

I

Aus der Medizinischen Klinik I
der Universität zu Lübeck
Komm. Direktor: Prof. Dr. med. T. Wagner

**Bedeutung des C-reaktiven Proteins im Rahmen maligner
Erkrankungen am Beispiel des Nierenzellkarzinoms**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

– Aus der Medizinischen Fakultät –

vorgelegt von
Marleen Busse
aus Kyritz

Lübeck 2007

Meinen Eltern
und Großeltern in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	C-reaktives Protein	1
1.1.1	Struktur und Bindungsverhalten	1
1.1.2	Funktion	3
1.1.3	Stellenwert in der medizinischen Diagnostik	3
1.2	Akut-Phase-Reaktion	4
1.2.1	Ablauf und beteiligte Strukturen	5
1.2.2	Bedeutung für den menschlichen Organismus	6
1.3	Nierenzellkarzinom	7
1.3.1	Inzidenz, Einteilung, Pathologie	7
1.3.2	Diagnostik, Überlebenszeit, Therapie	7
1.4	CRP und Karzinome	10
1.5	Fragestellung	11
2.	Material und Methoden	12
2.1	Geräte	12
2.2	Laborbedarf	12
2.3	Patienten	13
2.4	Probengewinnung und -verarbeitung	14
2.5	Weitere Laboruntersuchungen	14
2.6	Zellkultur	15
2.6.1	Zellkulturmedien und Reagenzien	15
2.6.2	Tumorzelllinien	15
2.6.3	Lymphozyten des peripheren Blutes	16
2.7	Immunhistochemie	18
2.7.1	Herstellung von Gefrierschnitten	19
2.7.2	Antikörper und Isotyp-Kontrolle	19
2.7.3	Puffer und Verbrauchsmaterialien	20
2.7.4	Durchführung	20
2.8	Quantitative <i>real-time</i> Polymerasekettenreaktion (PCR)	22
2.8.1	Reagenzien	22
2.8.2	Probenvorbereitung	23
2.8.2.1	Isolierung der RNA	23

2.8.2.2	Konzentrationsbestimmungen der RNA	24
2.8.3	Durchführung der reversen Transkription	24
2.8.4	Quantitative <i>real-time</i> PCR	25
2.8.4.1	Primer und Sonden	25
2.8.4.2	Hep3B-Zellen	26
2.8.4.3	Reaktionsansätze für die <i>real-time</i> PCR	26
2.8.4.4	Reaktionsbedingungen und Ablauf	27
2.8.4.5	Relative Quantifizierung der cDNA	27
2.9	CRP-Bestimmung im Plasma	28
2.10	Statistik	28
3.	Ergebnisse	30
3.1	Präoperative Plasma-CRP-Werte	30
3.2	Postoperative Plasma-CRP-Werte	31
3.3	Tumorzelllinien (Synthese von CRP in Karzinomzelllinien <i>in vitro</i>)	32
3.4	Lymphozyten (Synthese von CRP in Lymphozyten <i>in vitro</i>)	33
3.5	Synthese von CRP in Nierenzellkarzinomen <i>in vivo</i>	33
3.5.1	Immunhistochemie	34
3.5.2	PCR	37
4.	Diskussion	42
4.1	Präoperative Plasma-CRP-Werte	42
4.2	Postoperative Plasma-CRP-Werte	45
4.3	Tumorzelllinien	45
4.4	CRP-Expression durch Lymphozyten des peripheren Blutes	46
4.5	Synthese von CRP in Nierenzellkarzinomen <i>in vivo</i>	47
4.6	CRP als prognostischer Indikator maligner Erkrankungen	51
4.7	Einfluss des CRP in der Pathogenese nicht maligner Erkrankungen	53
5.	Zusammenfassung	55
6.	Abkürzungen	57
7.	Literaturverzeichnis	58
8.	Anhang	66
	Danksagung	73
	Lebenslauf und Publikation	74

1. Einleitung

1.1 C-reaktives Protein

Das C-reaktive Protein wurde bereits 1930 von Tillett und Francis als Substanz entdeckt, welche mit dem C-Polysaccharid der Zellwand von Pneumokokken (*Streptococcus pneumoniae*) reagierte [Tillett und Francis, 1930]. Während der Arbeit mit Pneumokokken-Extrakten isolierten sie eine als Fraktion C bezeichnete Substanz, welche bei Zugabe von Plasma von Patienten mit akuter Pneumokokken-Pneumonie Präzipitate bildete. Diese Präzipitatbildung war auf das akute Krankheitsstadium begrenzt, wurde jedoch auch bei anderen akuten bakteriellen Erkrankungen nachgewiesen – jedoch nicht bei Gesunden [Tillett und Francis, 1930; Pepys, 1981]. Erst später erfolgte die genauere Charakterisierung der C-reaktiven Substanz als ein Protein, welches zur Bindung an das C-Polysaccharid befähigt ist und sie erhielt den Namen C-reaktives Protein. Inzwischen ist die Calcium-abhängige Bindung an deren Phosphocholinreste erkannt worden [Volanakis, 2001].

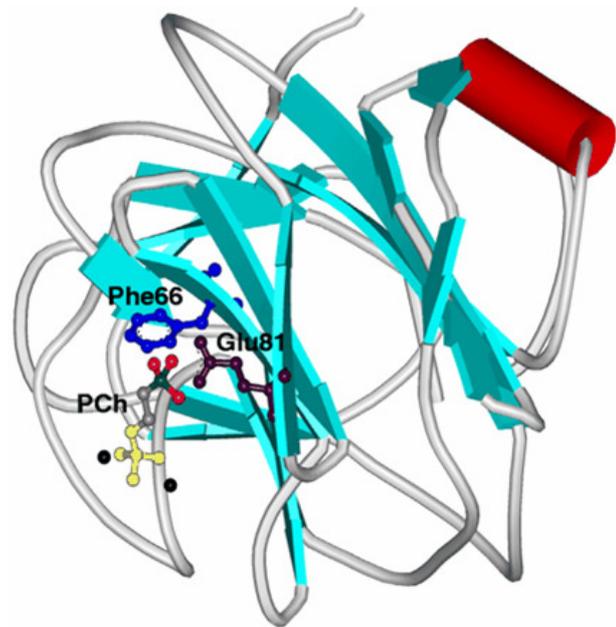
1.1.1 Struktur und Bindungsverhalten

Das C-reaktive Protein kommt in vielen Spezies vor, in Säugetieren ebenso wie in Fischen und dem phylogenetisch weit entfernten Pfeilschwanzkrebs, *Limulus polyphemus*. Im Laufe der Evolution ist die Struktur des CRP jedoch sehr gut erhalten geblieben [Kolb-Bachofen, 1991]. Das menschliche C-reaktive Protein gehört zur Familie der Pentraxine und enthält fünf identische, nicht glykolysierte Polypeptiduntereinheiten, welche jeweils aus 206 Aminosäuren bestehen [Pepys und Hirschfield, 2003]. Diese fünf Einheiten – oder Protomere – ordnen sich symmetrisch, nicht kovalent gebunden, um ein Zentrum an [Volanakis, 2001]. Die Struktur ähnelt dabei dem Pentraxin Serum-Amyloid-P (SAP). Alle fünf Protomere besitzen die gleiche Orientierung und jeweils zwei verschiedene gegenüberliegende Bindungsstellen. Die eine Seite dient der Erkennung von Phosphocholinresten, z.B. in Bakterienzellwänden, das gegenüberliegende Areal ist für Effekte auf das Komplementsystem [Volanakis, 2001] verantwortlich. Die Bindung von Liganden, wie Phosphocholinen oder Galactanen [Kolb-Bachofen, 1991], die Calcium-abhängig erfolgt [Volanakis, 2001], bewirkt nach Komplexierung durch das CRP-Molekül eine Konformationsänderung des Proteins. In Abwesenheit von Calcium bindet CRP Polykatione, z.B. Polylysine.

**Abbildung 1:
Modell eines monomeren
CRP-Moleküls in Bindung
mit einem
Phosphorylcholin-Rest
(PCh)**

Dargestellt sind außerdem
die beiden für die spezifische
Bindung essentiellen
Aminosäuren Phe66 und
Glu81 sowie die beiden
komplexierten Ca^{++} -Ionen
(schwarze Punkte).

(nach Volanakis, 2001)



Es konnten viele verschiedene Liganden mit unterschiedlicher Bindungsaffinität für CRP eruiert werden, zum Beispiel endogene Faktoren wie apoptotische Zellen [Gershov et al., 2000], Chromatin, DNA, Histone [Du Clos et al., 1988], Fibronectin, VLDL und LDL, aber auch exogene Liganden wie Bakterien, Pilze und Agarose [Kolb-Bachofen, 1991]. Phosphocholine besitzen die größte Bindungsaffinität zu CRP und sie kommen, außer in Lipopolysacchariden von Bakterien und anderen Mikroorganismen, auch an der Außenseite vieler biologischer Membranen als polare Gruppe von Lecithin und Sphingomyelin vor [Volanakis, 2001]. Dabei erfordert die Bindung von CRP das Vorhandensein von Lysolecithinen oder das Wirken des in der Leber produzierten Enzyms Phospholipase A₂ (PLA₂), welche in der Lage ist, Phospholipide zu hydrolysieren. Die Wirksamkeit der humanen PLA₂ ist dabei auf Phospholipide der inneren Zellmembranen begrenzt, so dass sie erst durch den Austausch (Flip-Flop) der Phospholipide zwischen innerer und äußerer Zellmembran zum Einsatz kommen kann. Das Enzym erzeugt Lysophospholipide, einschließlich Lysolecithin, wodurch eine Bindung des CRP an Phosphocholin der Zelloberfläche ermöglicht wird. Nach Martin et al. findet der Membran-Flip-Flop in apoptotischen Zellen statt [Martin et al., 1995]. Die Abhängigkeit in der Bindungsspezifität des CRP macht die Bedeutung als Akut-Phase-Protein deutlich. Das Protein interagiert mit geschädigten oder strukturell veränderten Zellen, nicht jedoch mit normalen Zellen [Volanakis, 2001].

1.1.2 Funktion

CRP ist ein höchst sensibler Marker entzündlichen und geschädigten Gewebes. Aufgrund der vielseitigen Bindungsmöglichkeiten für CRP besitzt es eine Abräumfunktion, die in der Literatur anschaulich als „Straßenfeger“ beschrieben wird [Robey und Jones, 1986]. Die hauptsächliche Funktion des Moleküls besteht darin, pathogene und geschädigte Zellen zu erkennen und deren Elimination durch Rekrutierung des Komplementsystems und phagozytischer Zellen zu initiieren.

Das CRP-Molekül zeigt eine enge Interaktion mit dem Komplementsystem [Volanakis 2001]. CRP aktiviert durch Bindung an C1q und eine daraus resultierende Konformationsänderung den klassischen Komplementweg, wobei nur jeweils eine Seite pro Pentamer C1q binden kann [Agrawal et al., 2001]. Nach Bindung an C1q kommt es kaskadenartig zur Aktivierung der C3-Konvertase, welche C3 zu C3b spaltet, und damit eine Bindung an Pathogene ermöglicht. Spezifische Komplementrezeptoren auf Phagozyten erkennen C3b und initiieren die Opsonierung von Pathogenen und die Entfernung von Immunkomplexen. Eine Opsonierung von Pathogenen, wie Bakterien oder Zellen, durch CRP hat die Phagozytose sowohl durch Makrophagen als auch durch neutrophile Granulozyten zur Folge. Innerhalb der Komplementkaskade ist CRP jedoch nicht in der Lage, den über eine C5-Spaltung erreichten Membranangriffskomplex zu induzieren [Jewell et al., 1993]. Dies liegt an der gleichzeitigen Interaktion von CRP mit dem Faktor H, einem natürlich vorkommenden Inhibitor des Komplementsystems. CRP wirkt in diesem Zusammenhang demnach nicht zwingend proinflammatorisch oder membranschädigend [Gershov et al., 2000; Volanakis, 2001; Bhakdi et al., 2004]. Diese Funktion des CRP unterstreicht seine herausragende Bedeutung für die Akut-Phase-Reaktion, in der es primär um Gewebeerhaltung und -rekonstitutionierung und weniger um Gewebeerstörung geht.

1.1.3 Stellenwert in der medizinischen Diagnostik

Als unspezifischer Entzündungsmarker eignet sich das CRP besonders gut zum Nachweis einer Akut-Phase-Reaktion. Die mittlere CRP-Konzentration bei Gesunden beträgt 0,8 mg/l (Referenzwert < 5 mg/l); sie kann jedoch unter Stimulation sehr schnell über mehr als 500 mg/l (10000-fach) ansteigen. Schon innerhalb von 48 Stunden kann ein Maximalwert erreicht sein, ebenso rasch kommt es wieder zu einer Normalisierung des CRP-Wertes. Die Plasma-Halbwertszeit von 19 Stunden bleibt unter allen Bedingungen konstant und zeigt, dass der einzig entscheidende Faktor der zirkulierenden CRP-Konzentration die Syntheserate ist.

Folglich reflektiert die stimulierte CRP-Produktion die Intensität des vorliegenden pathologischen Prozesses [Pepys und Hirschfield, 2003].

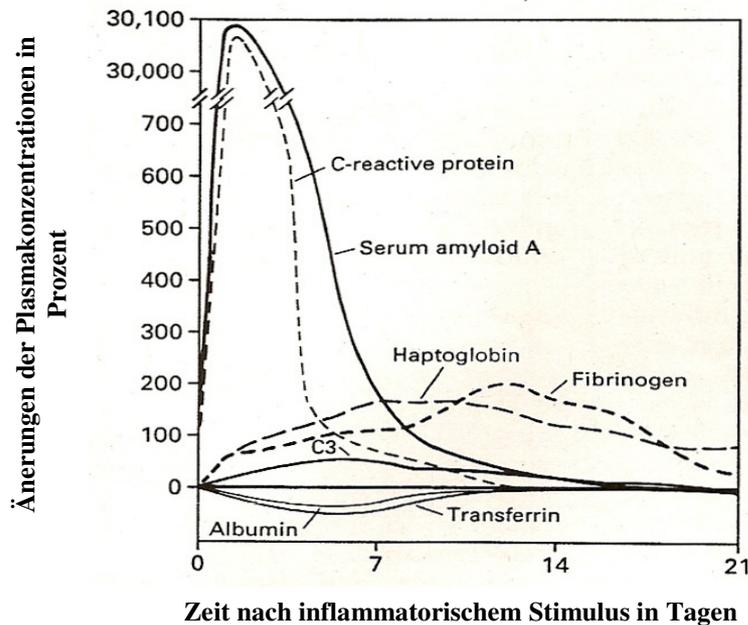
Da der Grad der CRP-Steigung gut mit der Schwere eines Krankheitsbildes korrespondiert, wird es als sensitives Zeichen einer Gewebeschädigung sowohl zum *Screening* von Organerkrankungen als auch zur Therapiekontrolle verwendet. Es existieren präzise immunochemische Tests für CRP, die schnell und einfach zu handhaben sind. Die Beurteilung des CRPs erfolgt immer im Hinblick auf die jeweilige Klinik und zusätzlicher diagnostischer Verfahren. Als besonders potenter Stimulus gelten bakterielle Infektionen. Nach Therapie zeigt sich eine schnelle Remission des CRP-Wertes. Gleichzeitig stellt CRP einen Index für die Krankheitsaktivität, z.B. eines Morbus Crohn oder einer Vaskulitis, dar. CRP kann bei Krankheiten ohne wesentlichen CRP-Anstieg (Colitis ulcerosa, Leukämie, Lupus erythematodes) das Vorliegen einer interkurrenten Infektion anzeigen. Diskutiert wird die prognostische Wertigkeit des CRPs im Hinblick auf Erkrankungen, wie rheumatoide Arthritis [van Leeuwen et al., 1994] oder auch Tumorerkrankungen.

Die Ermittlung der Blutkörperchengeschwindigkeit (BSG) als Indikator der Akut-Phase-Reaktion ist gegenüber der CRP-Bestimmung zurückgedrängt worden, da sie häufig ungenaue oder sogar fehlerhafte Werte liefert und in Abhängigkeit von Alter und Nahrungsaufnahme träger reagiert.

1.2 Akut-Phase-Reaktion

Als Akut-Phase-Reaktion werden Effekte sowohl auf Gewebeschäden, Infektionen, Entzündungen als auch auf das Vorkommen maligner Neoplasien bezeichnet [Pepys und Hirschfield, 2003]. Dabei kommt es zu einer Reihe unspezifischer physiologischer und biochemischer Reaktionen im betroffenen Organismus. Unter der Kontrolle von Zytokinen erfolgt eine Änderung der Spiegel verschiedener Plasmaproteine, zu der das als erstes beschriebene Akut-Phase-Protein CRP gehört. Neben CRP existieren noch weitere Proteine, deren Konzentrationen sich im Falle einer Entzündung im Körper ändern. Sie dienen der Lokalisation des Entzündungsprozesses, der Verhinderung ihrer Ausbreitung oder versetzen den Organismus in die Lage, sich adäquat auf die neue Situation einzustellen.

Abbildung 2: Änderungen der Plasma-Konzentrationen einiger Akut-Phase-Proteine nach inflammatorischem Stimulus [aus: Gabay und Kushner, 1999, modifiziert nach Gitlin und Colten, 1987]



Die Akut-Phase-Reaktion beinhaltet nicht nur ein Ansteigen (z.B. CRP, Komplementfaktoren, Fibrinogen, Antiproteasen, Haptoglobin, Phospholipase A₂), sondern auch den Abfall bestimmter Plasmaproteine (z.B. Albumin, Transferrin, *Insulin-like growth factor I*), was letztlich auf eine Veränderung der Synthese zurückgeführt wird. Das Maß des An- bzw. Abstiegs variiert von Protein zu Protein gewaltig. Auch können Patienten mit der gleichen Erkrankung in unterschiedlichem Maße Proteinveränderungen aufweisen [Gabay und Kushner, 1999].

1.2.1 Ablauf und beteiligte Strukturen

Die Antwort auf ein akutes Ereignis wird in jedem Fall individuell reguliert und findet seinen Ausdruck in der unterschiedlichen Weise der Produktion spezifischer Zytokine und ihrer Modulatoren in verschiedenen pathophysiologischen Stadien [Gabay und Kushner, 1999]. Das durch die Entzündung geschädigte Gewebe veranlasst aktivierte Zellen (sowohl Makrophagen als auch Endothelzellen und Fibroblasten) zur Produktion von Zytokinen, die als interzellulär wirksame Signalphosphopeptide agieren – zumeist IL-1 und IL-6. Viele Studien belegen auch eine Interaktion der Zytokine untereinander [Xing et al., 1998], so dass die Zytokine einem großen komplexen Netzwerk des Signalaustausches gleichen. Es ist bekannt, dass diese auf dem Blutweg zur Leber gelangen und dort durch spezifische Zytokinrezeptoren gebunden werden. Danach lösen diese die Biosynthese und Sekretion der Akut-Phase-

Proteine aus. Hauptsächlich ist die Genexpression der Akut-Phase-Proteine auf transkriptioneller Ebene geregelt [Gabay und Kushner, 1999], teilweise auch posttranskriptionell [Jiang et al., 1995].

Hurlimann et al. identifizierten 1966 über Immundiffusion und Autoradiographie C^{14} -markierter Proteine die Leber als einzigen Ort der CRP-Synthese [Hurlimann et al., 1966]. Später wurde diese Funktion den Hepatozyten zugeordnet [Kushner et al., 1978]. Mehr als 30 Jahre dauerte es, bis nicht zuletzt durch sensitivere Analysetechniken, auch in neuronalen Pyramidenzellen CRP nachgewiesen wurde [Yasojima et al., 2000]. Ebenso zeigten Gould und Weiser eine CRP-Expression respiratorischer Epithelzellen [Gould und Weiser, 2001]. Ein gezielterer Nachweis von CRP in lokalisierten Entzündungen und Gewebsveränderungen ist Gegenstand aktuellerer Forschungsbemühungen. Der Nachweis einer extrahepatischen CRP-Synthese gibt dem Einfluss des CRPs als Bindeglied zwischen angeborenem und erworbenem Abwehrsystem eine neue Bedeutung.

1.2.2 Bedeutung für den menschlichen Organismus

Die Wichtigkeit der Akut-Phase-Reaktion im Sinne einer Adaptation des Organismus an einen schädigenden Stimulus (Abwehr von Pathogenen oder der Reparatur geschädigten Gewebes) wurde bereits herausgestellt. Als ein komplexer und hoch organisierter Prozess, der viele Zelltypen und Moleküle einschließt [Kushner et al., 1998], birgt der hohe Einsatz dieser Schutzmechanismen auch gewisse Risiken. Besonders die lange Persistenz einer Akut-Phase-Antwort, beispielsweise bei fortgeschrittenen Krebserkrankungen, führt zu metabolischen Störungen. So löst die Akut-Phase-Antwort auch auf biochemischer und physiologischer Ebene Veränderungen im gesamten Organismus aus. Neben dem Ansteigen der Cortisol- und Adrenalinpiegel kommt es zur Anämie, Leuko- und Thrombozytose, ebenso zu Fieber, Somnolenz und Anorexie, um nur einige Beispiele zu nennen. Metabolische Veränderungen wie der Muskelverlust, sinkende Glykoneogenese und Osteoporose, aber auch gesteigerte Lipolyse im Fettgewebe führen letztlich zum Bild der Kachexie. Im extremsten Fall kann es durch die zytokininduzierten Veränderungen zu einem septischen Schock kommen [Bone et al., 1996]. Es wird deutlich, dass die Akut-Phase-Reaktion nicht nur einen positiven Effekt auf den Organismus ausübt. Es kann spekuliert werden, warum es zu oben genannten Beeinflussungen innerhalb des Kampfes gegen den Entzündungsprozess kommt, sei es ein gewünschter niedriger Energiebedarf des Körpers zugunsten der Abwehrreaktion oder der Bereitstellung von Substraten zur Regeneration geschädigter Membranen.

1.3 Nierenzellkarzinom

1.3.1 Inzidenz, Einteilung, Pathologie

Das früher als hypernephroides Karzinom bezeichnete Nierenzellkarzinom (RCC = *renal cell carcinoma*) ist die in der Niere am häufigsten vorkommende maligne Neoplasie. Mit einem Anteil von 3 % an allen malignen Geschwülsten liegt die Inzidenz in Deutschland bei 14000 Neuerkrankungen pro Jahr (USA 36000), wobei das Verhältnis von Männern zu Frauen 2:1 beträgt. Bevorzugt werden RCC zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr diagnostiziert.

Es handelt sich bei Nierenzellkarzinomen um eine heterogene Gruppe von Tumoren epithelialen Ursprungs, die histologisch und morphologisch klassifiziert werden. Der klarzellige Karzinomtyp, der sich durch ein klares glykogenhaltiges Zytoplasma auszeichnet, stellt mit 60 % der Fälle das häufigste Entartungsmuster dar. Von den proximalen Tubulusepithelzellen ausgehend, wächst er sowohl azinär als auch sarkomatoid und besitzt gewöhnlich eine Deletion auf Chromosom 3. Vermutlich ist für das Entstehen des RCC der Verlust eines Tumor-Suppressorgens verantwortlich. Dem gleichen Ursprungsort entstammen die selteneren (Häufigkeit 5 – 15 %) papillären, auch chromophil genannten Karzinome, dessen Zytoplasma als eosinophil bzw. basophil imponiert und vorwiegend in tubulopapillären Mustern wächst. Oft kommen sie multifokal vor und zeigen eine Trisomie von Chromosom 7 oder 17. Aus den Sammelrohren hervorgehende Karzinomtypen wie das chromophobe Karzinom mit seinem feinetzigen, nicht transparenten Zytoplasma (Häufigkeit 5 – 10 %), aber auch das vom Ductus-Bellini-Typ (Häufigkeit < 1 %), zeigen variable Wachstumsmuster. Letztere treten gehäuft bei jüngeren Patienten auf und verhalten sich äußerst aggressiv. Auch hier kommen verschiedenste Chromosomenverluste innerhalb der Tumorzytogenetik vor.

1.3.2 Diagnostik, Überlebenszeit, Therapie

Oft fallen Nierentumoren als radiologischer Zufallsbefund im Rahmen einer renalen Sonographie auf. Die weiterführende bildgebende Diagnostik, wie die Computertomographie oder die Magnetresonanztomographie, erhärten den Verdacht, wobei die intraoperative histopathologische Untersuchung eines Schnellschnittes die Diagnose endgültig sichert. Erst bei Vorliegen größerer Tumoren treten klassische Symptome wie der Flankenschmerz oder eine tastbare Raumforderung auf. Eine Hämaturie findet sich bei Einbruch des Tumors in das Hohlsystem.

In bis zu 20 % der Fälle werden paraneoplastische Veränderungen beschrieben. Hierzu zählt vor allem das so genannte Stauffer-Syndrom als Leberdysfunktion, aber auch eine Erythrozytose, Hyperkalzämie und eine Dysfibrinogenämie. Das Auftreten einer Anämie wird häufig als Zeichen einer fortgeschrittenen Erkrankung beobachtet. 70 – 75 % der Patienten zeigen eine deutliche Beschleunigung der BSG. Zum jetzigen Zeitpunkt ist kein Tumormarker innerhalb der Diagnostik des Nierenzellkarzinoms etabliert. Jedoch ist die klinische Bedeutung möglicher Tumormarker Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen, auf die im Verlauf dieser Arbeit noch weiter eingegangen wird.

Es bestehen verschiedene Möglichkeiten der Stadieneinteilung des RCC, die Klassifikation nach Robson [Robson-Klassifikation, 1969] und die nach dem TNM-System, welches von der UICC (Union International Contre Cancer) veröffentlicht wird. Die Unterscheidung der Tumoren nach Größe, lokaler Ausdehnung, beispielsweise auf Nachbarorgane oder die Infiltration von Nierenvene oder Vena cava, jedoch auch das Auftreten von Lymphknoten- und Fernmetastasen sind relevant für die Prognose des Patienten. Häufig metastasiert das RCC hämatogen in die Lunge und ins Mediastinum, aber auch Leber, kontralaterale Niere, Gehirn und das Skelettsystem sind betroffen. Seltener sind lymphogene Metastasierungen. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung sind 40 % der Nierenzellkarzinome in einem lokalisierten Stadium, 30 % sind metastasiert und 30 % erscheinen lokalisiert, entwickeln jedoch im weiteren Krankheitsverlauf Spätmetastasen [Chan et al. 1998].

Die Überlebenszeit ist entscheidend vom primären Tumorstadium abhängig [Kozak et al., 1996]. Durch den Einsatz sensitiver radiologischer Schnittbildverfahren kann eine steigende Anzahl von Nierenzellkarzinomen schon im frühen Tumorstadium erkannt werden, was die Überlebenszeit dieser Patienten verlängert. Ebenfalls besteht bei papillären RCC eine bessere Prognose als bei nicht-papillären Formen [Cheville et al., 2003]. Insgesamt beträgt die mittlere Überlebenszeit von Nierenzellkarzinomen 12 bis 15 Monate und weniger als 10 % aller Patienten leben länger als 5 Jahre [Jemal et al., 2004].

Die Standardtherapie lokalisierter, nicht metastasierter Tumoren ist die radikale Tumornephrektomie. Diese beinhaltet die En-bloc-Resektion der Gerota-Faszie mit der Niere, der ipsilateralen Nebenniere und den lokoregionären Lymphknoten. Die Exstirpation des Primärtumors hat vielfach eine Regression möglicher auftretender Sekundärtumoren zur Folge. Auch Patienten mit Stauffer-Syndrom profitieren von einer Operation, da in diesem Fall die hepatische Dysfunktion oft reversibel ist. Ob eine Lymphknotenentfernung sinnvoll ist, wird kontrovers diskutiert [Schafhauser, 1999]. Eine Steigerung der Fünf-Jahres-

Überlebensrate ist nicht endgültig gesichert, jedoch wird die Lymphadenektomie für das Tumorstaging und zur Abschätzung der Prognose benötigt.

Nierenteilresektionen stellen eine Therapieoption bei Patienten mit kleinen Primärtumoren bzw. Einzel- oder Restnieren dar. *Ultima ratio* der chirurgischen Therapie des RCC ist die so genannte Work-bench-Operation, bei welcher die Niere, zugehörige Gefäße und ein großer Teil des Harnleiters entfernt werden. Anschließend wird der Tumor ex vivo steril entfernt und das versorgte Nierenparenchym einschließlich Nierenkapsel autolog transplantiert [Brkovic, 1988].

Die Therapie des metastasierten RCC ist vielseitig und bildet die Grundlage vieler wissenschaftlicher Untersuchungen. Die palliative Tumornephrektomie scheint den Patienten Vorteile zu bringen. Dies ist unstrittig, wenn der Primärtumor lokale und allgemeine Komplikationen zeigt. Ebenso traten nach Tumorentfernung spontane Metastasenremissionen auf [Levy, 1998]. Patienten, die einer Nephrektomie unter Interferontherapie zugeführt wurden, hatten gegenüber denen mit ausschließlicher Interferontheapie einen Überlebensvorteil [Flanigan et al., 2000].

Eine wirksame Chemotherapie des metastasierten RCC gibt es nicht [Bokemeyer, 1999], da das RCC als „Multidrug“-resistent gilt. Dagegen existieren viel versprechende immunologische Therapieansätze. Eingesetzt werden hierbei Interleukin-2 und Interferon- α . Neuere Strategien zielen auf die Induktion der T-zell-vermittelten Immunität ab. Kugler et al. zeigte durch eine Hybridzell-Vakzinierung aus Tumor- und dendritischen Zellen ein Ansprechen der metastasierten Tumoren von 41 % und ein Auftreten von sowohl partiellen als auch kompletten Remissionen [Kugler et al., 2000]. Gebräuchliche Therapiekonzepte sind die Kombination aus Immun- und Chemotherapie (Interferon- α 2a und Vinblastin oder Interleukin-2 und 5-Fluorouracil), wodurch zwar hohe Ansprechraten erzielt werden können, jedoch ein Überlebensvorteil dieser Patienten nicht nachgewiesen wurde.

Unabhängig vom Tumorstadium tragen verschiedene Risikofaktoren zur Prognose bei. Neben dem Allgemeinzustand der Patienten, dem Diagnosezeitpunkt und einer Metastasierung spielen molekulare Marker als potentielle Prognoseparameter eine Rolle. Eine erhöhte BSG sowie veränderte Spiegel von CRP und anderen Akut-Phase-Proteinen schränken die Prognose ein [Ljungberg et al., 1995]. Interleukin-6 kann in diesem Zusammenhang als mögliche Schlüsselsubstanz angesehen werden [Wechsel, 1999]. Insgesamt sollten jedoch aufgrund der intratumoralen Heterogenität von RCC prognostische Aussagen mit Vorsicht geäußert werden [Henzler et al., 1992].

1.4 CRP und Karzinome

Es ist unumstritten, dass Karzinome durch Veränderungen auf zellulärer Ebene den gesamten Organismus beeinflussen können. Diese Veränderungen betreffen nicht nur die lokale Größenzunahme, sondern auch den Stoffwechsel in seiner Gesamtheit. So finden sich erhöhte CRP-Werte bei Patienten mit Malignomen, besonders bei denen, die metastasiert sind. Der hohe CRP-Wert scheint mit Tumoreigenschaften und der Prognose des Patienten zu korrelieren [Pepys und Baltz, 1983]. Um die Rolle des CRP im Verlauf maligner Krankheitsprozesse beurteilen zu können, bedarf es weiterer intensiver Forschungsbemühungen. Es existieren bereits Indizien für eine mögliche lokale Produktion durch Tumorzellen *in vitro* [Ramage et al., 2004]. Ebenso ist die Beteiligung an der Ausbildung paraneoplastischer Syndrome einschließlich des Kachexie-Syndroms denkbar. Die Kachexie ist eine der häufigsten Todesursachen fortgeschrittener Tumore. Hierzu trägt unter anderem die Wirkung proinflammatorischer Zytokine als auch die der produzierten Akut-Phase-Proteine bei. In diesem Zusammenhang wird die Bedeutung des CRP als Tumormarker, Risikofaktor oder prognostischer Indikator diskutiert [Masuda et al., 1998; Atzpodien et al., 2003; Nozoe et al., 2003].

1.5 Fragestellung

In der Literatur ist immer wieder ein bei Karzinomen vorkommender erhöhter CRP-Plasmaspiegel beschrieben [Pepys und Baltz, 1983; Wigmore et al., 2001; Wu et al., 1996; Nozoe et al., 1998]. Ebenso bestätigte ein Anstieg des Plasma-CRP im postoperativen Verlauf oftmals eine erneute Tumorprogression [Masuda et al., 1998; Atzpodien et al., 2003; Casamassima et al., 2005]. Nach Untersuchungen, die die Synthese von CRP durch Nierentubulusepithelzellen *in vitro* und *in vivo* zeigten [Jabs et al., 2003], ist es von großem Interesse, eine mögliche Synthese von CRP durch Karzinomzellen der Niere zu analysieren. Aus diesen Überlegungen heraus ergaben sich folgende Fragen:

1. Sind Tumorzelllinien *in vitro* befähigt, CRP zu produzieren? Zeigen demgegenüber auch Lymphozyten des peripheren Blutes unter Stimulation eine CRP-Synthese?

2. Findet sich eine CRP-Synthese in Nierenzellkarzinomen *in vivo*, sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene?
Gibt es eine Abhängigkeit eines CRP-Nachweises vom Tumorstadium, dem Grad der Differenzierung oder des histologischen Subtyps?

3. Welche Rolle spielt der CRP-Spiegel im Plasma von Patienten mit Nierenzellkarzinom?
Korreliert die Höhe einer CRP-Expression im Tumor mit Plasma-CRP-Werten?

2. Material und Methoden

2.1 Geräte

- Abi Prism 7700 Sequence Detection System (Perkin Elmer (PE), Applied Biosystems, Weiterstadt)
- Analysenwaage AG204 Delta Range® (Mettler Toledo, Gießen)
- Binokulares Labormikroskop Standard 20, Typ B (Zeiss, Oberkochen)
- Brutschrank 37°C Biocenter 2001 (Salvis, Reussbühl, Schweiz)
- Halbmikro-Küvetten aus Quarzglas Suprasil Typ® 104-QS (Hellma, Müllheim/Baden)
- Jung Frigocut 2800E (Leica Instruments GmbH, Nussloch)
- Labofuge M (Heraeus, Osterode)
- Lichtmikroskop Typ ID 03 (Zeiss, Oberkochen)
- Magnetheizplatte/Magnetrührer IKAMAG® (IKA-Labortechnik, Staufen)
- Metallblock-Thermostat Unitek HB 130 (Heb-Labor-Consulting, München)
- Mikroskop mit Kameraaufsatz: Axioskop, Kamera M 35 W (Zeiss, Oberkochen)
- pH-Meter 90 WTW (Wiss. Technische-Werkstätten, Weilheim)
- Pipetboy acu (Integra Biosciences, Fernwald)
- Rüttler VF2 (IKA®-Labortechnik, Staufen)
- Spectrophotometer: LKB Ultrospec III, Deuterium-Lampe (Pharmacia, Freiburg)
- Sterilwerkbank danLAF® Microbiological Safety Cabinet Class II, VFR 1206 (Claus Damm, Fredensborg, Dänemark)
- Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg)
- Wasserbad DC1/12P (ThermoHaake, Karlsruhe)
- Zentrifuge 5417C (Eppendorf, Hamburg)
- Zytozentrifuge Cytospin 2 mit Metallhalter (Shandon, Pittsburgh, USA)

2.2 Laborbedarf

- Cytospins Shandon Single Cytofunnel® with white filter cards (Thermo Electron Corporation, Pittsburgh, USA)
- Deckgläser 24 x 50 mm (Menzel, Braunschweig)
- Einmal-Filter FP 030/3, 0,2 µm (Schleicher & Schuell, Dassel)
- Eppendorf Pipetten 0,1 - 2,5 µm, 0,5 - 10 µm, 10 - 100 µm, 50 - 250 µm, 200 - 1000 µm (Eppendorf, Hamburg)
- Faltenfilter 595 ½, Durchmesser 150 mm (Schleicher & Schuell, Dassel)

- Finnpipette® 0,5 - 10 µm, 5 - 40 µl, 40 - 200 µl, 200 - 1000 µl (Labsystems, Helsinki, Finnland)
- Glaspasteurpipetten (Hirschmann, Eberstadt)
- Lab-Tek™ II-Chamber Slide™ System (Nunc, Wiesbaden)
- Li-Heparin-Monovette 7,5 ml (Sarstedt, Nümbrecht)
- Mikro-Amp® Optical Caps (PE Applied Biosystems, Weiterstadt)
- Mikro-Amp® Optical Tubes (0,2 ml) (PE Applied Biosystems, Weiterstadt)
- Mikro-Schraubröhren 1,5 ml (Sarstedt, Nürnberg)
- Objektträger Super Frost Plus (Menzel, Braunschweig)
- Pipettenspitzen -2,5, -10, -1000 µl (Greiner, Frickenhausen); -100 µl (Sarstedt, Nümbrecht)
- Pipettenspitzen Safeseal-Tips, 2,5, -10, -100, -200, -1000 µl (Biozym, Oldendorf)
- PS Mikroplatte, 96 Well (Greiner, Frickenhausen)
- Reagiergefäße Mikrotubes 1,5 ml Safety cap (Sarstedt, Nümbrecht)
- Reaktionsgefäße Multiply® Pro-0,5 ml (Sarstedt, Nümbrecht)
- Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml, wattiert (Sarstedt, Nümbrecht)
- Strip-Ease PCR Trays-R (Robbins, Sunnyvale, USA)
- Tissue-Tek® Cryo 2000, Cryomold® Biopsy, Inner Diameter- 0,65 in, Depth- 0,26 in (Sakura, USA)
- Tru-Cut Biopsienadeln 14 Ga. TW x 4,5 (11,4 cm) Pharmaseal (Allegiance, McGaw Park, USA)
- Zell Gewebekulturflaschen 75 cm² mit Belüftung (Sarstedt, Nümbrecht)
- Zentrifugenröhrchen 15 ml, Spitzboden (Sarstedt, Nümbrecht)
- Zentrifugenröhrchen 50 ml, konische Röhrchen (Falcon, Heidelberg)

Reagenzien, Kulturmedien, Antikörper, Primer und Sonden sind bei den entsprechenden Methoden aufgeführt.

2.3 Patienten

In Zusammenarbeit mit der Klinik für Urologie (PD Dr. med. C. Doehn) des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Lübeck wurden initial 47 Patienten mit dem Verdacht auf das Vorliegen eines Nierenzellkarzinoms untersucht. Bei den betreffenden Patienten wurden intraoperativ nach Tumornephrektomie Biopsien aus dem Tumor zur weiteren Diagnostik entnommen (s. u.). Die Patienten waren diesbezüglich aufgeklärt und mit

der Entnahme einverstanden. Diese Studie war von der Ethikkommission der Universität zu Lübeck (Aktenzeichen 05-122) genehmigt worden. Die Tumornieren selbst wurden in Formalin fixiert und durch das hiesige Institut für Pathologie gemäß den Leitlinien der UICC [Union International Contre Cancer; Guinan et al., 1997] und nach Thoenes et al. klassifiziert [Thoenes et al.; 1986].

Da nur 40 der 47 untersuchten Tumoren tatsächlich Nierenzellkarzinomen entsprachen, beziehen sich alle folgenden Untersuchungen und Aussagen nur auf die 40 weiter analysierten Patienten mit Nierenzellkarzinomen. Die sieben Nierenraumforderungen, die sich nicht als Nierenzellkarzinom identifizieren ließen, entsprachen chronisch aktiven granulierenden oder eitrig abszedierenden Pyelonephritiden, ebenso wie anderen chronisch nekrotisierenden granulomatösen Entzündungen der Niere. Die genaue Histologie inklusive Tumorstadium und -grad ist in Tabelle A (im Anhang) wiedergegeben.

2.4 Probengewinnung und -verarbeitung

Die Probengewinnung erfolgte auf zweierlei Wegen. Für eine anschließende RNA-Extraktion (s. u.) wurden zum einen mittels einer sterilen 14 G Tru-Cut-Biopsienadel ca. 15 mm lange Stanzzyylinder aus der entnommenen Niere gewonnen. Die Tumor-tragende Niere wurde dabei nach genauer makroskopischer Betrachtung in drei verschiedene Areale eingeteilt: Tumorzentrum, Tumorrand und nicht befallener, gesund erscheinender Nierenpol. Die Zylinder wurden sofort in sterile Eppendorf-Gefäße gegeben, welche einen Lysis-Puffer zum Gewebeverdaulichkeit, zur RNA-Stabilisierung und zur Inaktivierung von RNAsen enthielt (RLT Puffer, Qiagen). Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei -80 °C eingefroren.

Zum anderen wurden Proben für eine immunhistologische Untersuchung mittels Skalpell gewonnen. Die ca. 0,5 × 0,5 cm großen Gewebelöcher wurden wie zuvor aus dem Tumorzentrum, der Randzone und dem makroskopisch gesunden Gewebe entnommen. Die Blöcke wurden sofort vollständig mit Einbettmedium (*Tissue Freezing Medium*, Jung, Nussloch) bedeckt und ebenfalls bei -80 °C eingefroren.

2.5 Weitere Laboruntersuchungen

Zusätzlich wurde ein präoperativer Plasma-CRP-Wert sowie die Zahl an Gesamtleukozyten im Blut ermittelt und zur Bewertung der Untersuchungsergebnisse mit herangezogen. Bei 22 Patienten wurde präoperativ das Anlegen einer Urinkultur veranlasst, deren Ergebnisse ebenfalls dokumentiert und berücksichtigt wurden. Bei weiteren 20 Patienten wurde ca. vier

bis sechs Wochen postoperativ ein weiterer CRP-Wert im Plasma eruiert, welcher mit dem präoperativen Wert verglichen wurde.

2.6 Zellkultur

2.6.1 Zellkulturmedien und Reagenzien

- Fetal Calf Serum (FCS), hitzeinaktiviert bei 60 °C über 30 min (Biochrom)
- RPMI 1640 with L-Glutamine (Gibco BRL, Karlsruhe)
- IMDM Bio Whittaker™, Iscove´s Modified Dulbecco´s Medium with 25 mM HEPES, Cambrex Bio Science, Verviers, Belgium
- Biocoll Separating Solution (Biochrom)
- Interleukin-1 α , Tumornekrosefaktor- α (Tebu, Frankfurt a. M.)
- Interleukin-6 (Serva, Heidelberg)
- Lipopolysaccharid (Sigma)
- Phosphate buffered saline (PBS) w/o Ca²⁺, Mg²⁺, pH 7,2 (Biochrom)
- Tryptanblau (Sigma)

2.6.2 Tumorzelllinien

Durch die freundliche Bereitstellung *in vitro* gezüchteter Tumorzellen durch das Institut für Immunologie (PD Dr. med. C. Frohn) und der Klinik für Urologie wurden unten genannte Zelllinien der molekularbiologischen und immunhistochemischen Untersuchung auf eine nachweisbare CRP-Expression unterzogen. Dabei wurde mit folgenden Tumorzellstämmen gearbeitet:

1. Caki
2. SK-RC 35
3. SK-RC 47
4. SK-RC 58

Die kultivierten Zellen wurden an der sterilen Werkbank bei Raumtemperatur weiterverarbeitet. Hierzu wurde das überstehende Medium aus der Kulturflasche abgesaugt und zusätzlich mit PBS (*Phosphate buffered saline*) ausgespült. Nach Zugabe von Trypsin, wurden die Zellen für ca. 5 Minuten im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Trypsin bewirkte eine Ablösung der Zellen, so dass diese Zellsuspension anschließend in ein Zentrifugenröhrchen, welches 10 ml FCS (*Fetal Calf Serum*) enthält, überführt werden konnte. Zugabe von FCS und Auffüllen mit PBS auf 50 ml bewirkte eine Inaktivierung des

Trypsins. Durch Zentrifugation bei 1000 Umdrehungen pro Minute (UpM) bei 4 °C setzte sich das Pellet am Boden des Zentrifugenröhrchens ab, welches nach Abkippen des Überstandes mit 1 ml (Caki) bzw. 2 ml (FK-RC 35, 47, 58) Medium resuspendiert werden konnte. Aus der Zellsuspension wurden 25 µl im Verhältnis 1:1 mit Tryptanblau (4 °C) gemischt, die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer (in Methanol) ermittelt und eine definierte Zellzahl in Kulturflaschen (1×10^6 Zellen/ Kulturflasche) zur Analyse mittels *real-time* PCR und Lab-Teks (3 oder 6×10^4 Zellen/ 500 µl) für die immunhistochemische Untersuchung, welche Kombinationen aus Objektträger und Zellkulturkammer darstellen, eingebracht. Beides wurde im Brutschrank für 48 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend konnte der Überstand der Kulturflaschen sowie der angefertigten Lab-Teks abgesaugt werden. Die Lab-Teks wurden mit 1,25 %-igem Glutaraldehyd (250 µl/well) eingedeckt und etwa eine Stunde bei Raumtemperatur fixiert. Hierauf konnten diese nach Verwerfen des Überstandes luftgetrocknet bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C eingefroren werden.

Die Zellen innerhalb der Kulturflasche wurden in 600 µl Lysispuffer geschwenkt und dann in einem 1,5 ml Reagiergefäß (Mikrotube) mit 6 µl β-Mercaptoethanol vermischt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden auch diese Reaktionsgefäße bei -80 °C eingefroren.

2.6.3 Lymphozyten des peripheren Blutes

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC), also Lymphozyten und Monozyten, wurden aus Lithium-Heparin-Vollblut gesunder Freiwilliger isoliert. Im unten beschriebenen Zeitintervall wurden die nach Monozytenadhärenz und -isolation gewonnenen Lymphozyten mittels angegebener Zytokine stimuliert und somit zur CRP-Expression angeregt. Gleichzeitig erfolgte die Untersuchung unstimulierter Proben als Kontrolle.

Um zunächst die Zellen zu isolieren, wurde das Vollblut im Verhältnis 1:1 mit PBS gemischt. Anschließend wurden langsam 2 Teile Blut auf 1 Teil *Biocoll Separating Solution* (Dichte $1,077 \text{ g/cm}^3$) geschichtet. Diese Lösung fungierte einerseits als Trennphase zwischen mononukleären Zellen, die eine geringere Dichte aufwiesen, sowie Erythro- und Granulozyten größerer Dichte andererseits. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 2400 UpM und 20 °C ohne Bremse ließ sich eine der Dichte entsprechende Schichtung erkennen. Erythro- und Granulozyten wanderten demnach durch die Ficoll-Schicht und setzten sich am Boden des Zentrifugenröhrchens ab, während sich Lympo- und Monozyten in einer Schicht zwischen Medium und Ficoll wiederfanden. Dieser weißlich, trübe Interphasering konnte abpipettiert werden. Um Lymphozyten und Monozyten voneinander zu trennen, wurden

CD14-markierte Dynabeads (Dyna[®], Oslo, Norway) eingesetzt. Hierbei handelt es sich um magnetische Partikel, welche befähigt sind, Monozyten zu binden.

Weiteres Vorgehen:

- Zellen mit 25 ml PBS mischen, Zentrifugation 10 min, 1000 UpM, 4 °C
- Überstand verwerfen und dem verbleibendem Pellet jeweils 4 ml RPMI 1640-Medium zufügen, resuspendieren und in Zellkulturflaschen überführen (zusätzlich 1 ml Medium zum Ausspülen zusetzen)
- Brutschrank über 30 min bei 37 °C (Monozyten setzen sich am Boden ab)
- Kulturflascheninhalt vorsichtig in ein Zentrifugenröhrchen abkippen, Zentrifugation 10 min, 1000 UpM, 4 °C
- Überstand abkippen und mit 6 ml PBS resuspendieren
- 250 µl CD14-markierter Dynabeads (Dyna[®], Oslo, Norway) hinzufügen und für 15 min. in Magnethalter halten
- Flüssigkeit in neues Zentrifugenröhrchen überführen und mit 1000 UpM bei 4 °C abzentrifugieren
- Überstand abkippen und mit 1 ml RPMI-Medium mischen
- jeweils 25 µl Lösung in ein Eppendorf-Gefäß geben und mit Trypitanblau mischen
- Zellzahl ermitteln in der Neubauer Zählkammer und mit Medium auf 10⁵ /ml einstellen
- beschriftete 24-Lochplatten mit je 20 x 500 µl Suspension bestücken (eine Lochplatte pro Proband), Inkubation für 6, 12, 24 und 48 Stunden, ohne Stimulation und Stimulation mit LPS 1 µg/ml, IL-1α 4 µg/ml, IL-6 1000 U/ml und TNFα 50 U/ml

sowie

- 100 µl in Cytospins pipettieren (jeweils eine Positiv- und Negativkontrolle pro Proband) und 5 min bei 70 UpM zentrifugieren

Die Cytospin-Präparate standen nach dem Lufttrocknen über 24 Stunden der immunhistochemischen Färbetechnik zur Verfügung.

Zur molekularbiologischen Untersuchung wurde der Lochplatteninhalt nach einem entsprechenden Zeitintervall von 6, 12, 24 und 48 Stunden resuspendiert und in einem Eppendorf-Gefäß für 5 min bei 2000 UpM zentrifugiert. Der Überstand konnte vorsichtig abpipettiert und verworfen werden. Das Zellpellet verblieb im Reaktionsgefäß und wurde mit

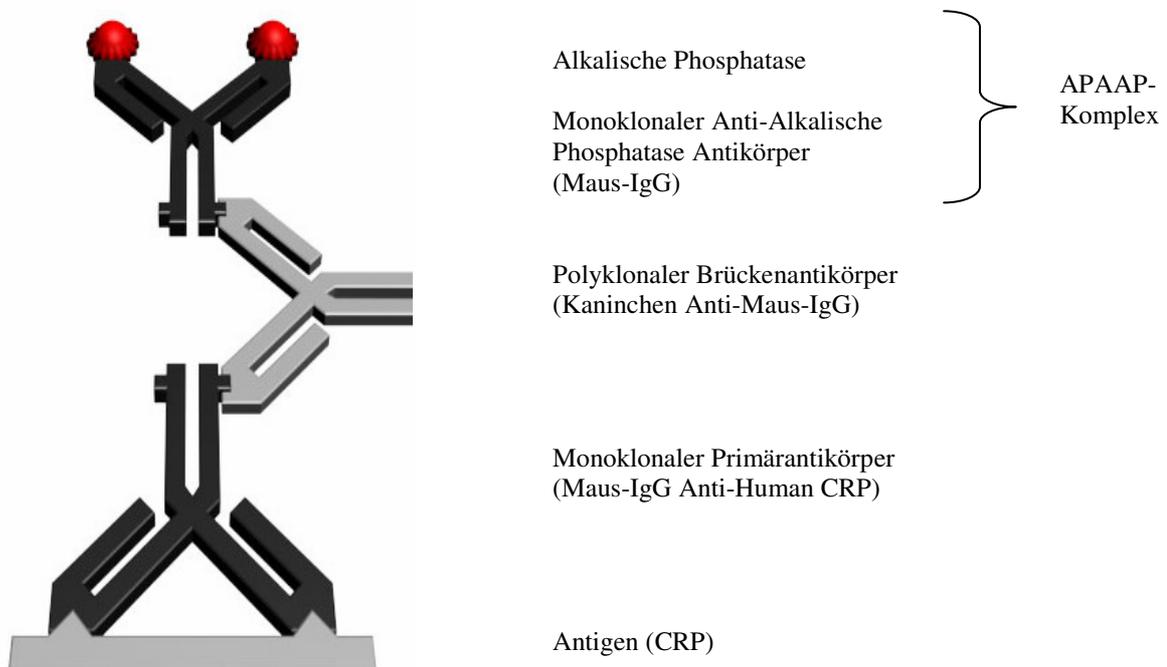
je 600 µl Lysis-Puffer und 6 µl β-Mercaptoethanol resuspendiert. Die Aufbewahrung bis zur weiteren Verwendung erfolgte in 1,5 ml-Reagenzgefäßen (Mikrotubes 1,5 ml Safety cap) bei -80 °C.

2.7 Immunhistochemie

Die APAAP-Methode (Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase) stellt eine empfindliche immunhistochemische Färbetechnik dar, die bei der Untersuchung von Gewebeschnitten und Zellabstrichen zur Anwendung kommt [Cordell et al., 1984]. Die Methode stützt sich auf die Reaktion löslicher, aber stabiler Enzym-Immunkomplexe [Boenisch, 1997], des APAAP-Komplexes, der hier als Tertiär-Antikörper fungiert. Dieser stammt von derselben Spezies wie der verwendete Primär-Antikörper, der mit der zu untersuchenden Zelle reagiert. Zwischengeschaltet befindet sich ein Brücken-Antikörper, der demzufolge auch Sekundär-Antikörper genannt wird. Der APAAP-Komplex besteht aus zwei Molekülen Alkalischer Phosphatase und einem dazugehörigen Antikörper [Boenisch, 1997].

Abbildung 3:

APAAP-Technik [modifiziert nach DAKO]



Die alkalische Phosphatase wird aus dem Intestinaltrakt von Kälbern isoliert und besitzt ein Molekulargewicht von 140 kD. Ihre Funktion bezieht sich auf die Hydrolyse und den

Transfer von Phosphatgruppen in organischen Estern, wobei die P-O-Bindung zerbrochen wird. Bei der Färbung selbst wird ein Naphtholphosphatester als Substrat verwendet (z.B. Naphthol-AS-BI-Phosphat), welches zu Phenolkomponenten und Phosphaten hydrolysiert wird. Die Phenole reagieren dann mit farblosen Diazoniumsalzen, so genannten Chromogenen, (z.B. Neufuchsin) und bilden unlösliche Azofarbstoffe. So können in einem kräftigen Rot die entsprechenden Antigen-Antikörper-Komplexe sichtbar gemacht werden. Letztendlich bietet es sich an, zur Kontraststeigerung eine Gegenfärbung mit einem blauen Farbstoff (z.B. Hämatoxylin) anzufertigen. Mit Hilfe des Lichtmikroskops ist es möglich, derartig gefärbte Schnitte in ihrer Morphologie und ihren immunologischen Begebenheiten zu beurteilen. Die APAAP-Methode diente als Nachweis von CRP in den Präparaten der Niere.

2.7.1 Herstellung von Gefrierschnitten

Hierzu wurde das bei -80 °C eingefrorene Material im Kryostat bei -20 °C in 4 - 5 µm dicke Schichten geschnitten, auf Objektträger gebracht und anschließend über Nacht (24 h) bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Sofern die Präparate nicht sofort weiterverarbeitet worden sind, wurden diese wiederum bei einer Temperatur von -80 °C in Aluminiumfolie verpackt eingefroren.

Um die Gewebeschnitte zu fixieren, wurden diese in gefrorenem Zustand für 10 min in einer Küvette mit 4 °C kaltem Aceton-TBS getaucht und anschließend luftgetrocknet. Danach konnte mit der immunhistochemischen Färbung begonnen werden.

2.7.2 Antikörper und Isotyp-Kontrolle

Primärantikörper: Monoklonales Anti-Human CRP, Maus IgG₁, Clone CRP-8. Der Antikörper erkennt ein Epitop der 24 kD Untereinheit von denaturiertem und reduziertem CRP, er reagiert ebenfalls mit nativem CRP (Sigma, USA), Aufbewahrung bei 2 - 8 °C, Verdünnung 1:1000 für Gefrierschnitte.

Isotyp-Kontrolle: Gereinigtes Maus IgG₁ (kappa), (BD Pharmingen Bioscience, Heidelberg), gleiche Konzentration wie Primärantikörper, Verdünnung 1:1000

Sekundärantikörper: Gereinigtes Kaninchen-Anti-Maus-Immunglobulin aus Kaninchen-Antiserum (2.7 g/l), reagiert mit allen Maus-Immunglobulin-Subklassen (Dako), Aufbewahrung bei 2 - 8 °C, Verdünnung 1:100

Tertiärantikörper: APAAP Maus Monoklonal, IgG₁ (kappa), 0,1 g/l, Komplex aus intestinaler Alkalischer Phosphatase von Kälbern und monoklonaler Maus Anti-Alkalischen Phosphatase (Dako), Verdünnung 1:100

2.7.3 Puffer und Verbrauchsmaterialien

- Aceton, 99,5 % Reinheit (Merck, Darmstadt)
- Tris: Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Serva, Heidelberg)
- Tris-Stammlösung: 12 g Tris auf 2000 ml Aqua dest. auf pH 7,4 eingestellt mit HCl
- Natriumchlorid reinst (Merck)
- Aqua dest.
- HCl 1 M (Apotheke des UKL)
- Tris buffered saline (TBS): 10,125 g NaCl auf 1125 ml Aqua dest. + 125 ml Tris-Stammlösung, Endkonzentration 5 mM Tris und 0,15 M NaCl
- 2 %-iges BSA/TBS: TBS und 2 % Bovines Serum-Albumin (BSA), Fraktion V (Sigma)
- Formaldehydlösung 37 % (Merck)
- Hämatoxylin nach Meyer (Apotheke des UKL)
- Aquatex (Merck)

Herstellung der Verdünnungspuffer

Zunächst wurden zwei Verdünnungspuffer hergestellt, um die gewünschten Konzentrationen der Antikörper zu erhalten.

Verdünnungspuffer 1: Tris buffered saline (TBS)

+ 2 % Bovines Serum Albumin (BSA)

Verdünnungspuffer 2: Tris buffered saline (TBS)

+ AB-Serum

2.7.4 Durchführung

Zur Untersuchung der Gewebeschnitte auf das immunhistochemisch nachweisbare Vorhandensein von CRP wurden pro Patient neun Schnitte angefertigt. Drei Proben aus den verschiedenen Entnahmestellen der Niere wurden mit dem Primärantikörper gelöst in 2%-igem BSA/TBS (Verdünnungspuffer 1) im Verhältnis 1:1000 inkubiert. Jeweils 100 µl wurden auf die Schnitte der Positiv-Kontrolle (CRP I, II und III) verteilt und für 30 Minuten in der feuchten Kammer inkubiert. Gleichzeitig erfolgte eine Isotyp-Kontrolle (Iso I, II, III) mit Immunglobulin G (gelöst in 2%-igem BSA/TBS) ohne spezifische Antigenbindungseigenschaften gleicher Konzentration an drei weiteren Proben unterschiedlicher Lokalisation, um eine antigenspezifische von einer antigenunspezifischen Färbung zu unterscheiden. Das Immunglobulin der Isotypkontrolle stellte den gleichen

Subtyp wie der Primärantikörper dar, besaß jedoch eine andere Spezifität. Letzte drei Schnitte dienten der Negativkontrolle (neg I, II und III) durch Zugabe von 2%-igem BSA/TBS. Die Inkubation wurde in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur vorgenommen, um sicherzustellen, dass die Präparate nicht austrocknen.

Nach der 30-minütigen Inkubation wurden sämtliche Schnitte in TBS gewaschen. Es war darauf zu achten, die Objektträger feucht zu halten und es wurde unverzüglich mit der folgenden Inkubation begonnen.

In einem zweiten Arbeitsschritt wurde eine Lösung aus dem sekundären oder Brückenantikörper (polyklonaler Kaninchen-anti-Maus-Antikörper) und dem Verdünnungspuffer 2, einer Kombination aus AB-Serum (Serum von Blutspendern mit der Blutgruppe AB) und TBS im Verhältnis 1:4, in einer Konzentration von 1:100 hergestellt. 100 µl wurden dann auf jeden Schnitt gegeben, ebenfalls 30 Minuten in einer feuchten Kammer belassen und hiernach in TBS gespült.

Der dritte Schritt diente der Inkubation mit dem Tertiär-Antikörper, dem so genannten APAAP-Komplex, welcher in einer Konzentration von 1:100 mit dem Verdünnungspuffer 1 (2%-igem BSA/TBS) vermischt wurde. Nach einer 30-minütigen Inkubation aller Proben in der feuchten Kammer konnten diese in TBS gewaschen werden.

Hiernach wurde die Inkubation mit Sekundärantikörper (polyklonaler Kaninchen-Anti-Maus-AK) und APAAP-Komplex zweimal wiederholt, jedoch blieben die Präparate nur für jeweils 10 Minuten im feuchten Milieu.

Herstellung der Färbelösung:

Lösung 1 wurde in einem 100 ml-Becherglas angesetzt und auf dem Magnetrührer vermischt:

- 18 ml Propandiolpuffer (0,2 M 2-Amino-2-2-methyl-propan 1,3diol (0,05 M) als Pulver (Merck))
- 50 ml Tris-Puffer (0,05 M), pH 9,7 (0,037 M)
- 28 mg Levamisole (0,41 g/l) (Sigma)
- [0,6 g NaCl (0,15 M)]

Lösung 2 wurde der Lösung 1 hinzu gegeben:

- 35 mg Naphthol-AS-BI-Phosphat (Sigma)
- 420 µl N,N-Dimethylformamid (Merck)

Lösung 3 wurde mit den Lösungen 1 und 2 auf dem Magnetrührer vermischt und mit 1 M HCl auf einen pH von 8,7 eingestellt

- 140 µl 5 % Neofuchsinlösung (in 2 M HCl) (Chroma, Münster)
- 350 µl 4 % Natriumnitrit (Sigma)

Aufgrund der geringen Stabilität von Naphthol-AS-BI-Phosphat und Neofuchsin mussten die Lösungen nach ihrer Herstellung innerhalb einer Minute verbraucht werden. Die Lösung wurde auf die in einer Küvette befindlichen Präparate filtriert und hier für 15 Minuten belassen. Nach dem Abkippen der Färbung und kurzem Spülen der Objektträger mit kaltem Leitungswasser wurden die Präparate mit 4%-iger Formalinlösung (Formaldehyd) über zwei Minuten fixiert. Nach abermaligem Spülen mit fließendem Leitungswasser erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin über drei Minuten. Anschließend wurden die Objektträger für 10 Minuten mit warmem Leitungswasser gespült, danach mit Aquatex® (Glycerin-Gelatine) eingedeckt und abschließend mit einem Deckglas verschlossen.

Das APAAP-Verfahren wurde analog zu den Gewebeschnitten auch mit den angefertigten Lab-Teks der Tumorzelllinien (CRP als Positivkontrolle, Isotyp und Negativkontrolle) und den Cytospinpräparaten für die Lymphozyten des peripheren Blutes (Positiv- und Negativkontrolle) durchgeführt.

2.8 Quantitative *real-time* Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.8.1 Reagenzien

- RNA-Isolations-Kit (inklusive Lysispuffer): RNeasy Mini Kit (Quiagen, Hilden)
- QIAshredderTM spin columns (Qiagen)
- TaqManTM Universal PCR Master Mix (2x) (PE Applied Biosystems, Weiterstadt)
- Random Hexamer Primer (50 ng/ml, Stammlösung 3 µg/µl, Gibco BRL, Karlsruhe)
- First-Strand Buffer (Gibco BRL)
- dNTP-Mix (Ultrapure dNTP-Set: 2'-Deoxyadenosine 5'-Triphosphat (dATP), 2'-Deoxythymidine 5'-Triphosphat (dTTP), jeweils in der Konzentration 100 mM Lösung, pH 7,5, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
- DTT 0,1 M (Gibco BRL)
- RNase-Inhibitor; 20 U/µl (PE Applied Biosystems, Weiterstadt)
- Superskript II (RT); 200 U/µl (Gibco BRL)
- UltrapureTM 0,1 micron filtered (destilliertes Wasser, Dnase / RNase-frei) (Gibco BRL)
- Ethanol 99 % (Apotheke des UKL)

2.8.2 Probenvorbereitung

Bei der Arbeit mit genetischer Substanz wurden grundsätzlich Einmalhandschuhe getragen und autoklavierte Reagenzgefäße verwendet. Als Arbeitsplatz diente ein speziell hierfür vorgesehener Pipettiertisch, um eine Kontamination mit Fremd-RNA zu vermeiden.

Um sowohl die Nierenbiopsien als auch gezüchtete Tumorzellen und gewonnene Lymphozyten des peripheren Blutes der RNA-Isolierung zugänglich zu machen, bedurfte es der Einbringung in den Lysispuffer RLT zur RNA-Freisetzung und der Zugabe von reduzierend wirkendem β -Mercaptoethanol. Der Lysispuffer enthielt GITC (Guanidinisothiocyanat), ein Salz, welches unter anderem zur RNase-Inaktivierung beiträgt. Beide Substanzen wurden im Verhältnis 1:100 in einem 1,5 ml Reagenzgefäß (Mikrotube) angesetzt und dienten, nach Zugabe der Biopsiezylinder direkt nach Entnahme oder einem bereits vorbereitetem Zellpellet, als Einfriergrundlage. Sofern die Proben nicht sofort weiterverarbeitet worden sind, wurden diese bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

2.8.2.1 Isolierung der RNA

Zunächst wurden die Proben bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgetaut. Biopsien wurden zusätzlich in einer Qiashredder *spin column* homogenisiert, indem jede Probe vollständig auf die Säule pipettiert wurde, um anschließend bei 14000 UpM über 2 Minuten zentrifugiert zu werden. Dieser Vorgang bewirkte die Scherung der Desoxyribonukleinsäuren (DNA). Die Säule konnte hiernach verworfen werden.

Folgende Arbeitsschritte galten für alle Proben und wurden mit dem RNeasy Mini Kit-System (Qiagen) durchgeführt. Zur RNA-Anreicherung wurden Säulen mit einer Membran aus Silika-Gel eingesetzt.

Den homogenisierten Proben ($600\text{ }\mu\text{l}$) wurden im Verhältnis 1:1 70%-ige Ethanollösung zugegeben und vermischt. Anschließend wurden $600\text{ }\mu\text{l}$ der Probe in eine RNeasy mini *spin column* pipettiert. Während der 15-sekündigen Zentrifugation bei 14000 UpM wurde die RNA an die Silika-Gelmembran gebunden und die abgepresste Restflüssigkeit im Sammeltube konnte ebenso wie in den folgenden Waschvorgängen verworfen werden. Dieser Schritt wurde mit der restlichen Probe wiederholt. Durch Zugabe von $700\text{ }\mu\text{l}$ Buffer RW1, eines chaotropen Salz- und ethanolhaltigen Waschpuffers, wurde die Membran der RNeasy *spin columns* gereinigt und von Inhibitoren befreit. Hierzu erfolgte ebenfalls eine kurze Zentrifugation von 15 Sekunden bei 14000 UpM . Nun konnten die Säulen auf neue 2 ml-Sammeltubes umgesetzt werden und mit $500\text{ }\mu\text{l}$ Buffer RPE (ethanolhaltiger Waschpuffer)

benetzt werden. Dieser Vorgang wurde nach kurzer Zentrifugation (15 sec bei 14000 UpM) zum Waschen (Entfernen der chaotropen Salze von RW1) und Verwerfen des Überstandes wiederholt. Eine Zentrifugation über 2 Minuten bei 14000 UpM führte zum Trocknen der RNeasy-Membran und Entfernen des Ethanols aus RPE. Hiernach wurden die RNeasy *spin columns* vorsichtig in neue 1,5 ml-Sammeltubes umgesetzt. Dabei durfte die Säule nicht mit dem zu verwerfenden Überstand in Kontakt kommen. Als letztes wurden 40 µl Rnase-freies Wasser, welches auf 70 °C erhitzt worden war, direkt auf die Silikagelmembran pipettiert. Die fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur und abschließende einminütige Zentrifugation bei 10000 UpM führte schließlich zum Eluieren der RNA.

2.8.2.2 Konzentrationsbestimmungen der RNA

Um die isolierte RNA photometrisch bestimmen zu können, wurden die Proben (10 µl RNA) im Verhältnis 1:80 mit DNase- und RNasefreiem Wasser gemischt und in einer Quarzglas-Küvette gegen einen auf Null abgeglichenen Leerwert (800 µl DNase- und RNasefreies Wasser) am LKB Ultrospec III Spectrophotometer (Deuterium-Lampe) gemessen. Das RNA-Extinktionsmaximum wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm abgelesen. Um die Reinheit des RNA-Gehaltes zu ermitteln, erfolgte eine zusätzliche Messung bei 280 nm, da diese Wellenlänge der Protein-Extinktion entsprach. Aus den Messwerten ließ sich die Konzentration der RNA (in µg/ml) in den Proben berechnen. Hierzu wurden die Extinktionswerte mit dem Verdünnungsfaktor 80 und einem Faktor 40, der den spezifischen Extinktionskoeffizienten von einzelsträngiger RNA (A_{260} ssRNA) berücksichtigt, multipliziert.

Lag eine RNA-Konzentration von über 50 µg/ml vor, so wurde sie durch Verdünnung mit DNase- und RNasefreiem Wasser auf den genannten Wert eingestellt. Eine Betrachtung des Verhältnisses von RNA zu Proteinkonzentration geschah durch die jeweilige Bildung des Quotienten aus RNA- und Proteinkonzentration (A_{260} / A_{280}), der Werte zwischen 1,5 und 2,0 annehmen sollte. Im Anschluss an die Konzentrationsbestimmung wurde die vorliegende RNA unmittelbar in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben.

2.8.3 Durchführung der reversen Transkription

Jeweils insgesamt 30 µl der vorhandenen RNA-Probe wurden in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Um die Anlagerung der Primer zu ermöglichen, wurden der RNA-Probe 3 µl Random Hexamer Primer zugesetzt und der so entstandene Annealing-Mix bei 70 °C in einem Thermoblock zehn Minuten inkubiert. Nach anschließender kurzer (1 min)

Abkühlung im Gefrierschrank bei -20 °C wurde das Kondensat durch zehnhündige Zentrifugation gesammelt. Dem Annealing-Mix wurden letztlich folgende Substanzen für die reverse Transkription zugegeben:

- 12 µl First Strand Buffer
- 3 µl dNTP-Mix
- 1,2 µl DTT (0,1 M)
- 9,6 µl DNase- und RNasefreies Wasser (UltraPure™ 0,1 micron filtered)
- 1,8 µl 4 °C kalter RNase-Inhibitor (20 units/µl)
- 3 µl 4 °C kaltes Superscript II (RT)

Das entstandene Gesamtvolumen von 63,6 µl wurde in drei Reagiergefäße portioniert aufgeteilt bei 37 °C für eine Stunde inkubiert und schließlich entweder bei -80 °C eingefroren oder mittels PCR gemessen.

2.8.4 Quantitative *real-time* PCR

Das genetische Material aus Nierenstanzbiopsien, Tumorzelllinien oder Lymphozyten wurde mittels quantitativer *real-time* PCR (TaqMan™ PCR) amplifiziert und mit dem ABI PRISM 7700 Sequence Detection System durchgeführt. Die PCR-Vorbereitung wurde in einem anderen Raum als die PCR selbst durchgeführt, um eine Kontamination zu vermeiden. Ebenso wurde mit Einmalhandschuhen unter einer sterilen Werkbank gearbeitet, die zuvor mittels UV-Bestrahlung von Fremd-DNA befreit wurde.

2.8.4.1 Primer und Sonden

Als Startermolekül für die eingesetzte Taq-Polymerase wurden synthetisch hergestellte einzelsträngige Oligonukleotide (RNA), so genannte Primer verwendet. Diese waren mit einer Länge von 21 bis 25 Nucleotiden der gesuchten DNA-Sequenz zwischengeschaltet. Primer, deren Sequenzen spezifisch für CRP waren, bildeten die Grundlage für eine ebenso spezifische cDNA Detektion (Primer von TIB MOLBIOL, Berlin, eingestellt auf 10 µM).

Innerhalb der durch die Primer festgelegten Grenzen hybridisierte die mit einem Quencher (TAMRA)- und Reporter (VIC)-Farbstoff markierte, für CRP spezifische Sonde (PE Applied Biosystems).

Als interne Amplifikations-Kontrolle wurde das Gen der Hypoxanthinphosphoribosyl-Transferase (HPRT) verwendet [Moniotte et al., 2001]. Entsprechende Primer und Sonden wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. H.-D. Volk, Berlin, zur Verfügung gestellt.

Analog zur CRP-Sonde wurde auch hier der Quencher-Farbstoff TAMRA (6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin) an die Sonde für HPRT gekoppelt, jedoch verfügte diese über den Fluoreszenzfarbstoff FAM (6-Carboxy-Fluorescein). Die Reaktionen für CRP und HPRT wurden als Multiplex-PCR in gleichen Reaktionsgefäßen durchgeführt.

Tabelle 1:

Sequenzen der Primer und Sonden zum Nachweis von CRP- und HPRT-spezifischer cDNA

	Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')
CRP	Forward Primer	gAA CTT TCA gCC gAA TAC ATC TTT T
	Reverse Primer	CCT TCC TCg ACA TgT CTg TCT
	Sonde	VIC – Cag gCC CTT gTA TCA CTg gCA gCA gg - TAMRA
HPRT	Forward Primer	AgT CTg gCT TAT ATC CAA CAC TTC g
	Reverse Primer	gAC TTT gCT TTC CTT ggT CAg g
	Sonde	FAM – TTT CAC CAg CAA gCT TgC gAC CTT gA - TAMRA

2.8.4.2 Hep3B-Zellen

Die Verwendung der zur CRP-Produktion stimulierten humanen Hepatom-Zelllinie Hep 3B [Aden et al., 1979] als Kalibrator für die quantitative *real-time* PCR wurde durch die freundliche Unterstützung von Prof. Dr. med. W. Jelkmann, Institut für Physiologie des Universitätsklinikum Lübeck, möglich gemacht.

2.8.4.3 Reaktionsansätze für die *real-time* PCR

Die notwendigen Reagenzien wurden als gemeinsamer Mastermix mit einem Gesamtvolumen von 23 µl je Probe angesetzt. Der Mastermix enthielt sowohl die benötigte Ampli Taq Gold DNA Polymerase und dNTPs mit dUTP als auch die passive Fluoreszenzfarbstoff-Referenz ROX und optimale Puffer-Komponenten. Erst kurz vor Einsatz in das TaqMan™Cycler wurden dem Mastermix 2 µl cDNA hinzugefügt, so dass ein Endvolumen von 25 µl zugrunde lag.

Mastermix (25 µl):

- 12,5 µl TaqMan™ Universal PCR Master Mix (2x)
- 0,75 µl CRP forward primer (300 nM)
- 0,75 µl CRP reverse primer (300 nM)
- 0,75 µl CRP probe (300 nM)

- 0,15 µl HPRT forward primer (60 nM)
- 0,15 µl HPRT reverse primer (60 nM)
- 0,25 µl HPRT probe (100 nM)
- 7,7 µl UltraPure™ 0,1 micron filtered (Dnase-, Rnase-frei)
- 2 µl Template (cDNA)

Der durch Pipettieren und Rüttelvibrationen durchmischte Mastermix wurde in die PCR-Reaktionsgefäße verteilt. Die luftfreie Zugabe der cDNA (2 µl/Reaktionsgefäß) erfolgte nach kurzer Zentrifugation der Proben.

Während jeder molekularbiologischen Bestimmung wurde eine Negativkontrolle mit DNase- und RNase-freiem Wasser (UltraPure™ 0,1 *micron filtered*) mitgeführt sowie die als Kalibrator und Positivkontrolle geeigneten Hep3B-Zellen eingesetzt. Alle Ansätze wurden als Doppelbestimmung durchgeführt. Die PCR-Reaktionsgefäße wurden nach Verschluss mittels *optical caps* in den TaqMan™Cycler eingesetzt.

2.8.4.4 Reaktionsbedingungen und Ablauf

Zu Beginn der PCR erfolgte die Aktivierung der Taq-Polymerase AmpliTaq Gold durch zehnminütige Inkubation bei 95 °C. Die über 45 Zyklen verlaufende DNA-Synthese erfolgte über verschiedene Stufen. Zum einen umfasste der Ablauf eine Temperaturerhöhung auf 95 °C für jeweils 15 Sekunden zur Denaturierung doppelsträngiger DNA, zum anderen das Hybridisieren der Primer (*annealing*) bei niedrigerer Temperatur (62 °C) für 60 Sekunden und zeitlich verknüpft die Synthese neuer komplementärer DNA-Stränge durch Anlagerung von dNTPs (*primer extension*). Am Ende der Amplifikation kühlte das System auf 25 °C ab.

2.8.4.5 Relative Quantifizierung der cDNA

Während der Amplifikation der cDNA wurde durch das *real-time* PCR-Verfahren die Vervielfältigung der Zielsequenz in jedem Zyklus quantitativ gemessen. Bei der relativen Quantifikation werden Änderungen der Gen-Expression in einer Probe in Relation zu einer anderen – nicht von ihr abhängigen oder regulierten – Referenzsubstanz gesetzt. Die aktive Referenz, wie HPRT, stellte eine endogene Amplifikationskontrolle dar, welche kointegriert wurde. HPRT wird konstant exprimiert und unterliegt keinen Regulationsmechanismen. Die Nutzung einer passiven Referenz, wie der im Mastermix enthaltene Farbstoff ROX, ermöglicht es auch PCR-unabhängige Fluktuationen der

Fluoreszenzsignale auszugleichen. Die Analyse erfasster Daten erfolgte mit Hilfe der Sequenz Detektor 1.6.3. Software.

Die initialen Zyklen waren durch geringe Fluoreszenzänderungen gekennzeichnet und legten die Basislinie (*baseline*) der Amplifikationskurve fest. Ein Anstieg des Fluoreszenzsignals über diese Linie hinweg deutete auf eine Detektion akkumulierter Zielsubstanz hin, wobei die *baseline* das mittlere Fluoreszenzsignal wiedergab, welches zwischen drittem Zyklus und dem Zyklus kurz vor dem exponentiellen Anstieg einer spezifischer Amplifikation gemessen worden war. Dabei stellte der so genannte *threshold* einen Schwellenwert dar, der die durchschnittliche 10-fache Standardabweichung der normalisierten Intensität der Reporteremission in den frühen PCR-Zyklen anzeigt und an den Beginn der exponentiellen Steigung gesetzt wurde. Er ermöglichte eine Differenzierung zwischen spezifischer und unspezifischer Amplifikation.

Der Parameter C_t (*cycle of threshold*) ist definiert als eine fraktionelle Zyklusnummer, an dem das Fluoreszenzsignal den festgelegten *threshold* überschreitet und in die logarithmische Phase übergeht. Je weniger Amplifikationszyklen benötigt wurden, um diesen Zeitpunkt zu erreichen, desto höher ist die ursprüngliche Konzentration der gesuchten Sequenz in der Probe.

Mittels der von PE Applied Biosystems entwickelten $\Delta\Delta C_t$ -Methode wurde das relative Expressionsniveau der Zielsequenz bestimmt. Hierzu wurde das gemessene Signal der Zielsequenz, ebenso das des eingesetzten Kalibrators, mit Hilfe der endogenen Referenz (hier HPRT) normalisiert. Verwendung fanden jeweils Mittelwerte einer Doppelbestimmung und es wurde die Differenz zwischen cDNA-Konzentration von CRP bzw. des Kalibrators Hep3B und HPRT gebildet. Anschließend wurde der errechnete ΔC_t -Wert jeder Probe in Beziehung zu dem Kalibrator ($\Delta C_{t_{\text{Hep3B}}}$) gesetzt, um die Basis für vergleichbare Ergebnisse zu schaffen. Hieraus ergab sich der $\Delta\Delta C_t$ -Wert, aus dem das relative Expressionsniveau der Zielsequenz über $2^{-\Delta\Delta C_t}$ berechnet wurde.

Analog zur Methodik für die Proben aus RCC wurde die PCR auch für die oben beschriebenen vorbereiteten Tumorzelllinien und Lymphozyten durchgeführt.

2.9 CRP-Bestimmung im Plasma

Die quantitative immunturbimetrische Bestimmung des CRP im Plasma der Patienten erfolgte anhand des Latex-Immunoassay „CRP Vario“ im Institut für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Lübeck. Das Testprinzip beruht auf einer Antigen-Antikörper-Agglutinationsreaktion zwischen dem in der Probe vorhandenen CRP und dem Anti-CRP-

Antikörper, der auf Latexpartikeln adsorbiert ist. Die Agglutination wurde als Extinktionsänderung bei 572 nm gemessen, deren Intensität proportional zur Menge an CRP in der Patientenprobe war. Der Test gilt als hoch präzise und reproduzierbar.

2.10 Statistik

Alle Daten sind – wenn nicht anders angegeben – als Mittelwert zuzüglich bzw. abzüglich Standardabweichung angegeben.

Die Abhängigkeit der CRP-Plasmawerte sowie der quantitativen mRNA-Werte vom jeweiligen Tumor- und Grading-Stadium wurde mit Hilfe des nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Tests analysiert.

Der Vergleich der quantitativen mRNA-Expression zwischen den verschiedenen Bereichen der nephrektomierten Nieren wurde mit Hilfe des nicht-parametrischen Wilcoxon-Test durchgeführt (gepaarte Analyse).

Die quantitative mRNA-Expression in den jeweiligen Tumor- bzw. Nierenabschnitten sowie die Tumorgröße in cm wurde mit Hilfe des χ^2 -Tests nach Pearson in Beziehung zu den entsprechenden CRP-Plasmawerten gesetzt. Diese Analyse wurde zudem mit Hilfe der partiellen Korrelationsanalyse für die Einflussgrößen Alter, Geschlecht und Histologie des Tumors korrigiert.

Die Analyse der quantitativen CRP mRNA-Expression in den jeweiligen Tumor- bzw. Nierenabschnitten in Abhängigkeit von dem histologischen Subtyp (klarzellig vs. papillär) wurde mit Hilfe des nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt.

Ein Signifikanzniveau von $p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

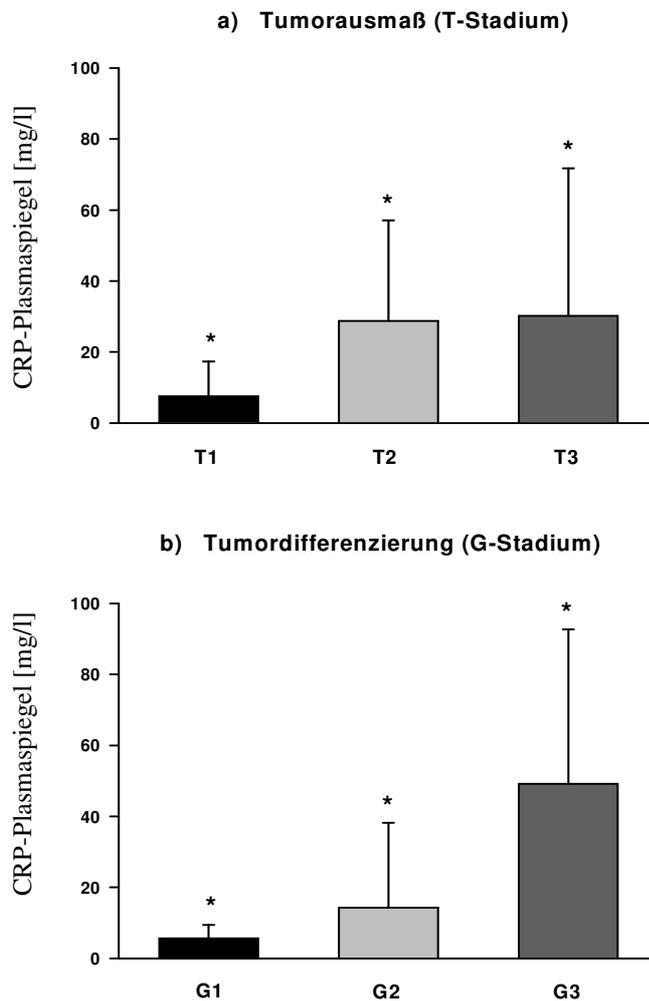
3. Ergebnisse

3.1 Präoperative Plasma-CRP-Werte: Abhängigkeit von Tumorstadium und Differenzierungsgrad

Es wurden die präoperativen Plasma-CRP-Werte aller 40 Patienten im Hinblick auf das zugehörige Tumorstadium und den jeweiligen Differenzierungsgrad des Tumors analysiert. Die Daten sind der Tabelle A des Anhangs zu entnehmen. Der CRP-Spiegel im Plasma wurde mit Hilfe eines Lateximmunoassays jeweils einen Tag vor der geplanten Tumornephrektomie ermittelt. Der Normalwert liegt hier bei < 5 mg/l. Um das Vorliegen eines systemischen Entzündungsprozesses, der großen Einfluss auf den CRP-Plasmaspiegel nimmt, weitgehend auszuschließen, wurde zeitgleich die Anzahl der Leukozyten im peripheren Blut bestimmt, welche sich bis auf 5 Patienten im Normbereich von 4,3 bis 10,0 /nl befanden. Es wurde bei 22 der ausgewählten Patienten eine Urin-Kultur angelegt, in der es zu keinem signifikanten Keimwachstum kam und die folglich als negativ beurteilt wurde. Somit war bei diesen Patienten auch das Vorliegen eines Harnwegsinfektes unwahrscheinlich.

Die histologische Prüfung laut UICC Klassifikation von 1997 [Guinan et al., 1997] erfolgte durch einen ortsansässigen Pathologen, welchem die CRP-Daten nicht bekannt waren. Aufgrund meist negativer oder unbekannter Daten betrachteten wir weder den Lymphknotenstatus (N) noch den Metastasierungsgrad (M) der Tumoren in unseren Analysen. Die CRP-Plasma-Spiegel waren signifikant erhöht bei Patienten mit steigenden Tumorstadien ($\chi^2 = 5.68$; $p = 0.05$) und undifferenzierten Tumoren ($\chi^2 = 6.52$; $p < 0.05$; Kruskal-Wallis-Test). Abbildung 4 zeigt diesen Zusammenhang. Die partielle Korrelationsanalyse- korrigiert für Alter, Geschlecht und Tumorhistologie- bestätigt den Zusammenhang zwischen höheren CRP-Werten und Tumorstadien ($r = 0.3312$; $p < 0.05$) ebenso wie für die Tumordifferenzierung ($r = 0.4327$; $p < 0.01$). Eine signifikante Abhängigkeit der präoperativen CRP-Plasma-Werte von der reinen Tumorgröße in Zentimeter ließ sich allerdings nicht erkennen ($p = 0.42$, Pearson-Test, χ^2 -Test).

Abbildung 4: Präoperativer CRP-Plasmaspiegel von 40 Patienten mit Nierenzellkarzinom in Korrelation zu Tumorstadium (T1 - 3) und Grad der Differenzierung (G1 - 3)



Tumorausmaß gemäß der Klassifikation der UICC von 1997 [Guinan et al., 1997]

Differenzierungsgrad des Tumors gemäß der Klassifikation von Thoenes et al., 1986 [Thoenes et al., 1986]

a) Präop. CRP und Tumorstadium: *, $\chi^2 = 5.68$; $p = 0.059$ mittels Kruskal-Wallis Test

b) Präop. CRP und Tumorgrad: *, $\chi^2 = 6.52$; $p < 0.05$ mittels Kruskal-Wallis Test

3.2 Postoperative Plasma-CRP-Werte

Im Abstand von 4 bis 6 Wochen nach Tumornephrektomie konnten bei 20 der 39 analysierten Patienten Plasma-CRP-Werte eruiert werden, die in Tabelle A des Anhangs aufgeführt sind. Dabei zeigte sich, dass bei 11 von 20 (55 %) der postoperative CRP-Wert abnahm, dagegen bei 9 von 20 stabil blieb oder sogar zunahm. Letzteres ließ sich in der Regel auf eine postoperative Komorbidität zurückführen (lokale Wundinfekte, Abszesse oder Pneumonien).

Es war festzustellen, dass mehr als 60 % der Patienten mit einem postoperativen Abfall des CRP-Plasmawertes Tumoren mit höherem Tumorstadium (T2, T3) und sogar mehr als 90 % (90.90 %) eher undifferenzierte Tumoren (G2, G3) aufwiesen (nicht gezeigt).

3.3 Tumorzelllinien (Synthese von CRP in Karzinomzelllinien *in vitro*)

Eine Synthese des C-reaktiven Proteins wurde *in vitro* anhand von vier verschiedenen gezüchteten Karzinomzelllinien der Niere ermittelt. Die kultivierten Zelllinien wurden mit Hilfe der APAAP-Technik und der *real-time* PCR auf eine Expression von CRP untersucht. Die Zelllinien blieben unstimuliert und es erfolgte jeweils ein Doppelansatz.

Unstimulierte Caki-Zellen und die Tumorzellreihen SK-RC 35, 47 und 58 zeigten eine homogene zytoplasmatische CRP-Färbung bei der Anwendung monoklonaler anti-CRP-Antikörper und der APAAP-Technik (Abbildung 5a,b). Sowohl Isotyp- als auch Negativkontrolle zeigten keine Rotfärbung.

Abbildung 5(a,b): Immunhistochemische Darstellung der CRP-Synthese durch die unstimulierte Tumorzelllinie Caki

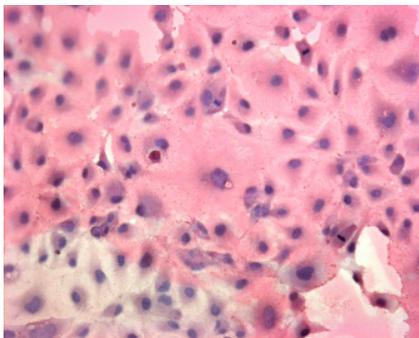


Abb.5a Positivkontrolle

Homogene, zytoplasmatische Immunreaktion für CRP in der Caki-Zelllinie (400x Vergrößerung)

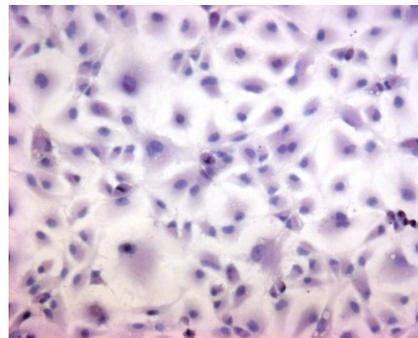


Abb. 5b Isotypkontrolle

Kontrollfärbung mittels irrelevanten Isotypantikörper (400x Vergrößerung)

Um die nachgewiesene CRP-Expression der Karzinomzelllinien auch auf mRNA-Ebene zu belegen, studierten wir alle Zelllinien mittels quantitativer *real-time* PCR. Native Caki-Zellen, SK-RC 35, 47 und 58 ergaben ein klares Amplifikationssignal für die gesuchte CRP-mRNA. Dieses lag ungefähr 3 - 5 log-Stufen unterhalb der maximal stimulierten Hep3B-Kontrolle (s. Tabelle 2).

3.4 Lymphozyten des peripheren Blutes

Lymphozyten des peripheren Blutes wurden ebenfalls der immunhistochemischen Färbemethode und molekularbiologischen Untersuchung zugänglich gemacht. Unter Verwendung von Vollblut dreier freiwilliger Spender wurden diese über Zeitintervalle von 6, 12, 24 und 48 Stunden stimuliert. Hierzu wurde LPS als Stimulans für Lymphozyten, jedoch auch IL-1 α , IL-6 und TNF- α verwendet. Zur Kontrolle wurde je eine Probe des entsprechenden Zeitintervalls unstimuliert belassen. Die Untersuchungen wurden als Doppelansatz vorgenommen.

Nach erfolgter Inkubation ergab die immunhistochemische Färbung unter Verwendung eines monoklonalen Anti-CRP-Antikörper kein Nachweis von CRP. Eine Rotfärbung blieb sowohl bei unstimulierten als auch bei stimulierten Lymphozyten einschließlich der jeweiligen Isotypkontrolle in allen drei Proben aus.

Die Auswertung der molekularbiologischen Untersuchung der unstimulierten und stimulierten Lymphozyten über vier Zeitintervalle hinaus ergab keinen Hinweis auf eine stattgehabte Amplifikation von CRP mRNA Transkripten (Tabelle 2).

Tabelle 2: Relatives Expressionsniveau von CRP mRNA innerhalb der angegebenen Tumorzelllinien und Lymphozyten mittels *real-time* PCR bezogen auf Hep3B

Zellkultur	CRP mRNA
Caki	0.147390
SK-RC 35	0.262920
SK-RC 47	0.126540
SK-RC 58	0.000693
Lymphozyten* (n=3)	0
Hep3B	1

*Lymphozyten sind über die angegebenen Zeitintervalle sowohl stimuliert als auch unstimuliert betrachtet worden

3.5 Synthese von CRP in Nierenzellkarzinomen *in vivo*

Um eine CRP-Synthese von Nierenzellkarzinomen nachzuweisen, wurden Gewebeproben (Stanzbiopsien für die Färbetechnik, Gewebeblöcke für die PCR) von insgesamt 40 Tumornieren nephrektomierter Patienten sowohl immunhistochemisch mittels APAAP-Technik als auch molekularbiologisch mit Hilfe der *real-time* PCR untersucht. Unter Berücksichtigung der drei unterschiedlichen Entnahmezonen der Biopsien konnten Rückschlüsse auf eine mögliche spezifische Produktionslokalisierung gezogen werden.

In Tabelle A im Anhang sind alle Patienten mit demographischen Angaben wie Alter, Geschlecht, TumorgroÙe, zugehörige histologische Diagnose einschließlich der TNM-Klassifikation von 1997 [Guinan et al., 1997], Grading [Thoenes et al., 1986] und prä- und postoperativer CRP-Wert, sowie Leukozyten im Plasma wiedergegeben. Soweit eine Urinkultur angelegt wurde, findet dies ebenfalls Erwähnung. Laborwerte und Urinkultur wurden von ortsansässigen unabhängigen Instituten untersucht. Ebenso diagnostizierte ein unabhängiger Pathologe die Histologie der Tumornieren aus einem zeitnah entnommenen Stanzzyylinder. Die Nachweisbarkeit von CRP mRNA in den Stanzzyindern mittels PCR bezogen auf die drei unterschiedlichen Nierenregionen wird in Tabelle B gezeigt. Ebenso präsentiert Tabelle B eine als positiv zu wertende immunhistochemische Rotfärbung für das CRP-Protein in Abhängigkeit der verschiedenen Entnahmezonen und bezogen auf die Menge der vorhandenen (Tumor-) Zellen im Vergleich zu gegebener Nekrosezone der Gewebeschnitte.

3.5.1 Immunhistochemie

Bei der Auswertung der in APAAP-Technik gefärbten Gefrierschnitte wurden grundsätzlich Rotfärbungen als positiv angesehen, jedoch nicht, wenn sie sich innerhalb von Nekrosen oder direkt am Rand des Schnittes befanden. Die Rotfärbung zeigte die Interaktion von CRP und dem verwendeten monoklonalen Primäntikörper an. Die durchgeführte Isotyp- und Negativkontrolle zeigte bis auf Rotfärbungen der Nekrosezonen und/oder diverse Randartefakte keine positive Anfärbung für CRP.

Eine gesunde Niere weist eine geordnete Struktur, die einer Unterteilung in Mark und Rinde entspricht, auf, welche sowohl Glomeruli als auch einzelne Tubuli nebeneinander sowie Gefäßanschnitte mit Endothelien enthält. Nierenzellkarzinome zeigen als epitheliale maligne Tumoren des Nierenparenchyms neben Nekrosezonen eine Vielzahl unterschiedlich differenzierter Zellen des Nephrons und GefäÙe. Der am häufigsten vorkommende Nierenkarzinomtyp (80 %) stellte sich in dieser Studie als eine Anhäufung großer Zellen mit eher kleinem Zellkern und hellem Zytoplasma dar. Aufgrund seiner Morphologie wird dieser auch als klarzellig bezeichnet. Papillär wachsende Nierenkarzinome traten dagegen nur zu 22,5 % (in der Literatur sogar nur 10 %) auf und weisen ein baso- oder eosinophiles Zytoplasma auf. Beide Typen beinhalten Merkmale des proximalen Tubulus. Zwei Präparate präsentierten Eigenschaften beider Karzinomtypen. Ein spindelzellartig wachsender Tumortyp wurde in den weiterfolgenden Analysen nicht beurteilt, da dieser mesenchymalen

Ursprungs war und sich in dieser Arbeit auf die Betrachtung epithelialer Nierenzellkarzinome beschränkt wurde.

Jeder Schnitt wurde systematisch durchgemustert und es konnte je nach Zellgehalt eine prozentuale Abstufung der Rotfärbung und damit der mutmaßlichen CRP-Produktion vorgenommen werden. Der Tumorzellanteil des Tumorzentrums (1) variierte sehr stark von 0 bis 90 %, wobei es sich bei den verbleibenden Präparatabschnitten meist um Nekrosen handelte. Die mit der Ziffer 2 bezeichnete Tumorgrenzzone (2) zwischen Tumorzentrum und makroskopisch gesund aussehenden umliegenden Gewebeabschnitten der Niere zeigte im Gegensatz zum Tumorzentrum einen insgesamt höheren Tumorzellanteil (durchschnittlich 68,4 %), der im einzelnen zwischen 20 und 90 % lag. Ein ebenso hoher Zellanteil (68,4 %) und eine vergleichbare Varianz (10 - 90 %) wies das umliegende Gewebe (3) auf.

Die Bewertung der CRP-spezifischen Färbung erfolgte jeweils bezogen auf den Anteil des zellulären Materials des Präparates. Wie in Tabelle B des Anhangs wurden je drei Positivitätsabstufungen vorgenommen, denen ein prozentualer Anteil an der Zellsubstanz zugeordnet wurde. Ungeachtet dieser Abstufungen konnte in allen Nierenregionen (1, 2 und 3) eine überwiegend positive CRP-Anfärbung beobachtet werden. Dabei wurde auffällig, dass die besonders zellreiche Tumorgrenzzone (2) durchschnittlich 84,6 % CRP-Positivität zeigte. Im Tumorzentrum (1) und dem tumorangrenzenden Gewebe (3) waren immerhin noch mehr als 50 % der Schnitte positiv für CRP. Die aufgeführte tabellarische Darstellung (Tabelle 3) fasst diesen Sachverhalt zusammen.

Tabelle 3: Quantitatives Verhältnis der immunhistochemischen CRP-Anfärbung in Abhängigkeit von der Lokalisation innerhalb der karzinombefallenen Niere unter Berücksichtigung einer prozentualen Abstufung des positiven CRP-Nachweises

Relativer CRP Protein- Nachweis	Tumor/-Nierenregion		
	1	2	3
-	17 (42 %)	6 (15 %)	18 (46 %)
+	13 (34 %)	18 (46 %)	17 (44 %)
++	7 (18 %)	13 (33 %)	3 (8 %)
+++	2 (5 %)	2 (5 %)	1 (3 %)
absolut	39 (100 %)	39 (100 %)	39 (100 %)

(- Anfärbung < 10 %, + 10 - 40 % Rotfärbung, ++ 40 - 80 % Rotfärbung, +++ > 80 % der Zellen sind angefärbt)

Abbildung 5(c-f): Gefrierschnitte der Nierenzellkarzinome und des umgebenen Gewebes nach immunohistochemischer Anfärbung mittels APAAP-Technik unter Verwendung monoklonaler Antikörper

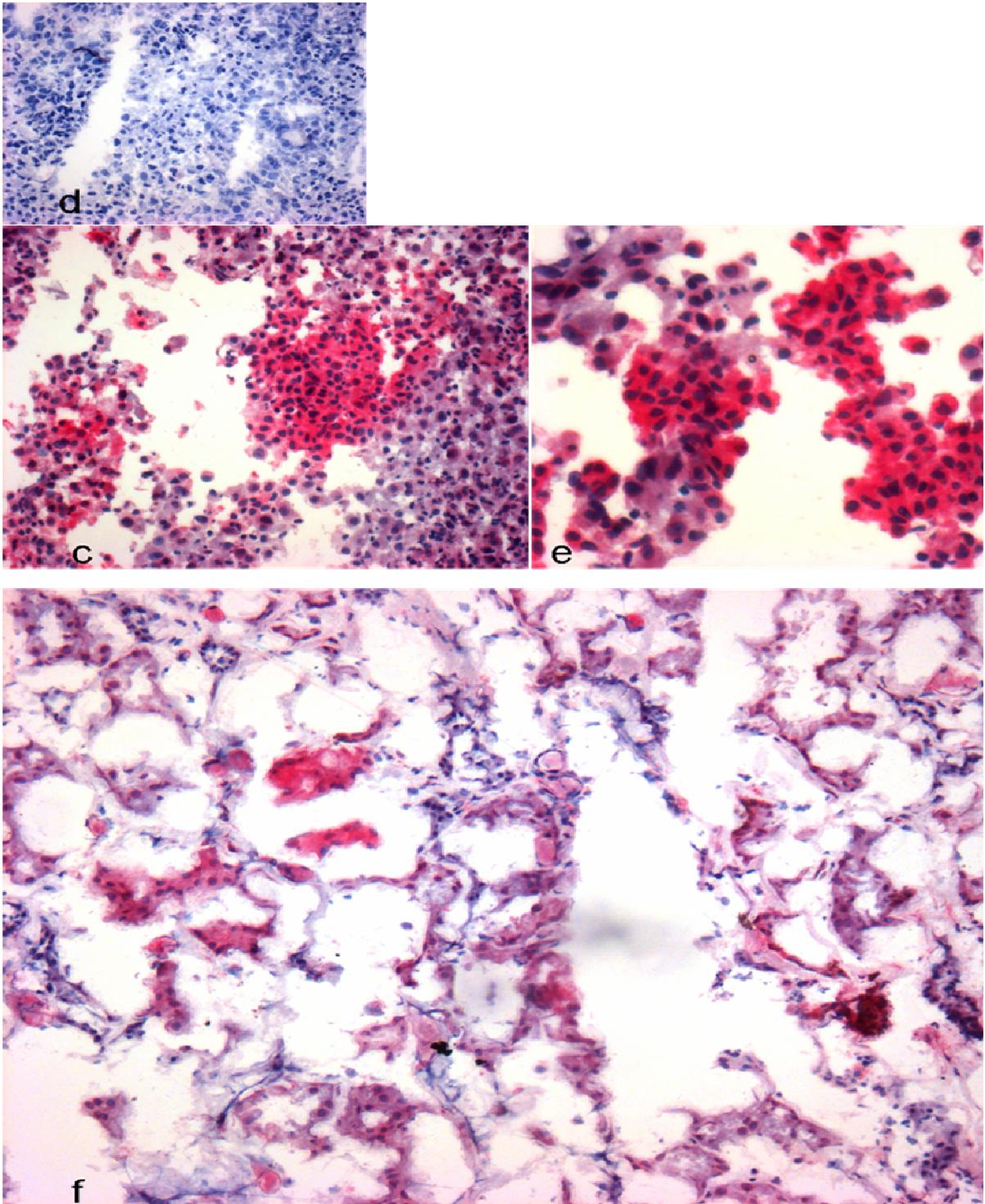


Abbildung 5c: CRP-Nachweis perinukleär in nahezu allen Tumorzellen der Grenzzone neben Tumorzellclustern mit intensiver homogener Färbung (Pat. Nr. 12, Originalgröße x200)

Abbildung 5d: Isotypkontrolle der Grenzzone (Pat. Nr. 12, Originalgröße x200)

Abbildung 5e: Detaillierte Darstellung der Immunreaktivität in Nierenzellkarzinomen (Pat. Nr. 12, Originalgröße x400)

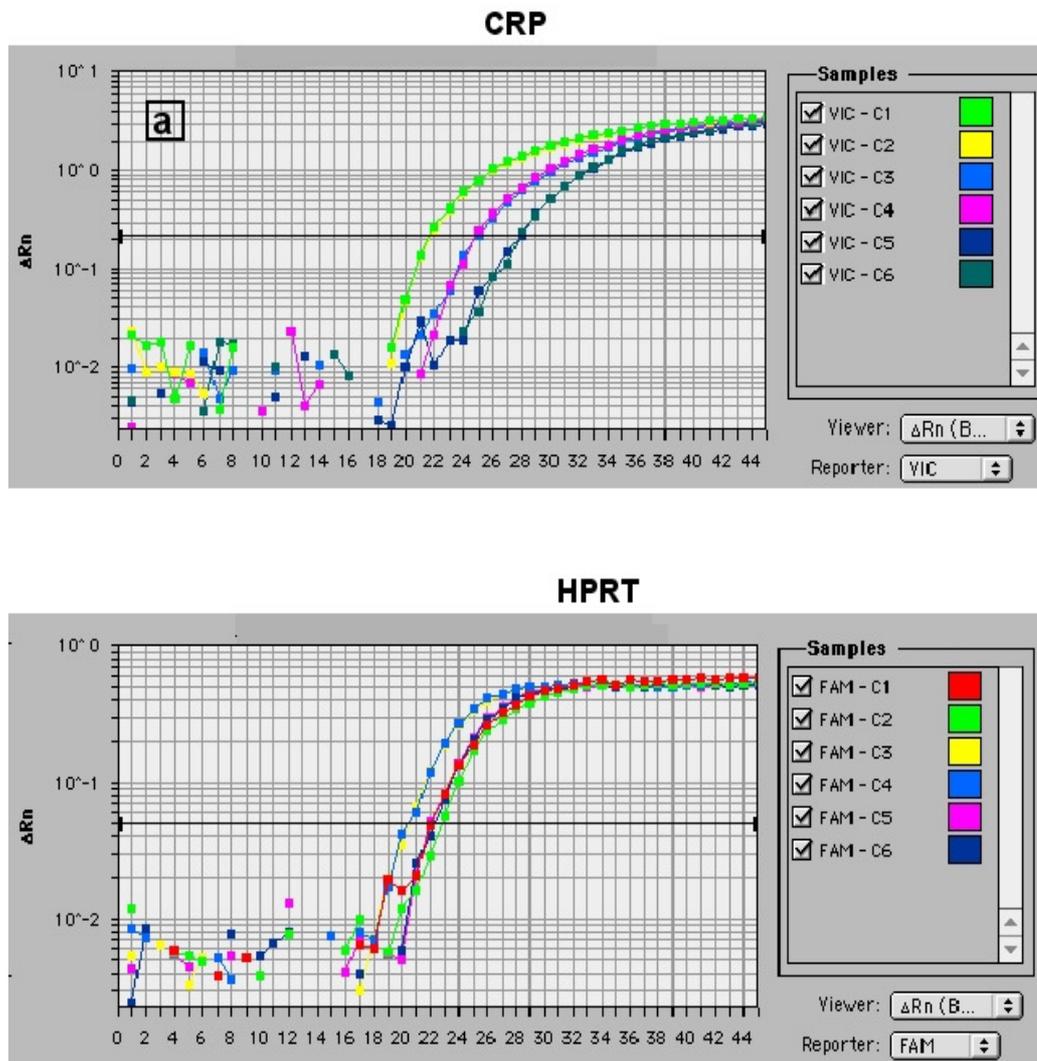
Abbildung 5f: Immunreaktivität des CRP in angrenzenden Nierengewebe mit starker perinukleärer Anfärbung der meisten Tubulusepithelzellen und einiger homogen gefärbter Tubuli (Pat. Nr. 12, Originalgröße x100)

Immunohistochemisch wurde im großen und ganzen ein perinukleäres Färbemuster für CRP beobachtet, welches entweder an einzelnen Tumorzellen der Nekrosezonen oder an beinahe allen Tumorzellen der Grenzzone (Abbildung 5c,d) lokalisiert werden konnte. Interessanterweise erschien die CRP-Produktion in manchen Fällen als ein sehr helles homogenes Färbemuster, welches in Clustern von Tumorzellen der Tumorgrenzzone (Abbildung 5e) auftrat. Im makroskopisch gesund anmutenden umgebenen Nierengewebe des RCCs war die CRP-Produktion begrenzt auf das Tubulusepithel, in welchem die Färbung dem gleichen Muster folgt, wie dies schon bei den Tumorzellen selbst beobachtet wurde. Es zeigte sich eine perinukleäre Färbung der meisten Epithelzellen, jedoch ebenso eine helle zytoplasmatische Färbung in einigen Nierenkanälchen (Abbildung 5f). Aufgrund der relativ schlechten Qualität der Gefrierschnitte war es nicht möglich, einzelne tubuläre Segmente, die für diese zwei unterschiedlichen Färbemuster verantwortlich waren, genauer zu definieren.

3.5.2 PCR

Es wurde die CRP mRNA-Expression aus cDNA-Präparationen von Tumorgewebe und angrenzenden makroskopisch gesundem Gewebe der Niere mittels quantitativer *real-time* PCR ermittelt. Des Weiteren wurde der jeweilige Mittelwert einer Doppelbestimmung zur Berechnung im Rahmen der Quantifizierung benutzt. Fünfundzwanzig von 32 Proben (78 %) abstammend vom Tumorzentrum, 30 von 36 (83 %) von der Tumorgrenzzone, aber auch 32 von 36 (89 %) Stenzen vom angrenzenden makroskopisch gesunden Gewebe waren positiv für die CRP mRNA. Die gemessenen C_t -Werte für CRP wurden mit denen von HPRT als interne Kontrolle abgeglichen und wie geschildert in Beziehung zur Positivkontrolle Hep3B gesetzt. In Tabelle B des Anhangs ist das errechnete relative Expressionsniveau der CRP mRNA angegeben, wobei ein Wert größer als Null einen positiven CRP mRNA Nachweis ausdrückt. Aus einigen Proben konnte, wie aus der Tabelle B ersichtlich, nicht auf die CRP-Expression geschlossen werden, da aufgrund des geringen RNA-Gehaltes dieser Proben die interne HPRT-Kontrolle zu schwache Signale lieferte. C_t -Werte der HPRT-Amplifikations-Plots lagen normalerweise in der Größenordnung zwischen 20 und 25. Proben mit Werten über 30 wurden von weiteren Analysen ausgeschlossen. Abbildung 6 gibt ein repräsentatives Beispiel von CRP und HPRT Amplifikations-Plots für die drei verschiedenen Nierenregionen (Patient Nr. 41). Des Weiteren muss darauf hingewiesen werden, dass eine Probe (Patient Nr. 39) aufgrund oben genannter histologischer Gegebenheiten aus der Wertung genommen wurde.

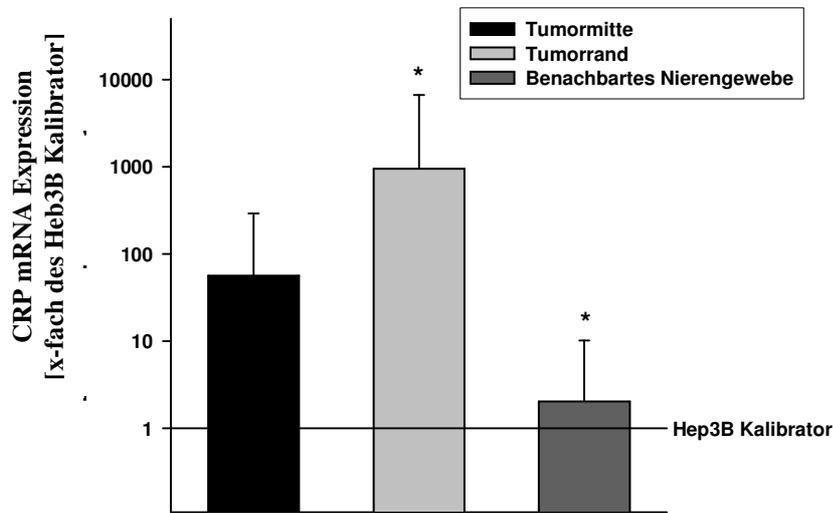
Abbildung 6: CRP mRNA-Nachweis mittels quantitativer *real-time* TaqMan™ PCR



Dargestellt sind die Amplifikationskurven für den Nachweis von CRP mRNA (oben) und HPRT mRNA (unten) des Patienten 41. C1, 2 Tumorzentrum; C3, 4 Tumorrandzone; C5, 6 benachbartes Nierengewebe. x-Achse: PCR-Zyklen. y-Achse: normalisiertes Reportersignal ΔR_n (VIC-Farbstoff für CRP, FAM-Farbstoff für HPRT)

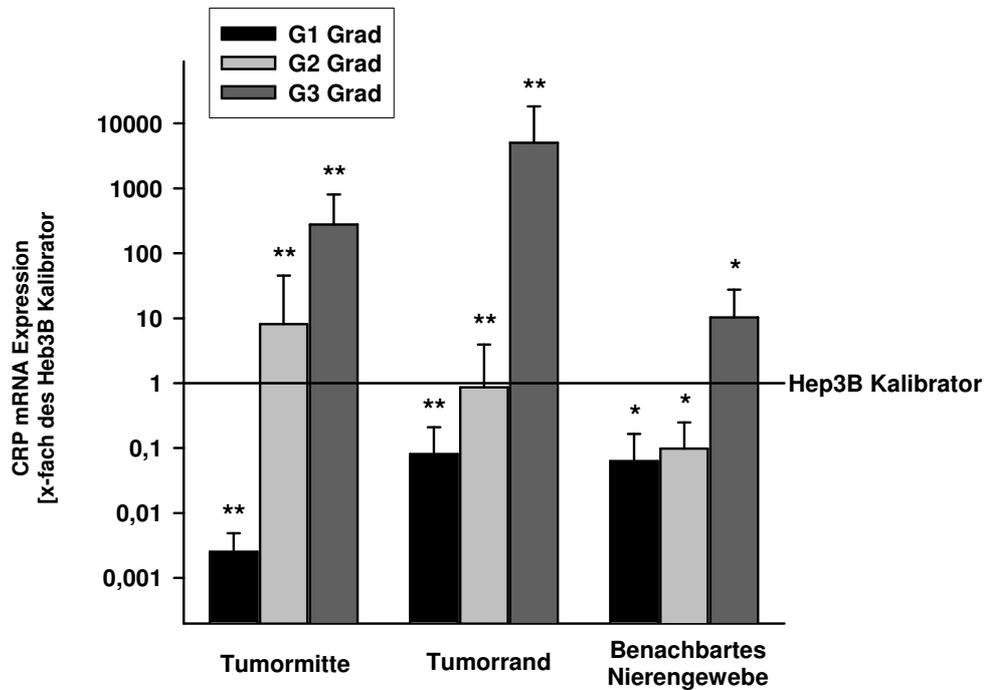
In solchen Proben, die zur Analyse geeignet waren, wurde eine bemerkenswert höhere CRP-mRNA-Expression im tumorabstammenden Gewebe im Vergleich zu makroskopisch gesunden Bereichen beobachtet. Dieser Unterschied war statistisch signifikant zwischen der Tumorgrenzzone und angrenzenden Nierengewebe (Wilcoxon-Test, $p < 0.01$; Abbildung 7a). Die Höhe der CRP-Expression in den einzelnen Bereichen der Nephrektomiepräparate korrelierte jedoch hochsignifikant miteinander: $r = 0.964$ für das Tumorzentrum im Vergleich zur Randzone, $r = 0.822$ für das Tumorzentrum im Vergleich zum angrenzenden makroskopisch gesunden Nierengewebe und $r = 0.676$ für die Tumorgrenzzone im Vergleich zum angrenzenden makroskopisch gesunden Nierengewebe (alle $p < 0.001$). Dies lässt auf

Abbildung 7a: CRP mRNA-Expression aller 39 Nierenzellkarzinome bezogen auf Tumorzentrum, Randzone und angrenzendes Nierengewebe in der *real-time* TaqMan™ PCR



CRP mRNA-Expression als Mittelwert \pm SD; * $p < 0.01$. Wilcoxon Test

Abbildung 7b: CRP mRNA-Spiegel dreier verschiedener Tumorregionen im Hinblick auf den Grad der Differenzierung in der *real-time* TaqMan™ PCR

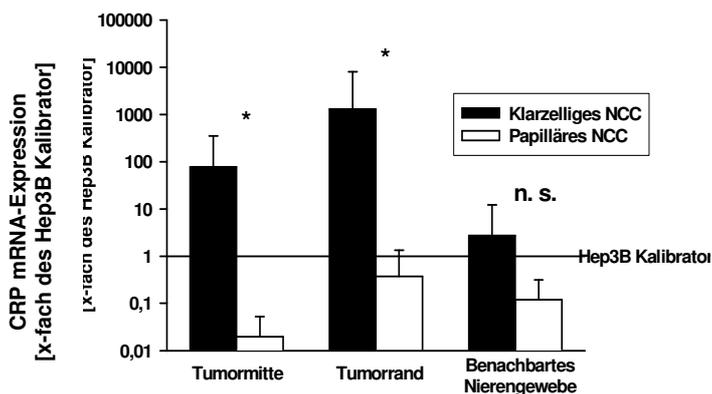


** $p < 0.01$ für Tumorzentrum und Grenzzone; * $p < 0.05$ für angrenzendes Nierengewebe. Kruskal Wallis-Test

eine parakrine oder systemische Stimulation der CRP-Expression, nicht jedoch auf eine intrinsische oder autokrine Stimulation schließen. Die Höhe der CRP-Expression korrelierte darüber hinaus sehr mit dem Differenzierungsgrad (G-Stadium; $\chi^2 = 12.74$, $p < 0.01$ für das Tumorzentrum; $\chi^2 = 13.64$, $p < 0.01$ für die Tumorrandzone und $\chi^2 = 6.73$, $p < 0.05$ für angrenzendes makroskopisch gesundes Nierengewebe). Die CRP mRNA-Spiegel in Abhängigkeit vom jeweiligen Tumorgrad wurden in Abbildung 7b graphisch anschaulich gemacht. Dagegen fand sich keine Abhängigkeit der CRP-Expression vom Tumorstadium (nicht gezeigt).

Die Analyse der histologischen Subtypen (klarzellig vs. papillär) offenbarte zudem eine signifikant höhere CRP-Expression in klarzelligen Tumoren (Abbildung 8, $p < 0.05$, Mann-Whitney U-Test).

Abbildung 8: CRP mRNA-Expression in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp



n.s. nicht signifikant

Der Vergleich zwischen RNA- und Proteinexpression ist in Tabelle 4 gegenübergestellt.

Als besonders interessant konnte zudem eine signifikante Korrelation zwischen den quantitativen CRP mRNA Spiegeln innerhalb des Tumors und den CRP Plasmaspiegeln nachgewiesen werden (Abbildung 9). Diese Korrelation bestand sowohl für das Tumorzentrum, den Tumorrand als auch das angrenzende gesunde Nierengewebe (für die ersten beiden gezeigt in Abbildung 9).

Tabelle 4: Quantitative Darstellung des CRP-Proteinnachweises in der immunhistochemischen Untersuchung und der gemessenen CRP mRNA-Expression in der *real-time* PCR bezogen auf die ursprüngliche Tumor- bzw. Nierenregion

Tumor/- Nierenregion	CRP-Protein		CRP mRNA	
	+	-	+	-
1	22 (56%)	17 (44%)	25 (78%)	7 (22%)
2	33 (85%)	6 (15%)	30 (83%)	6 (17%)
3	21 (54%)	18 (46%)	32 (89%)	4 (11%)

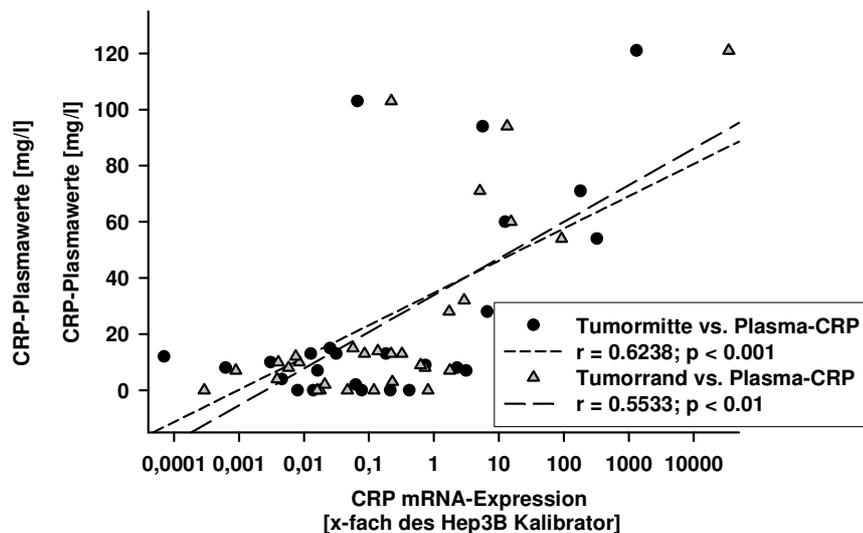
1 Tumorzentrum, 2 Grenzzone, 3 angrenzendes Nierengewebe

+ positiver CRP-Nachweis (> 10 % Rotfärbung bzw. relatives Expressionsniveau > Null)

- CRP negativ (keine oder < 10 % Anfärbung bzw. relatives Expressionsniveau bei Null)

Angabe in Absolutzahlen der Proben und in Prozent

Abbildung 9: Korrelation zwischen präoperativen CRP-Plasmaspiegel und CRP mRNA Expression innerhalb des Tumors



Graphische Darstellung der Abhängigkeit der CRP mRNA vom präoperativen CRP-Plasmaspiegel. Auch nach Korrektur möglicher Störfaktoren wie Alter, Geschlecht, histologischem Subtyp sind die Korrelationen noch signifikant.

Tabelle B (siehe Anhang) zeigt eine sehr viel detailliertere Übersicht über den Zusammenhang der quantitativen Expression von CRP auf Protein- und mRNA-Ebene. Hieraus ließ sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen beiden Variablen ableiten.

4. Diskussion

Patienten, die an einem Nierenzellkarzinom erkrankt sind, weisen eine eingeschränkte Überlebenszeit, insbesondere bei fortgeschrittenen Tumoren, auf. Eine Heilung ist hier selten möglich. Ziel palliativer Therapieansätze sollte – neben einer rein supportiven Behandlung – die Verlängerung der Überlebenszeit sein. Ob eine aktive Intervention bei fortgeschrittenen Malignomen Erfolg versprechend ist, kann oft erst retrospektiv beurteilt werden. So ist es hilfreich, sich prognostischer Faktoren zu bedienen, mit deren Hilfe Überlebenszeit und Prognose des Patienten abgeschätzt werden können. Des Weiteren ist die Überlegung anzustellen, welche Rolle dieser Marker in der Pathogenese und Entwicklung des malignen Tumors besitzt. Ist es möglich, diesen Sachverhalt zu klären, so ergeben sich hieraus mögliche Ansatzpunkte für eine bessere palliative oder sogar kurative Therapie der jeweiligen Krebserkrankung.

In Anlehnung an die Tatsache, dass zahlreiche Studien [Masuda et al., 1998; Atzpodien et al., 2003; Cassamassima et al., 2005] eine postoperative Erhöhung der CRP-Spiegel im Blut von Patienten mit erneuter Tumorprogression zeigten, lässt sich spekulieren, ob es eine positive Korrelation zwischen CRP-Wert und Ausmaß des Tumors (Stadium, Metastasen) gibt und der Tumor der Herkunftsort erhöhter Plasma-CRP-Werte ist. Es stellt sich die Frage nach einem Zusammenhang zwischen lokalen und invasiven tumorösen Prozessen und dem Vorkommen des Akut-Phase-Proteins im Plasma.

Ziel dieser Arbeit war der Nachweis einer CRP-Synthese durch Tumorzelllinien und Nierenzellkarzinome; der Korrelation zu Plasma-CRP-Werten untersuchter Patienten vor und nach einer Tumornephrektomie galt dabei besonderes Augenmerk.

4.1 Präoperative Plasma-CRP-Werte

Bei den meisten der hier untersuchten Patienten bestand ein mit dem Tumorleiden einhergehender erhöhter CRP-Plasmawert (> 5 mg/l). Diese CRP-Erhöhung war klinisch nicht auf einen Infekt (Fieber, Schüttelfrost, Husten, Dysurie) zurückzuführen und die Patienten befanden sich in einem befriedigenden Allgemeinzustand, welcher nicht gegen die Durchführung einer Tumornephrektomie sprach.

Die präoperativen CRP-Plasmaspiegel zeigten eine signifikante Korrelation zum Tumorstadium [TNM-Klassifikation gemäß UICC, Guinan et al., 1997]. Diese Befunde passen gut zu Daten aus der Literatur, die zeigten, dass besonders Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren hohe CRP-Plasma-Werte aufweisen, die vermutlich als

prognostisch ungünstiges Zeichen zu werten sind. Verschiedene Autoren konnten einen Zusammenhang zwischen präoperativem CRP-Wert und der Ausdehnung sowie dem malignen Potential von bösartigen Tumoren darstellen [Wu et al., 1996; Wigmore et al., 2001; Earlam et al., 1996]. Nozoe et al. studierten 127 Patienten mit kolorektalem Karzinom und fanden eine signifikant höhere Inzidenz an Lebermetastasen, Peritonealkarzinomatose, vergrößerten Lymphknoten und intravaskulärer Invasion bei Patienten mit präoperativ erhöhten CRP-Werten im Vergleich zu denen mit niedrigeren Werten [Nozoe et al., 1998]. Wigmore et al. (2001) untersuchte die CRP-Plasma-Spiegel von Patienten (n = 202) mit kolorektalem Karzinom vor und nach der Operation [Wigmore et al., 2001]. Hierbei ergab sich bei 36 % der Patienten ein präoperativer CRP-Wert von 10 mg/l oder mehr, welcher postoperativ bei nur noch 5 % der operierten Patienten erhöht war. Es lässt sich auch hier vermuten, dass der primäre Tumor in direkter oder indirekter Form an der CRP-Produktion beteiligt ist.

Einige Studien zeigten eine Abhängigkeit des CRP-Wertes von der Tumorlast. Es bestanden höhere CRP-Spiegel bei Patienten mit Metastasen als bei denen in lokalisierten Stadien [Huang et al., 2001; O’Gorman et al., 2000; Barber et al., 1999]. Ebenso zeigten sich positive Korrelationen zwischen Volumen der Lebermetastasen bei kolorektalen Karzinomen und den Serum-Werten von IL-6. Einige Studien versuchten zu belegen, dass eine zunehmende Tumormasse mit einer vergesellschafteten Zunahme an Tumornekrose und Entzündung einhergehe, die die erhöhten Plasma-CRP-Werte widerspiegeln würden [McMillan et al., 1995; Wu et al., 1996; O’Gorman et al., 2000; Wigmore et al., 2001]. Dies unterstreicht unsere Beobachtungen, die eine Abhängigkeit zwischen Tumorstadium und CRP-Plasmawerten zeigten. Die Tumormasse ist jedoch vermutlich nicht der einzige Faktor, der auf den CRP-Spiegel Einfluss nimmt. Zum einen kann ein Beitrag der Leber an einer CRP-Produktion nicht ausgeschlossen werden (IL-6-Steigerung im Plasma der Patienten, [Yoshida et al., 2002]), zum anderen bestehen jeweils unterschiedliche inflammatorische Veränderungen im Tumor, die im Weiteren noch näher erläutert werden.

Ob eine Zytokin- und/oder CRP-Produktion durch den primären Tumor selbst stattfindet oder die CRP-Plasmaspiegel eine inflammatorische Antwort darstellen, die mit dem Tumor assoziiert ist, ist eine Frage größten Interesses. Nierenzellkarzinome mit inflammatorischer Begleitreaktion wurden als besonders aggressive Formen mit schlechter Prognose erkannt [Oya et al., 2003; Oya et al., 2003]. Die Transkription von CRP wird sowohl durch Zytokine wie IL-6 und IL-1, aber auch durch Komplementkomponenten und Steroidhormonen induziert. Dabei binden die Transkriptionsfaktoren der hepatischen CRP-Expression an

C/EBP und STAT (*signal transducers and activators of transcription*) oberhalb des CRP-Promotors [Volanakis, 2001].

Neben einem Anstieg der CRP-Plasmaspiegel bei fortgeschrittenen Nierenzelltumoren hoben Studien eine gleichzeitige Aktivitätszunahme eines durch Zytokine induzierbaren Transkriptionsfaktors NF- κ B hervor. Zelllinien und Gewebeproben von Nierenzellkarzinomen zeigten erhöhte Aktivität für NF- κ B und C/EBP- β [Oya M et al., 2001], welchen synergistische Effekte auf die CRP-Expression zugeschrieben wurden [Agrawal et al., 2003] und schließlich mit einem inflammatorisch, aggressiven Phänotyp einhergehen. Eine Aktivierung von Signalen, die der Verstärkung oder der Induktion von CRP dienen, könnte eine entscheidende Bedeutung für den Nachweis einer CRP-Expression in Tumoren und dem erhöhten CRP-Plasmaspiegel haben.

Des Weiteren stellt sich die Frage, ob CRP in diesem Zusammenhang als Index für ein Tumorrezidiv (Vergleich postoperative Werte) genutzt werden könnte. Beispielsweise sind präoperativ erhöhte CRP-Werte im Vergleich zu normalen präoperativen Werten mit vermehrten Rezidiven nach kurativer Kolorektalresektion assoziiert [McMillan et al., 1995; Wigmore et al., 2001]. Während McMillan et al. (1995) über Tumorrezidive in 73 % der Fälle mit CRP-Werten über 5 mg/l und nur über 10 % der Patienten mit CRP-Spiegeln von weniger als 5 mg/l berichtete, fand Wigmore et al. (2001) keinen Unterschied in der Rezidivrate operierter Patienten mit erhöhten oder erniedrigten CRP-Werten.

Neuere Arbeiten von Miki et al. (2004) demonstrierten, dass eine präoperative Präsenz von Akut-Phase-Proteinen die postoperative Überlebenszeit bei Patienten mit Metastasen signifikant zu reduzieren vermag und ein erhöhtes Serum-CRP mit Rezidiven von Kolonkarzinomen assoziiert war [Miki et al., 2004].

Ein postoperativer Anstieg des CRP-Spiegels könnte Marker eines Tumorrezidivs sein. Auch nach Untersuchungen von Patienten mit Nierenzellkarzinomen postulierte Fujikawa et al. (1999), dass eine postoperative Verlaufsmessung von CRP das Potential für die Vorhersage eines Tumorrezidivs und der Überlebenszeit besäße [Fujikawa et al., 1999].

Die Rolle von CRP und der Veränderungen des Immunsystems bei Patienten mit metastasierten Nierenzellkarzinom sowohl prä- als auch postoperativ stellten einen Aspekt dar, der auch durch Fujikawa et al. (2000) Betrachtung fand. Patienten mit präoperativ erhöhten CRP zeigten nach der Tumornephrektomie eine verminderte Konzentration des Immunsuppressiven sauren Proteins (serum immunosuppressive acidic protein) und einer erhöhten Aktivität der Natürlichen Killerzellen. Fujikawa vermutete, dass im Falle des

präoperativ erhöhten CRPs der Tumor selbst proliferierende Faktoren produziert, welche nach erfolgter Tumornephrektomie jedoch wegfallen und die geschilderten Veränderungen im Immunsystem bedingen [Fujikawa et al., 2000].

Aufgrund geschilderter Studien wäre es auch in der vorliegenden Arbeit interessant gewesen, den Verlauf der Patienten mit präoperativ hohen CRP-Plasmawerten zu begleiten, um Aussagen über deren weitere Prognose hinsichtlich einer Assoziation mit Tumorrezidiven und der postoperativen Überlebenszeit treffen zu können.

4.2 Postoperative Plasma-CRP-Werte

Bei 20 der untersuchten Patienten war es möglich, postoperative CRP-Plasmawerte zu erheben. Die Wertigkeit ihrer Beurteilung muss jedoch kritisch begutachtet werden. Einerseits lassen sich über den gesundheitlichen Zustand zum Zeitpunkt der Abnahme nur wage Aussagen machen, andererseits ist uns das Messverfahren für die CRP-Bestimmung nur in einigen Fällen bekannt, da es hier auf die kollegiale Korrespondenz verschiedener medizinischer Einrichtungen ankam. Ungeachtet dieser Bemerkungen, ließen sich bei 55 % der Untersuchten sinkende CRP-Werte im Plasma konstatieren. Auffallend war hierbei, dass besonders Tumore mit hohen Tumorstadien und -graden und präoperativ hohem CRP-Plasmawert einen postoperativen CRP-Abfall im Plasma aufwiesen. Diese Tatsache könnte ein Indiz für eine autochthone CRP-Produktion besonders fortgeschrittener Tumoren sein, welche infolge der Tumornephrektomie sistiert.

Leider reichten die hier durchgeführten Untersuchungen zum postoperativen Verlauf nicht aus, Aussagen darüber zu treffen, ob erneut ansteigende CRP-Werte im Plasma mit einem Tumorrezidiv vergesellschaftet waren – so wie es Nozoe et al. in ihren Arbeiten dargesetzt hatten [Nozoe et al., 2000 und 2003]. Die Nachbeobachtungszeit unseres Patientenkollektivs hätte zu diesem Zweck länger ausfallen müssen.

4.3 Tumorzelllinien

Kultivierte unstimulierte Caki-Zellen und die Tumorzellreihen SK-RC 35,47 und 58 wurden mit Hilfe der APAAP-Technik und der *real-time* PCR auf eine Expression von CRP untersucht. Es ist bereits bekannt, dass Tumorzellen in der Lage sind, Substanzen wie Fibrinogen, welches wie CRP in die Gruppe der Akut-Phase-Proteine fällt, zu produzieren, um deren Vaskularisierungsprozess voranzutreiben [Blood und Zetter, 1990]. Merkmale maligner Zellen sind neben ihrer barriereüberschreitenden autonomen Wachstumstendenz auch die Aktivierung abnormer Stoffwechselwege und paraneoplastischer Syndrome. Diese

rühren einerseits von Tumorzellprodukten und auch von den von Tumorzellen induzierten Autoimmunmechanismen her. Ebenso nimmt klinisch die Bedeutung gewisser Differenzierungsmarker (Tumormarker), die von neoplastischen Zellen sezerniert oder von der Plasmazellmembran abgestoßen werden, aber auch im Serum der Patienten erhöht sind, zu.

Die durch diese Arbeit gezeigte homogene zytoplasmatische Anfärbung der verwendeten Tumorzelllinien für CRP in der immunhistochemischen Untersuchung belegte eine Expression von CRP auf Proteinebene. Frühere Arbeiten wiesen bereits die Anwesenheit von CRP im Zytoplasma von Kulturen stimulierter humaner Tubulusepithelzellen mittels APAAP-Technik nach. Allerdings fehlte die CRP-Anfärbung bei unstimulierten Tubulusepithelzellen [Lögering, 2001 und 2004]. In den oben genannten Zellpopulationen fand sich ein klares Amplifikationssignal für CRP-mRNA, was eine Transkription des Akut-Phase-Proteins CRP durch unstimulierte wie stimulierte Tumorzelllinien belegte. Der Nachweis einer renalen CRP-Synthese mittels *real-time* PCR gelang ebenfalls bei humanen Nierentubulusepithelzellen, die sich wie Hep3B-Zellen durch IL-6 stimulieren ließen [Lögering, 2001]. In unstimulierten Tubulusepithelzellen wies die erwähnte Studie nur vereinzelt CRP mRNA nach.

Die hier dargestellten Ergebnisse belegen die CRP-Synthese durch unstimulierte Tumorzellen, welches sowohl transkribiert (CRP mRNA-Nachweis mittels PCR) als auch translatiert (Protein-Nachweis mittels APAAP) werden kann. Inwiefern das CRP auch sezerniert wird, kann erst durch weiterführende Untersuchungen geklärt werden. Allerdings gelang der oben erwähnten Forschergruppe der Nachweis der CRP-Sekretion in stimulierten und unstimulierten Tubulusepithelzellen mittels Western Blot.

4.4 CRP-Expression durch Lymphozyten des peripheren Blutes

Durch die gezielte Untersuchung von peripheren Blutlymphozyten stellte sich heraus, dass sowohl unstimulierte als auch stimulierte Zellen zu keiner CRP-Synthese fähig waren. Diese Aussage ist prinzipiell unvereinbar mit Ergebnissen früherer Untersuchungen, in denen behauptet wurde, dass Lymphozyten ein Epitop exprimieren könnten, das durch einen polyklonalen Antikörper gegen CRP erkannt werden würde [Kuta und Baum, 1986]. Die Untersuchungen erfolgten jeweils mittels nach Immunpräzipitation angelegter SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) oder der Biotin-Avidin-Immunfluoreszenztechnik. Das Peptid soll ausschließlich membrangebunden vorliegen.

Untersuchungen von Baum et al. (1983) sprachen dem oberflächlichen CRP eine Rolle bei der Vermittlung der Zytotoxizität Natürlicher Killerzellen zu [Baum et al., 1983].

Erfolgt eine Denaturierung der CRP-Struktur, entsteht durch frei gewordene CRP-Untereinheiten ein so genanntes neoCRP. Dieses kommt als galaktosespezifischer Rezeptor an Membranen natürlicher Killerzellen und Makrophagen vor [Kolb-Bachofen, 1991]. Es ist jedoch nicht mehr in der Lage, Phosphocholin zu binden. Von einigen Autoren werden einzeln vorliegende Untereinheiten von CRP auch als modifiziertes CRP (mCRP) bezeichnet. Die Antigenität von nativem und modifiziertem CRP ist ungleich, da sich ausgebildete Epitope auf ihren Oberflächen unterscheiden. Die Formen besitzen ebenfalls verschiedene physikochemische Eigenschaften [Kresl et al., 1998]. Insofern wird deutlich, dass in der Beurteilung einer lokalen CRP-Synthese, seinem systemischen Auftreten und deren pathophysiologischer und klinischer Bedeutung Abstufungen nötig sind. Unsere Untersuchungen konnten jedoch zweifelsfrei klären, dass periphere Blutlymphozyten keine Transkription des CRP-Gens aufweisen, so dass die ursprünglich nachgewiesenen neoCRP- oder mCRP-Epitope auf Lymphozyten nicht von diesem Gen herkommen können.

Auch der Nachweis einer CRP-Synthese durch humane PBMC (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes, Lymphozyten und Monozyten) durch Ikuta et al. (1986) steht den in dieser Arbeit formulierten Ergebnissen entgegen. Hierbei wurde radioaktiv markiertes CRP in der SDS-PAGE nachgewiesen. In keiner der Studien wurde jedoch der Nachweis einer humanen mRNA-CRP-Expression mittels RT-PCR erbracht. Murphy et al. (1991) schloss nach Hybridisierung fast CRP mRNA-identischer Sequenzen auf ein von mononukleären Zellen exprimiertes CRP-Gen [Murphy et al., 1991]. Jedoch lässt sich auch bei 99%-iger Homologie zum CRP-Gen die CRP-Synthese nur vermuten, nicht beweisen. Des Weiteren zeigten neuere Untersuchungen von Nakahara et al. (2001) und Lögering (2004), dass bei Verwendung spezifischer monoklonaler Antikörper keine CRP-spezifische Anfärbung von mononukleären Zellen zu finden ist [Nakahara et al., 2001; Lögering, 2004]. Die hier gezeigten Ergebnisse an peripheren Lymphozyten bestätigen unter Einsatz ebenso spezifischer monoklonaler Antikörper die Ergebnisse dieser Studien.

4.5 Synthese von CRP in Nierenzellkarzinomen *in vivo*

Um die Frage nach einer signifikanten CRP-Expression und Synthese von CRP durch Nierenkarzinomzellen *in vivo* beantworten zu können, wurden Proben von 40 Tumorpatienten immunhistochemisch und molekularbiologisch untersucht. Alle Proben sind nach Indikationsstellung einer Tumornephrektomie zugänglich gemacht worden. In

Rücksichtnahme auf drei Entnahmezonen, die jedoch rein makroskopisch unterschieden wurden, ergaben sich Rückschlüsse auf eine der spezifischen Lokalisation entsprechenden CRP-Synthese.

Die Fähigkeit der Zellen in Nierenzellkarzinomen, CRP zu synthetisieren wurde sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene nachgewiesen. Hurlimann postulierte die Leber als einzigen Ort einer humanen CRP-Bildung *in vivo* [Hurlimann et al., 1966]. Dabei wurde auf den Nachweis mittels immunoelektrophoretischer Verfahren zurückgegriffen. Nach Arbeiten mit Tubulusepithelzellen von Transplantatnieren [Lögering, 2004], die eine CRP-Expression dieser Zellen aufwiesen und durch die hier vorliegende Arbeit wurde eine extrahepatische Synthese von CRP belegt. Es muss in diesem Zusammenhang darauf hingewiesen werden, dass bereits Gould und Weiser 2001 eine CRP-Expression auch auf RNA-Ebene, in menschlichen Epithelzellen des Respirationstraktes, erkannt haben [Gould und Weiser, 2001]. Hier wurde sie nun erstmals speziell für Nierenzellkarzinome beschrieben.

Durch die für CRP spezifische immunhistochemische Färbetechnik zeigte sich ein in Tumorzellen befindliches perinukleäres Färbemuster, welches jedoch in einigen Clusterverbänden in ein homogenes zytoplasmatisches Muster übergang. In der Tumorgrenzzone (2), die sich als besonders tumorzellreich darstellte, manifestierte sich der überwiegende Anteil der positiven CRP-Anfärbung. Da das Tumorzentrum weitgehend aus nekrotischem Material und weniger vitalen Tumorzellen bestand, wurden hier zwar ebenfalls CRP-positive Areale gefunden, jedoch in weitaus geringerem Umfang wie in der vital anmutenden Tumorgrenzzone. Die dritte Entnahmezone wurde dem makroskopisch gesund aussehenden Nierenanteil zugeordnet. Hierbei ist anzumerken, dass eine geordnete Struktur, wie sie in einer vollkommen gesunden Niere vorkommt, selten beobachtet werden konnte. Die Ergebnisse dieser Zone auf das Verhalten einer gesunden Niere übertragen zu wollen, wäre nicht tragbar, da es sich hier immer noch um eine Tumorniere handelt. Des Weiteren erfolgte die Entscheidung der Probeentnahme aus einer unbefallenen Nierenregion aufgrund subjektiver und ausschließlich makroskopischer Beurteilung. Insofern lässt sich feststellen, dass die mutmaßlichen gesunden Tubulusepithelzellen eine ähnliche perinukleäre, kombiniert mit einigen zytoplasmatischen Färbungen zeigten, wie es die Tumorzellen taten. Ob es sich hierbei tatsächlich um gesunde Nierenzellen oder um Zellen handelt, die bereits unter dem Einfluss des malignen Geschehens verändert wurden, ist fraglich. Aus ethischen Gründen verbietet es sich selbstverständlich, gesunde, vitale Nieren von Menschen zur Klärung dieser Frage zu untersuchen.

Diese Arbeit zeigt, dass Nierenkarzinomzellen fähig sind, das Protein CRP zu exprimieren. Diese Behauptung wird unterstützt durch die Tatsache, dass der verwendete monokleäre Antikörper für CRP sehr spezifisch ist. Nakahara et al. wiesen mit der gleichen Methodik CRP in Nierenstanzen von Kindern mit Glomerulonephritis nach, wobei sich CRP hier entlang von Kapillargefäßen fand und vermutet wurde, das es sich hierbei um plasmatisches CRP handelt [Nakahara et al., 2001]. Ähnliche Untersuchungen an Transplantatnieren zeigten eine CRP-Anfärbung von Tubulusepithelzellen nach einer Abstoßungsreaktion der Nierenrinde [Lögering et al., 2004] und die Untersucher sahen in diesem Zusammenhang ein CRP renalen Ursprungs. Die Arbeit von Nozoe et al. (2003) untersuchte Gewebeproben von 37 Ösophaguskarzinomen mittels immunhistochemischer Färbemethode und wies erstmals eine Expression von CRP in Ösophaguskarzinomzellen nach. Allerdings verwendeten die Forscher einen für CRP spezifischen, jedoch polyklonalen Antikörper (*sheep antihuman polyclonal CRP antibody*) [Nozoe et al., 2003].

Analog zu den Ergebnissen der immunhistochemischen Färbung ergab die molekularbiologische Untersuchung der Stanzzyylinder mittels *real-time* PCR eine positive CRP-Expression in allen Entnahmezonen, die jeweils in einer Größenordnung von 80 % lag. Im Tumor-abstammenden Gewebe wurde dabei eine signifikant höhere mRNA-Expression gemessen als im makroskopisch gesunden Gewebe. Ebenso wiesen besonders undifferenzierte und Nierentumore vom klarzelligem Typ signifikant höhere CRP mRNA-Transkripte auf. Beide Eigenschaften gehen mit einer schlechteren Prognose für den Patienten einher [Cheville et al., 2003].

Insgesamt belegen die hier aufgeführten Untersuchungsergebnisse eine autochthone Produktion des Akut-Phase-Proteins CRP durch Nierenkarzinomzellen. Interessanterweise korrelierten die CRP mRNA-Level aller Zonen mit dem im Plasma bestimmten CRP-Spiegel. Es lässt sich zu diesem Zeitpunkt nur vermuten, welchen Einfluss lokal gebildetes CRP auf den Plasmaspiegel hat, jedoch ist die enge Korrelation von CRP-Plasmaspiegeln und quantitativer CRP-Expression im Tumor ein gewichtiges Argument für einen direkten Einfluss der tumorständigen CRP-Produktion auf die CRP-Plasmaspiegel.

Nierenzellkarzinome sind oft von entzündlichen Reaktionen begleitet. Besonders aggressive Phänotypen zeigen paraneoplastische Syndrome einschließlich eines Anstiegs von Zytokinen (z.B. IL-6 und TNF α) und CRP im Blut. Der molekulare Mechanismus, der diesem Phänomen zugrunde liegt, ist weitgehend ungeklärt. Untersuchungen von Oya et al. an Nierenzellkarzinomen zeigen, dass zytokininduzierende Transkriptionsfaktoren, der Nuklearfaktor κ B (NF- κ B) und CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP- β), eine Rolle in

der Progression von Nierenzellkarzinomen spielen [Oya et al., 2003]. Insbesondere fortgeschrittene Tumore ($> pT_3$) und sämtliche mit Metastasen befallene Patientenproben zeigten bei Oya et al. erhöhte Aktivitäten von NF- κ B in der elektrophoretischen Analyse. Die Serum-CRP-Erhöhung korrelierte mit der erhöhten NF- κ B-Aktivität, was die ursächliche Rolle des Transkriptionsfaktors bei inflammatorischen, paraneoplastischen Prozessen des Nierenzellkarzinoms unterstreicht. Ähnliches gilt für Aktivitäten von C/EBP- β , welche ebenso vorzugsweise bei fortgeschrittenen und in die Nierenvene eingedrungenen Tumoren zu finden waren.

Analog dazu wurde bei vielen Malignomen eine signifikante Korrelation zwischen IL-6-Expression und Serum-CRP demonstriert [Tartour et al., 1994; Barber et al., 1999]. Der IL-6-Rezeptor konnte bei Patienten nachgewiesen werden, welche Metastasen oder einen hohen Tumorgrad aufwiesen. Diese Patienten zeigten gleichzeitig erhöhte Serum-IL-6-Spiegel. Auch Takenava et al. fanden IL-6-Rezeptortranskripte in Nierenzellkarzinomen und Zelllinien [Takenava et al., 1991]. Eine Produktion von IL-6 und TNF- α durch Nierenzellkarzinome wiesen Gogusev et al. (1993) *in vitro* und *in vivo* sowohl auf Protein- als auch auf RNA-Ebene nach [Gogusev et al., 1993]. Takenava et al. (1991) zeigten ebenfalls eine IL-6-Expression in Nierenzellkarzinomen und Zelllinien [Takenava et al., 1991]. Hier ging die hohe IL-6-Expression auch mit einem höheren Anstieg von Serum-CRP einher. Gleiches galt für die Inzidenz von Lymphknotenmetastasen.

Die autochthone CRP-Expression in Nierenzellkarzinomen lässt sich also durch eine auto- und parakrine IL-6 Wirkung im Tumor, die zur weiteren Aktivierung pro-inflammatorischer Transkriptionsfaktoren führt, erklären. Insofern spiegelt die CRP-Expression insbesondere den Phänotyp inflammatorisch veränderter Karzinome wider.

Als Vergleich zu Nierenzellkarzinomen wurde Prostatakarzinomgewebe von drei Patienten in gleicher Weise wie die oben genannten Tumoren untersucht. Die Probeentnahme erfolgte sofort nach geplanter radikaler Prostatektomie. Aus drei verschiedenen Entnahmezonen der Prostata nach Prostatektomie aufgrund eines Prostatakarzinoms ergaben sich Rotfärbungen für CRP in drüsigen Abschnitten der Prostata. Alle drei Karzinome zeigten auch in der CRP-spezifischen PCR ein positives Ergebnis – unabhängig von der Lokalisation.

Somit scheint die CRP-Expression nicht nur auf Nierenkarzinome beschränkt zu sein. Ramage et al. (2004) wiesen in malignen Lungenepithelzelllinien (A549) mittels ELISA, Western Blot und einer Immunfluoreszenztechnik eine Expression von CRP im Zytoplasma und Kerngebieten der Zellen im Anschluss an die Behandlung mit ultrafeinen

Karbonpartikeln (ufCB) oder PM10 nach. Sie vermuteten, dass es sich bei der Sekretion von CRP um ein Ergebnis des oxidativen Stresses handelt, denn die Sekretion konnte durch Zugabe von Antioxidantien reduziert werden [Ramage et al., 2004]. Letztlich stellt sich die hier untersuchte CRP-Synthese als Zeichen einer inflammatorischen Antwort auf die Stimulation in Form von inhalierten Partikeln dar.

Auch wurde bereits darauf hingewiesen, dass Arbeiten von Nozoe et al. (2003) eine CRP-Expression in Ösophaguskarzinomen zeigten, zwar nicht auf transkriptioneller Ebene, jedoch vermuteten auch sie eine intratumorale CRP-Expression [Nozoe et al., 2003]. Bei Tumoren, die eine CRP-Expression zeigten, bestand eine höhere Inzidenz für den Einbruch ins venöse und lymphatische System und das Vorkommen von Metastasen. Die präoperativ gemessenen CRP-Plasma-Werte der Tumoren mit nachgewiesener CRP-Expression korrelierten mit einer intratumoralen CRP-Expression. Auch die Fünfjahres-Überlebensrate war geringer bei nachweislicher CRP-Expression. CRP kann in diesem Fall als prognostischer Faktor betrachtet werden.

4.6 CRP als prognostischer Indikator maligner Erkrankungen

Die Überlebenszeit maligner Erkrankungen wird von verschiedenen prognostischen Faktoren bestimmt. Für viele Tumorentitäten wurde CRP als prognostischer Indikator beschrieben [Mahmoud et al., 2002]. Die Bedeutsamkeit des CRPs als ein Vorhersagewert für das Überleben und die Prognose von malignen Erkrankungen zeigte sich in Untersuchungen von Melanomen [Tartour et al., 1994], multiplen Myelomen [Pelliniemi et al., 1995] und Lymphomen [Legouffe et al., 1998], aber auch bei ovariellen [Kodoma et al., 1999], gastrointestinalen [O’Gorman et al., 2000] und pankreatischen [Barber et al., 1999] Krebserkrankungen.

Eine Studie von Atzpodien et al. (2003), an der 425 Patienten mit Nierenzellkarzinomen teilnahmen, eröffnete die Sicht auf ein umfassendes prognostisches System für das Überleben dieser Patienten [Atzpodien et al., 2003]. Sie berücksichtigten nicht nur das Vorkommen von Metastasen, sondern auch Serumspiegel von Neutrophilen Granulozyten, LDH und CRP. Den entscheidenden Faktor für die Prognosebeurteilung bildet nach dieser Studie die Anzahl der Neutrophilen Granulozyten (> 6500 Zellen/ μl), aber auch das CRP zeigte sich als ein signifikanter Prognosefaktor. Masuda et al. (1998) wies CRP und das jeweilige T-Stadium (Kapselinfiltration) als wichtigsten prognostischen Faktor bezogen auf die Fünfjahresüberlebensrate nach kurativer Tumornephrektomie nach [Masuda et al., 1998]. Eine weitere Studie befasste sich mit metastasierten Nierenzellkarzinompatienten, die einer

subkutanen IL-2-Immuntherapie unterzogen wurden. Casamassima et al. (2005) assoziierte erhöhtes Fibrinogen und CRP mit einer schlechten Prognose, was die Überlebenszeit dieser Patienten angeht [Casamassima et al., 2005]. Mit einem hohen Grad an Signifikanz wurde CRP als der wichtigste unabhängige Faktor zur Beurteilung der Prognose des Patienten postuliert.

Der Nachweis von Akut-Phase-Proteinen und Zytokinen bei Patienten, die malignen Krankheitsprozessen unterliegen, wirft die Frage auf, welche Bedeutung diese als Tumormarker oder Risikofaktor für das pathophysiologische Geschehen haben. Klee und Go definierten den idealen Tumormarker als eine bei allen Patienten mit dem spezifischen Tumor einheitlich positiv getestete Substanz, die normalerweise nicht im Blut präsentiert ist und deren Konzentration proportional zur Größe oder Aktivität des Tumors ist. Gleichzeitig war festzustellen, dass noch kein idealer Tumormarker gefunden wurde [Klee und Go, 1982]. Auch CRP wird dem Anspruch eines idealen Tumormarkers bei weitem nicht gerecht, stellt es in der Medizin doch den Prototyp eines unspezifischen Entzündungsmarkers dar. Dennoch macht die Tatsache, dass viele Studien bei der Untersuchung von Patienten mit malignen Krankheitsprozessen erhöhte CRP-Spiegel finden [Terada et al., 1990 gynäkologische Malignome; Jablonska et al., 1997 Mundhöhlenkarzinom; Erlinger et al., 2004 kolorektales Karzinom], die Behauptung glaubwürdig, dass CRP als ein Marker für Proliferation und Entwicklung des Tumors in Betracht kommt. Beispielhaft kann dafür ein Fallreport von Nozoe et al. (2000) herangezogen werden, indem ein Tumorrezidiv eines Ösophaguskarzinoms jeweils mit erhöhtem CRP-Spiegel und die Reduktion des Tumors durch therapeutische Intervention mit einem Rückgang des CRP-Wertes einhergingen [Nozoe et al., 2000]. Ähnliche Ergebnisse erzielten Terada et al. (1990) bei der Beobachtung von Patienten mit gynäkologischen Malignomen. Auch hier reflektierte der CRP-Spiegel im Blut den Status der Erkrankung [Terada et al., 1990].

Die Hypothese, CRP als Risikofaktor für die Entstehung von Malignomen zu verifizieren, wird durch die Rolle chronischer Entzündungen bei der Entstehung von Kolonkarzinomen und die strenge Assoziation erhöhter CRP-Konzentration und der Entwicklung des Kolonkarzinoms unterstützt [Erlinger et al., 2004]. Durch Einnahme von Aspirin und NSAIDs kann das Risiko von Kolonkarzinomen reduziert werden [Baron et al., 2003; Sandler et al., 2003]. Interessanterweise wurde bei Krebspatienten durch eine kurze Ibuprofen-Applikation eine signifikante Senkung der Plasma-CRP-Werte erreicht [Preston et al., 1995; McMillan et al., 1999]. Dieser Zusammenhang lässt auf zukünftige interventionelle Möglichkeiten im Rahmen der Krebsbehandlung hoffen.

4.7 Einfluss des CRP in der Pathogenese nicht maligner Erkrankungen

Einen Ausblick auf die umfassende Bedeutung des CRP mit lokalem Ursprung geben folgende beispielhafte Erläuterungen:

In der Pathogenese arteriosklerotischer Erkrankungen manifestierte sich, neben der bekannten Ablagerung von Lipiden, eine Beteiligung inflammatorischer, zellulärer und molekularer Mechanismen. Diese tragen entscheidend zur Entstehung der Arteriosklerose bei [Libby, 1995; Ridker, 1998]. Dies ist nicht nur durch das Eindringen von Immunzellen, wie Monozyten, in die Arterienwände bedingt [Ross, 1999; Libby, 1995], sondern äußerte sich auch in nachweisbar erhöhten Entzündungsmarkern, wie CRP, im Blut von Patienten mit Myokardinfarkt [de Beer et al., 1982]. CRP wurde auch in atherosklerotischen Plaques, jedoch nicht in normalen Gefäßwänden, lokalisiert [Lagrand, 1999; Reynolds, 1987]. Später etablierte sich CRP als strenger, unabhängiger prädiktiver Marker für die Beurteilung des Risikos kardiovaskulärer Ereignisse [Ridker et al., 1997]. Dabei korreliert die Erhöhung des CRPs mit einer ungünstigen Prognose und mit einem, im Vergleich zu Patienten mit normalem CRP-Spiegel, erhöhten vaskulären Risiko, und zwar auch dann, wenn keine zusätzliche Hyperlipidämie vorliegt [Ridker et al., 1998]. Die Bedeutung von CRP im Geschehen der Arteriosklerose-Entwicklung wird vor allem durch Funde einer lokalen, Gefäßwand-ständigen CRP-Expression gestützt [Yasoshima et al., 2001; Jabs et al., 2003].

Pro-inflammatorische Effekte, die CRP auf die Progression vaskulärer Erkrankungen haben könnte, sind neben der Komplementaktivierung und der Induktion von Zelladhäsionsmolekülen und Gewebefaktoren auch die Vermittlung des LDL-Anstiegs durch endotheliale Makrophagen und die Induktion der Monozytenrekrutierung in die Arterienwände [Torzewski et al., 2000; Bhakdi et al., 1999; Pasceri et al., 2001; Zwaka et al., 2001].

Inwiefern die Erkenntnisse um die Bedeutung des CRPs bei kardiovaskulären Erkrankungen klinisch nutzbar gemacht werden können, ist Gegenstand derzeitiger Forschungsbemühungen. So wiesen Ridker et al. (1999) eine Reduktion der CRP-Konzentration nach therapeutischer Anwendung von Statinen und Aspirin nach [Ridker et al., 1999]. Ob der Einsatz insbesondere der Statine in der klinischen Praxis zum Einsatz kommen wird, lässt sich noch nicht abschließend beurteilen, aber Ergebnisse verschiedener Studien zeigen eine Risikoreduktion im Auftreten primär koronarer Ereignisse und CRP als vermutlichen Faktor der Prävention [Albert et al., 2001; Ridker et al., 2001].

Neben dem Nachweis von CRP in arteriosklerotischen Plaques konnte CRP auch in Pyramidalneuronen und befallenen Regionen des Gehirns bei an M. Alzheimer Erkrankten registriert werden [Yasojima et al., 2000]. Der Nachweis wurde sowohl für die Protein- (Western Blot und Immunhistochemie) als auch mRNA-Ebene (RT-PCR) bestätigt. Die Forscher schrieben dem CRP, ebenso wie es Gershov et al. tat [Gershov et al., 2000], eine zentrale Rolle in der angeborenen Immunantwort als Abwehrschutz zu und konstatierten zusätzlich, dass CRP selbst destruktive Wirkungen auf das Gewebe hat. Die Überlegungen, CRP zum Ziel therapeutischer Interventionen zu nutzen, sind unter anderem durch Arbeiten von McGeer et al. zu verstehen. In diesen Untersuchungen war eine niedrigere Prävalenz für die Alzheimer Erkrankung bei Patienten zu verzeichnen, welche anti-inflammatorische Mittel eingenommen hatten [McGeer et al., 1996].

Interessant ist im Gegenzug die Beobachtung von Szalai (2004), der CRP neben der Abwehr und Elimination von Pathogenen auch protektive Wirkungen bei Autoimmunerkrankungen (Lupus erythematoses, Multiple Sklerose) zugestand [Szalai, 2004]. Er nahm an, dass durch die bekannte Bindungsfähigkeit von CRP an Auto-Antigene die Beseitigung apoptotischer Zellen gefördert würde. Die Art und Weise dieses Schutzes gegen Autoimmunerkrankungen machte er jedoch abhängig von Änderungen in der Konzentration und Glykolysation des zirkulierenden CRPs. Hierbei stellte er die Hypothese auf, dass CRP unter normalen Bedingungen mittels Komplementaktivierung non-inflammatorisch apoptotische Zellen beseitigt, während einer Entzündungssituation dagegen glykosyliertes CRP – zusammen mit Fc γ R – die Beseitigung der opsonierten Ziele durch Monozyten unterstützt und so die Entzündung eindämmt.

Durch die aufgeführten Erörterungen wird deutlich, welcher möglicherweise hohen Stellenwert das CRP nicht nur systemisch, sondern auch in der lokalen Abwehr- und Schutzreaktion entzündlicher [Pratt et al., 2002] oder maligne veränderter Gewebe hat. Speziell für diese Arbeit gilt, dass ein so genanntes „Tumor-CRP“ mit lokalem Ursprung in Patienten mit Nierenzellkarzinom existiert. Ebenso rechtfertigen die Ergebnisse die Überwachung des CRPs bei Nierenzellkarzinompatienten nach operativen oder anderen therapeutischen Interventionen, und zwar nicht ausschließlich hinsichtlich der Qualität des CRPs als Entzündungsmarker, sondern auch als Faktor, der Auskunft über Therapieerfolg oder Rezidive maligner Geschehen im Organismus geben kann.

5. Zusammenfassung

Die bei Karzinomen oft nachweisbaren erhöhten Plasmawerte für das C-reaktive Protein (CRP) gaben Anlass, über eine mögliche Beteiligung maligner Gewebe an der Synthese des Akut-Phase-Proteins zu spekulieren. Lange galt die Leber als alleiniger Ort der CRP-Synthese. Nachdem jedoch Untersuchungen an Nierentransplantaten erstmals eine extrahepatische CRP-Synthese aufzeigten, stellte sich hier die Frage nach einer Produktion des CRPs durch Nierenzellkarzinome. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, eine Produktion des CRP durch Nierenzellkarzinome und Tumorzelllinien sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene zu beweisen. Zudem sollte die Betrachtung der Ergebnisse unter besonderer Berücksichtigung der CRP-Plasmawerte erfolgen, um die Rolle des Akut-Phase-Proteins im Rahmen maligner Erkrankungen abzuschätzen.

Für die Untersuchungen *in vivo* wurden Biopsien einer repräsentativen Anzahl von 40 Nierenzellkarzinomen im Anschluss an indizierte Tumornephrektomien entnommen. Dabei erfolgte die Probeentnahme aus dem Tumorzentrum, dem Tumorrand sowie dem makroskopisch gesunden, nicht befallenen Nierenpol. Gleichzeitig wurde ein in die Auswertung einfließender präoperativer und in 50 % der Fälle ein postoperativer Plasma-CRP-Wert ermittelt. Vergleichsweise erfolgte die Untersuchung der unstimulierten Tumorzelllinien Caki, SK-RC 35, SK-RC 47 und SK-RC 58 und von isolierten sowohl stimulierten als auch unstimulierten Lymphozyten des peripheren Blutes auf eine CRP-Synthese *in vitro*. Das Vorkommen des Proteins wurde hierbei durch die Verwendung monoklonaler, enzymmarkierter und gegen CRP gerichteter Antikörper im Rahmen einer immunhistochemischen Färbemethode beurteilt. Zur Klärung der Frage nach einer CRP-Expression wurden oben beschriebene Biopsien und Zellen nach Umwandlung (reverse Transkription) der isolierten mRNA in cDNA der quantitativen *real-time* RT-PCR zugänglich gemacht. Als Vergleichsparameter diente die humane Hepatom-Zelllinie Hep3B, die sich durch eine positive CRP-Expression auszeichnet.

Die immunhistochemischen Untersuchungen wiesen CRP insbesondere innerhalb der Tumorgrenzzone nach, wobei diese in einem perinukleären, zum Teil auch homogenen Muster der Tumorzellen zum Ausdruck kamen. Färbungen des unbefallenen Nierenpols bezogen sich auf die Tubulusepithelien, wobei diese weitgehend denen der Tumorzellen entsprachen. In allen Regionen war eine CRP-Expression (ca. 80 %) zu verzeichnen, welche sich in quantitativ höherem Maße im tumorabstammenden Gewebe feststellen ließ. Interessanterweise zeigten besonders undifferenzierte Tumoren eine hohe CRP-Expression,

ebenso ließ sich eine besonders hohe CRP-Expression im häufigsten Subtyp, dem klarzelligen Nierenzellkarzinom im Rahmen der molekularbiologischen Untersuchungen finden. Dessen ungeachtet korrelierte der quantitative CRP mRNA-Nachweis im Tumor mit den präoperativ ermittelten Plasma-Spiegeln für CRP. Auch fand sich eine signifikante Abhängigkeit der CRP-Plasma-Werte vom Tumorstadium und in eindrucksvoller Weise vom Differenzierungsgrad. Gleichzeitig offenbarte sich ein postoperativer Abfall der CRP-Plasma-Werte insbesondere bei fortgeschrittenen und undifferenzierten Tumoren, was die Vermutung einer lokalen Beteiligung des Tumors am Plasma-CRP impliziert. Die *in vitro*-Versuche der unstimulierten Tumorzelllinien sicherten den Nachweis einer CRP-Synthese sowohl durch die homogene zytoplasmatische Anfärbung in der APAAP-Technik als auch durch ein klares Amplifikationssignal für die CRP mRNA in der *real-time* PCR. Stattdessen zeigten isolierte stimulierte und unstimulierte Lymphozyten keine Fähigkeit zur CRP-Synthese, weder auf Protein- noch auf RNA-Ebene.

Die vorliegende Arbeit zeigt erstmalig die Fähigkeit von Nierenzellkarzinomen, CRP zu produzieren, auf und stellt die Bedeutung eines lokal synthetisierten CRPs, des Tumor-CRPs, für den Gesamtorganismus in ein neues Licht. Es lassen sich Vermutungen über die Ursache der lokalen CRP-Synthese und gegebenenfalls klinischer Konsequenzen anstellen. Die klinische Bedeutung, die aus einem Zusammenhang zwischen Tumor- und Plasma-CRP im Rahmen fortgeschrittener maligner Erkrankungen erwächst, bezieht sich auf eine mögliche Nutzung des CRPs als prognostischen Indikator. Ebenso könnte ein erneuter Anstieg des CRPs nach Tumornephrektomie auf eine erneute Tumorprogression hindeuten und das CRP als Risikofaktor oder Verlaufsparemeter karzinomatöser Erkrankungen glaubwürdig machen. Weitere Arbeiten sollten die molekularen Abläufe der lokalen CRP-Synthese näher beleuchten und Ergebnisse darüber liefern, in welchem Umfang es in den unterschiedlichsten Tumorformen (Tumorstadium, Differenzierung und Histologie) an den lokalen Schutz- und Abwehrmechanismen beteiligt ist.

6. Abkürzungen

AK	Antikörper
APAAP	Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase
BSA	Bovines Serum Albumin
cDNA	komplementäre DNA
CRP	C-reaktives Protein
C _t	Cycle of Threshold
DNA	Desoxyribunukleinsäure
FCS	Fetal Calf Serum
HCl	Hydrochloric Acid
Hep3B	Humane Hepatom-Zelllinie
HPRT	Hypoxanthinphosphoribosyl-Transferase
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
mRNA	Messenger-RNA
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCh	Phosphorylcholin
PCR	Polymerase Chain Reaction
PLA ₂	Phospholipase A ₂
RCC	Renal Cell Carcinoma
RNA	Ribunukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
SAP	Serum-Amyloid P
TBS	Tris Buffered Saline
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
UICC	Union International Contre Cancer
UpM	Umdrehungen pro Minute

7. Literaturverzeichnis

1. Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanow I, Knowles BB. Controlled synthesis of HbsAg in a different human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 1979;282:615-616
2. Agrawal A, Shrive AK, Greenhough TJ, Volanakis JE. Topology and structure of the C1q-binding site on C-reactive protein. *J Immunol.* 2001;166(6):3998-4004
3. Agrawal A, Cha-Molstad H, Samols D, Kushner I. Overexpressed nuclear factor- κ B can participate in endogenous C-reactive protein induction, and enhances the effects of C/EBP β and signal transducer and activator of transcription-3. *Immunology* 2003;108:539-547
4. Albert MA, Danielson E, Rifai N et al. Effect of statin therapy on C-reactive protein levels. The Pravastatin Inflammation/CRP Evaluation (PRINCE): a randomized trial and cohort study. *JAMA* 2001;286:64-70
5. Atzpodien J, Royston P, Wandert T, Reitz M et al. Metastatic renal carcinoma comprehensive prognostic system. *Br J Cancer* 2003;88:348-353
6. Barber MD, Fearon KC, Ross JA. Relationship of serum levels of interleukin-6, soluble interleukin-6 receptor and tumour necrosis factor receptors to the acute-phase protein response in advanced pancreatic cancer. *Clin Sci* 1999;96:83-87
7. Baron JA, Cole BF, Sandler RS, et al. A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas in patients with previous colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003; 348:883-890
8. Baum LL, James KK, Glaviano RR, Gewurz H. Possible role for C-reactive protein in the human natural killer cell response. *J Exp Med* 1983;157:301-311
9. Bhakdi S, Torzewski M, Klouche M et al. Complement and atherogenesis : binding of CRP to degraded, nonoxidized LDL enhances complement activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2348-2354
10. Bhakdi S, Torzewski M, Paprotka K, Schmitt S, Barsoom H, Suriyaphol P, Han SR, Lackner KJ, Husmann M. Possible protective role for C-reactive protein in atherogenesis: complement activation by modified lipoproteins halts before detrimental terminal sequence. *Circulation* 2004;109:1870-1876
11. Blood CH, Zetter BR. Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. *Biochim Biophys Acta* 1990;1032:89-118
12. Boenisch T. Färbemethoden. In: *Handbuch II immunchemischer Färbemethoden.* DAKO Corporation, Carpinteria, 3. Aufl., 1997; 22-27
13. Bokemeyer C, Hartmann T. Chemotherapy for renal cell carcinoma. *Anticancer Res* 1999;19:1541-1543

14. Bone RC. Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: what we do and do not know about cytokine regulation. *Crit Care Med* 1996; 24:163-172
15. Brkovic D, Stähler G. Stadiengerechte chirurgische Therapie des Nierenzellkarzinoms. *Der Onkologe* 1988;4:237-246
16. Casamassima A, Picciariello M, Quaranta M, et al. C-reactive protein: a biomarker of survival in patients with metastatic renal cell carcinomas treated with subcutaneous interleukin-2 based immunotherapy. *J Urol* 2005;173:52-55
17. Chan DY, Marshall FF. Surgery in advanced and metastatic renal cell carcinoma. *Cur Op in Urol* 1998;8:369-373
18. Cheville JC, Lohse CM, Zinck H, Weaver A, Blute ML. Comparisons of outcome and prognostic features among histologic subtypes of renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2003;27:612-624
19. Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, MacDonald S, Pulford KAF, Stein H, Mason DY. Immunoenzymatic labeling of monoklonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem* 1984;32:219-229
20. De Beer FC, Hind CR, Fox KM, et al. Measurement of serum C-reactive protein concentration in myocardial ischaemia and infarction. *Br Heart J* 1982;47:239-243
21. Du Clos TW, Zlock LT, Rubin RL. Analysis of the binding of C-reactive protein to histones and chromatin. *J Immunol* 1988;141:4266-4270
22. Earlam S, Glover C, Fordy C ET AL: Relation between tumour size, quality of life, and survival in patients with colorectal liver metastases. *J Clin Oncol* 1996;14:171-175
23. Erlinger TP, Platz EA, Nader R, Helzlsouer KJ. C-reactive protein and the risk of incident colorectal cancer. *Jama* 2004;291:585-590
24. Flanigan RC, Blumenstein BA, Salmon S, Crawford E. Cytoreduction Nephrectomy in metastatic renal cancer: results of Southwest Oncology group trial 8949. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2000;19:3.2a
25. Fujikawa K, Matsui Y, Oka H et al. Serum C-reactive protein level and the impact of cytoreductive surgery in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Urol* 1999;162:1934-1937
26. Fujikawa K, Matsui Y, Miura K, Kobayashi T, Oka H, Fukuzawa S, Takeuchi H. Serum immunosuppressive acidic protein and natural killer cell activity in patients with metastatic renal cell carcinoma before and after nephrectomy. *J Urol* 2000;164:673-675
27. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999;340:448-454

28. Gershov D, Kim SJ, Brot N, Elkon KB. C-reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an antiinflammatory innate immune response: Implications for systemic autoimmunity. *J Exp Med* 2000;192:1353-1363
29. Gogusev J, Augusti M, Chretien Y, Droz D. Interleukin-6 and TNF alpha production in human renal cell carcinoma. *Kidney Int* 1993;44:585-592
30. Gould JM, Weiser JN. Expression of C-reactive protein in the human respiratory tract. *Infect Immun* 2001;69:1747-54
31. Guinan P, Sobin LH, Algaba F, Badellino F, Kameyama S, MacLennan G, Novick A. TNM staging of renal cell carcinoma: Workgroup No. 3. Union International Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer* 1997;80:992-993
32. Henzler B, Bichler KH, Nelde HJ, Frosch I. Investigators on the heterogeneity of renal cell cancer (RCC) assessed by DNA single-cell cytometry. 1992;147:227A
33. Huang A, Tsavellas G. Acute-phase protein, survival and tumour recurrence in patients with colorectal cancer. *Br J Surg* 2001;88:1128
34. Hurlimann J, Thorbecke GJ, Hochwald GM. The liver as the site of C-reactive protein formation. *J Exp Med* 1966;123:365-378
35. Ikuta T, Okubo H, Ishibashi H, Okumura Y, Hayashida K. Human lymphocytes synthesize C-reactive protein. *Inflammation* 1986;10:223-232
36. Jablonska E, Piotrowski L, Grabowska Z. Serum levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α , sTNF-RI and CRP in patients with oral cavity cancer. *Pathol Oncol Res* 1997;3:126-129
37. Jabs WJ, Lögering BA, Gerke P, Kreft B, Wolber EM, Klinger MHF, Fricke L, Steinhoff J. The kidney as a second site of human C-reactive protein formation *in vivo*. *Eur J Immunol* 2003;33:152-161
38. Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, Feuer EJ, Thun MJ; American Cancer Society. Cancer Statistics, 2004. *CA Cancer J Clin* 2004;54:8-29
39. Jewell WS, Marnell LL, Rokeach LA, Du Clos TW. C-reactive protein binding to the Sm-D protein of snRNPS. Identification of a short polypeptide binding region. *Mol Immunol* 1993;30:701-708
40. Jiang SL, Samols C, Rzewnicki D et al. Kinetic modeling and mathematical analysis indicate that acute phase gene expression in Hep3B cells is regulated by both transcriptional and posttranskriptional mechanisms. *J Clin Invest* 1995;95:1253-1261
41. Klee G.G. and Go, V.L.W. Serum tumor markers. *MayoClinic Proceedings* 1982; 57:129

42. Kodoma J, Miyagi Y, Seki N et al. Serum C-reactive protein as a prognostic factor in patients with epithelial ovarian cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999;82:107-110
43. Kolb-Bachofen V. A review on the biological properties of C-reactive protein. *Immunobiol* 1991;183:133-145
44. Kozak W, Holtl W, Pummer K, Maier U, Jeschke K, Bucher A. Adrenalectomy – still a must in radical renal surgery? *Br J Urol* 1996;77:27-31
45. Kresl JJ, Potempa LA, Anderson BE. Conversion of native oligomeric to a modified monomeric form of human C-reactive protein. *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30:1415-1426
46. Kugler A, Stuhler G, Walden P, Zoller G, Zobywalski A, Brossart P, Trefzer U, Ullrich S, Muller CA, Becker V, Gross AJ, Hemmerlein B, Kanz L, Muller GH, Ringert RH. Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids. *Nat Med* 2000;6:332-336
47. Kushner I. Semantics, inflammation, cytokines and common sense. *Cytokine Growth Factor Rev* 1998;9:191-196
48. Kushner I, Feldmann G. Control of the acute phase response. Demonstration of C-reactive protein synthesis and secretion by hepatocytes during acute inflammation in the rabbit. *J Exp Med* 1978;148:466-477
49. Kuta, A. E. and Baum, L. L., C-reactive protein is produced by a small number of normal human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med* 1986;164:321-326
50. Lagrand WK, Visser CA, Hermens WT, Niessen HWM, Verheugt FWA, Wolbink GJ, Hack CE. C-reactive protein as a cardiovascular risk factor: More than an epiphenomenon? *Circulation* 1999;100:96-102
51. Legouffe E, Rodriguez C, Picot MC et al. C-reactive protein serum level is a valuable and simple prognostic marker in non Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma* 1998;31:351-357
52. Levy DA, Swanson DA, Slaton JW, Ellerhorst J, Dinney CP. Timely delivery of biological therapy after cytoreductive nephrectomy in carefully selected patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Urol* 1998;159:1168-1173
53. Libby P. Molecular basis of the acute coronary syndromes. *Circulation* 1995;91:2844-2850
54. Ljungberg B, Grankvist K, Rasmuson T. Serum acute phase reactants and prognosis in renal cell carcinoma. *Cancer* 1995;76:1435-1439
55. Lögering BA, Jabs WJ, Kreft B, Steinhoff J. Human renal tubular cells express membranebound C-reactive Protein. *Kidney & Blood Pressure Research* 2001;24:329

56. Lögering BA. Untersuchungen über eine lokale Synthese des C-reaktiven Proteins durch Tubulusepithelzellen der Niere am Beispiel der akuten Transplantatabstoßung. Med. Diss. Lübeck, 2004
57. Mahmoud FA, Rivera NL. The role of C-reactive protein as a prognostic indicator in advanced cancer. *Curr Oncol Rep* 2002;4:250-255
58. Martin SJ, Reutelingsperger CPM, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, Green DR. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 1995;182:1545-1556
59. Masuda H, Kurita Y, Fukuta K, et al: Significant prognostic factors for 5-year survival after curative resection of renal cell carcinoma. *Int J Urol* 1998;5:418-422
60. McGeer PL, Schulzer M, McGeer EG. Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiological studies. *Neurology* 1996;47:425-432
61. McMillan DC, Wigmore SJ, Fearon KC et al. A prospective randomized study of megestrol acetate and ibuprofen in gastrointestinal cancer patients with weight loss. *Br J Cancer* 1999;79:495-500
62. McMillan DC, Wotherspoon HA, Fearon KC et al. A prospective study of tumour recurrence and the acute-phase response after apparently curative colorectal cancer surgery. *Am J Surg* 1995;170:319-322
63. Miki C, Konishi N, Ojima E, Hatada T, Inoue Y, Kusunoki M. C-reactive protein as a prognostic variable that reflects uncontrolled up-regulation of the IL-1-IL-6 network system in colorectal carcinoma. *Dig Dis Sci* 2004;49:970-976
64. Murphy TM, Baum LL, Beaman KD. Extrahepatic transcription of human C-reactive protein. *J Exp Med* 1991;173:495-498
65. Nakahara C, Kanemoto K, Saito N, Oyake Y, Kamoda T, Nagata M, Matsui A. C-reactive protein frequently localizes in the kidney in glomerular diseases. *Clin Nephrol* 2001;55:365-370
66. Nozoe T, Korenaga D, Futatsugi M, Saeki H, Maehara Y, Sugimachi K. Immunohistochemical expression of C-reactive protein in squamous cell carcinoma of the esophagus – significance as a tumor marker. *Cancer Lett* 2003;192:89-95
67. Nozoe T, Matsumata T, Kitamura M, Sugimachi K. Significance of preoperative elevation of serum C-reactive protein as an indicator for prognosis in colorectal cancer. *Am J Surg* 1998;176:335-338
68. Nozoe T, Matsumata T, Sugimachi K. Serum level of C-reactive protein may be a marker for proliferation of esophageal carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2000;47:1622-1623

69. O’Gorman P, McMillan DC, McArdle CS. Prognostic factors in advanced gastrointestinal cancer patients with weight loss. *Nutr Cancer* 2000;37:36-40
70. Oya M, Ohtsubo M, Takayanagi A, Tachibana M, Shimizu N, Murai M: Constitutive activation of nuclear factor- κ B prevents TRAIL-induced apoptosis in renal cancer cells. *Oncogene* 2001;20:3888-3869
71. Oya M, Takayanagi A, Horiguchi A, Mizuno R, Ohtsubo M, Marumo K, Shimizu N, Murai M. Increased nuclear factor- κ B activation is related to the tumor development of renal cell carcinomas. *Carcinogenesis* 2003;24:377-384
72. Oya M, Horiguchi A, Mizuno R, Marumo K, Murai M. Increased activation of CCAAT/enhancer binding protein- β correlates with the invasiveness of renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003;9:1021-1027
73. Pasceri V, Chang J, Willerson JT et al. Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs. *Circulation* 2001;103:2531-2534
74. Pelliniemi TT, Irjala K, Mattila K et al. Immunoreactive interleukin-6 and acute phase proteins as prognostic factors in multiple myeloma. Finnish Leukemia Group. *Blood* 1995;85:765-771
75. Pepys MB. C-reactive protein fifty years on. *Lancet* 1981;1(8221):653-657
76. Pepys MB, Baltz ML. Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein. *Adv Immunol* 1983;34:141-211
77. Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest* 2003;111:1805-1812
78. Pratt JR, Basheer SA, Sacks SH. Local synthesis of complement component C3 regulates acute renal transplant rejection. *Nat Med* 2002;8:582-587
79. Preston T, Fearon KC, McMillan DC et al. Effect of ibuprofen on the acute-phase response and protein metabolism in patients with cancer and weight loss. *Br J Surg* 1995;82:229-234
80. Ramage L, Guy K. Expression of C-reactive protein and heat-shock protein-70 in the lung epithelial cell line A549, in response to PM10 exposure. *Inhal Toxicol* 2004;16:447-452
81. Reynolds GD, Vance RP. C-reactive protein immunohistochemical localization in normal and atherosclerotic human aortas. *Arch Pathol Lab Med* 1987;111:265-269
82. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ et al. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1997;336:973-979
83. Ridker PM. C-reactive protein and risks of future myocardial infarction and thrombotic stroke. *Eur Heart J* 1998;19:1-3

84. Ridker PM, Glynn RJ, Hennekens CH. C-reactive protein adds to the predictive value of total and HDL cholesterol in determining risk of first myocardial infarction. *Circulation* 1998;97:2007-2011
85. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA et al. Long-term effects of pravastatin on plasma concentration of C-reactive protein: the Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. *Circulation* 1999;100:230-235
86. Ridker PM, Rifai N, Clearfield M et al. Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events. *N Engl J Med* 2001;344:1959-1965
87. Ridker PM, Rifai N, Lowenthal SP. Rapid reduction in C-reactive protein with cerivastatin among 785 patients with primary hypercholesterolemia. *Circulation* 2001;103:1191-1193
88. Robey FA, Jones KD. C-reactive protein, chromatin, immunomodulation and the acute phase response: In vitro evidence for a possible "CRP cycle". *Prot Biol Fluids* 1986;34:267-270
89. Robson CJ, Churchill BM, Anderson W. The results of radical nephrectomy for renal cell carcinoma. *J Urol* 1969;101:297
90. Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-126
91. Sandler RS, Halabi S, Baron JA et al. A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas in patients with previous colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003;348:883-890
92. Schafhauser W, Ebert A, Brod J, Petsch S, Schrott KM. Lymph node involvement in renal cell carcinoma and survival chance by systematic lymphadenectomy. *Anticancer Res* 1999;19:1573-1578
93. Szalai A. C-reactive protein (CRP) and autoimmune disease: facts and conjectures. *Clin Dev Immunol* 2004;11:221-226
94. Takenawa J, Kaneko Y, Fukumoto M, Fukatsu A, Hirano T, Fukuyama H, Nakayama H, Fujita J, Yoshida O. Enhanced expression of interleukin-6 in primary human renal cell carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 1991;83:1668-1672
95. Tartour E, Dorval T, Mosseri V et al. Serum interleukin 6 and C-reactive protein levels correlate with resistance to IL-2 therapy and poor survival in melanoma patients. *Br J Cancer* 1994;69:911-913
96. Terada K, Hayashi G, Hokama Y. C-reactive protein and 6-Keto Prostaglandin F 1- α in patients with gynecologic cancer. *Gynecol Oncol* 1990;36:212-214
97. Thoenes W, Störkel S, Rumpelt HJ. Histology and classification of renal cell tumors (adenomas, oncocytomas, and carcinomas): the basic cytological and histological elements and their use for diagnostics. *Path Res Pract* 1986;181:125-143

98. Tillett WS, Francis T. Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus. *J Exp Med* 1930;52:561-571
99. Torzewski M, Rist C, Mortensen RF, Zwaka TP, Bienek M, Waltenberger J, Koenig W, Schmitz G, Hombach V, Torzewski J. C-reactive protein in the arterial intima: Role of C-reactive protein receptor-dependent monocyte recruitment in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2094-2099
100. van Leeuwen MA, van der Heijde DMFM, van Rijswijk MH et al. Interrelationship of outcome measures and process variables in early rheumatoid arthritis: a comparison of radiologic damage, physical disability, joint counts, and acute phase reactants. *J Rheumatol* 1994;21:425-429
101. Volanakis JE. Review: Human C-reactive protein: expression, structure, and function. *Mol Immunol* 2001;38:189-197
102. Wechsel HW, Feil G, Lahme S, Zumbraegel A, Petri E, Bichler KH. Control of hepatic parameters in renal cell carcinoma (RCC) by interleukin-6 (IL-6)?. *Anticancer Res* 1999;19:2577-2581
103. Wigmore SJ, McMahon AJ, Sturgeon CM, Fearon KC. Acute-phase protein response, survival and tumour recurrence in patients with colorectal cancer. *Br J Surg* 2001;88:255-260
104. Wu CW, Wang SR, Chao MF et al. Serum interleukin-6 levels reflect disease status of gastric cancer. *Am J Gastroenterol* 1996;91:1417-1422
105. Xing Z, Gauldie J, Cox G et al. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest* 1998;101:311-320
106. Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, McGeer PL. Generation of C-reactive protein and complement components in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 2001;158:1039-1051
107. Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, McGeer PL. Human neurons generate C-reactive protein and amyloid P: upregulation in Alzheimer's disease. *Brain Res* 2000;887:80-89
108. Yoshida N, Ikemoto S, Narita K, Sugimura K, Wada S, Yasumoto R, Kishimoto T, Nakatani T. Interleukin-6, tumour necrosis factor- α and interleukin-1 β in patients with renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 2002;86:1396-1400
109. Zwaka TP, Hombach V, Torzewski J. C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis. *Circulation* 2001;103:1194-1197

Tabelle A: Prä- und perioperative Charakteristika der 40 Nierenkarzinompatienten

Patient	Alter (Jahre)	Geschl.	Tumorgröße (cm)	Histologie	Tumorstadium T	Grading G	Plasma-CRP präop (mg/l)	Leukozytenzahl (/nl)	U-Kultur	Plasma-CRP postop (mg/l)
1	64	m	7	klar	2	2	40	6,2	neg.	n.b.
2	69	m	10,3	klar	3a	1	10	10,3	neg.	6
3	60	m	2,5	klar	1	2	18	7,7	neg.	64
5	65	m	7,1	klar	2	2	7	8,1	n. b.	<10
6	86	w	4,1	klar	3b	2	15	11,8	neg.	<3
7	41	m	7,5	klar	2	2	12	12,6	neg.	11,3
8	89	m	1	papillär	1	2	0	5,9	n. b.	n.b.
9	67	w	2,5	papillär	1	3	32	7,9	n. b.	9
10	60	m	6	klar	1	1	4	8,3	n. b.	35
11	55	m	11	klar	3b	2	0	6,9	neg.	n.b.
12	70	w	6	klar	3a	3	94	9,8	neg.	n.b.
13	62	m	7,5	papillär	3a	2	13	6,0	neg.	8,45
14	80	m	4,5	klar	1	2	71	7,3	n. b.	0,48

Patient	Alter	Geschl.	Tumorgröße	Histologie	Tumorstadium	Grading	Plasma-CRP präop	Leukozytenzahl	U-Kultur	Plasma-CRP postop
	(Jahre)		(cm)		T	G	(mg/l)	(/nl)		(mg/l)
15	46	w	5,6	klar	1	3	0	6,7	n. b.	n.b.
16	60	m	2,8	klar	1	2	0	4,8	neg.	n.b.
17	81	m	12	klar	3a	3	121	8.0	n. b.	n.b.
18	68	w	7,1	klar	2	2	0	7,4	n. b.	10
19	64	m	4,5	klar	1	2	13	8,4	n. b.	n.b.
20	50	m	3	klar	1	2	2	7.0	neg.	5
21	71	m	6	klar	1	3	28	8,1	n. b.	0,37
22	56	w	3,7	klar	1	2	0	9,1	n. b.	n.b.
23	71	m	4,5	papillär	1	2	0	8,1	n. b.	n.b.
24	61	m	5,3	papillär	3a	2	103	8,6	n. b.	6
25	68	m	5,4	papillär	1	2	7	9,5	n. b.	n.b.
26	61	w	5,5	klar	1	2	3	7,5	neg.	n.b.
27	71	w	13	klar	2	2	14	7,9	n. b.	n.b.
29	59	m	2,6	klar + papillär	1	2	0	6,1	neg.	17

Patient	Alter	Geschl.	Tumorgröße	Histologie	Tumorstadium	Grading	Plasma-CRP präop	Leukozytenzahl	U-Kultur	Plasma-CRP postop
	(Jahre)		(cm)		T	G	(mg/l)	(/nl)		(mg/l)
30	54	w	1,8	klar + papillär	1	2	0	6.0	neg.	n.b.
31	62	w	8	klar	2	2	60	9,2	neg.	40
32	61	w	2,6	klar	1	2	10	7,2	neg.	<6
33	46	m	3,6	klar	1	2	0	12,6	neg.	n.b.
34	68	m	6,5	klar	3a	2	1	11,4	neg.	81
35	63	m	12,5	klar	3b	2	9	6,5	n. b.	<5
36	73	m	13	klar	3a	1	3	5,1	neg.	285
38	77	w	4	papillär	1	2	8	7,6	neg.	50
39 ¹	38	w	22	spindelzell.	3	2	0	6.0	n. b.	n.b.
40	76	m	12	klar	3a	3	54	6,4	n. b.	n.b.
41	40	m	7,4	klar	3b	3	7	6,5	neg.	n.b.
46	63	m	9	klar	3b	2	13	7,9	neg.	n.b.
47	48	m	9	klar	3b	2	9	6,2	neg.	n.b.

Tabelle A: Patientendaten

Plasma-CRP:	präoperatives CRP im Plasma, 1 Tag vor Entnahme der Biopsie postoperatives CRP im Plasma, 4 - 6 Wochen nach Tumornephrektomie		
Leukozyten:	Leukozytenzahl im Blut, 1 Tag vor Entnahme der Biopsie		
U-Kultur:	Urin-Kultur als präoperative Diagnostik zum Ausschluß eines Harnwegsinfektes neg. negativ (kein relevanter Keimnachweis in der Urinkultur)		
Histologie:	klar: Nierenzellkarzinom vom klarzelligem Typ papillär: Nierenzellkarzinom vom papillären, chromophilen Typ spindelzell.:Tumor zeigt spindelzellartige Strukturen, war mesenchymalen Ursprungs und wird aus der weiteren Betrachtung ausgeschlossen		
TNM-Klassifikation: nach UICC 1997 (Guinan et al., 1997)	Tumorstadium	T1:	Tumorgröße bis 7 cm, auf die Niere begrenzt
		T2:	Tumorgröße über 7 cm, aber auf die Niere beschränkt
		T3:	Tumor wächst über die Niere hinaus, bleibt jedoch innerhalb der Gerotafaszie
		T3a:	bis ins perirenale Fettgewebe oder die Nebenniere
		T3b:	infiltriert die Vena renalis oder die Vena cava unterhalb des Zwerchfells
		T3c:	infiltriert die Vena cava oberhalb des Zwerchfells
		T4:	Tumorwachstum geht über die Gerotafaszie hinaus
Grading: Differenzierungsgrad des Tumors (Thoenes et al., 1986)		G1:	hoch differenziert
		G2:	mittelgradig differenziert
		G3:	gering differenziert

m männlich, w weiblich

n.b. Werte nicht bestimmt

¹ Dieser Tumor mesenchymalen Ursprungs wurde bei der Auswertung nicht betrachtet.

Tabelle B: Gegenüberstellung der Ergebnisse aus immunhistochemischer Untersuchung, *real-time* PCR und der Histologie des Tumors

Patient	CRP mRNA			Immunhistochemische Beurteilung einer lokalen CRP-Synthese						Histologie		
	1	2	3	1 TZ in %	1 CRP-Nachweis	2 TZ in %	2 CRP-Nachweis	3 Z in %	3 CRP-Nachweis	T	G	Typ
1	n.v.	n.v.	n.v.	0	-	70	-	70	-	2	2	klar
2	0,00306	0,00845	0,00392	30	-	60	+	80	-	3a	1	klar
3	n.v.	n.v.	n.v.	60	+	70	++	10	+	1	2	klar
5	0,01622	0,00089	0,012	20	+	90	+	80	-	2	2	klar
6	0,02519	0,05648	0,036	60	++	60	+++	80	+++	3b	2	klar
7	0,00007	0,00744	0,01273	20	-	90	-	90	+	2	2	klar
8	Null	0,00029	0,03627	50	+	90	++	50	-	1	2	papillär
9	n.v.	2,92817	0,567	70	+	20	-	80	-	1	3	papillär
10	0,00457	0,00384	0,00643	30	-	70	+	80	-	1	1	klar
11	0,00798	0,0465	0,01318	20	-	50	++	80	-	3b	2	klar
12	5,65685	13,40779	0,03235	1	++	98	++	70	-	3a	3	klar
13	0,01274	0,21915	0,04512	5	-	50	+	80	-	3a	2	papillär
14	181,0193	5,11594	0,14459	70	++	40	+	35	-	1	2	klar
15	2,28945	0,733	0,02477	80	++	70	+	70	-	1	3	klar
16	n.v.	0,0178	0,07076	90	+	60	-	50	-	1	2	klar
17	1325,038	34865,67	34,51137	0	-	60	+	10	-	3a	3	klar
18	0,00002	0,00001	0,0796	80	++	60	+	70	+	2	2	klar
19	0,03125	0,32309	0,24401	80	-	80	+	70	+	1	2	klar
20	0,06246	0,02089	0,03166	80	-	80	+	70	+	1	2	klar
21	6,65759	1,71713	0,11826	70	+	60	+	50	-	1	3	klar

Patient	CRP mRNA			Immunohistochemische Beurteilung einer lokalen CRP-Synthese						Histologie		
	1	2	3	1 TZ in %	1 CRP-Nachweis	2 TZ in %	2 CRP-Nachweis	3 Z in %	3 CRP-Nachweis	T	G	Typ
22	0,41899	0,81225	0,5905	80	-	80	++	90	+	1	2	klar
23	0,07721	Null	Null	2	+	30	+	80	+	1	2	papillär
24	0,06629	0,21991	0,1092	25	+	80	-	50	+	3a	2	papillär
25	Null	Null	Null	60	+++	70	++	80	+	1	2	papillär
26	Null	n.v.	0,02401	80	+	70	+	80	-	1	2	klar
27	n.v.	0,13717	0,01355	10	+++	20	+++	70	++	2	2	klar
29	Null	Null	Null	50	-	100	++	100	+	1	2	klar + papillär
30	Null	Null	Null	40	+	60	++	90	-	1	2	klar + papillär
31	12,54465	15,44427	0,01369	60	+	40	+	70	-	2	2	klar
32	n.v.	0,004	n.v.	80	++	90	+	70	-	1	2	klar
33	0,21301	0,11941	0,01508	60	-	80	++	70	++	1	2	klar
34	n.v.	Null	0,0011	70	+	80	++	80	+	3a	2	klar
35	Null	Null	0,00197	90	-	80	++	80	++	3b	2	klar
36	Null	0,22925	0,17983	80	+	70	+	80	+	3a	1	klar
38	0,00062	0,00576	0,32086	80	-	80	-	70	+	1	2	papillär
39 ¹	0,01389	0,01595	0,15443	30	-	30	-	80	-	3	2	spindelzellartig
40	324,8135	92,7323	36,63117	50	-	80	+	70	+	3a	3	klar
41	3,14923	1,75524	0,56644	70	-	60	++	50	+	3b	3	klar
46	0,18301	0,08508	0,45376	80	++	60	++	60	+	3b	2	klar
47	0,73713	0,62417	0,23899	80	-	80	+	70	+	3b	2	klar

Tabelle B: Gegenüberstellung der Ergebnisse aus immunhistochemischer Untersuchung, *real-time* PCR und der Histologie des Tumors

1 Tumorzentrum, 2 Grenzzone, 3 angrenzendes Gewebe

CRP mRNA-Expression in Renalzellkarzinomen unter Berücksichtigung von Tumorstadium (T) und Differenzierungsgrad (G)
Nimmt das relative Expressionsniveau einen Wert größer als Null an, so hat eine cDNA Amplifikation stattgefunden und wird qualitativ als positiv gewertet.
Ein Wert gleich Null bedeutet eine negative CRP mRNA Expression.
Leere Felder weisen auf ein geringes Amplifikationssignal für HPRT hin, was aufgrund der in der Probe zu gering vertretenen RNA-Menge zum Ausschluss dieser Proben in der Auswertung führte.

- TZ:** Tumorzellanteil in %
Z: Zellulärer Anteil in %
-: keine Rotfärbung bzw. Färbung anteilig < 10%
+: 10-40% der Zellen sind angefärbt
++: 40-80% der Zellen sind angefärbt
+++: über 80% der Zellen sind angefärbt
- T:** Tumorstadium nach TNM-Klassifikation (UICC 1997, Guinan et al., 1997)
G: Grading (Thoenes et al., 1997)
Typ: Histopathologisch klarzelliger oder papillärer Wachstumstyp

¹ Dieser Tumor mesenchymalen Ursprungs wurde bei der Auswertung nicht betrachtet.

n.v. nicht verfügbar

Danksagung

Mein Dank gilt in besonders großem Maße Herrn Prof. Dr. med. Wolfram J. Jabs, Juniorprofessor Transplantationsimmunologie, für die professionelle Begleitung meiner Arbeit, seine stets konstruktive Kritik und das Verständnis, welches er mir allzeit entgegenbrachte.

Der Klinik für Urologie (Direktor Prof. Dr. med. D. Jocham), insbesondere Herrn PD Dr. med. C. Doehn, danke ich für die Unterstützung bei der Gewinnung der Biopsien, ebenso für die Bereitstellung der Tumorzelllinien. Zusätzlich möchte ich mich bei Frau M. Hansen und Frau M. Warnick für ihre stets freundliche und zuvorkommende Mithilfe bei logistischen Fragen meiner Arbeit bedanken.

Ganz besonderen Dank schulde ich den Mitarbeiterinnen des Labors für „Experimentelle Nephrologie“ in den Räumlichkeiten der Klinisch-Experimentellen Forschungseinrichtung, namentlich Frau M. Behrens, Frau A. Willemsen und Frau S. Wichmann. Ihr uneingeschränktes Engagement hat das Vorankommen der experimentellen Arbeit wesentlich beeinflusst. Ich danke auch Frau Dr. med. B. A. Lögering für die sachkundige Einführung in die experimentelle Forschungsarbeit.

Herrn PD Dr. med. C. Frohn und dem Institut für Immunologie der Universität zu Lübeck (Direktor: Prof. Dr. med. H. Kirchner) danke ich für das freundliche Überlassen der Tumorzelllinien.

Herrn Prof. Dr. med. W. Jelkmann, Institut für Physiologie der Universität zu Lübeck, danke ich für die Bereitstellung der humanen Hepatom-Zelllinie Hep3B.

Ebenso möchte ich mich bei der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Lübeck bedanken, die es mir ermöglichte, das *ABI PRISM 7700 Sequence Detection System* für die molekularbiologischen Untersuchungen zu nutzen.

Dem Zentrallabor des Universitätsklinikum Lübeck danke ich für die Bestimmung der Laborparameter. Ebenso gilt mein Dank denjenigen hausärztlichen Kollegen, die mir bei der Erfassung der postoperativen Laborparameter behilflich waren.

Schlussendlich bin ich meinem Ehemann Sebastian Busse zu großem Dank verpflichtet, denn sein unermüdlicher Einsatz und seine uneingeschränkte Loyalität mir gegenüber haben meinen Weg begleitet und es ermöglicht, diese Arbeit zu einem erfolgreichen Abschluss zu bringen.

Lebenslauf

Marleen Busse, geb. Knospe

geboren am
in

01.06.1978
Kyritz

Eltern

Hans-Werner Knospe und
Karin Knospe, geb. Pratscher

Familienstand

verheiratet mit Sebastian Busse, seit 01.03.2003
Sohn, Stian Hendrik Busse, geb. 04.04.2004

Schulbildung

08/1985 – 07/1991
08/1991 – 06/1998
27.06.1998

Goetheschule, Kyritz
Gymnasium Friedrich-Ludwig Jahn, Kyritz
Abitur, Note 1,3

Studium

10/1998 – 11/2006

Studium der Humanmedizin,
Universität zu Lübeck

Examina

10/2000
03/2002
03/2005
11/2006

Ärztliche Vorprüfung, Note 2,6
1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note 3,0
2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note 2,0
3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note 1,0

Publikationen

Busse M, Doehn C, Steinhoff J, Jabs WJ. Expression of C-reactive protein by renal cell carcinomas and adjacent renal tissue (Abstract). Kongress für Nephrologie, September 2004, Basel, Switzerland

Jabs WJ, Busse M, Krüger S, Jocham D, Steinhoff J, Doehn C. Expression of C-reactive protein by renal cell carcinomas and unaffected surrounding renal tissue. *Kidney Int* 2005;68:2103-10; **Impact Faktor 4.93**