.

Da die Ergebnisse dieser Methode jedoch von vielen Faktoren abhängen (Temperatur, Vorbehandlung der Zellen, Einwirkdauer des Antikörpers etc.) sollte standardisiert nach Protokoll und unter möglichst gleichbleibenden Bedingungen gearbeitet werden, um Fehlerquellen zu minimieren.

Um den entstandenen Antigen-Antikörper-Komplex für das menschliche Auge sichtbar zu machen, bedient man sich unterschiedlicher Verfahren, denen jedoch gemein ist, dass ein Detektionssystem an diesen Komplex gekoppelt wird, welches dessen Existenz quantitativ und teilweise auch qualitativ anzeigt.

Man unterscheidet im Allgemeinen die direkte von der indirekten immunhistochemischen Färbung.

Bei der direkten Methode wird dem Antigen ein Antikörper zugegeben, an welchen direkt das Detektionssystem (ein Enzym oder Fluorochrom) gekoppelt ist. Nachdem überschüssiger nicht gebundener Antikörper herausgespült wurde, wird dem Enzym nun ein Substrat angeboten das unter Bildung von Farbstoff mit diesem reagiert. Fluorochrome benötigen kein weiteres Substrat, sondern können direkt durch Belichtung mittels Fluoreszenzmikroskop dargestellt werden.

Die indirekte Methode, welche auch für den Nachweis von BSP in dieser Arbeit genutzt wurde, verwendet einen weiteren Zwischenschritt zur Darstellung des gesuchten Antigens. Es wird zunächst ein Primärantikörper hinzugegeben, welcher an das Antigen bindet, jedoch noch kein Detektionssystem beinhaltet. Nach Auswaschen des nicht gebundenen Überschusses wird ein zweiter, sogenannter Sekundärantikörper hinzugegeben, welcher wie oben beschrieben das Detektionssystem beinhaltet. Durch die indirekte Darstellung, welche neben der beschriebenen 2-Schritt-Methode auch als 3-Schritt-Methode durchgeführt werden kann, wird eine bessere Darstellung oder sogar Verstärkung des Signals erreicht. Daher ist dies die Methode der Wahl auch zum Nachweis geringerer Mengen eines gesuchten Antigens.

2.2.6 Etablierung der BSP-Färbung

Das Ziel bei der Etablierung der BSP-Färbung war, die richtige Konzentration und Einwirkzeit für die beiden verwendeten Antikörper zu finden, bei der eine optimale Darstellung des Bone Sialoproteins bei gleichzeitig möglichst wenig Hintergrundfärbung und eindeutig negativ ausfallender Negativkontrolle erreicht wird. Hierfür wurden zunächst nach den Herstellerempfehlungen Probeschnitte gefärbt.

Verwendet wurden dafür aus den Tumor- und Nierengeweben angefertigte und nach dem Zufallsprinzip ausgewählte Schnitte. Die Färbung erfolgte (ausgehend von den in PBS gelagerten, entparaffinierten Schnitten) nach folgendem Schema:

Versuchstag	Gewebe	Negativ-Kontrolle des Gewebes	Inkubation
Tag 1	Primärantikörper 1:100 in 1% BSA in PBS	Nur 1% BSA in PBS	Inkubation über Nacht (24h) in feuchter Kammer bei 4°C
Tag 2	3 x Waschen in PBS-Puffer für je 10 Minuten, dann Abdunkeln des Raumes		Inkubation 1 Stunde abgedunkelt bei Raumtemperatur
	Sekundärantikörper 1:200 in 0,1% BSA in PBS		
	Nach 1-stündiger Inkubation erneut 3 x Waschen in PBS- Puffer für je 10 Minuten. Dann Eindecken der Schnitte mittels Elvanol und 10 µl DAPI pro Schnitt.		

Tabelle 11: Initial verwendetes Färbeschema entsprechend Herstellerempfehlungen für Gewebe und Negativ-Kontrollen (Verwendete Antikörper: siehe Tabelle 7)

Bereits bei der Mikroskopie der ersten Schnitte wurde deutlich, dass dieses Färbungsschema für Nieren- und Tumorgewebe nicht optimal war. So zeigten die gefärbten Schnitte einen sehr starken Farbhintergrund, der so ausgeprägt war, dass es bei einem Teil der Schnitte nicht möglich war, anhand der Mikroskopie zwischen Positivfärbung und Negativkontrolle zu unterscheiden. Es fiel ebenfalls auf, dass die Färbung sich relativ homogen über den gesamten Schnitt verteilte und nicht spezifisch Gewebsstrukturen oder einzelne Zellen hervorhob.

Die Vermutung lag nahe, dass für dieses Problem eine zu unspezifische Bindung des zweiten Antikörpers verantwortlich sein könnte, da das Problem des zu starken Farbhintergrunds auch in der Negativkontrolle auftrat, welche ausschließlich mit dem zweiten Antikörper in Kontakt gekommen war.

Darüber hinaus war die Möglichkeit gegeben, dass die Konzentration des zweiten Antikörpers mit 1:200 zu hoch war und sich hierdurch zu viel Antikörper unspezifisch anlagern konnte.

Eine andere Überlegung war, dass die Waschvorgänge nicht lang oder intensiv genug gewesen sein könnten, so dass überschüssiger Farbstoff nicht vollständig herausgewaschen wurde. Allerdings sind drei Waschgänge mit jeweils 10 Minuten ein übliches Vorgehen bei der immunhistochemischen Färbung und eine versuchsweise durchgeführte Verlängerung der Waschzeit auf 15 Minuten pro Waschgang brachte keine Änderung des Farbhintergrundes.

Um sicherzustellen, dass das Problem im Zusammenhang mit der Spezifität des zweiten Antikörpers an Nieren- und Tumorgewebeschnitten zu suchen war und nicht etwa in einer grundsätzlich nicht funktionierenden Färbung, beispielsweise weil die Antikörpercharge durch fehlerhafte Herstellung oder Einwirkungen beim Transport oder Lagerung in ihrer Funktion beeinträchtigt war, wurden die Probeschnitte nun durch Knochen- und Knorpelgewebsschnitte ergänzt, da hier das Vorkommen und die Verteilung von BSP bekannt ist.

Hierbei zeigte sich, dass sich in den Knochen- und Knorpelschnitten mit dem oben genannten Schema eine zufriedenstellende Färbung erreichen ließ. Zwar war auch in diesen Gewebsschnitten eine dezente Hintergrundfärbung zu erkennen, diese ließ sich jedoch deutlich von den angefärbten Gewebsstrukturen differenzieren, welche eine weitaus höhere Färbungsintensität aufwiesen, so dass sich einzelne Gewebsstrukturen wie beispielsweise Knochenumbauzonen oder Chondrone deutlich differenzieren ließen.

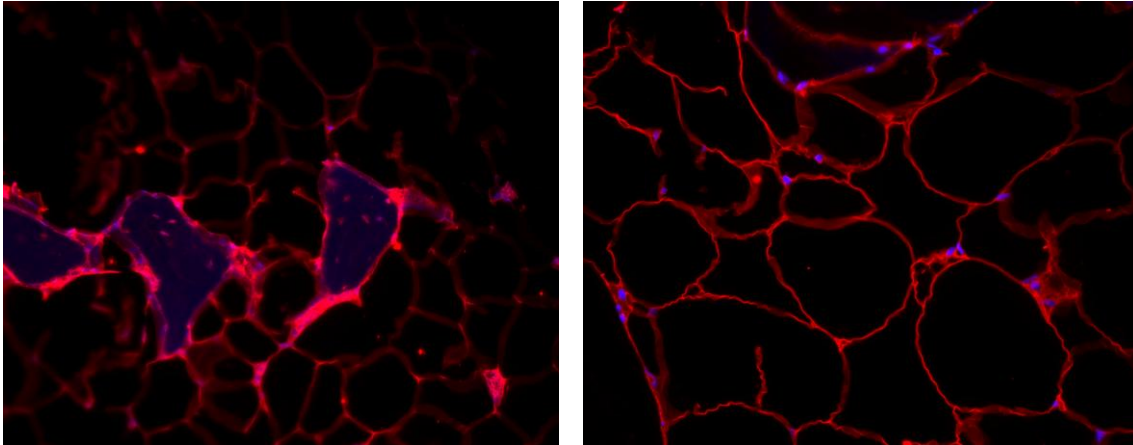


Abbildung 5: Beispielbilder der immunhistochemischen Anfärbung von BSP im Knochengewebe (links 100fache Vergrößerung, rechts 200fache Vergrößerung)

Die Probleme bei der Färbung der Nieren- und Tumorschnitte waren folglich nicht auf fehlerhaft hergestellte oder gelagerte Reagenzien oder ein grundsätzlich falsches Färbeschema zurückzuführen, sondern mussten mit den gewebespezifischen Merkmalen der Nieren- und Tumorgewebe zusammenhängen.

Um zu überprüfen, ob sich durch eine Anpassung des Färbeschemas eine zufriedenstellende Färbung dieser Gewebe erreichen ließ oder ob das oben genannte Färbungsschema und die hierfür verwendeten Antikörper nur an Knochen- und Knorpelschnitten praktikabel waren, da beispielsweise unspezifische Bindung des Zweitantikörpers an Oberflächenstrukturen des Nierengewebes stattfand, wurden die beiden Parameter, welche im Verdacht standen für das schlechte Färbeergebnis verantwortlich zu sein variiert. Dies waren zum Einen die Konzentration des Zweitantikörpers und zum Anderen dessen Inkubationszeit und –temperatur.

Im ersten Schritt wurde daher mit verschiedenen Konzentrationen des Zweitantikörpers gefärbt. Diese Konzentrationen waren:

- 1: 500 in 0,1% BSA in PBS
- 1:1000 in 0,1% BSA in PBS

- 1:2000 in 0,1% BSA in PBS

Alle übrigen Parameter wurden, wie in obigem Schema beschrieben, beibehalten.

Leider ließen die unterschiedlichen Konzentrationen keinerlei Unterschiede im Anfärbeverhalten erkennen und das Problem der unspezifischen Anfärbung und der zu starken Hintergrundfärbung war in allen Konzentrationen ähnlich ausgeprägt gegeben.

In einem weiteren Schritt wurden daher nun Inkubationszeit und -temperatur verändert, um das Färbeergebnis zu verbessern. Da die Bindung eines Antikörpers bekanntlich bei höheren Temperaturen schneller als bei tieferen Temperaturen aber eben auch unspezifischer erfolgt, wurde nun der zweite Antikörper ebenfalls bei 4°C und über 24 Stunden inkubiert, um eine spezifischere Bindung an die gesuchte Struktur zu erreichen. Als Konzentration des Zweitantikörpers wurde 1:400 gewählt, da sich in der Konzentrationsreihe gezeigt hatte, dass auch mit geringeren Konzentrationen als 1:200 noch eine ausreichend hohe Fluoreszenz erreicht werden konnte. Zusätzlich wurde der Zweitantikörper nun auch wie der erste Antikörper in 1% BSA in PBS verdünnt, um hierdurch unspezifische Bindungsstellen besser zu blockieren.

Mit den oben genannten Maßnahmen ließ sich insgesamt eine klare qualitative Verbesserung der Färbung erreichen. Die Negativkontrollen waren deutlich als negativ zu identifizieren und wiesen fast keine Hintergrundfärbung mehr auf. Die Positivproben waren zufriedenstellend angefärbt und es ließen sich innerhalb eines Schnittes Areale mit unterschiedlicher Intensität der Fluoreszenz differenzieren.

Das gefundene Färbeschema wurde dann folgendermaßen auf alle zu untersuchenden Schnitte angewandt:

Versuchstag	Gewebe	Negativ-Kontrolle des Gewebes	Inkubation
Tag 1	Primärantikörper 1:100 in 1% BSA in PBS	Nur 1%BSA in PBS	Inkubation über Nacht (24h) in feuchter Kammer bei 4°C
Tag 2	3 x Waschen in PBS-Puffer für je 10 Minuten, dann Abdunkeln des Raumes Sekundärantikörper 2. AK 1:400 in 1% BSA in PBS		Inkubation über Nacht (24h, abgedunkelt) in feuchter Kammer bei 4°C
Tag 3	Abdunkeln des Raumes, dann 3 x Waschen in PBS-Puffer für je 10 Minuten. Eindecken der Schnitte mittels Elvanol und 10 µl DAPI pro Schnitt. Aufbewahrung der eingedeckten Gewebeschnitte in lichtundurchlässiger Mappe bis zur Mikroskopie		

Tabelle 12: Endgültig verwendetes Färbeschema für Gewebe und Negativ-Kontrollen

2.2.7 Immunhistochemische Darstellung von BSP

Für die immunhistochemische Darstellung der BSP-Expression in Nieren- und Tumorgewebe wurde pro Blöckchen jeweils eine Probe mit BSP und eine Negativkontrolle, welche lediglich mit BSA inkubiert wurde, angefertigt.

Hierfür wurden die vorbereiteten entparaffinierten Schnitte kurz in PBS gewaschen und dann vorsichtig die überschüssige Flüssigkeit abgetupft, wobei das Gewebe selbst jedoch feucht bleiben musste. Dann wurde mit einem Pap-Pen der Schnitt kreisförmig markiert, um ein Auslaufen des Antikörpers später zu vermeiden.

Mit dem Primärantikörper gegen human Bone Sialo Protein Locus ID 3381 Mouse balb-c clone ID 1.2 IgG1 in einer Verdünnung von 1:100 mit 1%iger BSA in PBS-Lösung wurde nun der erste Gewebeschnitt vollständig bedeckt. Die Negativkontrolle erhielt keinen Antikörper, sondern nur 1%ige BSA in PBS-Lösung gleicher Menge, wobei pro Schnitt ca. 200 µl Lösung nötig waren, um ihn vollständig zu bedecken.

Anschließend wurden die so behandelten Schnitte in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4°C im Kühlschrank belassen, damit der Primärantikörper ausreichend Zeit hatte, sich an das BSP zu binden.

Am nächsten Tag erfolgte nun die Weiterbehandlung der Schnitte mit dem Zweitantikörper.

Hierfür wurden die Schnitte zunächst 3 Mal für je 10 Minuten in PBS-Puffer gewaschen, um Überschüsse des Primärantikörpers zu entfernen. Da der Zweitantikörper fluoreszierend und somit lichtempfindlich ist, musste der Raum angedunkelt werden, um später beim Mikroskopieren eine gute Fluoreszenz zu erreichen.

Der Zweitantikörper R-PE (Phycoerythrin)-conjugiert Goat anti Mouse IgG wurde im Verhältnis 1:400 mit 1%iger BSA in PBS-Lösung in einem Eppendorfcup verdünnt und dieses unmittelbar in Alufolie gewickelt, um es vor Licht zu schützen.

Die Gewebeschnitte wurden nun wieder, wie oben beschrieben, mit der Lösung benetzt, wobei sowohl die Probe als auch die Kontrolle mit der gleichen Lösung behandelt und dann wieder in der feuchten Kammer 24 Stunden dunkel und bei 4°C inkubiert wurden.

Im Anschluss erfolgte erneut das Auswaschen von überschüssigem Antikörper für jeweils 3 mal 10 Minuten in BSP, wobei der Behälter wieder mit Alufolie komplett abgedeckt wurde.

Nun wurden die Schnitte einzeln herausgenommen, rings um das Gewebe vorsichtig trockengetupft und mit Elvanol, dem jeweils ein Tropfen DAPI 1:1000 für die Kernfärbung hinzugegeben wurde, eingedeckt und bis zum anschließenden Mikroskopieren dunkel in einer Mappe gelagert.

Alle Schnitte wurden bis maximal zwei Tage nach dem Eindecken mikroskopiert und abfotografiert und bis dahin kühl und lichtgeschützt gelagert.

2.2.8 Fluoreszenzmikroskopie und Auswertung der Schnitte

Die Auswertung aller Schnitte erfolgte an einem Zeiss Axiophot-Mikroskop.

Die Wahl fiel dabei auf ein 5-stufiges dimensionsloses semiquantitatives Scoringssystem zur Beschreibung der Stärke der Fluoreszenz. Hierbei wurde 0 als Wert für keinerlei nachweisbare Fluoreszenz und IV als Wert für die maximal erreichbare Fluoreszenz festgelegt. Wert 0 war dabei der Zielwert für alle Negativkontrollen. Wert IV wurde mit Hilfe von Knochengewebeschnitten festgelegt, in denen BSP in sehr starker Ausprägung vorkommt und dementsprechend eine sehr ausgeprägte Fluoreszenz erkennen lässt. Wert I zeigte eine schwache aber gerade noch nachweisbare Fluoreszenz, Wert II eine mäßige aber bereits gut sichtbare Fluoreszenz und Wert III eine ausgeprägte jedoch noch submaximale Fluoreszenz.

- 0 keine Fluoreszenz
- I schwache Fluoreszenz
- II mäßige Fluoreszenz
- III starke Fluoreszenz
- IV maximale Fluoreszenz

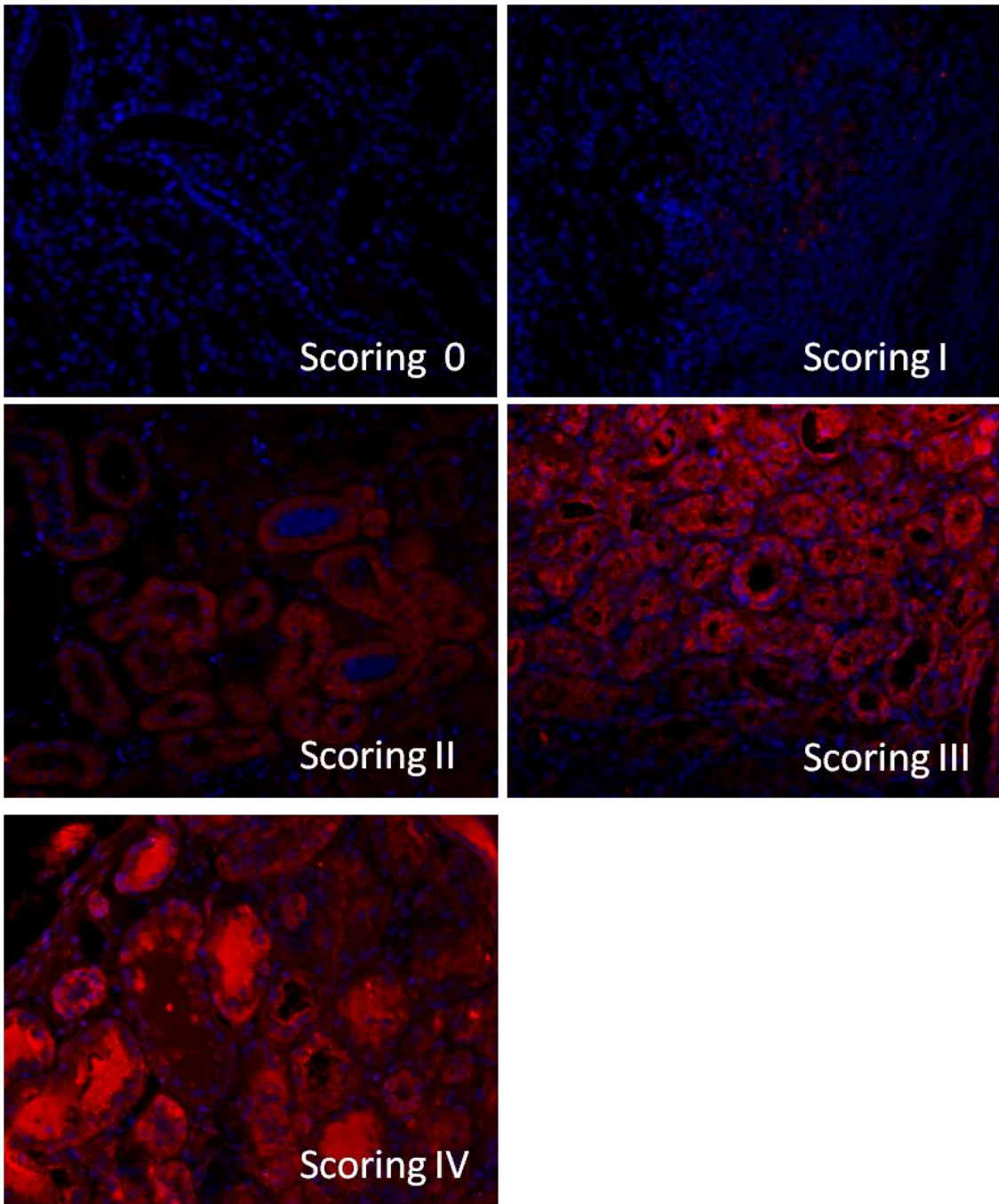


Abbildung 6: Gegenüberstellung der Fluoreszenzscoringwerte 0- IV, 200-fache Vergrößerung, verwendete Einzelbilder siehe Abb. 6-10

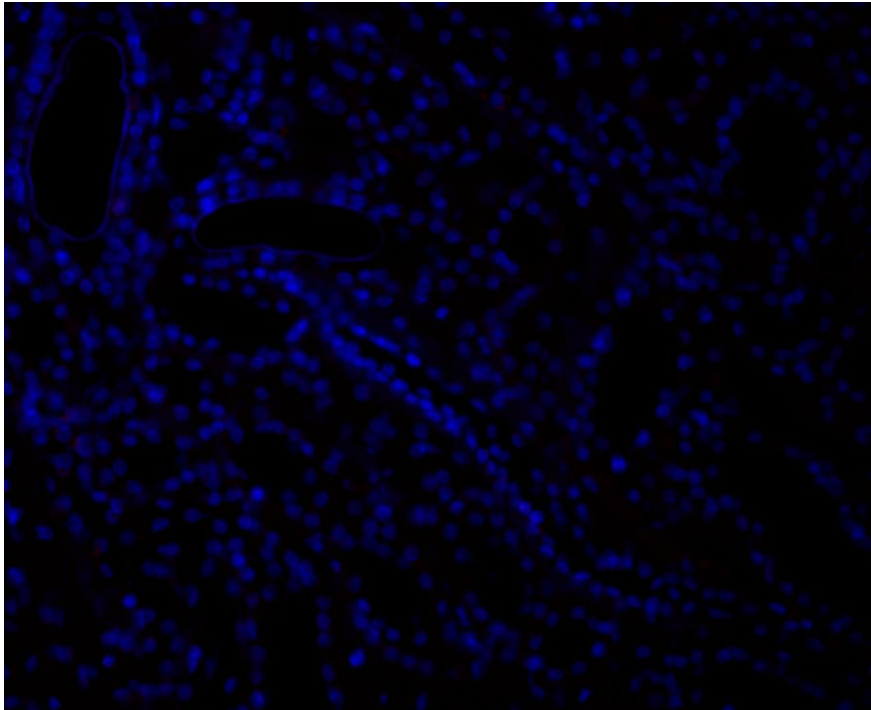


Abbildung 7: Beispielbilder für die einzelnen Scoringwerte:

Scoringwert 0

(06/266, Bild 2 , Negativ-Kontrolle Nierengewebe, 200-fache Vergrößerung)

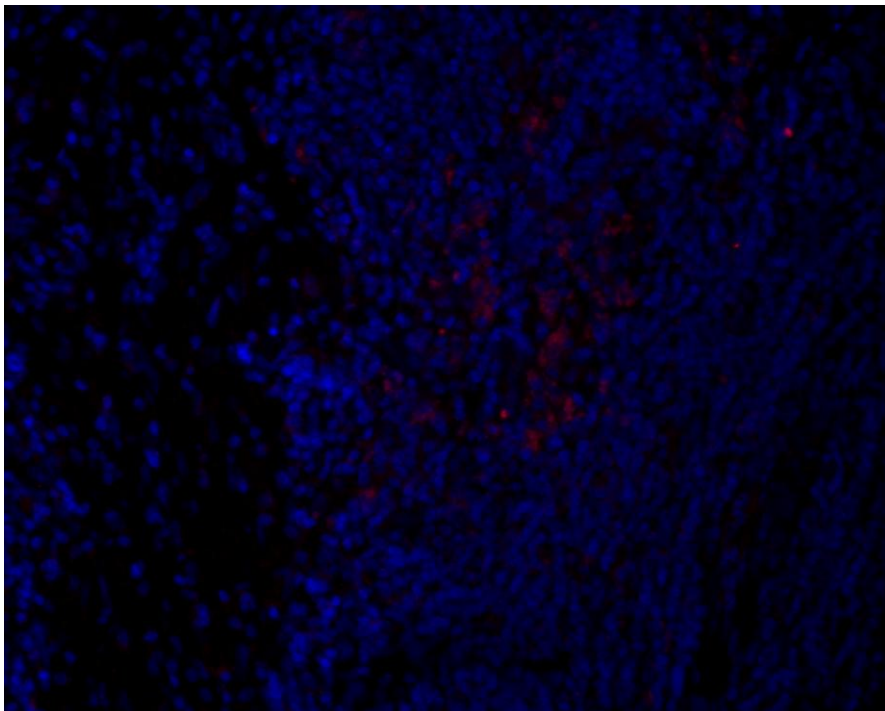


Abbildung 8: Beispielbilder für die einzelnen Scoringwerte:

Scoringwert I

(04/441 Bild1, Nierenzellkarzinom, 200-fache Vergrößerung)

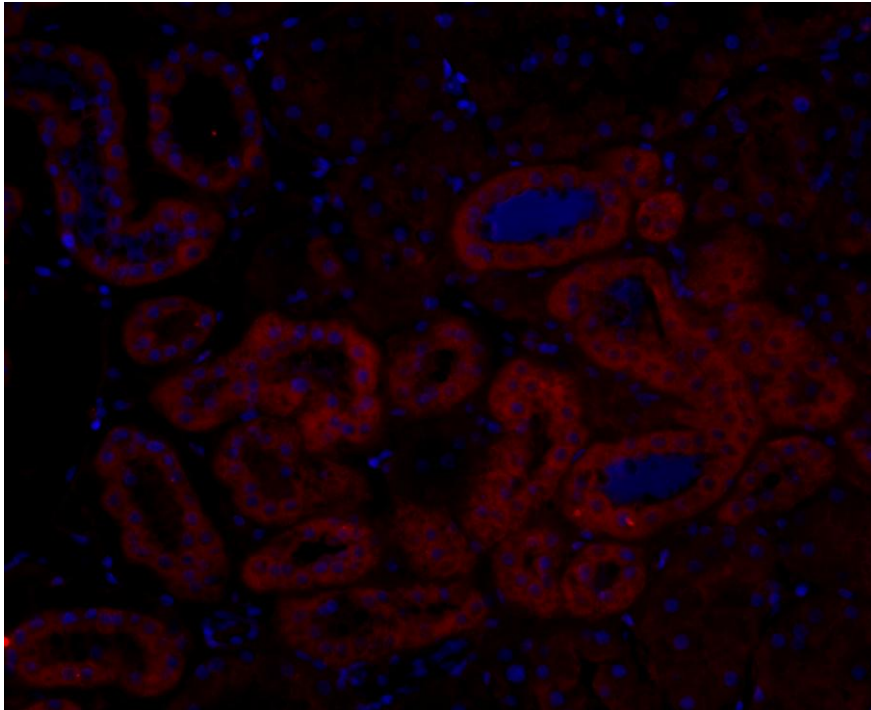


Abbildung 9: Beispielbilder für die einzelnen Scoringwerte:

Scoringwert II

(05/432 Bild 2, Nierengewebe, 200-fache Vergrößerung)

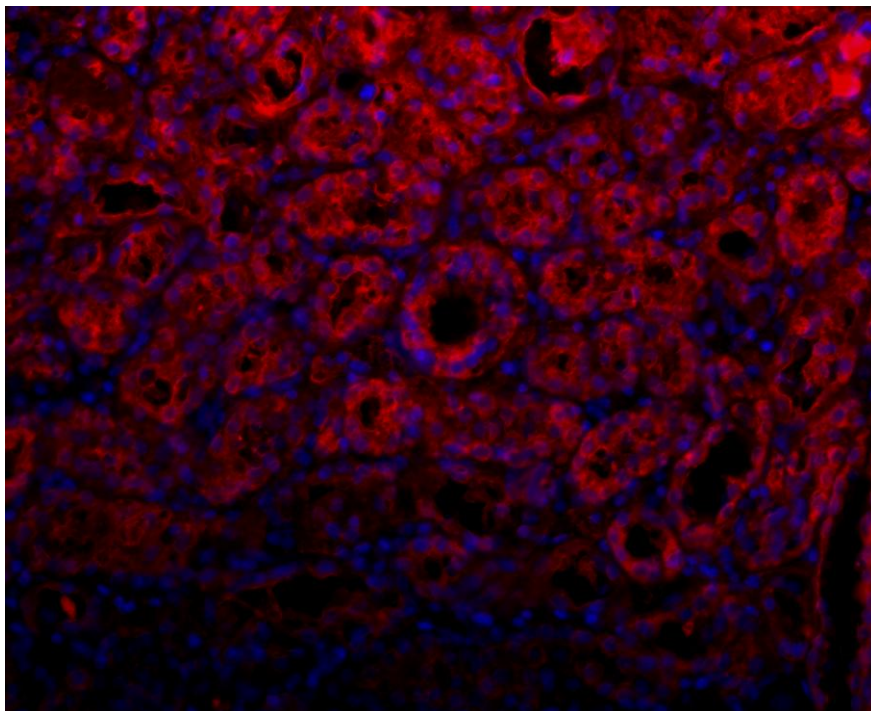


Abbildung 10: Beispielbilder für die einzelnen Scoringwerte:

Scoringwert III

(05/418, Bild 3, Nierengewebe, 200-fache Vergrößerung)

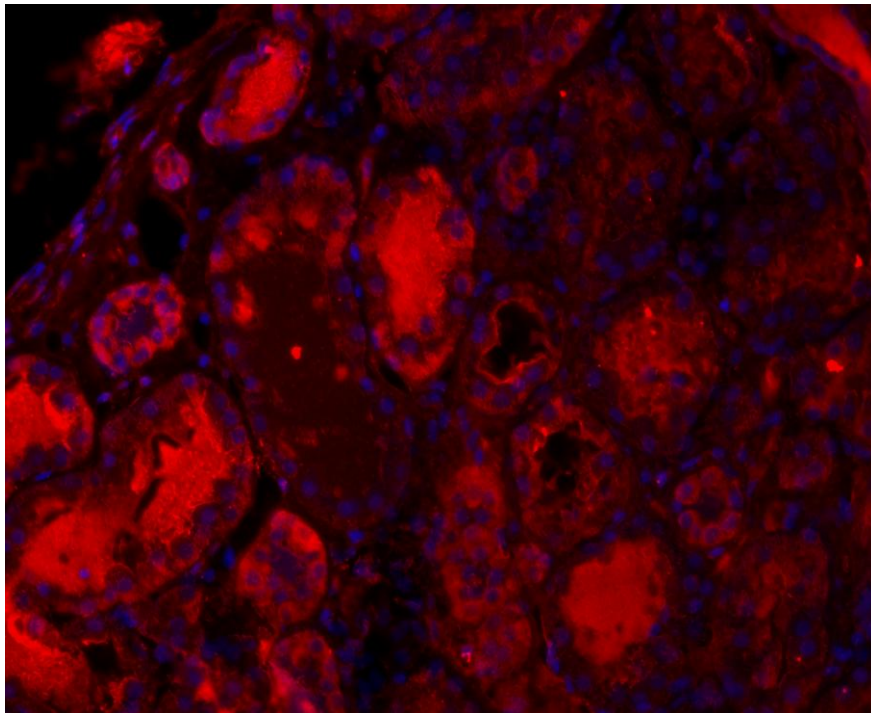


Abbildung 11: Beispielbilder für die einzelnen Scoringwerte:

Scoringwert IV

(05/432, Bild 4, Nierengewebe, 200-fache Vergrößerung)

Bei jeder Färbecharge wurden zusätzlich 2 Knochengewebeproben mitgefärbt, jeweils einmal als Positivfärbung und einmal als Negativkontrolle, um stets einen Anhaltspunkt für die maximale Fluoreszenz im Vergleich zu den übrigen Schnitten zu haben und darüber hinaus als Kontrollmöglichkeit um Abweichungen im Anfärbeverhalten detektieren zu können.

Das Scoring wurde vergeben, indem der Gewebeschnitt zunächst in der Übersichtsvergrößerung betrachtet und hierbei festgelegt wurde, wieviel Prozent der gesamten Schnittfläche welchen Scoringwert aufwiesen. Die Prozentangaben aller Scoringwerte pro Schnitt ergeben daher addiert immer 100%, wobei nicht jeder Scoringwert in jedem Schnitt vorkommen muss. Zusätzlich wurden die Schnitte in höheren Vergrößerungen durchgesehen und Besonderheiten, wie beispielsweise nekrotische Areale, Einblutungen, Zerreißen im Schnitt notiert.

Anschließend wurde von jedem Scoringwert, der im Schnitt vorkam, ein Areal welches diesem entsprach, fotografiert und für die weitere Bearbeitung gespeichert.

In der Reihenfolge innerhalb einer Färbecharge wurden zuerst die Knochennegativkontrolle, dann die angefärbten Knochengewebeproben und dann jeweils zuerst die Negativkontrolle und anschließend der korrespondierende positive Schnitt betrachtet, um für jedes untersuchte Gewebe sicherzustellen, dass die Färbung ohne Fehler verlaufen war.

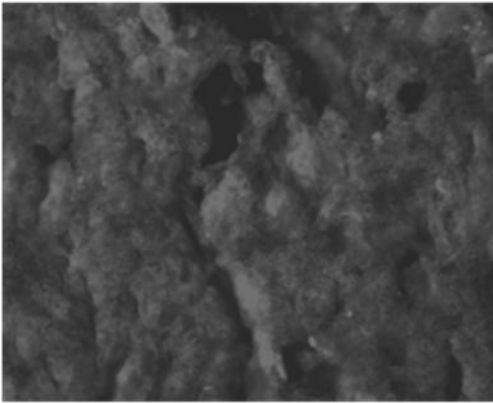
Um methodische Fehler zu vermeiden, wurden alle Schnitte an dem gleichen Mikroskop (Zeiss Axiophot, ausgestattet mit Spezialfiltern für DAPI-, FITC- und PE-Fluoreszenz) und von der gleichen Person ausgewertet. Die Auswertung erfolgte dabei blind, was bedeutet, dass die untersuchten Schnitte lediglich mit den in der Pathologie vergebenen Zahlen und mit dem Zusatz „positiv“ oder „Negativkontrolle“ versehen waren und nicht erkennen ließen, welcher Patientengruppe die Schnitte entstammten.

Die verblindeten Schnitte wurden hierbei von einer zweiten Person hinsichtlich der korrekten Vergabe der Scoringwerte kontrolliert.

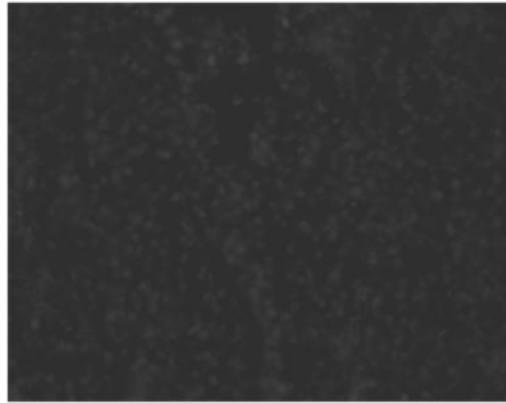
Fotografiert wurden für eine Darstellung jeweils 2 Bilder in 200-facher Vergrößerung, eines von der DAPI-Kernfärbung und eines von der BSP-Anfärbung, jeweils entsprechend mittels DAPI- und PE-Filter. Mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms Zeiss Axiovision wurden diese Bilder anschließend angefärbt (DAPI=blauviolett, BSP=rot), bezüglich Hintergrundfärbung und Kontrast korrigiert und zu einem Einzelbild überlagert.

In der folgenden Abbildung ist dies beispielhaft dargestellt.

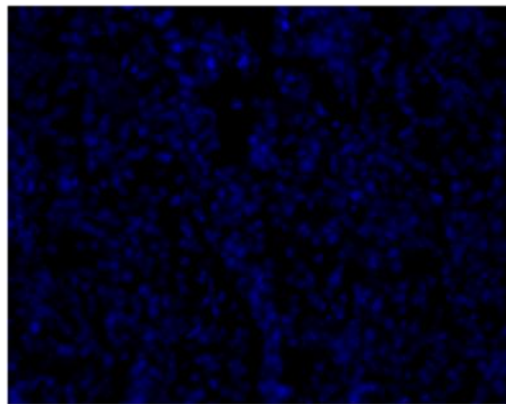
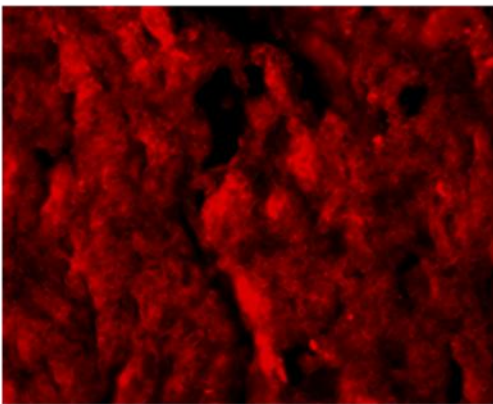
BSP-Färbung



DAPI-Kernfärbung



Digitale Anfärbung mittels Bildbearbeitungssoftware



Überlagerung zu einem Einzelbild

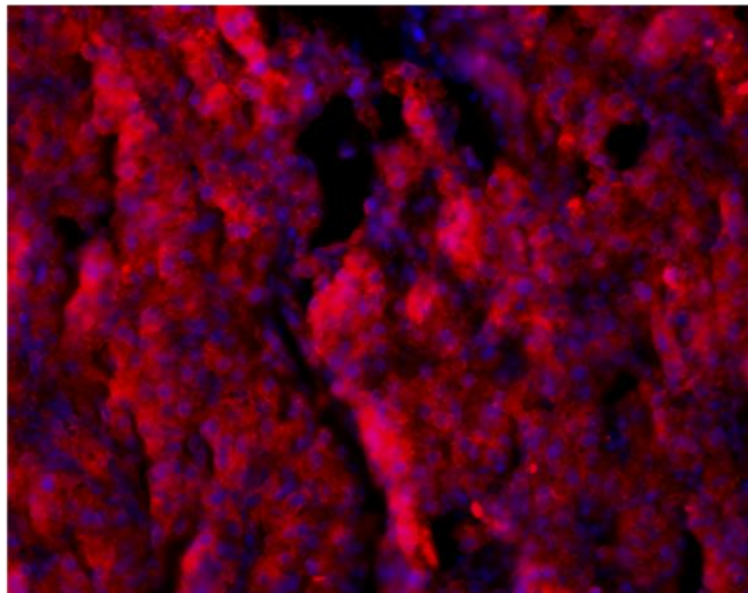


Abbildung 12: Darstellung der Bildbearbeitung am Beispiel eines Nierenzellkarzinomgewebeschnittes, 200-fache Vergrößerung

Um eine bessere Vergleichbarkeit und praktikable Zahlenwerte zu erhalten, wurde nun für jeden Gewebeschnitt ein Summenwert für die Gesamtfluoreszenz berechnet.

Die Berechnung erfolgte dabei mittels der Formel:

$$\Sigma = w^1 \times 1 + w^2 \times 2 + w^3 \times 3 + w^4 \times 4$$

$w^{1,2,3,4}$ ist hierbei der prozentuale Anteil der Gesamtfläche des betreffenden Schnittes, die den Scoringwert I, II, III oder IV aufweist.

Dies bedeutet beispielsweise für einen Gewebeschnitt mit den Werten I=45%, II= 45%, III=10% und IV=0% eine Summe für diesen Schnitt von:

$$\Sigma = 45 \times 1 + 45 \times 2 + 10 \times 3 + 0 \times 4 = 165$$

Da die einzelnen Scoringwerte I-IV addiert nie größer als 100% sein können, ergibt sich daraus ein maximaler Summenwert pro Schnitt von 400, wenn w^4 den Wert 100% annimmt und ein minimaler Summenwert von 100, wenn w^1 den Wert 100% annimmt.

2.2.9 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Herr Dr. biol. hum. Christoph Meisner vom Institut für medizinische Biometrie der Universität Tübingen.

Mit einer multivariaten Varianzanalyse (MANOVA) wurde hierbei untersucht, ob sich die drei Gruppen hinsichtlich der primären Zielgröße, der Gewebefluoreszenz, unterscheiden und ob in Bezug auf diese Zielgröße zwischen den beiden Gewebearten ein Unterschied besteht. Dabei wurde davon ausgegangen, dass die primäre Zielgröße in der Grundgesamtheit normalverteilt ist und die Varianz in jeder der Subgruppen homogen ist.

Um aussagekräftigere Werte zu erhalten, wurden die in den Gewebeschnitten bestimmten Fluoreszenzen rechnerisch zu zwei Zielgrößen zusammengefasst,

wofür Scoringwert I + II (schwache bis mäßige Fluoreszenz) und Scoringwert III + IV (starke bis sehr starke Fluoreszenz) einander gegenübergestellt wurden.

Weiterhin wurden die jeweiligen Fluoreszenz-Expressionen als relative Anteile eines Maximums dargestellt und mittels One way ANOVA nach Gruppenzugehörigkeit und klinischen Daten als ordinale Einflussvariablen verglichen. Zur Prüfung eines Zusammenhangs zwischen der stetigen Variable „Expressionsstärke“ von Tumorgewebe und Nierengewebe wurden lineare Regressionsanalysen durchgeführt.

Zur Berechnung wurde hierfür die Software JMP 7.0 (Cary, NC USA: SAS Institute Inc., 2007) verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse

Die vollständigen Daten der immunhistochemischen Auswertung aller Schnitte sind im Anhang tabellarisch dargestellt. Im Folgenden werden der Übersicht halber, soweit nicht anders angegeben, stets die errechneten Mittelwerte verwendet.

Bei der Auswertung der Schnitte zeigte sich in allen Positivproben sowohl im Nierengewebe, als auch im Tumorgewebe eine Fluoreszenz als Nachweis für das Vorhandensein von BSP.

Hierbei kamen alle Scoringwerte (I-IV) in beiden Geweben vor.

Es bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von BSP im Nierengewebe und dem dazugehörigen Karzinomgewebe des jeweiligen Patienten unabhängig vom Metastasierungsgrad ($p=0,01$).

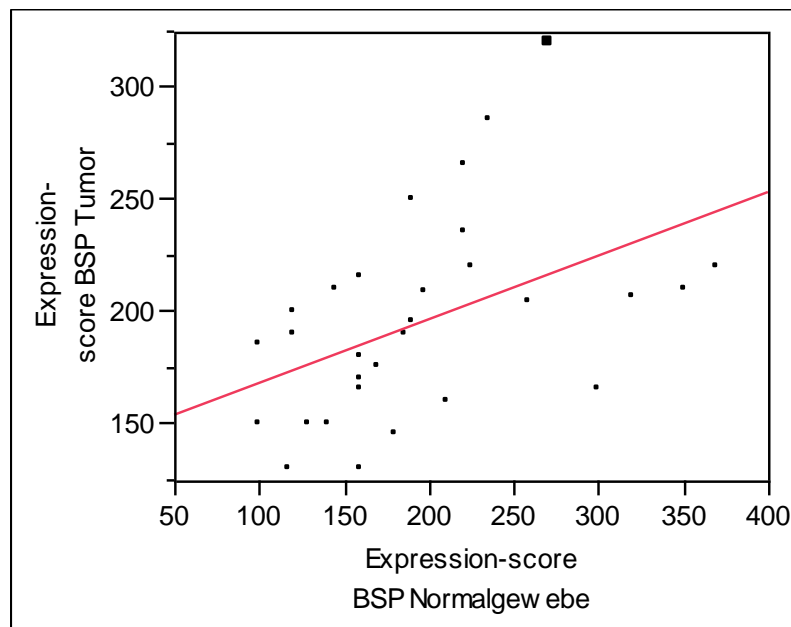


Abbildung 13: Zusammenhang zwischen Expression von BSP im Tumorgewebe und im dazugehörigen Nierengewebe für alle 30 Patienten. Dargestellt sind die einzelnen Summenwerte der Tumorgewebe und Nierengewebe.

Die folgenden Abbildungen zeigen die Mittelwerte für die Scoringwerte aller 30 Tumorgewebeschnitte, sowie aller 30 korrespondierender Nierengewebeschnitte, unterteilt nach den unterschiedlichen Metastasierungsgraden (Gruppe 1-3).

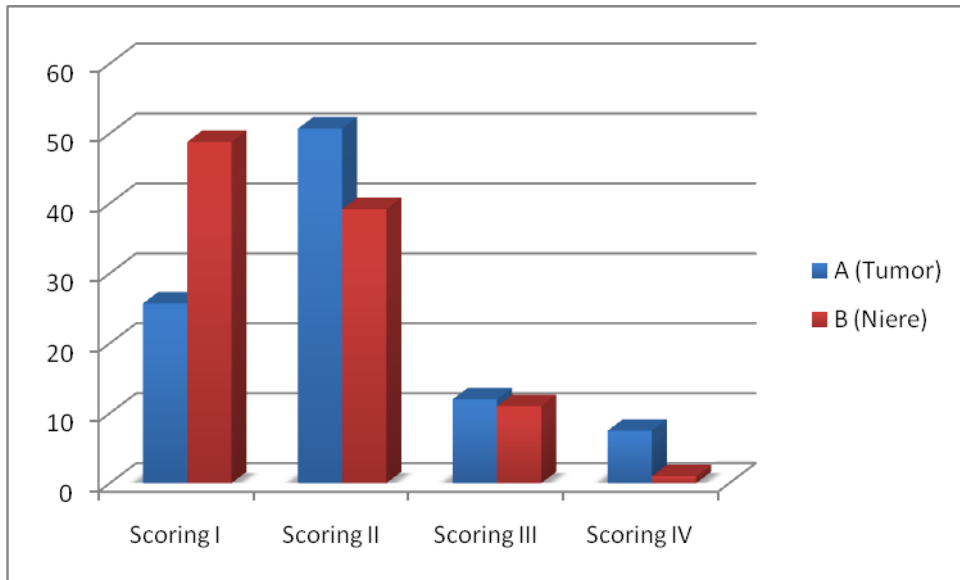


Abbildung 14: Mittelwerte der Scoringwerte I-IV in Prozent der Gesamtsschnittfläche für Gruppe 1 (keine Metastasierung, n=10)

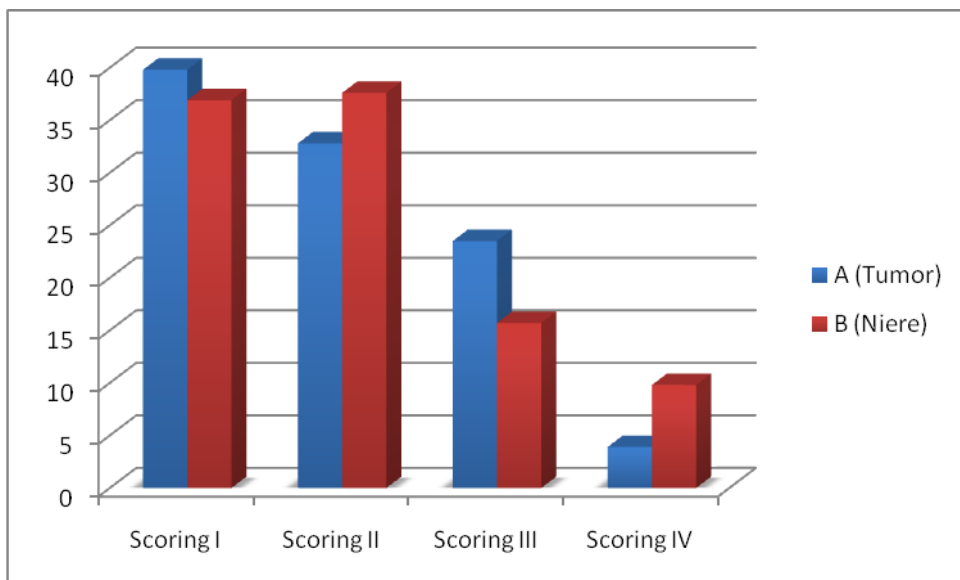


Abbildung 15: Mittelwerte der Scoringwerte I-IV in Prozent der Gesamtsschnittfläche für Gruppe 2 (Weichteilmetastasierung, n=10)

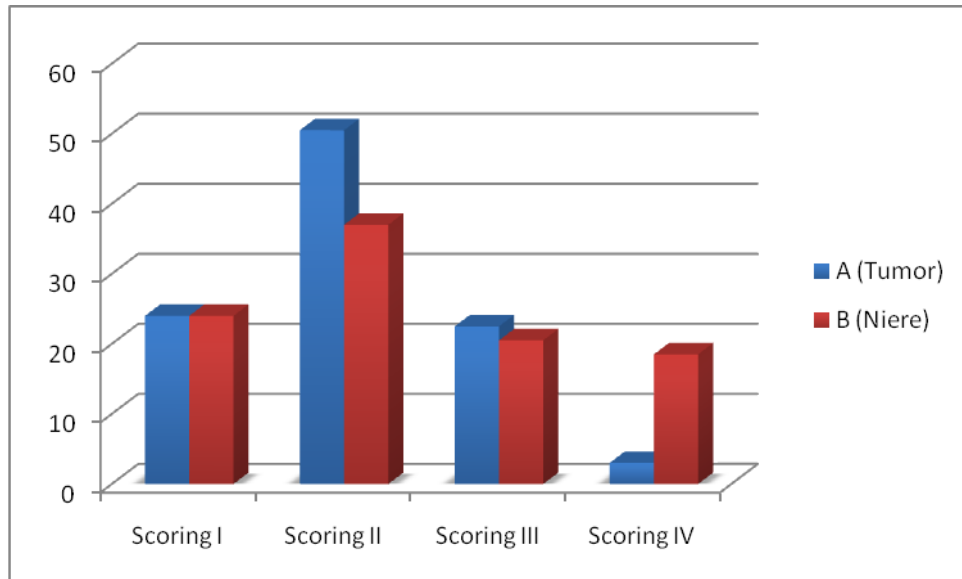


Abbildung 16: Mittelwerte der Scoringwerte I-IV in Prozent der Gesamtsschnittfläche für Gruppe 3 (Knochenmetastasierung, n=10)

Es zeigte sich, dass insgesamt die Scoringwerte I und II in beiden untersuchten Geweben im Durchschnitt flächenanteilig am höchsten vertreten sind. Darüber hinaus fiel auf, dass nur in Gruppe 1 eine Präferenz der Tumorgewebeproben zu den höheren Scoringwerten III und IV zu erkennen ist (siehe Abbildung 12), mit durchschnittlich 12 % (A III) und 7,5 % (A IV), während in den Nierengewebeproben 11 % (B III) und 1 % (B IV) erreicht werden.

In den Gruppe 2 und 3, also bei den Patienten mit Metastasen zeigte sich hingegen überraschenderweise eine Präferenz der Nierengewebeproben zu den höheren Scoringwerten (siehe Abbildungen 13 und 14).

Die nun folgenden beiden Abbildungen zeigen jeweils in Prozent der Gesamtschnittfläche die Mittelwerte aller Tumorgewebeproben (A) und dem gegenübergestellt die Mittelwerte aller Nierengewebeproben (B):

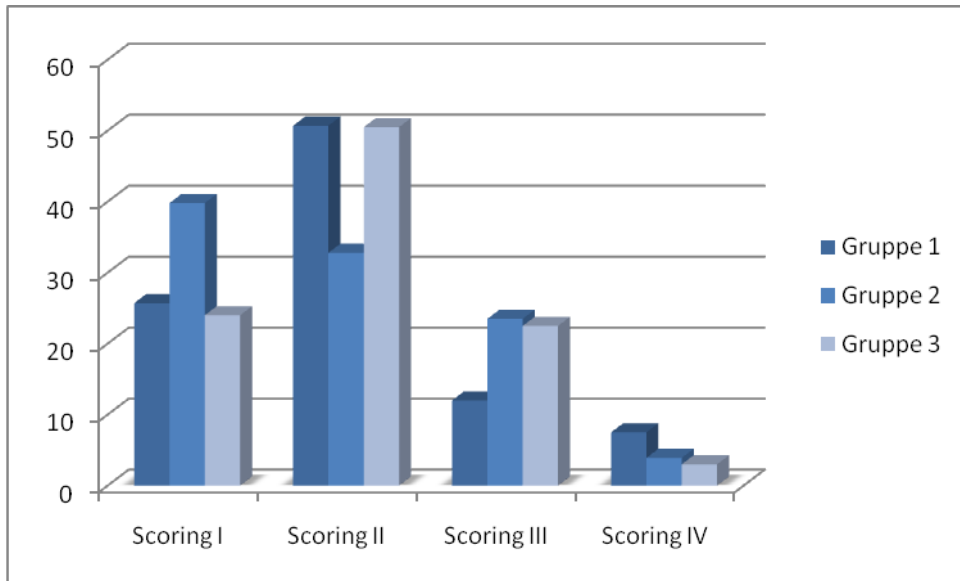


Abbildung 17: Mittelwerte der Scoringwerte I-IV in Prozent der Gesamtsschnittfläche aller Tumorgewebeproben A

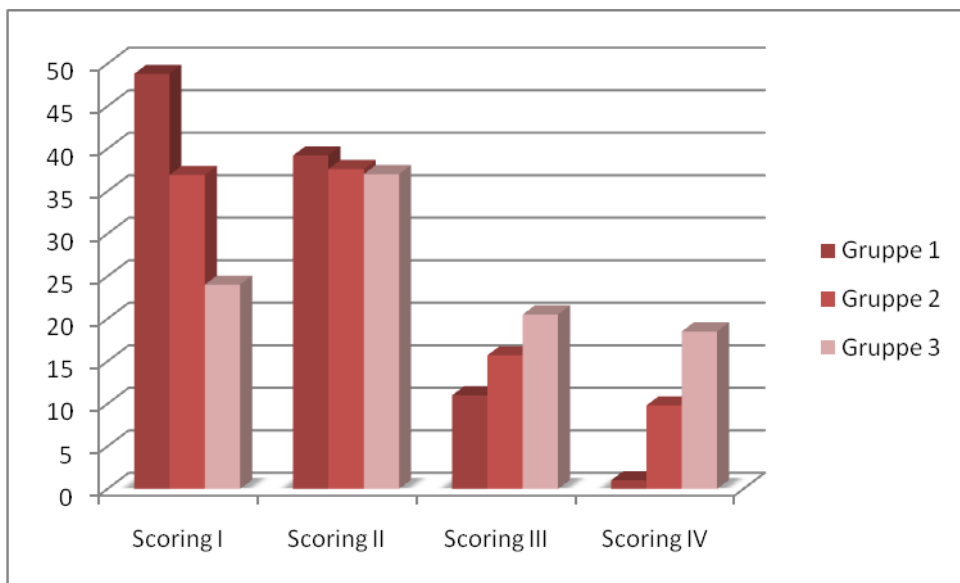


Abbildung 18: Mittelwerte der Scoringwerte I-IV in Prozent der Gesamtsschnittfläche aller Nierengewebeproben B

Betrachtet man hierbei alle Tumorgewebeproben und alle Nierengewebeproben zusammengenommen gegeneinander (Abbildungen 17 und 18), wird deutlich, dass während in den Tumorgeweben kein klarer Zusammenhang zwischen dem Flächenanteil mit hoher Fluoreszenz und zunehmendem

Metastasierungsgrad zu erkennen ist, dies in den Nierengewebebeobachten sehr wohl gegeben ist.

Es zeigt sich hier eine konstante Zunahme der Fluoreszenz von Gruppe 1 zu Gruppe 2 und weiter zu Gruppe 3, sowohl für Scoringwert III (Gruppe 1: 11; Gruppe 2: 15,7; Gruppe 3: 20,5) als auch für Wert IV (Gruppe 1: 1; Gruppe 2: 9,8; Gruppe 3: 18,5).

Neben den Mittelwerten für die vier verschiedenen Scoringwerte wurden auch Gesamtsummen für jeden Scoringwert für jede Gruppe bzw. für jedes Gewebe berechnet.

Gruppen- zugehörigkeit	Scoring I	Scoring II	Scoring III	Scoring IV
Gruppe 1	745	940	230	85
Gruppe 2	767	704	392	137
Gruppe 3	480	875	430	215

Tabelle 13: Summenwerte (absolut) der Scoringwerte I bis IV für die Gruppen 1, 2 und 3 (jeweils Tumor- und Normalgewebe addiert)

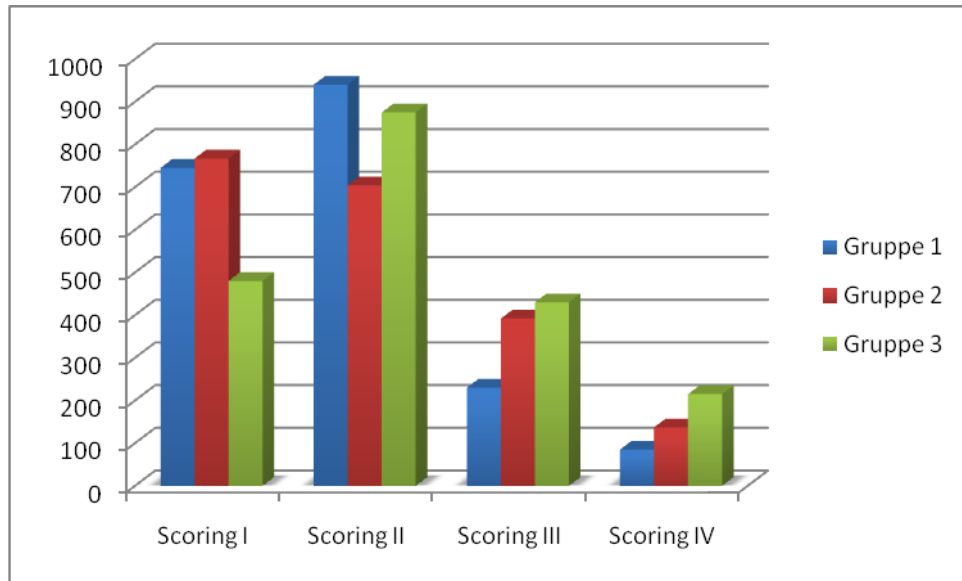


Abbildung 19: Summenwerte (absolut) der Scoringwerte I bis IV für die Gruppen 1 (blau), 2 (rot) und 3 (grün). Verwendete Daten sind der Tabelle 13 zu entnehmen.

Gewebe	Scoring I	Scoring II	Scoring III	Scoring IV
A (Tumor) gesamt	895	1381	580	144
A 1	257	548	120	75
A 2	398	328	235	39
A 3	240	505	225	30
B (Niere) gesamt	1097	1138	472	293
B 1	488	392	110	10
B 2	369	376	157	98
B 3	240	370	205	185

Tabelle 14: Summenwerte (absolut) der Scoringwerte I bis IV für die Gewebe A und B gesamt und nach Gruppen unterteilt.

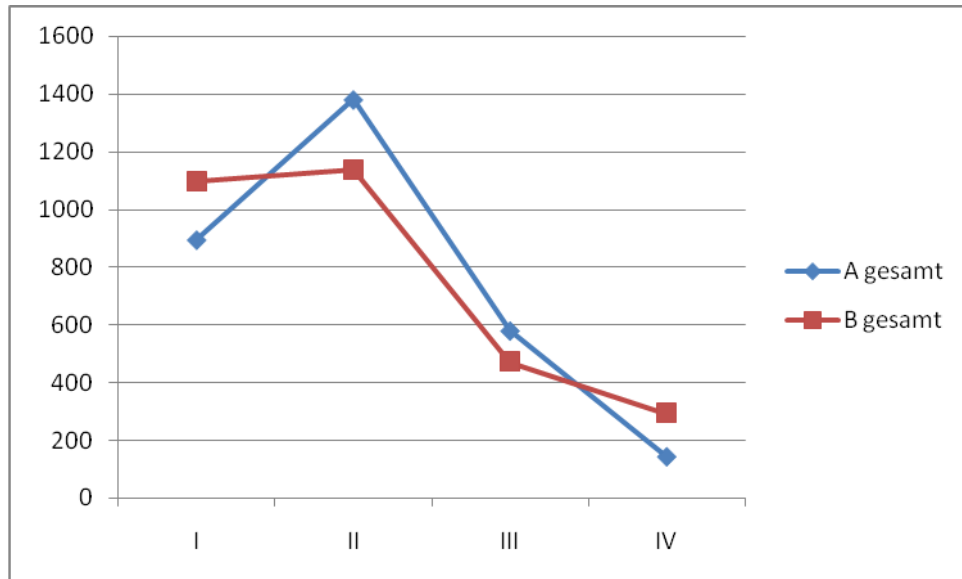


Abbildung 20: Summenwerte (absolut) der Scoringwerte I bis IV für die Gewebe A und B. Verwendete Daten sind der Tabelle 14 zu entnehmen.

Auf die Interpretation dieser Summenwerte wird im Abschnitt 3.3 noch einmal näher eingegangen.

Im Folgenden wurden nun verschiedene Aspekte differenziert voneinander ausgewertet:

Zum Einen wurden die Unterschiede hinsichtlich der Gewebefluoreszenz im Tumorgewebe gegenüber der im Nierengewebe bewertet, wofür jeder Tumorgewebeschnitte (A) mit dem entsprechenden Nierengewebeschnitten (B) desselben Patienten unabhängig von dessen Metastasierungsgrad verglichen wurden.

Ziel dieser Analyse war es, herauszufinden, ob innerhalb der Patientenkollektive ein messbarer Unterschied der BSP-Expression zwischen Tumor und Normalgewebe nachweisbar ist.

Zum Anderen wurden die Unterschiede in der Fluoreszenz zwischen den drei verschiedenen Metastasierungsgraden (1=nicht metastasiert vs. 2=Weichteilmetastasierung vs. 3=Knochenmetastasierung) untersucht, um zu

überprüfen, ob die Höhe der BSP-Expression mit dem Metastasierungsgrad des Nierenzellkarzinoms korreliert und damit zwischen den einzelnen Patientenkollektiven nachweisbare Unterschiede hinsichtlich der BSP-Expression vorliegen.

Darüber hinaus wurde untersucht, ob sich eine Interaktion der Gruppen nachweisen ließ und innerhalb der Patientenkollektive (1, 2, 3) Unterschiede zwischen Tumorgewebe (A) und Nierengewebe (B) nachweisbar waren.

3.2 Unterschiede innerhalb der Patientenkollektive

3.2.1 Intraindividuelle Trends

Um der Fragestellung, ob es einen relevanten Unterschied zwischen der BSP-Expression im Tumorgewebe (A) gegenüber der im Nierengewebe (B) gibt näherzukommen, wurden die vorliegenden Daten zunächst hinsichtlich der Nachweisbarkeit eines Trends analysiert.

Dabei definierte sich ein Trend entweder Richtung Normalgewebe oder Richtung Tumorgewebe durch das Vorliegen von mindestens 50% intraindividuellen Unterschieds zwischen den Summen für die Färbekategorien III und IV eines Patienten ($\text{Wert III A} + \text{Wert IV A}$ vs. $\text{Wert III B} + \text{Wert IV B}$). Kein erkennbarer Trend lag vor, wenn das oben genannte Kriterium nicht erfüllt war, also der intraindividuelle Unterschied zwischen A und B kleiner als 50% war, was sowohl identische Summen als auch den Wert null miteinschloss.

Patientenkollektiv	Trend Tumorgewebe	Trend Normalgewebe	Kein Trend erkennbar
Patienten Gruppe 1 n=10	3	1	6
Patienten Gruppe 2 n=10	6	3	1
Patienten Gruppe 3 n=10	4	4	2
Alle Patienten n=30	13	8	9

Tabelle 15: Intraindividuelle Trends für Tumorgewebe, Normalgewebe oder kein Trend. Angegeben ist die Anzahl der Patienten, welche die Kriterien für o.g. Trend erfüllt

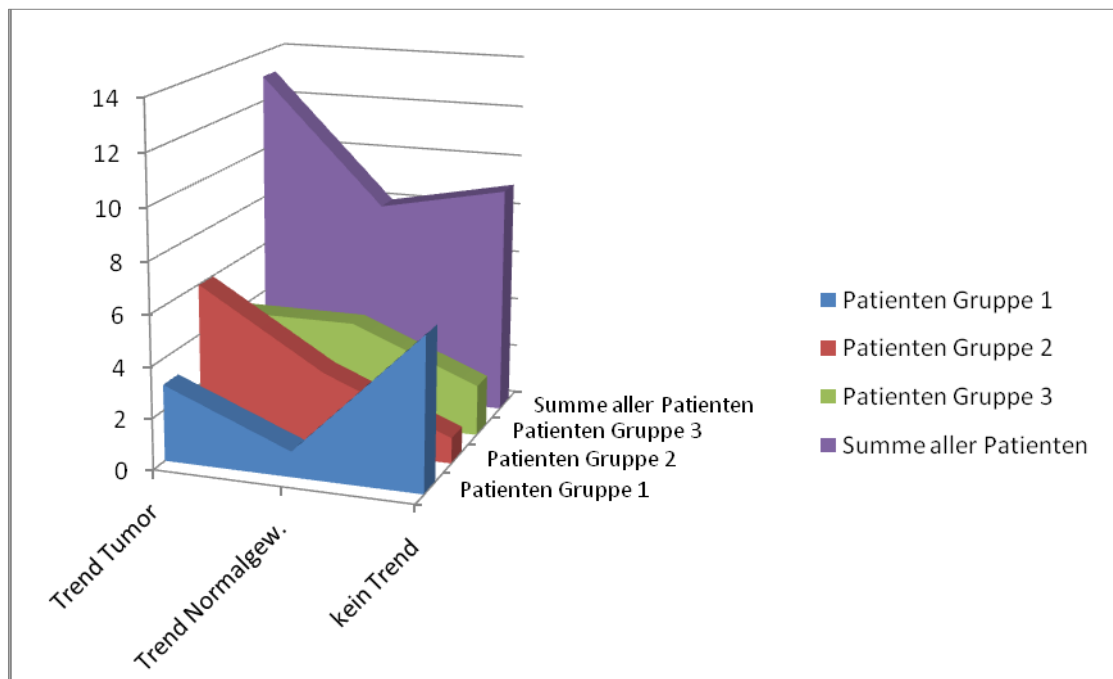


Abbildung 21: Grafische Darstellung der Trends für die höchste BSP-Fluoreszenz nach Patientenkollektiven 1, 2, 3 und als Gesamtsumme. Zugrundeliegende Daten sind der Tabelle 15 zu entnehmen.

Es zeigte sich, dass die BSP-Fluoreszenz im Trend in der Summe aller Patienten im Tumorgewebe am höchsten ausfällt (Vergleich violette Fläche, Abbildung 20).

Von 30 Patienten zeigten 13 einen Trend der BSP-Fluoreszenz für Tumorgewebe und 8 für Normalgewebe. 9 Patienten zeigten keinen eindeutigen Trend hinsichtlich der Fluoreszenz.

Weiterhin fiel auf, dass sich mit dem Vorliegen einer metastasierten Tumorerkrankung, sowohl für Knochen-, als auch für Weichteilmetastasierung, ein gesteigerter Trend zur BSP-Fluoreszenz gegenüber den Patienten mit nicht metastasierter Tumorerkrankung nachweisen ließ.

So wiesen unter den nicht metastasierten Patienten 3 einen Trend Richtung Tumor auf und 6 Patienten zeigten keinen klaren Trend, während es in den metastasierten Gruppen nur jeweils 1 (Weichteilmetastasen) bzw. 2 (Knochenmetastasen) Patienten ohne klaren Trend gab.

3.2.2 Statistische Signifikanz

Der beschriebene Trend der BSP-Fluoreszenz zum Tumorgewebe, lässt sich in der statistischen Analyse der Daten nicht bestätigen. Es findet sich hier mit $F = 0.0445$ und $P = 0.8346$ kein signifikanter Unterschied im Vergleich der Patientengewebe A und B, also keine statistisch fassbarer Unterschied in der BSP-Expression zwischen Tumor- und Normalgewebe.

Test	Value (Wert)	Exact F	Num DF (Freiheitsgrade des Zählers)	Den DF (Freiheitsgrade des Nenners)	Prob >F
F-Test	0.0016466	0.0445	1	27	0.8346

Tabelle 16: Statistische Ergebnisse der multivariaten Varianzanalyse für den intraindividuellen Vergleich zwischen A und B. (Bei NumDF = 1 ist exactF der relevante Wert.)

3.3 Unterschiede zwischen den Patientenkollektiven

3.3.1 Interindividuelle Trends

Hinsichtlich der Fragestellung, ob es einen Unterschied in der BSP-Expression in Abhängigkeit vom Metastasierungsgrad gibt, wurden erneut die Scoringwerte III und IV, als Korrelat starker Fluoreszenz betrachtet. Es wurde nun die Summe der prozentualen Flächenanteile mit Scoringwert III und IV für die 3 verschiedenen Patientenkollektive 1, 2, und 3 einzeln gebildet, wobei in diese Summe sowohl die prozentualen Flächenanteile der Nierengewebeproben, als auch die der Tumorgewebeproben eingingen. Im Folgenden sind diese Summen als Absolut- und als Prozentualwerte dargestellt (siehe auch Tabelle 13 und 14).

Patientenkollektiv:	Scoring III	Scoring IV	Scoring III+IV
Gruppe 1 (keine Metastasen)	230	85	315
Gruppe 2 (Weichteilmetastasen)	392	137	529
Gruppe 3 (Knochenmetastasen)	430	215	645

Tabelle 17: Summen (absolut) der prozentualen Flächenanteile für Scoringkategorie III, IV und III+IV nach Patientenkollektiven unterteilt.

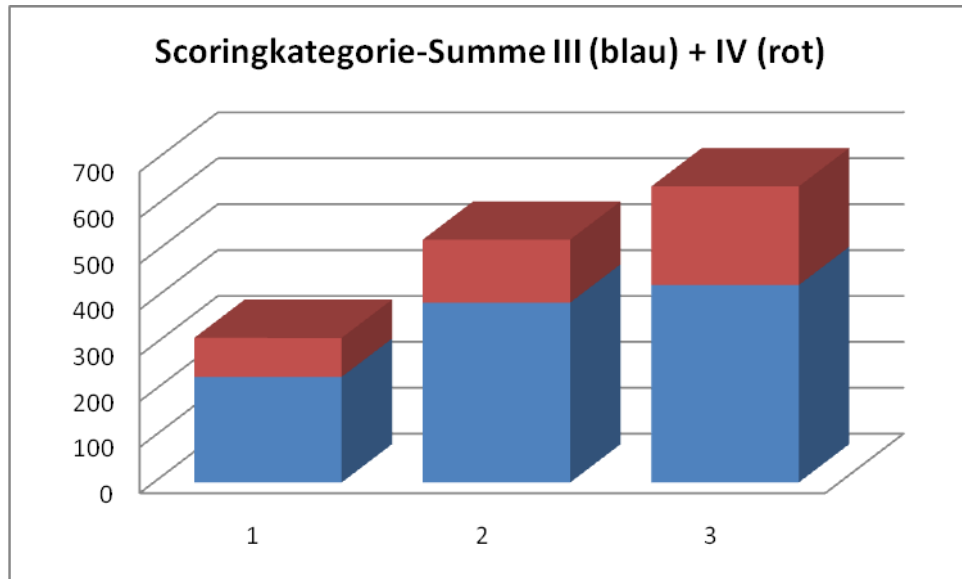


Abbildung 22: Grafische Darstellung der Summen (absolut) für die Scoringkategorien III (blaue Balken) und IV (rote Balken) nach Patientenkollektiven 1-3 unterteilt. Die zugrunde liegenden Daten sind der Tabelle 17 zu entnehmen.

Patientenkollektiv:	Scoringkategorie III	Scoringkategorie IV	Scoringkategorie III+IV
Gruppe 1 (keine Metastasen)	100%	100%	100%
Gruppe 2 (Weichteilmetastasen)	170%	161%	168%
Gruppe 3 (Knochenmetastasen)	180%	253%	205%

Tabelle 18: Summen für A+B (prozentual) der prozentualen Flächenanteile für Scoringkategorie III, IV und III+IV nach Patientenkollektiven unterteilt. Dabei wurden die Werte der Gruppe 1 (keine Metastasen) als Ausgangswert jeweils mit 100% gleichgesetzt.

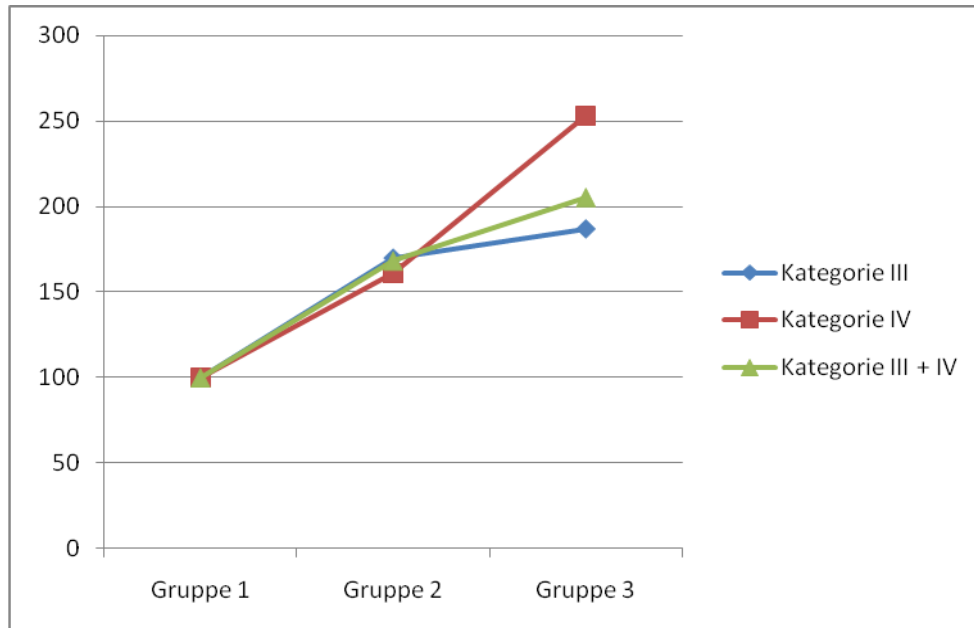


Abbildung 23: Grafische Darstellung der Summen (prozentual) für die Scoringkategorien III, IV und III+IV nach Patientenkollektiven unterteilt. Die zugrunde liegenden Daten sind der Tabelle 18 zu entnehmen.

Hierbei zeigte sich ein nahezu identischer prozentualer Anstieg in den dargestellten Scoringkategorien vom nicht-metastasierten Patientenkollektiv zum Patientenkollektiv mit Weichteilmetastasen.

Darüber hinaus war ein deutlich überdurchschnittlicher Anstieg (durchschnittlicher Anstieg entspricht Kategorie III+IV, dargestellt durch die grüne Linie in Abbildung 20) der Scoringkategorie IV in der Patientengruppe mit Knochenmetastasen zu beobachten.

Insgesamt zeigte sich ein nahezu linearer durchschnittlicher Anstieg (III+IV) der Summen von den nicht-metastasierten Patienten (1), hin zu denjenigen mit Weichteilmetastasen (2) und weiter zu denjenigen mit Knochenmetastasen (3), so dass hier eine Zunahme der Gesamtfläche mit hohen Scoringwerten mit zunehmendem Metastasierungsgrad gesehen werden kann.

3.3.2 Statistische Signifikanz

Der oben beschriebene lineare Anstieg der Scoringsummen für Kategorie III und IV mit zunehmendem Metastasierungsgrad konnte in der multivariaten Varianzanalyse bei $F= 1.482$ und $P= 0.245$ nicht als signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen nachgewiesen werden.

Test	Value (Wert)	Exact F	Num DF (Freiheitsgrade des Zählers)	Den DF (Freiheitsgrade des Nenners)	Prob >F
F-Test	0.109813	1.4825	2	27	0.2450

Tabelle 19: Statistische Ergebnisse der multivariaten Varianzanalyse für den interindividuellen Vergleich zwischen den Gruppen 1, 2 und 3

3.4 Gruppeninteraktion

Dieser Abschnitt beschäftigt sich mit der Frage, ob es innerhalb der Gruppen nachweisbare Unterschiede oder Interaktionen zwischen Tumorgewebe und Nierengewebe gab. Hierzu wurden zunächst die Summen und Summenverhältnisse für alle drei Gruppen und beide Gewebe A und B für die Scoringwerte III + IV, welche eine hohe Fluoreszenz repräsentieren betrachtet.

	Summe A	Summe B	Verhältnis A:B	Summe A+B
Gruppe 1	120+75 =195	110+10=120	195 : 120 1,625:1	315
Gruppe 2	235+39=274	157+98=255	274 : 255 1,07:1	529
Gruppe 3	225+30=255	205+185=390	255 : 390 1 : 1,53	645
Gesamt	724	765	1: 1,06	

Tabelle 20: Vergleich der Summen der Scoringwerte III + IV von Gruppe 1, 2 und 3 bezüglich Tumorgewebe (A) und Nierengewebe (B)

	Mittelwert A	Mittelwert B	Verhältnis A : B	Mittelwert der Mittelwerte A und B
Gruppe 1	19,5 %	12%	19,5 : 12 1,625 : 1	15,75%
Gruppe 2	27,4%	25,5%	27,4 : 25,5 1,07 : 1	26,45%
Gruppe 3	25,5%	39%	25,5 : 39 1 : 1,53	32,25%
Durchschnitt Gruppe 1-3	24,1%	25,5%	1 : 1,06	

Tabelle 21: Vergleich der Mittelwerte der Scoringwerte III + IV von Gruppe 1, 2 und 3 bezüglich Tumorgewebe (A) und Nierengewebe (B)

Hier zeigte sich, dass das Gesamtverhältnis der Verteilung der Scoringwerte III und IV zwischen beiden Geweben A und B mit einem Summenverhältnis von 724:765 (entsprechend 1: 1,06) nahezu ausgeglichen ist. Allerdings zeigt dieses Summenverhältnis eine lineare Regression hinsichtlich des zunehmenden Metastasierungsgrades, ausgehend von 1,625:1 für Gruppe 1 über 1,07:1 für Gruppe 2, bis hin zu 1:1,53 für Gruppe 3, wie dies in der folgenden Abbildung verdeutlicht wird.

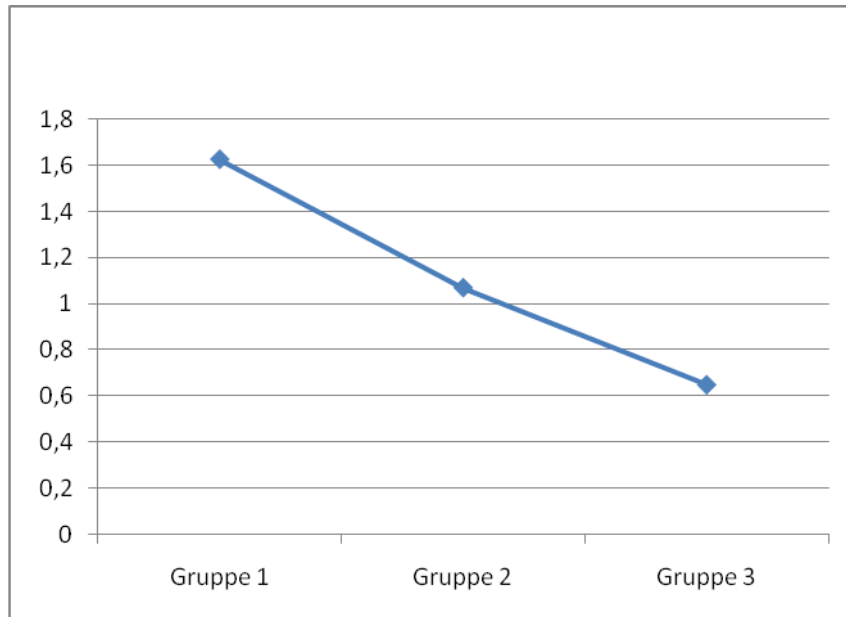


Abbildung 24: Summenverhältnisse (III + IV) von A : B für Gruppe 1, 2 und 3

Das Summenverhältnis A:B für die Scoringwerte III+IV zeigt hierbei ein nahezu linear-inverses Verhalten, was bedeutet, dass mit zunehmendem Metastasierungsgrad auch zunehmend mehr Nierengewebe eine intensivere Fluoreszenz aufweist.

Die folgende Abbildung der Mittelwerte für die Scoringwerte III + IV für die drei verschiedenen Patientenkollektive zeigt den deutlichen Anstieg des Färbekoeffizienten im Nierengewebe bei zunehmender Metastasierung im Vergleich zu dem eher mäßigen Anstieg dieses Koeffizienten im Tumorgewebe:

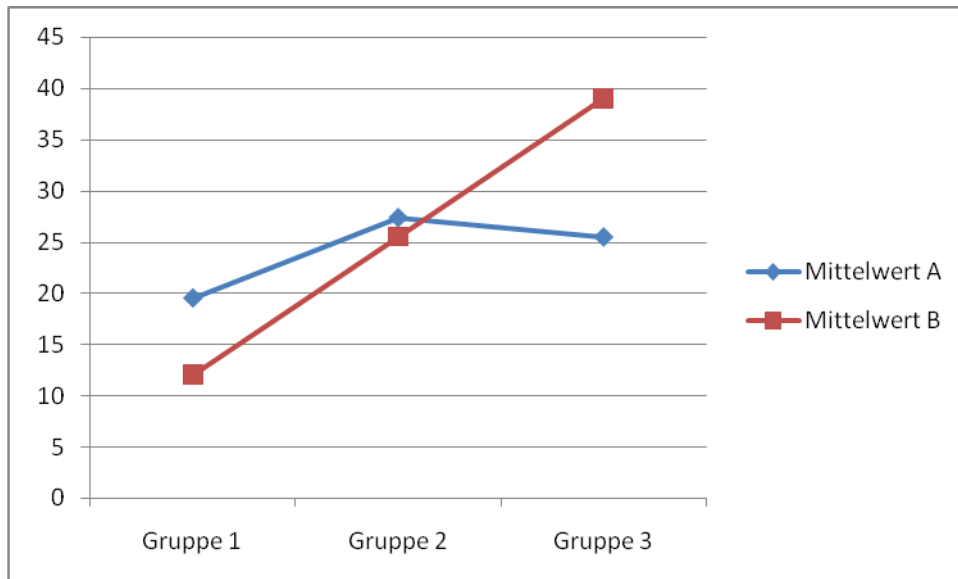


Abbildung 25: Mittelwerte von A und B für die Summen von III + IV für Gruppe 1, 2 und 3

Hieraus lässt sich für die in dieser Studie untersuchten Patienten folgendes ableiten:

- Liegt keine Metastasierung vor, färbt sich im Verhältnis Tumor zu Nierengewebe vorwiegend Tumorgewebe intensiv an.
- Liegt eine Weichteilmetastasierung vor, kommt es zu einem nahezu gleichwertigen Verhältnis zwischen den beiden Gewebetypen hinsichtlich der intensiv angefärbten Areal, also zu einem mäßigen Anstieg der Fluoreszenz im Tumorgewebe und einem deutlich stärker ausgeprägten Anstieg im Normalgewebe und resultierend zu einem nahezu identischen Gesamtverhältnis.
- Liegt eine Knochenmetastasierung vor, kommt es im Vergleich zur Weichteilmetastasierung zu einem nochmaligen Anstieg der intensiv angefärbten Areale im Nierengewebe, bei im Vergleich zur Weichteilmetastasierung nahezu gleichbleibender Fluoreszenz im Tumorgewebe.

Es lässt sich allerdings statistisch kein signifikanter Zusammenhang nachweisen, was bedeutet, dass in keiner der drei Gruppen ein signifikanter Unterschied zwischen den Geweben A und B zu finden war.

Test	Value (Wert)	Exact F	Num DF (Freiheitsgrade des Zählers)	Den DF (Freiheitsgrade des Nenners)	Prob>F
F-Test	0.0694997	0.9382	2	27	0.4037

Tabelle 22: Statistische Ergebnisse der multivariaten Varianzanalyse hinsichtlich der Gruppeninteraktion (Gewebe * Gruppenzugehörigkeit)

3.5 Unterschiede in Abhängigkeit von der Tumorgroße

Um zu überprüfen, ob es einen Zusammenhang zwischen der Größe des Primärtumors und der Expression von BSP im Tumorgewebe, beziehungsweise im korrespondierenden Nierengewebe gibt, wurden alle Patienten unabhängig von ihrem Metastasierungsgrad nun hinsichtlich ihres T-Stadiums unterteilt.

Dabei wurden T1 und T2 als eine Entität zusammengefasst und den Tumoren mit einer T3-Situation gegenübergestellt. T4-Stadien waren in dem untersuchten Patientenkollektiv nicht vertreten.

Es ergaben sich damit 8 Patienten mit einem T1/T2-Stadium (=26,7%) und 22 Patienten mit einem T3-Stadium (=73,3%).

Für die Tumorgewebe zeigte sich im Vergleich in den T3-Tumoren mit einem durchschnittlichen Summenwert von 202,2 eine nur gering höhere BSP-Expression, als in den T1/T2-Stadien mit einem Wert von 178,9 (siehe Abbildung 26).

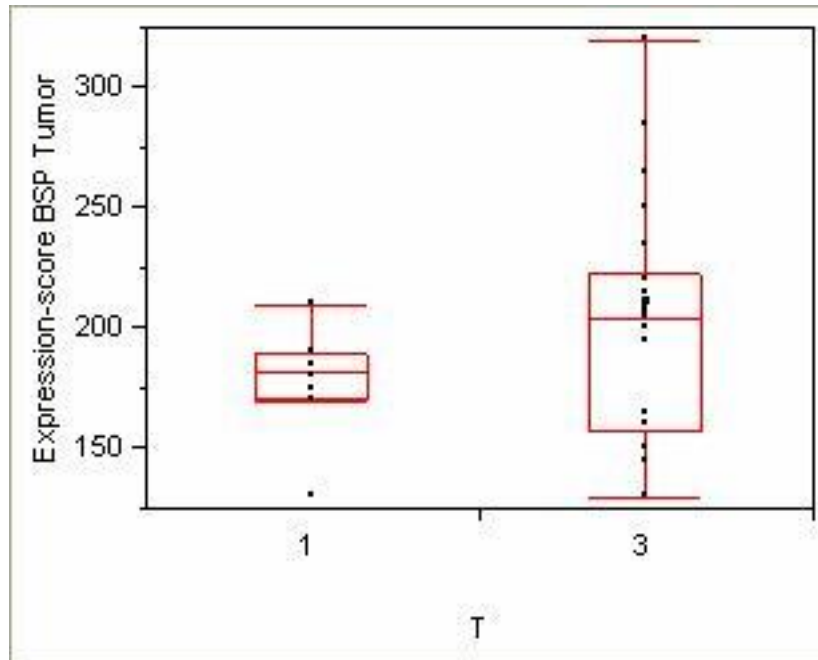


Abbildung 26: Zusammenhang zwischen T-Stadium und BSP-Expression im Tumorgewebe. Angegeben sind die TumorgroÙe (1= T1/2, 3= T3) und die BSP-Expression als Summenwert.

Dieser Unterschied war im Oneway Anova mit $p= 0,21$ statistisch nicht signifikant nachweisbar.

Für die korrespondierenden Nierengewebe zeigte sich allerdings eine signifikant ($p=0,02$) höhere BSP-Expression in den T3-Nierengeweben mit einem durchschnittlichen Summenwert von 214 während sich in den T1/T2-Nierengeweben lediglich ein Wert von 145 fand (siehe Abbildung 27).

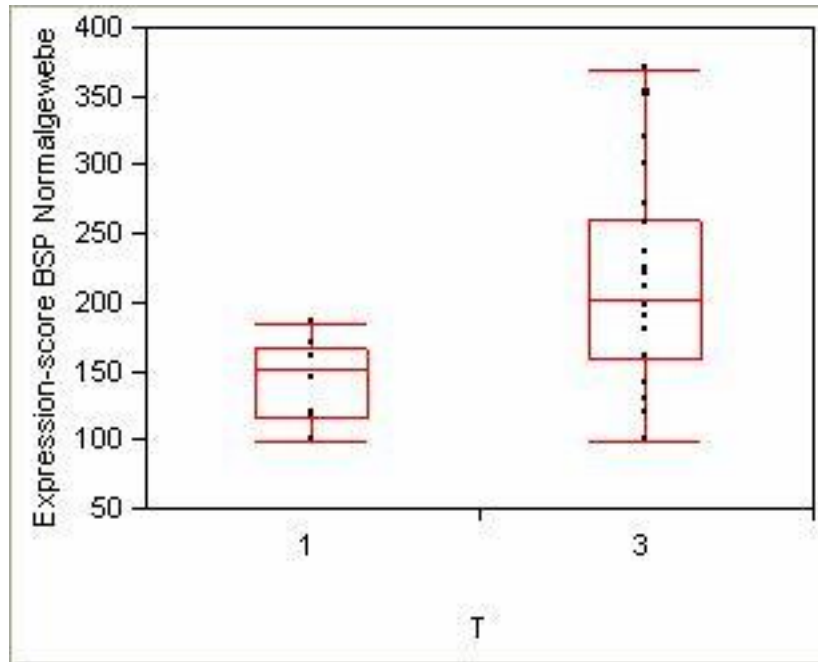


Abbildung 27: Zusammenhang zwischen T-Stadium und BSP-Expression im Nierengewebe. Angegeben sind die TumorgroÙe (1= T1/2, 3= T3) und die BSP-Expression als Summenwert.

Ähnlich wie also bereits bei dem Vergleich zwischen zunehmendem Metastasierungsgrad und Expression in den Nierengeweben, zeigte sich eine zunehmende BSP-Expression auch mit zunehmender TumorgroÙe. Vorallem wurde dies auÙerhalb des eigentlichen Tumors, nämlich im korrespondierenden Nierengewebe signifikant deutlich.

4. Diskussion

Ziel dieser Studie war es, zu untersuchen, ob es eine Korrelation zwischen der Expression von Bone Sialoprotein und dem Metastasierungsgrad von Nierenzellkarzinomen gibt. Dies erfolgte auch im Hinblick auf eine mögliche zukünftige Anwendung von BSP als diagnostischer Marker und Verlaufsparemeter beim Nierenzellkarzinom bezüglich Knochenmetastasierung.

Neben der Frage nach nachweisbaren Unterschieden in der BSP-Expression zwischen einerseits Nierengewebe und Tumorgewebe und andererseits Patienten mit unterschiedlichen Metastasierungsgraden, war auch die Frage nach der wissenschaftlich-theoretischen und der praktisch-technischen Eignung von BSP als möglicher klinischer Marker Thema dieser Studie. Im Folgenden werden die gewonnenen Ergebnisse noch einmal zusammengefasst und hinsichtlich ihrer Gemeinsamkeiten und Unterschiede im Vergleich zu anderen Autoren, sowie hinsichtlich möglicher Fehlerquellen, klinischer Anwendbarkeit und neu aufgeworfener Aspekte und daraus resultierender Fragestellungen diskutiert.

4.1 Studienaufbau, Gewebematerial und Patientengut

Die in dieser Studie untersuchten Gewebe stammten von 30 Patienten, die aufgrund eines Nierenzellkarzinoms zwischen 2004 und 2007 eine Nephrektomie oder eine Nierenteilresektion in der Urologie der Universitätsklinik Tübingen erhielten, wobei randomisiert aus einer großen Anzahl Patienten jeweils 10 Patienten ohne Metastasierung, mit Weichteilmetastasierung und mit Knochenmetastasierung ausgewählt wurden um diese drei Entitäten miteinander vergleichen zu können. Darüber hinaus wurden von jedem der Patienten sowohl Gewebeproben, des histopathologisch gesichert als maligne befundeten Areals im Sinne eines Nierenzellkarzinoms, als auch des regelrechten Nierengewebes ohne Anhalt für histologische Veränderungen aufbereitet und verglichen.

Die Aufbereitung und histopathologische Beurteilung der Gewebeprobe erfolgte unmittelbar nach der intraoperativen Entnahme durch die Pathologie der Universitätsklinik Tübingen, entsprechend deren Standardverfahren für die Paraffineinbettung von Gewebeprobe.

Retrospektiv wurde dann im Rahmen dieser Studie einerseits eine HE-Färbung der Schnitte als erneute histologische Kontrolle und andererseits eine immunhistochemische Darstellung von BSP durchgeführt, welche durch Knochen- und Knorpelgewebeprobe als Kontrollfärbung ergänzt wurde.

Ein vergleichbarer Studienaufbau hinsichtlich der Wahl von drei verschiedenen Metastasierungsgraden und der Aufbereitung der Gewebeprobe mittels Paraffineinbettung für die immunhistochemische Analyse wurde beispielsweise auch von Papotti et al. (52) zur Untersuchung der BSP-Expression beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom angewandt.

Die Verwendung von Paraffinschnitten für die immunhistochemische Färbung ist ein häufig angewandtes Verfahren. Es wird trotz der immer wieder diskutierten Gefahr einer Denaturierung von Proteinen durch Kontakt mit Formalin oder Hitze von den meisten Autoren als zuverlässiges Standardverfahren angesehen, wie eine Vielzahl von Veröffentlichungen unter Verwendung dieser Technik zeigt (49, 64).

Dies begründet sich nicht zuletzt auch in der methodisch gut praktikablen und flexiblen Durchführbarkeit dieser Methode im Vergleich zu anderen Gewebeaufbereitungsarten, die eine begrenzte Haltbarkeit besitzen und eine unmittelbare Weiterverarbeitung der Probe oder aber eine zeit-, personal- und kostenintensive Einbettung, wie beispielsweise bei der Verwendung von GMA (Glykolmethacrylat) mit sich bringen und hierdurch auch anfälliger für Fehlerquellen sind.

Die in diese Studie eingeschlossenen Patienten zeigten mit 22 männlichen und 8 weiblichen Patienten eine Geschlechtsverteilung männlich: weiblich von 2,75:1 und ein Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Operation von 69,1 Jahren

(Frauen) und 58,3 Jahren (Männer), beziehungsweise 63,72 Jahren (alle Patienten).

Da der exakte Zeitpunkt der Erstdiagnose nicht bei allen Patienten zu ermitteln war, wurde auf die Berechnung eines Durchschnittsalters bei Erstdiagnosestellung verzichtet. Aufgrund der primär chirurgischen Therapie des RCC dürfe sich dieser Wert jedoch auch nur marginal von dem oben angegebenen Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Operation unterscheiden. Die Altersspanne reichte dabei von 47-84 Jahre bei den weiblichen und von 41-80 Jahren bei den männlichen Patienten.

Diese Daten decken sich weitestgehend mit den gängigen Angaben der Literatur, die einen Erkrankungsgipfel in der sechsten Lebensdekade und eine deutliche Bevorzugung des männlichen Geschlechts beschreibt (5, 34).

4.2 Etablierung der BSP-Färbung

Trotz der Tatsache, dass BSP-Antikörper für die Immunfluoreszenzdarstellung an menschlichen Geweben und Zellen von diversen Unternehmen und in verschiedensten Varianten erhältlich sind und aufgrund des lebhaften Interesses an BSP und anderen Vertretern der SIBLING-Familie in letzter Zeit relativ weit verbreiteten Einsatz finden, zeigte sich, dass eine Anwendung nach Herstellerempfehlungen hinsichtlich Konzentration und Inkubationszeit zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis führte, sondern die initialen Färbungen eine ausgeprägte Hintergrundfärbung und unspezifische Anlagerung der Fluoreszenz aufwiesen.

Es war daher notwendig mehrerer Testreihen mit unterschiedlichen Konzentrationen, Inkubationszeiten und -temperaturen an Knochen-, Nieren- und Nierenzellkarzinomgewebeproben durchzuführen um ein konstantes und zufriedenstellendes Ergebnis hinsichtlich Fluoreszenz zu erzielen.

Im Hinblick auf andere Studien wirft dies natürlich, bei fehlender Möglichkeit zur Standardisierung der Färbeschemata aus oben angegebenen Gründen, die Frage nach einer Vergleichbarkeit der Ergebnisse auf, erst recht unter

Berücksichtigung der Tatsache, dass eine Vielzahl verschiedener Antikörper mit jeweils leichten Abweichungen in ihrem Anfärbeverhalten sich mit einer Vielzahl verschiedener zu untersuchender Gewebe mit möglichem Potential für unspezifische Antikörperanlagerung durch gewebespezifische Oberflächenantigene summiert.

Für die vergleichende Auswertung der Ergebnisse innerhalb einer Studie spielen die oben genannten Aspekte allerdings kaum eine Rolle, da man hier, sofern standardisiert nach festen Vorgaben, im Sinne eines Färbeschemas gearbeitet wurde, kaum mit derartigen Fehlerquellen Probleme haben sollte.

4.3 Immunhistochemische Darstellung von BSP und Scoring

Es zeigte sich bereits bei der Begutachtung der Probefärbungen, dass die Vergabe nur eines Wertes für den gesamten Gewebeschnitt eine ungenaue und nicht zufriedenstellende Bewertung der Fluoreszenz erlaubte. Daher wurde stattdessen der gesamte Schnitt als 100% Fläche definiert und ausgewertet, wieviel Prozent dieser Gesamtfläche die oben genannten Scoringwerte aufwiesen. Dabei konnten alle Scoringwerte 0-IV innerhalb eines Schnittes vertreten sein oder nur ein Teil davon oder in seltenen Fällen nur ein einziger. Die Gesamtsumme der pro Schnitt vergebenen Werte ergab jedoch stets 100%.

Aus den oben genannten Scoringwerten wurde dann nach der Formel $\Sigma = w^1x1 + w^2x2 + w^3x3 + w^4x4$ ein Gesamtsummenwert für die Fluoreszenz pro Schnitt berechnet, um die einzelnen Gruppen hinsichtlich ihrer Fluoreszenz besser miteinander vergleichen zu können.

Andere Autoren verwendeten ein hiervon differierendes mehrstufiges Auswerteverfahren mit verschiedenen Meßskalen (68).

Da die in dieser Studie angewandte immunhistochemische Anfärbung stets eine semiquantitative Auswertung mittels dimensionslosem Scoring mit sich bringt,

sofern man nicht additiv unter hohem Mehraufwand auf andere Verfahren zurückgreift, bieten sich hier durchaus kritisch zu diskutierende Aspekte.

Diese bestehen einerseits in der Konstanz der Auswertung, beziehungsweise der Anwendung der Auswertungskriterien innerhalb einer Studie, welche sich jedoch zumindest zum Teil nivellieren lassen, indem eine Verblindung der Gewebeproben erfolgt und alle Gewebeproben von derselben Person oder sogar parallel von mehreren Personen ausgewertet werden und ergänzend Positiv- und Negativkontrollen sowohl als Fluoreszenzvorgabe für den Auswerter, als auch als Qualitätskontrolle für die regelhafte Immunfluoreszenzfärbung selbst, welche leicht durch Licht- oder Temperatureinfluss oder zu lange Lagerung an Intensität verlieren kann, mitgefärbt werden.

In dieser Studie wurde daher den oben genannten Kriterien entsprochen, indem stets nach dem gleichen Färbeschema verfahren wurde, alle Schnitte verblindet von einer Person ausgewertet wurden und darüber hinaus in jeder Färbecharge sowohl Negativkontrollen von Nieren- und Tumorgewebe, als auch Knochengewebeproben in Positiv- und Negativkontrolle im Sinne einer Qualitätskontrolle der Färbung mitgefärbt wurden.

Darüber hinaus ist auch der Vergleich der immunhistochemischen Resultate verschiedener Studien aus den oben angesprochenen Gründen nur eingeschränkt möglich und bleibt, sofern nicht identische oder nahezu identische Färbeschemata und Auswertungssysteme Anwendung fanden, ein Vergleich hinsichtlich Einschluss oder Ausschluss der Expression in einem bestimmten Gewebe oder Zelltyp und Lokalisation, beziehungsweise Verteilungsmuster und weniger ein Mittel zur vergleichenden quantitativen Messung.

Im Falle eines Nachweises von Unterschieden in der Fluoreszenz, sollte daher eine Quantifizierung der Fragestellung, beispielsweise durch Western-Blot und verwandte Verfahren in Betracht gezogen werden.

4.4 Ergebnisse der immunhistochemischen Auswertung

Bei der Auswertung der Gewebeproben zeigte sich in allen untersuchten Positivproben, sowohl im Nieren- als auch im Tumorgewebe ein Nachweis von BSP mittels Fluoreszenz.

Dies korreliert mit der gegenwärtigen Literatur, in der sowohl eine BSP-Expression für das Nierenzellkarzinom (22) als auch für normales Nierengewebe nachgewiesen wurde, wobei hier eine im Vergleich zu anderen Geweben relativ hohe und weitflächig verteilte Expression demonstriert werden konnte (49).

Es zeigte sich eine breite Streuung der verwendeten Scoringwerte, die durch das Vorkommen aller Scoringwerte in allen Patientenkollektiven und Geweben (A und B) repräsentiert wurde.

Die insgesamt höchsten Mittelwerte und auch die mit 4511 höchste Gesamtsumme wurden in allen Geweben und Patientenkollektiven für die Scoringwerte I und II erreicht.

Im Vergleich der Mittelwerte für die hohen Scoringwerte III und IV nach Gruppen unterteilt, zeigte sich lediglich in der Patientengruppe ohne Metastasierung (Gruppe 1) ein höherer Mittelwert des Tumorgewebes. In den anderen beiden Gruppen (Gruppe 2 und 3) dominierten die Mittelwerte des Nierengewebes.

Im Vergleich der Mittelwerte aller drei Gruppen zeigte sich für die hohen Scoringwerte III und IV für die Tumorgewebeproben kein klarer Zusammenhang zwischen Höhe der Fluoreszenz und dem Metastasierungsgrad, für die Nierengewebeproben hingegen schon.

Hier war eine konstante Zunahme von III und IV von den nicht metastasierten Patienten (Gruppe 1), zu denen mit Weichteilmetastasen (Gruppe 2) und weiter

zu denen mit Knochenmetastasen (Gruppe 3) zu erkennen, wie dies die Abbildung 17 demonstriert.

Die Mittelwerte des Scoringwerts III betragen für Gruppe 1: 11; Gruppe 2 15,7 und für Gruppe 3 20,5 und die Mittelwerte des Scoringwerts IV für Gruppe 1= 1, Gruppe 2= 9,8 und Gruppe 3= 18,5.

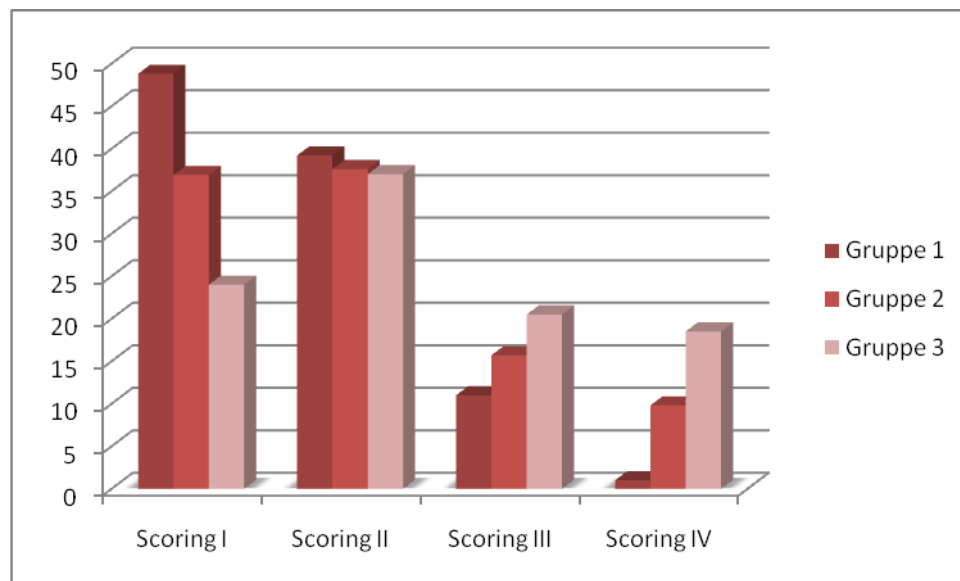


Abbildung 17: Mittelwerte der Scoringwerte I-IV in Prozent der Gesamtsschnittfläche aller Tumorgewebeproben A

In Anbetracht dieses, möglicherweise als Mitreaktion des histopathologisch als unauffällig bewerteten Nierengewebes zu deutenden Anstiegs der hohen Scoringwerte mit zunehmendem Metastasierungsgrad, eröffnet sich die Frage nach einer Veränderung dieses Gewebes auf Genexpressions- oder Proteinebene, im Sinne einer durch die benachbarten Tumorzellen induzierten Veränderung im „Mikroklima“, wie einer Faktoren-vermittelten Veränderung der intrazellulären Regulationsmechanismen, welche beispielsweise von Kaplan et. al in anderem Zusammenhang bereits postuliert wurde.

Hierzu passt auch die Beobachtung einer Abhängigkeit der BSP-Fluoreszenz im korrespondierenden Nierengewebe mit dem zunehmenden T-Stadium des Primärtumors, welche signifikant nachgewiesen werden konnte.

Möglicherweise ist diese Ausdruck einer, mit zunehmender Tumormasse steigender Beeinflussung des umgebenden Gewebes durch bisher nicht ausreichend verstandene Mechanismen, die eine Veränderung der Genexpression im umliegenden mikroskopisch unauffälligen Gewebe verursachen. Es ist denkbar, dass eine tumorinduzierte Veränderung der Expression von Proteinen insbesondere aus der SIBLING-Familie, welche wesentlichen Anteil an den Signalwegen haben, die Zellmigration, -adhäsion und Apoptose steuern, den Tumorprogress und die ossäre Metastasierung („bone-targeting“) fördern oder sogar erst ermöglichen.

Bellahcene et al. (9, 10) beschrieben hierzu bereits 2008 das Andocken von Tumorzellen an SIBLING-Proteine und die Interaktion mit diesen über zahlreiche Integrine, welche sowohl RGD-abhängig als auch ohne Nutzung der RGD-Sequenz stattfindet. Sie konnten in vitro den Einfluss von BSP auf Tumorproliferation, Migration, Adhäsion, Invasion, Angiogenese und Metastasierung, insbesondere in den Knochen für mehrere Tumorarten beschreiben.

Wann und wie genau Tumorzellen sich diese Proteinfamilie zunutze machen um die normalen Regulationsmechanismen zu modifizieren, ist zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht umfassend verstanden.

Ein tieferer Einblick in diese Mechanismen wird entscheidend für das diagnostische und prognostische Verständnis und darüber hinaus die therapeutische Beeinflussung dieser Signalwege sein, stellen sie doch einen vielversprechenden Ansatz der Tumorthherapie dar, der nicht nur relativ spezifisch scheint, sondern darüber hinaus auch die Beeinflussung mehrerer Aspekte des Tumorwachstums (Proliferation, Angiogenese, Metastasierung etc.) in Aussicht stellt.

Im Rahmen dieser Studie war es aufgrund des nicht darauf ausgerichteten Studiendesigns leider nicht möglich, diese Frage näher zu beleuchten. Es bieten sich hier jedoch interessante Anknüpfungspunkte hinsichtlich der Frage nach nachweisbaren „microenvironmental changes“, die in enger

Verknüpfung zum Tumorprogress und Beginn des Metastasierungsprozess zu stehen scheinen, im Hinblick auf die Planung weiterer Studien.

4.5 Conclusio

Das Ziel dieser Studie war es, zu untersuchen ob eine Korrelation zwischen der Expression von Bone Sialoprotein und dem Metastasierungsgrad von Nierenzellkarzinomen nachweisbar ist.

Dafür wurden die folgenden Fragestellungen erläutert:

1. Gibt es einen messbaren Unterschied bezüglich der BSP-Expression beim Nierenzellkarzinom im Nierengewebe gegenüber der im Tumorgewebe?
2. Findet sich ein Zusammenhang zwischen der Höhe der BSP-Expression und dem Metastasierungsgrad oder der Tumorgröße des Nierenzellkarzinoms?
3. Eignet sich die in dieser Untersuchung verwendete Technik mittels immunhistochemischer Färbung im Hinblick auf eine mögliche klinische Anwendung der BSP-Bestimmung in Gewebeschnitten?

Es zeigte sich, dass keine statistisch signifikante Korrelation zwischen der BSP-Expression und dem Metastasierungsgrad von Nierenzellkarzinomen nachgewiesen werden konnte. Ebenso konnte in dieser Studie kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der BSP-Expression in Nieren- und Tumorgewebe gezeigt werden.

Allerdings war ein Zusammenhang zwischen Tumorstadium (T3) und BSP-Expression im korrespondierenden Nierengewebe signifikant nachweisbar.

Eine klinische Anwendung der in dieser Arbeit verwendeten Techniken der immunhistochemischen Darstellung von BSP ist zum momentanen Zeitpunkt noch nicht zielführend im Hinblick auf die Etablierung eines diagnostischen und

therapeutischen Markers für Knochenmetastasierung beim Nierenzellkarzinom, da sich die signifikanten Zusammenhänge bisher nicht im Tumorgewebe, sondern im umgebenden histologisch unauffälligen Nierengewebe nachweisen ließen.

Der genaue Mechanismus dieser erhöhten BSP-Expression im Nierengewebe abhängig von der Größe des Primärtumors ist bisher unklar.

Die Methodik der immunhistochemischen Färbung am Paraffinschnitt ist grundsätzlich hingegen ein bewährtes, häufig verwendetes und allgemein anerkanntes Verfahren, welches bei planvoller Durchführung im Vergleich zu anderen Verfahren relativ wenig Fehlerquellen birgt.

Das Fehlen eines statistisch signifikanten Zusammenhangs in Bezug auf die Expression im Tumorgewebe selbst mag dabei verschiedene Gründe haben.

So ist es theoretisch möglich, dass entgegen den bisher beschriebenen Zusammenhängen zwischen BSP-Expression und Metastasierung für andere Gewebe (8, 15, 17, 22) für das Nierenzellkarzinom kein derartiger Zusammenhang im Tumorgewebe besteht. Hiergegen spricht allerdings, dass in anderen Arbeiten (17) bereits eine erhöhte BSP-Expression für das Nierenzellkarzinom nachgewiesen werden konnte.

Ein anderer möglicher Grund ist darin zu suchen, dass BSP schon im normalen Nierengewebe in relativ hohem Maße und von verschiedenen Zelltypen exprimiert wird (49). Im Vergleich zu anderen Geweben, die im Normalzustand nahezu keine BSP-Expression zeigen, fällt der Unterschied zum maligne entarteten Gewebe bei der Niere dementsprechend geringer aus und wird daher möglicherweise in einem relativ kleinen Patientenkollektiv, wie dem in dieser Studie untersuchten und der Verwendung von lediglich semiquantitativen Nachweismethoden, nicht signifikant zur Geltung kommen.

Hinzu kommt, dass in den zu untersuchenden Tumorgeweben möglicherweise bedingt durch Einblutungen, Tumornekrosen und lokale Gewebereaktionen mit

Minderperfusion und Azidose andere Voraussetzungen für die immunhistochemische Färbung bestehen, als im normalen Nierengewebe.

Es ist gut vorstellbar, dass durch derartige Veränderungen das vom Tumor exprimierte BSP in seiner Struktur verändert wird und daher mit immunhistochemischen Verfahren nicht mehr ausreichend zuverlässig detektiert werden kann.

Möglicherweise wäre hier eine quantitativ feinere Bestimmung, beispielsweise mittels Western-Blot, oder aber ein qualitativ anderes Nachweisverfahren, welches bereits auf RNA-Ebene ansetzt eher in der Lage, Unterschiede zwischen Nierengewebe und Tumorgewebe exakter zu detektieren, beziehungsweise genauere Informationen über die tatsächliche Menge an synthetisiertem BSP im Tumorgewebe zu bieten.

Denkbar wäre für weitere Studien auch eine Kombination mehrerer Methoden zum BSP-Nachweis.

So konnten mehrere Autoren mit dem Nachweis von Serum-BSP-Konzentrationen, einer Kombination mehrerer Blots oder dem gemeinsamen Nachweis von BSP und der koexprimierten MMP-2 exaktere Ergebnisse erzielen (8, 17, 49, 50).

Wenngleich sich in dieser Studie keine statistisch signifikanten Zusammenhänge zwischen BSP-Expression und Metastasierungsgrad im Tumor nachweisen ließen, zeigten sich dennoch interessante und zum Teil neue Aspekte.

Insbesondere der überraschende Anstieg der BSP-Expression im Nierengewebe mit zunehmendem Metastasierungsgrad, sowie zunehmender Tumorgröße im dazugehörigen Patientenkollektiv ist ein neu aufgeworfener Gesichtspunkt, der sicherlich hinsichtlich seiner Replizierbarkeit und Quantifizierung in einem größeren Patientenkollektiv und unter Einbeziehung weiterer Nachweismethoden zu überprüfen ist, nichtsdestotrotz jedoch die

Frage auf eine mögliche Mitreaktion des mikroskopisch „gesunden“ Nierengewebes im Rahmen der Tumorentstehung und Metastasierung lenkt.

Dieser Aspekt ist vor allem deshalb so bemerkenswert, da hier mit exakteren Methoden vielleicht der Nachweis von frühesten „microenvironmental changes“ zu Beginn einer Metastasierung oder als Ausdruck eines Progresses gelingen könnte, mit allen daraus resultierenden diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten.

Es zeigte sich weiterhin, dass eine einfach anwendbare immunhistochemische Darstellung von BSP und deren Korrelation mit dem Metastasierungsgrad im Sinne von „wenig Fluoreszenz = keine ossäre Metastasierung und viel Fluoreszenz = ossäre Metastasierung“ nicht ohne Weiteres möglich ist, was jedoch die grundsätzliche Anwendung von BSP keinesfalls ausschließt, sondern zeigt, dass es für die Etablierung einer Anwendung von BSP in der Klinik noch mehr Wissen um die komplexen Interaktionen dieses Proteins und der SIBLING-Familie einschließlich der interagierenden Metalloproteinasen zu erarbeiten gilt.

5. Zusammenfassung

Das Nierenzellkarzinom gehört zu den häufigsten urologische Tumorerkrankungen, bleibt dabei meist lange klinisch stumm und zeigt eine bevorzugte Metastasierung in den Knochen mit damit einhergehender deutlicher Prognoseverschlechterung.

Die Therapie der Wahl ist primär eine radikale Nephrektomie, wobei für fortgeschrittene inoperable Stadien aufgrund des schlechten Ansprechens des Nierenzellkarzinoms auf Strahlen- und Chemotherapie Bedarf an neuen Therapiekonzepten besteht.

Die Tatsache, dass mehr als die Hälfte der Nierenzellkarzinome als Zufallsbefunde, und damit häufig bereits in einem metastasierten Stadium, diagnostiziert werden, lässt erkennen, dass es bisher an validen diagnostischen und prognostischen Markern fehlt.

Dies wird insbesondere in Bezug auf Patienten mit Knochenmetastasen deutlich, für die es hinsichtlich der Dynamik ihrer metastatischen Erkrankung nur unzureichende Messverfahren gibt, die lediglich eine bereits eingetretene Schädigung der Knochensubstanz detektieren können und nur eingeschränkt in der Lage sind Auskunft über das Ansprechen einer Therapie zu liefern. Gerade im Hinblick auf eine frühzeitige orthopädische Intervention, bevor pathologische Frakturen und daraus resultierende Komplikationen auftreten, wäre ein Knochenresorptionsmarker, der Informationen über den aktuellen Knochenmetabolismus geben kann, als Verlaufsparemeter hilfreich.

Bone Sialoprotein scheint hierfür als Knochenresorptionsmarker ein geeigneter Kandidat, da ein Zusammenhang zwischen der BSP-Expression, BSP-Serumkonzentration und dem Auftreten von Knochenmetastasen für verschiedene andere Tumoren mit bevorzugter Knochenmetastasierung bereits nachgewiesen werden konnte.

Daher befasste sich diese Studie mit der Frage, ob für das Nierenzellkarzinom eine Korrelation zwischen BSP-Expression und Metastasierungsgrad besteht, im Hinblick auf eine mögliche klinische Anwendung von BSP als diagnostischer und prognostischer Marker, sowie als Verlaufspareter.

Hierfür wurden Gewebeprouben von 30 Patienten mit Nierenzellkarzinomen unterschiedlichen Metastasierungsgrades, welche eine Nephrektomie oder Nierenteilresektion erhielten, untersucht und gegeneinander verglichen. Dabei wurden 3 Patientengruppen mit jeweils 10 Patienten randomisiert gebildet, deren Patienten keinerlei Metastasen (Gruppe 1), nur Weichteilmetastasen (Gruppe 2) oder Knochenmetastasen (Gruppe 3) aufwiesen.

Von jedem Patienten wurden zwei Gewebeprouben aus den Operationspräparaten als Paraffineinbettung aufbereitet, jeweils einmal Tumorgewebe (A) und einmal Nierengewebe (B).

Es erfolgte nun die HE-Färbung dieser Gewebe zur erneuten histologischen Kontrolle, sowie der immunhistochemische Nachweis von BSP mittels indirekter Immunfluoreszenzmethode unter Anwendung eines dimensionslosen semiquantitativen Scoringsystems zur Auswertung der Gewebeschnitte.

In der Auswertung der Gewebeschnitte wurden sowohl die Gewebe A und B und die Gruppen 1, 2 und 3 gegeneinander verglichen als auch darüber hinaus alle Gruppen und Gewebe im Hinblick auf eine Interaktion untersucht.

Hierbei konnte keine statistisch signifikante Korrelation zwischen Gewebefluoreszenz und Metastasierungsgrad oder zwischen Gewebefluoreszenz und Gewebeart festgestellt werden. Auch hinsichtlich der Gewebeinteraktion zeigten sich keine statistisch signifikanten Zusammenhänge.

Hingegen konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Tumorstadium des Patienten (T 1/2 versus T3) und Erhöhung der BSP-Expression im korrespondierenden Nierengewebe, nicht jedoch im Tumorgewebe selbst, gefunden werden.

Es bleibt festzustellen, dass die in dieser Studie verwendete Methodik der Immunfluoreszenzfärbung nicht geeignet war, um eine Korrelation zwischen Metastasierungsgrad und BSP-Expression im Nierenzellkarzinom signifikant nachzuweisen.

Um zu klären, ob ein derartiger Zusammenhang beim Nierenzellkarzinom nicht existiert oder ob dieser lediglich, bedingt durch die semiquantitative Methodik dieser Arbeit und die nachweislich bereits hohe BSP-Expression im Nierengewebe, mit daraus resultierender geringerer Differenz zur Expression im Tumorgewebe oder aber durch Veränderungen im Tumorgewebe selbst, die Einfluss auf die Immunfluoreszenzfärbung nehmen, nicht signifikant nachweisbar war, bedarf es sicherlich weiterführender Untersuchungen mit quantitativ exakteren Nachweisverfahren und idealerweise einer Kombination mehrerer Nachweisverfahren, sowie deren Anwendung auf eine größere Patientenzahl.

6. Literaturverzeichnis

1. **Andrews, A.T., Herring, G.M., Kent, P.W.** (1967)
Some studies on the composition of bovine cortical-bone sialoprotein
Biochem J. 104 (3): 705-15
2. **Amato, R.J.** (2000)
Chemotherapy for renal cell carcinoma
Semin. Oncol. 27(2): 177-86
3. **Amato, R.J.** (2005)
Renal cell carcinoma: review of novel single-agent therapeutics and combination regimens
Ann. Oncol. 16(1): 7-15
4. **Baloch, K.G., Grimer, R.J., Carter, S.R., Tillman, R.M.** (2000)
Radical surgery for the solitary bony metastasis from renal-cell carcinoma
J. Bone Joint Surg. Br. 82 (1): 62-7
5. **Bänkler, H.W., Fritze, D., Fießl, H.S.** (2001)
Innere Medizin –Duale Reihe S. 719-21
Georg Thieme Verlag
6. **Bäuerle, T., Peterschmitt, J., Hilbig, H., Kiessling, F., Armbruster, F.P., Berger, M.R.** (2006)
Treatment of bone metastasis induced by MDA-MB-231 breast cancer cells with an antibody against bone sialoprotein
Int. J. Oncol. 28 (3): 573-83
7. **Bedke, J., Stenzl, A.** (2010)
Renal cell carcinoma: recent developments in diagnostics and therapy
Urologe A. 49 Suppl 1: 178-84
8. **Bellahcène, A., Maloujahnoum, N., Fisher, L.W., Pastorino, H., Tagliabue, E., Ménard, S., Castronovo, V.** (1997)
Expression of bone sialoprotein in human lung cancer
Calcif. Tissue Int. 61 (3): 183-8
9. **Bellahcène, A., Bonjean, K., Fohr, B., Fedarko, N.S., Robey, F.A., Young, M.F., Fisher, L.W., Castronovo, V.** (2000)
Bone sialoprotein mediates human endothelial cell attachment and migration and promotes angiogenesis
Circ. Res. 86 (8): 885-91
10. **Bellahcène, A., Castronovo, V., Ogbureke, K.U., Fisher, L.W., Fedarko, N.S.** (2008)
Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs): multifunctional proteins in cancer
Nat. Rev. Cancer 8 (3), 212-26

11. **Böhm, P., Huber, J.** (2002)
The surgical treatment of bony metastases of the spine and limbs
J. Bone Joint Surg. Br. 84 (4): 521-9
12. **Bühling, K.J., Lepenies, J., Witt, K.** (2004)
Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pathologie 3. Auflage, S. 313-4
Elsevier Urban&Fischer
13. **Bunyaratavej, P., Hullinger, T.G., Somerman, N.J.** (2000)
Bone morphogenetic proteins secreted by breast cancer cells upregulate bone sialoprotein expression in preosteoblast cells
Exp. Cell Res. 260 (2): 324-33
14. **Clines, G.A., Guise, T.A.** (2004)
Mechanisms and treatment for bone metastases
Clin. Adv. Hematol. Oncol. 2 (5): 295-302
15. **Coleman, R., Brown, J., Terpos, E., Lipton, A., Smith, M.R., Cook, R., Major, P.** (2008)
Bone markers and their prognostic value in metastatic bone disease: clinical evidence and future directions
Cancer Treat Rev. 34 (7): 629-39
16. **Demers, L. M., Costa, L., Lipton, A.** (2000)
Biochemical markers and skeletal metastases
Cancer 88 (12 Suppl): 2919-26
17. **Diel, I.J., Solomayer, E.F., Seibel, M.J., Pfeilschifter, J., Maisenbacher, H., Gollan, C., Pecherstorfer, M., Conradi, R., Kehr, G., Boehm, E., Armbruster, F.P., Bastert, G.** (1999)
Serum bone sialoprotein in patients with primary breast cancer is a prognostic marker for subsequent bone metastasis
Clin. Cancer Res. 5 (1): 3914-9
18. **Doehn, C., Merseburger, A.S., Jocham, D., Kuczyk, M.A.** (2007)
Is there an indication for neoadjuvant or adjuvant systemic therapy in renal cell cancer?
Urologe A. 46 (10): 1371-2, 1374, 1376-8
19. **Drucker, B.J.** (2005)
Renal cell carcinoma: current status and future prospects
Cancer Treat. Rev. 31 (7): 536-45
20. **Fedarko, N.S., Fohr, B., Robey, P.G., Young, M.F., Fisher, L.W.** (2000)
Factor H binding to bone sialoprotein and osteopontin enables tumor cell evasion of complement-mediated attack
J. Biol. Chem. 275 (22): 16666-72
21. **Fergany, A.F., Hafez, K.S., Novick, A.C.** (2000)
Long-term results of nephron sparing surgery for localized renal cell carcinoma: 10-year followup

- J. Urol. 163 (2): 442-5
22. **Fisher, L.W., Jain, A., Tayback, M., Fedarko, N.S.** (2004)
Small integrin binding ligand N-linked glycoprotein gene family expression in different cancers
Clin. Cancer Res. 10 (24): 8501-11
 23. **Fitch, M., Maxwell, C., Ryan, C., Löthman, H., Drudge-Coates, L., Costa, L.** (2009)
Bone metastases from advanced cancers: clinical implications and treatment options
Clin J Oncol Nurs. 2009 13 (6): 701-10
 24. **Fontana, A., Delmas, P.D.** (2000)
Markers of bone turnover in bone metastases
Cancer 15; 88 (12 Suppl): 2952-60.
 25. **Forauer, A.R., Kent, E., Cwikiel, W., Esper, P., Redman, B.** (2007)
Selective palliative transcatheter embolization of bony metastases from renal cell carcinoma
Acta Oncol. 46(7): 1012-8
 26. **Frank, I., Blute, M.L., Cheville, J.C., Lohse, C.M., Weaver, A.L., Leibovic, B.C., Zincke, H.** (2003)
A multifactorial postoperative surveillance model for patients with surgically treated clear cell renal cell carcinoma
J. Urol. 170 (6 pt.1) 2225-32
 27. **Fuchs, B., Trousdale, R.T., Rock, M.G.** (2005)
Solitary bony metastasis from renal cell carcinoma: significance of surgical treatment.
Clin. Orthop. Relat. Res. 431: 187-92
 28. **Ganss, B., Kim, R.H., Sodek, J.** (1999)
Bone sialoprotein
Crit. Rev. Oral Biol. Med. 10 (1): 79-98
 29. **Gordon, J.A., Sodek, J., Hunter, G.K., Goldberg, H.A.** (2009)
Bone sialoprotein stimulates focal adhesion-related signaling pathways: role in migration and survival of breast and prostate cancer cells
J. Cell Biochem. 107 (6): 1118-28
 30. **Guinan, P.D., Vogelzang, N.J., Fremgen, A.M., Chmiel, J.S., Sylvester J.L., Sener, S.F., Imperato, J.P.** (1995)
Renal cell carcinoma: tumor size, stage and survival. Members of the Cancer Incidence and End Result Committee
J.Urol. 153 (3 Pt. 2): 901-3
 31. **Guise, T.A.** (2000)
Molecular mechanisms of osteolytic bone metastases
Cancer 88 (12 suppl): 2892-8

32. **Hafez, K.S., Fergany, A.F., Novick, A.C.** (1999)
Nephron sparing surgery for localized renal cell carcinoma: impact of tumor size on patient survival, tumor recurrence and TNM staging
J. Urol. 162 (6): 1930-3
33. **Harrington, K.D.** (1997)
Orthopedic surgical management of skeletal complications of malignancy
Cancer 80 (8 Suppl): 1614-27
34. **Herold, G.** (2006)
Innere Medizin – eine vorlesungsorientierte Darstellung
35. **Jung, S.T., Ghert, M.A., Harrelson, J.M., Scully, S.P.** (2003)
Treatment of osseous metastases in patients with renal cell carcinoma
Clin. Orthop. Relat. Res. 409: 223-31
36. **Jocham, D., Richter, A., Hoffmann, L., Iwig, K., Fahlenkamp, D., Zakrzewski, G., Schmitt, E., Dannenberg, T., Lehmacher, W., von Wietersheim, J., Doehn, C.** (2004)
Adjuvant autologous renal tumour cell vaccine and risk of tumour progression in patients with renal-cell carcinoma after radical nephrectomy: phase III, randomized controlled trial
Lancet. 363 (9409): 594-9
37. **Kaplan, R.N., Rafii, S., Lyden, D.** (2006a)
Preparing the “soil”: the premetastatic niche
Cancer Res. 66 (23): 11089-93
38. **Kaplan, R.N., Psaila, B., Lyden, D.** (2006b)
Bone marrow cells in the “pre-metastatic niche”: within bone and beyond
Cancer Metastasis Rev. 25 (4): 521-9 –*article not free available*
39. **Karmatschek, M., Maier, I., Seibel, M.J., Voitge, H.W., Ziegler, R., Armbruster, F.P.** (1997)
Improved purification of human bone sialoprotein and development of a homologous radioimmunoassay.
Clin. Chem. 43 (11): 2076-82
40. **Kasugai, S., Nagata, T., Sodek, J.** (1992)
Temporal studies on the tissue compartmentalization of bone sialoprotein (BSP), osteopontin (OPN), and SPARC protein during bone formation in vitro.
J Cell Physiol. 152 (3): 467-77.
41. **Kirkali, Z.** (2009)
What is new in kidney cancer?
Expert Rev. Anticancer Ther. 9 (12): 1753-5.
42. **Lee, F., Patel, H.R.** (2002)
Kidney cancer: current management guidelines
Hosp. Med. 63 (4): 214-7

43. **Lee, J.E., Spiegelman, D., Hunter, D.J., Albanes, D., Bernstein, L., van den Brandt, P.A., Buring, J.E., Cho, E., English, D.R., Freudenheim, J.L., Giles, G.G., Graham, S., Horn-Ross, P.L., Håkansson, N., Leitzmann, M.F., Männistö, S., McCullough, M.L., Miller, A.B., Parker, A.S., Rohan, T.E., Schatzkin, A., Schouten, L.J., Sweeney, C., Willet, W.C., Wolk, A., Zhang, S.M., Smith-Warner, S.A.** (2008)
Fat, protein, and meat consumption and renal cell cancer risk: a pooled analysis of 13 retrospective studies
J. Natl. Cancer Inst. 100 (23): 1695-706
44. **Malaval, L., Wade-Guéye, N.M., Boudiffa, M., Fei, J., Zirngibl, R., Chen, F., Laroche, N., Roux, J.P., Burt-Pichat, B., Duboeuf, F., Boivin, G., Jurdic, P., Lafage-Proust, M.H., Amédée, J., Vico, L., Rossant, J., Aubin, J.E.** (2008)
Bone sialoprotein plays a functional role in bone formation and osteoclastogenesis
J. Exp. Med. 205 (5): 1145-53
45. **Nakao, K., Itoh, M., Tomita, Y., Tomooka, Y., Tsuji, T.** (2004)
FGF-2 potently induces both proliferation and DSP expression in collagen type I gel cultures of adult incisor immature pulp cells
Biochem. Biophys. Res. Commun. 325 (3): 1052-9
46. **Nam, J.S., Suchar, A.M., Kang, M.J., Stuelten, C.H., Tang, B., Michalowska, A.M., Fisher, L.W., Fedarko, N.S., Jain, A., Pinkas, J., Lonning, S., Wakefield, L.M.** (2006)
Bone sialoprotein mediates the tumor cell-targeted prometastatic activity of transforming growth factor beta in a mouse model of breast cancer
Cancer Res. 66 (12): 6327-35
47. **Niethard, F. U., Pfeil, J.** (2005)
Orthopädie, 5., korrigierte Auflage, S. 250-2
Duale Reihe, Thieme
48. **Ogata, Y.** (2008)
Bone sialoprotein and its transcriptional regulatory mechanism
J. Periodont. Res. 43 (2): 127-35
49. **Ogbureke, K.U., Fisher, L.W.** (2005)
Renal expression of SIBLING proteins and their partner matrix metalloproteinases (MMPs)
Kidney Int. 68 (1): 155-66
50. **Ogbureke, K.U., Nikitakis, N.G., Warburton, G., Ord, R.A., Sauk, J.J., Waller, J.L., Fisher, L.W.** (2007)
Up-regulation of SIBLING proteins and correlation with cognate MMP expression in oral cancer
Oral Oncol. 43 (9): 920-32
51. **Oppenheimer, S.B.** (2006)
Cellular basis of cancer metastasis: A review of fundamentals and new advances
Acta Histochem. 108 (5): 327-34

52. **Papotti, M., Kalebic, T., Volante, M., Chiusa, L., Bacillo, E., Cappia, S., Lausi, P., Novello, S., Borasio, P., Scagliotti, G.V.** (2006)
Bone sialoprotein is predictive of bone metastases in resectable non-small-cell lung cancer: a retrospective case-control study
J. Clin. Oncol. 24 (30): 4818-24
53. **Pascual, D., Borque, A.** (2008)
Epidemiology of kidney cancer
Adv. Urol. 2008: 782381
54. **Persson, L., Johansson, C., Rydén, C.** (2009)
Antibodies to Staphylococcus aureus Bone Sialoprotein-Binding Protein indicate infectious osteomyelitis
Clin. Vaccine Immunol. 16 (6): 949-52
55. **Pharoah, P.D., Caldas, C.** (1999)
Molecular genetics and the assessment of human cancers
Expert Rev. Mol. Med. 1999: 1-19
56. **Qin, C., Baba, O., Butler, W.T.** (2004)
Post-translational modifications of sibling proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis
Crit. Rev. Oral Biol. Med. 15 (3): 126-36
57. **Reeves, D.J., Liu, C.Y.** (2009)
Treatment of metastatic renal cell carcinoma
Cancer Chemother. Pharmacol. 64(1):11-25
58. **Roato, I., Grano, M., Brunetti, G., Colucci, S., Mussa, A., Bertetto, O., Ferracini, R.** (2005)
Mechanisms of spontaneous osteoclastogenesis in cancer with bone involvement
FASEB J. 19 (2): 228-30
59. **Samoto, H., Shimizu, E., Matsuda-Honjyo, Y., Saito, R., Nakao, S., Yamazaki, M., Furuyama, S., Sugiyama, H., Sodek, J., Ogata, Y.** (2003)
Prostaglandin E2 stimulates bone sialoprotein (BSP) expression through cAMP and fibroblast growth factor 2 response elements in the proximal promoter of the rat BSP gene
J. Biol. Chem. 278 (31): 28659-67
60. **Sorbellini, M., Kattan, M.W., Snyder, M.E., Reuter, V., Motzer, R., Goetzl, M., McKiernan, J., Russo, P.** (2005)
A postoperative prognostic nomogram predicting recurrence for patients with conventional clear cell renal cell carcinoma
J. Urol. 173 (1): 48-51
61. **Stadler, W.M., Rybak, M.E., Vogelzang, N.J.** (1995)
A phase II study of subcutaneous recombinant human interleukin-4 in metastatic renal cell carcinoma.
Cancer 76 (9): 1629-33

62. **Szendroi, A., Dinya, E., Kardos, M., Szász, A.M., Németh, Z., Ats, K., Kiss, J., Antal, I., Romics, I., Szendroi, M.** (2009)
Prognostic factors and survival of renal clear cell carcinoma patients with bone metastases
Pathol. Oncol. Res 29
63. **Tamaskar, I., Pili, R.** (2009)
Update on novel agents in renal cell carcinoma
Expert Rev Anticancer Ther 9 (12): 1817-27.
64. **Theodoreescu, D., Broder, S.R., Boyd, J.C., Mills, S.E., Frierson H.F. Jr.** (1997)
Cathepsin D and Chromogranin A as Predictors of Log Term Disease Specific Survival after Radical Prostatectomy for Localized Carcinoma of the Prostate
Cancer 80 (11): 2109-19.
65. **Tsui, K.H., Shvarts, O., Smith, R.B., Figlin, R.A., deKernion, J.B., Beldegrun, A.** (2000)
Prognostic indicators for renal cell carcinoma: a multivariate analysis of 643 patients using the revised 1997 TNM staging criteria
J. Urol. 163 (4): 1090-5
66. **Tu, Q., Zhang, J., Fix, A., Brewer, E., Li, Y.P., Zhang, Z.Y., Chen, J.** (2009)
Targeted overexpression of BSP in osteoclasts promotes bone metastasis of breast cancer cells.
J. Cell Physiol. 218 (1): 135-45
67. **Tye, C.E., Hunter, G.K., Goldberg, H.A.** (2005)
Identification of the type I collagen-binding domain of bone sialoprotein and characterization of the mechanism of interaction
J. Biol. Chem. 280 (14): 13487-92
68. **Waltregny, D., Bellahcène, A., Van Riet, I., Fisher, L.W., Young, M., Fernandez, P., Dewé, W., de Leval, J., Castronovo, V.** (1998)
Prognostic value of bone sialoprotein expression in clinically localized human prostate cancer
J. Natl. Cancer Inst. 90 (13): 1000-8
69. **Wedin, R.** (2001)
Surgical treatment for pathologic fracture
Acta. Orthop. Scand. Suppl. 72 (302): 2p, 1-29
70. **Williams, P.A., Peacocke, A.R.** (1965)
The physical properties of a glycoprotein from bovine cortical bone (bone sialoprotein).
Biochim Biophys Acta. 101 (3): 327-35
71. **Withold, W., Armbruster, F.P., Karmatschek, M., Reinauer, H.** (1997)
Bone sialoprotein in serum of patients with malignant bone disease
Clin. Chem. 43 (1): 85-91

72. **Yi, Z., Fu, Y., Zhao, S., Zhang, X., Ma, C.** (2009)
Differential expression of miRNA patterns in renal cell carcinoma and nontumorous tissues
J. Cancer Res. Clin. Oncol. (Epub ahead of print)
73. **Yoshikawa, H., Ueda, T., Kudawara, I., Araki, N., Yonenobu, K., Ochi, T., Uchida, A.** (1998)
Surgical treatment for skeletal metastases from soft tissue sarcomas: experience with 23 lesions in 20 patients
Sarcoma 2 (2): 107-14
74. **Zisman, A., Pantuck, A.J., Wieder, J., Chao, D.H., Dorey, F., Said, J.W., deKernion, J.B., Figlin, R.A., Belldegrun, A.S.** (2002)
Risk group assessment and clinical outcome algorithm to predict the natural history of patients with surgically resected renal cell carcinoma
J. Clin. Oncol. 20 (23): 4559-66

7. Veröffentlichungen

Teile dieser Dissertationsschrift wurden bereits in folgender Publikation veröffentlicht:

Mittag F, Hennenlotter J, Minkley L, Ipach I, Schilling D, Scharpf M, Stenzl A, Leichtle U, Kluba T.

Alteration of bone sialoprotein expression in osseous metastasized renal cell carcinomas and the tumor surrounding tissue.

Clin Exp Metastasis. 2012 Feb; 29(2):179-83.

8. Anhang

8.1 Patientendaten

[einfügen Tab1 Patientendaten] Tabelle 24

[einfügen Tab 2 Patientendaten] Tabelle 25

[einfügen Tab 3 Patientendaten] Tabelle 26

8.2 Vorbereitung der Lösungen und Reagenzien

PBS-Puffer:

1 Tablette wurde in 500 ml destilliertem Wasser mittels Magnetrührer vollständig aufgelöst. Der Puffer wurde jeweils täglich neu angesetzt.

1% BSA in PBS:

1g BSA-Pulver wurde in 100 ml BPS-Puffer gelöst. Diese Lösung wurde in Portionen von ca. 1,5 ml in Eppendorf-Cups eingefroren und bei Bedarf jeweils einzeln bei Zimmertemperatur aufgetaut.

0,1% BSA in PBS:

Verdünnung der hergestellten 1% BSA in PBS-Lösung im Verhältnis 1: 100 mit PBS-Puffer.

1% Eosin für die HE-Färbung:

1g Eosin wird in 100 ml destilliertem Wasser gelöst und anschließend mit einem Tropfen Eisessig versetzt.

8.3 Abkürzungsverzeichnis

AV β -3	alpha V beta 3-Integrine
BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
BSA	Bovines Serumalbumin
BSP	Bone Sialoprotein
cDNA	complementary Desoxyribonucleic acid
CT	Computertomographie
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMP1	Dentin matrix acidic phosphoprotein 1
DSPP	Dentin Sialophosphoprotein
GMA	Glykolmethacrylat
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
ILGF I	insulin-like growth factor I
MEPE	Matrix extracellular phosphoglycoprotein
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
NSAR	Nicht-steroidale Antirheumatika
OPN	Osteopontin

PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PTHrP	Parathyroid hormone-related protein
RCC	Renal Cell Carcinoma (Nierenzellkarzinom)
RGD	Arginin–Glycin–Asparaginsäure
SIBLING	small integrin-binding ligand, N-linked glycoprotein
TGF-beta	transforming growth factor beta
TNF-alpha	tumor necrosis factor alpha
UICC	International Union against Cancer
VEGF	vascular endothelial growth factor

8.4 Abbildungsverzeichnis

Nummer	Bezeichnung
1.	Bekannte Regulationsmechanismen der BSP-Expression (unvollständig)
2.	Steuerung von metastatischen Tumorzellen in den Knochen durch BSP. Mutmaßlicher Mechanismus des durch BSP vermittelten Targetings des Knochens (aus: Ganss, B., Kim, R.H., Sodek, J., Bone Sialoprotein, Critical Reviews in Oral Biology & Medicine, 1999)
3.	Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus
4.	Durchgeführte Färbungen für jeden Patient (n=30)
5.	Beispielbilder der immunhistochemischen Anfärbung von BSP im Knochengewebe
6.	Gegenüberstellung der Fluoreszenzscoringwerte 0- IV, 200-fache Vergrößerung, verwendete Einzelbilder siehe Abb. 6-10
7.	Beispielbilder für die einzelnen Scoringwerte: Scoringwert 0 (06/266, Bild 2 , Negativ-Kontrolle Nierengewebe, 200-fache Vergrößerung)
8.	Beispielbilder für die einzelnen Scoringwerte: Scoringwert 1 (04/441 Bild1, Nierenzellkarzinom, 200-fache Vergrößerung)
9.	Beispielbilder für die einzelnen Scoringwerte: Scoringwert 2 (05/432 Bild 2, Nierengewebe, 200-fache Vergrößerung)
10.	Beispielbilder für die einzelnen Scoringwerte: Scoringwert 3 (05/418, Bild 3, Nierengewebe 200-fache Vergrößerung)
11.	Beispielbilder für die einzelnen Scoringwerte: Scoringwert 4 (05/432, Bild 4, Nierengewebe, 200-fache Vergrößerung)
12.	Darstellung der Bildbearbeitung am Beispiel eines Nierenzellkarzinomgewebeschnittes, 200-fache Vergrößerung

13.	Zusammenhang zwischen Expression von BSP im Tumorgewebe und im dazugehörigen Nierengewebe für alle 30 Patienten. Dargestellt sind die einzelnen Summenwerte der Tumorgewebe und Nierengewebe
14.	Mittelwerte der Scoringwerte I-IV in Prozent der Gesamtsschnittfläche für Gruppe 1 (keine Metastasierung, n=10)
15.	Mittelwerte der Scoringwerte I-IV in Prozent der Gesamtsschnittfläche für Gruppe 2 (Weichteilmetastasierung, n=10)
16.	Mittelwerte der Scoringwerte I-IV in Prozent der Gesamtsschnittfläche für Gruppe 3 (Knochenmetastasierung, n=10)
17.	Mittelwerte der Scoringwerte I-IV in Prozent der Gesamtsschnittfläche aller Tumorgewebeproben A
18.	Mittelwerte der Scoringwerte I-IV in Prozent der Gesamtsschnittfläche aller Nierengewebeproben B
19.	Summenwerte (absolut) der Scoringwerte I bis IV für die Gruppen 1 (blau), 2 (rot) und 3 (grün). Verwendete Daten sind der Tabelle 13 zu entnehmen.
20.	Summenwerte (absolut) der Scoringwerte I bis IV für die Gewebe A und B. Verwendete Daten sind der Tabelle 14 zu entnehmen.
21.	Grafische Darstellung der Trends für die höchste BSP-Fluoreszenz nach Patientenkollektiven 1, 2, 3 und als Gesamtsumme. Zugrundeliegende Daten sind der Tabelle 15 zu entnehmen.
22.	Grafische Darstellung der Summen (absolut) für die Scoringkategorien III (blaue Balken) und IV (rote Balken) nach Patientenkollektiven 1-3 unterteilt. Die zugrunde liegenden Daten sind der Tabelle 17 zu entnehmen..
23.	Abbildung 23: Grafische Darstellung der Summen (prozentual) für die Scoringkategorien III, IV und III+IV nach Patientenkollektiven unterteilt. Die zugrunde liegenden Daten sind der Tabelle 18 zu entnehmen.
24.	Abbildung 24: Summenverhältnisse (III + IV) von A : B für Gruppe 1, 2 und 3

25.	Abbildung 25: Mittelwerte von A und B für die Summen von III + IV für Gruppe 1, 2 und 3
26.	Abbildung 26: Zusammenhang zwischen T-Stadium und BSP-Expression im Tumorgewebe. Angegeben sind die TumorgroÙe (1= T1/2, 3= T3) und die BSP-Expression als Summenwert.
27.	Abbildung 27: Zusammenhang zwischen T-Stadium und BSP-Expression im Nierengewebe. Angegeben sind die TumorgroÙe (1= T1/2, 3= T3) und die BSP-Expression als Summenwert

8.5 Tabellenverzeichnis

Nummer:	Bezeichnung
1.	Klassifikation der Nierenzellkarzinome (modifiziert aus: Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pathologie, Elsevier 2004)
2.	Einige Risikofaktoren und deren relatives Risiko für das RCC
3.	TNM-Klassifikation des Nierenzellkarzinoms (UICC 2010)
4.	Grading des Nierenzellkarzinoms (UICC 2009)
5.	Stadieneinteilung des Nierenzellkarzinoms (UICC 2010) (aus: Innere Medizin, G. Herold, 2012)
6.	5-Jahres-Überlebensrate in Abhängigkeit von der Stadieneinteilung des Nierenzellkarzinoms (UICC 2010) (aus: Innere Medizin, G. Herold, 2012)
7.	Verwendete Primär- und Sekundärantikörper
8.	Altersverteilung der eingeschlossenen Patienten, unterteilt nach Gruppenzugehörigkeit und Geschlecht; angegeben sind das Durchschnittsalter sowie die Altersspanne
9.	Tumorgrading der untersuchten Nierenzellkarzinome, nach Patientengruppen zusammengefasst:
10.	Einbettungsschema der Paraffinschnitte
11.	Initial verwendetes Färbeschema entsprechend Herstellerempfehlungen für Gewebe und Negativ-Kontrollen
12.	Endgültig verwendetes Färbeschema für Gewebe und Negativ-Kontrollen
13.	Summenwerte (absolut) der Scoringwerte I bis IV für die Gruppen 1, 2 und 3 (jeweils Tumor- und Normalgewebe addiert)
14.	Summenwerte (absolut) der Scoringwerte I bis IV für die Gewebe A und B gesamt und nach Gruppen unterteilt.
15.	Intraindividuelle Trends für Tumorgewebe, Normalgewebe oder kein Trend. Angegeben ist die Anzahl der Patienten, welche die Kriterien für o.g. Trend erfüllt

16.	Statistische Ergebnisse der multivariaten Varianzanalyse für den intraindividuellen Vergleich zwischen A und B. (Bei NumDF = 1 ist exactF der relevante Wert.)
17.	Summen (absolut) der prozentualen Flächenanteile für Scoringkategorie III, IV und III+IV nach Patientenkollektiven unterteilt.
18.	Summen (prozentual) der prozentualen Flächenanteile für Scoringkategorie III, IV und III+IV nach Patientenkollektiven unterteilt. Dabei wurden die Werte der Gruppe 1 (keine Metastasen) als Ausgangswert jeweils mit 100% gleichgesetzt.
19.	Statistische Ergebnisse der multivariaten Varianzanalyse für den interindividuellen Vergleich zwischen den Gruppen 1, 2 und 3
20.	Vergleich der Summen der Scoringwerte III und IV von Gruppe 1, 2 und 3 bezüglich Tumorgewebe (A) und Nierengewebe (B)
21.	Vergleich der Mittelwerte der Scoringwerte III und IV von Gruppe 1, 2 und 3 bezüglich Tumorgewebe (A) und Nierengewebe (B)
22.	Statistische Ergebnisse der multivariaten Varianzanalyse hinsichtlich der Gruppeninteraktion (Gewebe * Gruppenzugehörigkeit)
23.	Zusammenfassung der statistischen Ergebnisse
24.	Patientendaten für Gruppe 1
25.	Patientendaten für Gruppe 2
26.	Patientendaten für Gruppe 3

8.6 Danksagung

„Im Anfang war das Wort.“

Mein Dank gilt dem Ärztlichen Direktor der Universitätsklinik für Orthopädie Professor Dr. med. Nikolaus Wülker und meinem Betreuer Dr. med. Falk Mittag für die Überlassung des Themas, die hierfür nötige Vorarbeit und Recherche, die Bereitstellung aller Mittel und die geduldige Betreuung und Korrektur der vielen Worte und Sätze die nun meine Doktorarbeit formen.

„Im Anfang war der Sinn.“

Ohne die ideelle und materielle Unterstützung meiner Mutter wären weder mein Studium, noch diese Arbeit möglich gewesen, weshalb ihr ein ganz besonderer Dank gebührt. In diesem Sinn ist meine Doktorarbeit ein Stück weit auch ihre Doktorarbeit.

„Im Anfang war die Kraft.“

Ich möchte mich bei allen Menschen, die meine Arbeit unterstützt haben und hierfür einen Teil ihrer eigenen Kraft und Zeit aufgewendet haben herzlich bedanken. Namentlich ist das Professor Dr. rer. nat. Wilhelm Aicher, der mir in die klinisch-experimentelle Laborarbeit näher gebracht hat und jederzeit persönlich für Fragen und Ideen als Ansprechpartner zur Verfügung stand, was wesentlich zu meinem Verständnis der Materie und meiner Motivation beigetragen hat.

Außerdem sind das, stellvertretend für alle an der Kooperation mit der Klinik für Urologie Beteiligten, Prof. Dr. med. Arnulf Stenzl und Dipl. biol. Jörg Hennenlotter die nicht nur die Gewebeproben und den urologischen „background“ für die Arbeit, sondern darüber hinaus auch das fundierte Wissen um Datenbearbeitung und –auswertung und viele hilfreiche Ideen und Anregungen beigesteuert haben.

Nicht zu vergessen ist auch Herr Dr. biol. hum. Christoph Meisner vom Institut für medizinische Biometrie der Universität Tübingen, der die statistische Auswertung der Daten für diese Arbeit durchgeführt hat.

„Im Anfang war die Tat.“

Weiterhin gilt ein großer Dank allen, die mich in den sich stellenden Aufgaben dieser Doktorarbeit tagtäglich mit großen und kleinen Taten unterstützt haben. Sie alle namentlich aufzuzählen würde den Rahmen der Arbeit sprengen und doch bliebe sicher trotzdem noch jemand unerwähnt, der es nicht sein sollte.

Stellvertretend für alle tatkräftigen guten Geister danke ich daher dem Laborteam des Zentrums für medizinische Forschung, namentlich Elisabeth Kienzle, die mir alles über Paraffinschnitte und Gewebefärbungen beigebracht hat, sowie Anita Hack und Michaela Weiß-Klemm, die wesentlich zu dem Gelingen der immunhistochemischen Anfärbungen beigetragen haben.

Darüber hinaus möchte ich mich bei den Diplomanden der Biologie bedanken, mit denen ich die Labore teilen durfte. Sie standen mir trotz dem eigenen straffen Zeitplan stets für praktische Fragen zur Verfügung, haben mir die ersten Schritte im Laboralltag wesentlich erleichtert und bereitwillig Mikroskope, Labore, Materialien und die ein oder andere Tasse Kaffee geteilt.

Zu guter Letzt gilt mein Dank auch meinen Freunden und Kommilitonen, die mir in vielen praktischen Fragen zu Literaturrecherche oder technischen Problemen zur Seite standen, sich bei gelegentlichen Stimmungstiefs und Zeitmangel nie nachtragend gezeigt haben und nicht zuletzt auch tröstliche Leidensgefährten beim Thema Doktorarbeit waren.

8.7 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Lena Minkley

Geburtsdatum: 30.08.1984

Geburtsort: Berlin

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1990- 1992 Kant-Grundschule Berlin

1992 - 1994 Bodensee-Grundschule Friedrichshafen

1994 Zeppelin-Gymnasium Friedrichshafen

1994 - 2000 Neues Gymnasium Stuttgart

2000 - 2003 Stiftsgymnasium Sindelfingen

Juni 2003 Abitur

Studium:

2003-2010 Studium der Humanmedizin, Eberhard-Karls-Universität Tübingen

2005 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2009 Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Tübingen (Wahlfach: Neurologie)

11.05.2010

Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Promotion:

Seit 03/2008

bei Herr Prof. Dr. med. N. Wülker an der
Universitätsklinik für Orthopädie,
Eberhard-Karls-Universität Tübingen

Beruf:

Seit 06/2010

Wissenschaftliche Mitarbeiterin /
Assistenzärztin in der Medizinischen Klinik I,
Universitätsklinik Tübingen