Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz
Sektion für Transplantationsimmunologie und Immunhämatologie
Leiterin: Professor Dr. C. A. Müller

Immunhistologische Analyse von Zelladhäsions- und Matrixmolekülen bei Nierenzellkarzinomen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Susanne Widmann
aus Waiblingen
2005

Dekan	Professor Dr. C. D. Claussen
1. Berichterstatter	Frau Professor Dr. C. A. Müller
2. Berichterstatter	Professor Dr. H.-G. Rammensee

Meinen Eltern und Felix

1 Einleitung

1.1 Das Nierenzellkarzinom – eine Einführung 6
1.2 Adhäsionsmoleküle 8
1.2.1 Cadherine 8
1.2.2 Syndecan-1 12
1.2.3 Integrine 14
1.3 Matrixmoleküle 16
1.3.1 Tenascin-C 16
1.3.2 Perlecan 19
1.3.3 Laminin-10/11 21
1.4 Zielsetzung 23

2 Material und Methoden

2.1 Bezugsfirmen 24
2.2 Reagenzien 24
2.3 Materialien 24
2.4 Geräte 26
2.5 Verwendetes Gewebe 26
2.5.1 Herkunft 26
2.5.2 Aufbewahrung 26
2.5.3 Histopathologische, morphologische und klinische Beurteilung 27
2.6 Verwendete Antikörper 28
2.6.1 Einteilung und Spezifität der Antikörper 28
2.7 Immunhistochemie 29
2.7.1 Die indirekte Immunperoxidasefärbung 29
2.7.2 Vermeiden von Hintergrundfärbungen 29
2.7.3 Lösungen und Puffer 30
2.7.4 Herstellen der Gefrierschnitte 31
2.7.5 Durchführung der Färbung 31
2.7.6 Mikroskopische Auswertung und Fotographieren der Präparate 33

3 Ergebnisse

3.1 Expression von Adhäsionsmolekülen 34
3.1.1 Darstellung von Expressionsmustern der einzelnen Cadherine 35
E- und N-Cadherin 35
P-Cadherin 39
VE-Cadherin 40
3.1.2 Darstellung des Expressionsmusters von Syndecan-1 41
3.2 Expression von Integrinen 43
3.2.1 Darstellung der Expressionsmuster der einzelnen Integrine 44
3.3 Expression von Matrixmolekülen 57
3.3.1 Darstellung von Expressionsmustern der einzelnen Matrixmoleküle 58
Laminin-10/11 58
Tenascin-C 60
Perlecan 62

4 Diskussion

4.1 Expression von Adhäsionsmolekülen 70
E- und N-Cadherin 70
P-Cadherin 73
VE-Cadherin 74
Syndecan-1 75
4.2 Expression von Integrinen 77
4.3 Expression von Matrixmolekülen 80

5 Zusammenfassung 82

6 Abkürzungen 84

7 Literaturverzeichnis 85

8 Danksagung 95

Abbildungen

Abbildung 1: Molekülstruktur der klasssischen Cadherine 9
Abbildung 2: Verteilung von E- und N-Cadherin entlang dem Nephron 11
Abbildung 3: Molekülaufbau der Syndecane 14
Abbildung 4: Struktur der Integrine 16
Abbildung 5: Strukturmodel von Tenascin-C 18
Abbildung 6: Molekülstruktur von Perlecan 20
Abbildung 7: Struktur von Laminin-10/11 22
Abbildung 8: E-Cadherin, S2355, 1:500 37
Abbildung 9: E-Cadherin, S2333, 1:500 37
Abbildung 10: N-Cadherin, S2355, 1:500 38
Abbildung 11: P-Cadherin, S2355, 1:1000 39
Abbildung 12: VE-Cadherin, S2333, 1:500 40
Abbildung 13: Syndecan-1, S2315, 1:1000 42
Abbildung 14: VLA-1, S2315, 1:500 45
Abbildung 15: VLA-2, S1922, 1:500 47
Abbildung 16: VLA-2, S2355,1:500 47
Abbildung 17: VLA-3, S2337, 1:1000 48
Abbildung 18: VLA-4, S2431, 1:225 49
Abbildung 19: VLA-4, S2337, 1:500 50
Abbildung 20: VLA-5, S2393, 1:500 52
Abbildung 21: VLA-5, S2431, 1:225 52
Abbildung 22: VLA-6, S1987, 1:225 54
Abbildung 23: VLA-αv, S2337, 1:1000 56
Abbildung 24: Laminin-10/11, S1987, 1:225 59
Abbildung 25: Tenascin-C, S2431, 1:500 61
Abbildung 26: Tenascin-C, S2381, 1:225 61
Abbildung 27: Perlecan, S2431, 1:500 62
Abbildung 28: Expression von NZK in Korrelation zum histologischen Subtyp 67

Tabellen

Tabelle 1: Einteilung der Tumorpräparate nach Thoenes und TNM-Staging 27
Tabelle 2: Einteilung, Spezifität und Verdünnung der Antikörper 28
Tabelle 3: Expression von Adhäsionsmolekülen in der normalen Niere 63
Tabelle 4: Expression von Integrinen in der normalen Niere 64
Tabelle 5: Expression von Matrixmolekülen in der normalen Niere 65
Tabelle 6: Expression von Adhäsionsmolekülen in Nierenzellkarzinomen 66
Tabelle 7: Expression von Integrinen in Nierenzellkarzinomen 68
Tabelle 8: Expression von Matrixmolekülen in Nierenzellkarzinomen 69

1 Einleitung

1.1 Das Nierenzellkarzinom – eine Einführung

Das Nierenzellkarzinom (NZK) gehört zu einer Gruppe von epithelialen Tumoren, die schon bei geringer Größe und geringgradigen zytologischen Veränderungen metastasieren können (Thönes et al., 1986). In diesem Stadium ist die klinisch-diagnostische Nachweisbarkeit auf 10% der Patienten beschränkt, da sich das Tumorleiden nur in wenigen Fällen durch eine Frühsymptomatik erkennen läßt. Häufig werden die Tumore zufällig im Rahmen anderer diagnostischer Maßnahmen entdeckt.

Auch nach radikaler Entfernung des Primärtumors können Metastasen des Nierenzellkarzinoms nach einem langen Zeitintervall plötzlich wieder in Erscheinung treten.

Die bisher verwendeten klassischen Parameter wie Grading, histopathologisch definierte Tumorart, Alter und Allgemeinzustand des Patienten, Anzahl, Lokalisation und Zeitpunkt des Auftretens von Metastasen und der Zeitpunkt einer frühen radikalen Nephrektomie, besitzen nur eine begrenzte prognostische Aussagekraft.

Allerdings gibt es bisher auch keine sicheren molekularen oder zytogenetischen Prädiktoren, die sowohl über den weiteren klinischen Verlauf als auch die jeweils geeignete Therapiestrategie eindeutig Aufschluss geben könnten (Mejean et al., 2003).

Auch das meist verwendete Klassifikationssystem für maligne Tumore, das TNM-Staging, das auf der Beurteilung der Tumorgröße, des Lymphknotenbefalls und der Metastasierung beruht, läßt keine sichere Vorhersagbarkeit für den Verlauf der Tumorerkrankung zu (Goodley et al., 2002).

In den letzten Jahrzehnten wurde dieses System zwar immer wieder an die klinischen und histologischen Beobachtungen angepasst und führte auch zu einem erweiterten klinischen Verständnis mit einer frühzeitigen Behandlung des Tumors durch eine radikale Nephrektomie (Guinan, 1997).

Dennoch konnte in vielen Studien wiederum nicht eindeutig geklärt werden, welche Tumorgröße und Metastasierungsparameter deutliche prognostische Unterschiede zwischen den Tumorstadien pT1 und pT2, wie auch zwischen pT2 und pT3 ergeben (Javidan et al., 1999; Minervini et al., 2001).

Neben Tumorgrösse und -ausdehnung scheinen beim NZK auch histologische Kriterien wichtig zu sein, die im TNM-Staging keine Berücksichtigung finden. Allgemein stellen NZK eine sehr heterogene Gruppe von epithelialen Neoplasien dar, die auch durch große Unterschiede in der Fähigkeit zur Metastasierung charakterisiert sind (Gelb et al., 1993; Renshaw et al., 1995).

Die kombinierte Beurteilung der NZK nach der derzeitigen international akzeptierten histo-

morphologischen Einteilung in klarzellige, papilläre (chromophile) und chromophobe Tumorsubtypen (Moch et al., 2000) und nach der neuen TNM-Klassifzierung scheint eine gute Abgrenzung prognostisch relevanter Guppen zu ermöglichen.
Nach Aussage von Renshaw et al. (1999) sollen sich histologisch definierte Subtypen des NZK in ihrem präferentiellen Muster der Organmetastasierung unterscheiden.
Bisher ist der genaue zelluläre Ursprung der NZK ungeklärt. Man konnte jedoch beobachten, daß Tumore, die vermutlich von epithelialen Zellen der Sammelrohre ausgingen, zu den aggressivsten Karzinomen der Niere zählen und meistens schnell eine systemische Tumorerkrankung entwickeln (Moch et al., 2000; Dimopoulos et al., 1993).
Die Invasivität und das Metastasierungspotential beim NZK scheint auch von komplexen molekularen Faktoren abzuhängen. Dazu zählen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen, die über spezifische Zelladhäsionsstrukturen reguliert werden. Man geht davon aus, daß diese Interaktionen im Gesunden eine Hömöostase der Proliferation und Differenzierung aufrecht erhalten können, im Tumorgewebe aber einer Dysregulation unterliegen.
Verschiedene Autoren berichteten bereits über phänotypische Veränderungen der Expression von Zelladhäsionsmolekülen und Liganden der extrazellulären Matrix beim Nierenzellkarzinom (Markovic-Lipkovski et al., 1995; Lohi et al., 1998; Shimazui et al., 2000; Okegawa et al., 2002; Cairns et al., 2003).
Die fehlende Expression eines Adhäsionsmoleküls auf Tumorzellen könnte dafür sprechen, daß Störungen der Zellinteraktion gegeben sind, die Wanderung, Proliferation und Differenzierung beeinflussen. Solche Veränderungen könnten die Metastasierung begünstigen und mit einer schlechten Prognose einhergehen (Shimazui et al., 1998).
Verschiedene andere molekulare und genetische Mechanismen werden postuliert, die es NKZ ermöglichen, sich lange Zeit der Immunantwort zu entziehen oder auch gegen die Wirkung zytotoxischer Chemotherapeutika weitgehend resistent zu sein.
Obwohl die aktuell gängigen Therapieformen, die vorwiegend auf chirurgischen und immuntherapeutischen Ansätzen beruhen, vielversprechend sind, scheint gerade bei einer Erkrankung mit Metastasen der Langzeiterfolg eingeschränkt zu sein (Goodley, 2002).
Darum sind geeignete Tumormarker sowohl für eine genaue Prognosestellung wie auch für die Entwicklung neuer Therapiestrategien in Abstimmung auf klinische und histologische Merkmale des Tumors erforderlich.
Unter diesem Aspekt scheint es interessant, das Augenmerk auf die Expressionsmuster von Adhäsions- und Matrixmolekülen in gesundem und malignem Gewebe des Nierenzellkarzinoms zu richten.

1.2 Adhäsionsmoleküle

Adhäsionsmoleküle dienen im Organismus in erster Linie der Zell-Zell- bzw. der Zell-Matrix-Interaktion. Sie können neben ihrer zelladhäsiven auch signalübertragende Wirkung haben und somit an Proliferation, Differenzierung und Wanderung von Einzelzellen sowie an der Organogenese beteiligt sein (Gumbiner, 1996; Shimazui et al., 2000).

Die wichtigsten Gruppen von Adhäsionsmolekülen, die in dieser Studie berücksichtigt wurden, sollen im folgenden kurz besprochen werden.

1.2.1 Cadherine

Cadherine stellen eine Familie von calciumabhängigen Glykoproteinen dar, die vor allem an homophilen Zell-Zell-Interaktionen beteiligt sind und eine große Rolle in der Zelladhäsion und embryonalen Entwicklung spielen (Barth et al., 1997; Vleminckx und Kemler, 1999; Shimazui et al., 2000).

Der extrazelluläre Anteil der Cadherine enthält eine Reihe von calciumbindenden Domänen («Repeats»), deren Anzahl und Ähnlichkeit ihre Zugehörigkeit zu einer spezifischen Untergruppe bestimmen (siehe Abb.1).

Allgemein werden die Cadherine in mittlerweile sechs Subfamilien neben verschiedenen einzelnen Mitgliedern eingeteilt. Einige Cadherine aus der Untergruppe der klassischen Typ-I-Cadherine und der Typ-II-Cadherine wurden in dieser Studie analysiert.

Die klassischen Typ-I-Cadherine, wie E-, N- und P-Cadherin, besitzen typischerweise fünf extrazelluläre Domänen. Daran schließt sich eine Transmembranregion und ein intrazellulärer Abschnitt an (Alattia et al., 1999) (siehe Abb.1).

Der intrazelluläre Anteil interagiert mit Cateninen, die wiederum eine Verbindung zum Zytoskelett herstellen können (Vleminckx und Kemler, 1999). Ohne diese intrazelluläre Wechselwirkungen können die Cadherine keine Adhäsionsfunktion ausüben (Barth et al., 1997). Ebenso ist die Anwesenheit von Calciumionen notwendig (Alattia et al., 1999).

Typ-II-Cadherine, wie VE-Cadherin, sind im Aufbau zu den Typ-I-Cadherinen identisch, unterscheiden sich aber durch phylogenetische Aspekte und eine geringere Ähnlichkeit innerhalb ihrer extrazellulären Domänen aufgrund einer fehlenden spezifischen Proteinsequenz (Nollet et al., 2000).

Der Cadherin-vermittelte Kontakt zwischen den Zellen ist zwar stabil und fest, kann aber unter anderem für den Gewebeaufbau moduliert werden, um normale morphogenetisch notwendige Zellbewegungen zuzulassen. Ähnlich diesem Vorgang scheint bei der Tumorentstehung das Auftreten von malignen Zellen mit pathologisch veränderten interzellulären Adhäsionseigenschaften zu aggressiveren, auch zur Metastasierung fähigen Phänotypen zu führen (Shimazui et al., 2000).

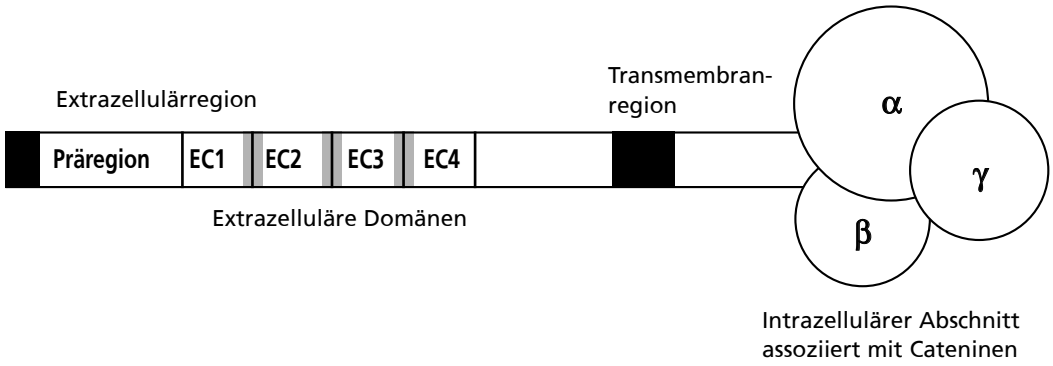


Abbildung 1: Molekülstruktur der Cadherine

(aus: Cell Adhesion Molecules, R&D Systems, 1996)

E-Cadherin

E-Cadherin wurde vorwiegend auf Zellen epithelialen Ursprungs gezeigt. Die Aufrechterhaltung der Zellpolarität in den renalen Epithelien, die z. B. den tubulären Transport in der Niere erst ermöglicht, scheint durch E-Cadherin induziert zu werden (Rabb, 1994).

Im normalen adulten Nierengewebe wird E-Cadherin nicht von proximalen Tubuluszellen exprimiert, sondern ist ausschließlich auf Zellen des Tubulus attenuatus (auch intermediärer Tubulus genannt) oder des dünnen Teils der Henle'schen Schleife, des distalen Tubulus und der Sammelrohre beschränkt (siehe Abb.2) (Müller et al., 1996; Shimazui et al., 2000). Eine Expression in Zellen der Bowmann'schen Kapsel wird in einer Untersuchung beschrieben (Nouwen et al., 1993).

Im renalen Tumorgewebe, besonders bei NZK höhergradiger Malignität, konnte eine Herunterregulierung bzw. ein Fehlen der E-Cadherin-Expression beobachtet werden (Katagiri et al., 1995; Giroldi et al., 2000), wie auch bei anderen Tumoren, z.B. bei Magenkarzinomen und Urothelkarzinomen (Becker et al., 1994; Giroldi et al., 1996).

Da der Zellursprung renaler Karzinome noch nicht völlig geklärt ist, könnte die Regulation der Cadherine hier komplexer als bei anderen Tumoren sein.

Nach Shimazui et al. (2000) entstehen NZK aus epthelialen Zellen proximaler Tubuli, die im Gesunden kein E-Cadherin exprimieren.

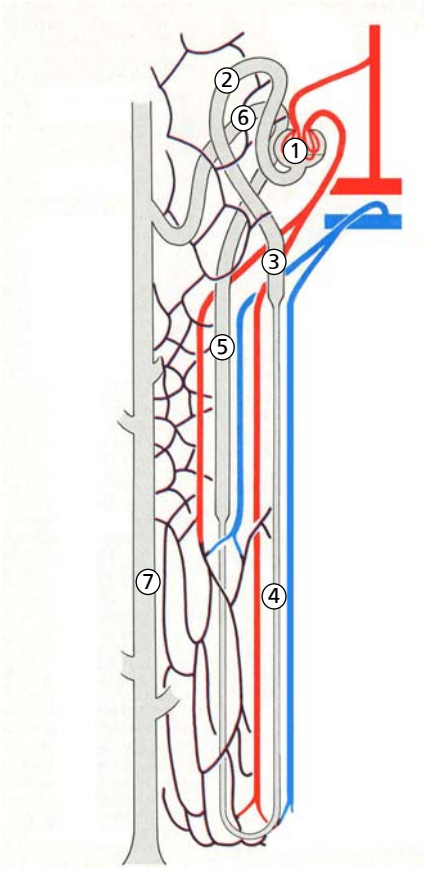
Bei E-Cadherin-negativen Karzinomen könnte dieses Expressionsmuster auf den Zellursprung des Tumors hinweisen.

Eine vorhandene E-Cadherin-Expression in Zellen, die sonst im Gesunden dieses Merkmal nicht aufweisen, scheint unter pathologischen Bedingungen, wie der Tumorentstehung, auf eine aberrante Regulation der Zelladhäsion hinzudeuten (Shimazui et al., 2000).
Jedoch könnte nach Aussage von Katagiri et al. (1995) eine erhaltene E-Cadherin-Expression mit einer besseren Prognose für die Patienten mit NZK verbunden sein.
Denn die zusätzliche Untersuchung von Cadherin-6, dessen prognostischer Wert kürzlich bestätigt wurde, zeigte bei NZK mit gleichzeitig fehlender E-Cadherin- und Cadherin-6-Expression ein signifikant hohes Metastasierungspotential (Shimazui et al., 1998; Paul et al., 2004).
In der vorliegenden Studie wurde das Expressionsmuster von E-Cadherin mit N-Cadherin, das wie Cadherin-6 in Zellen des proximalen Tubulus im gesunden adulten Nierengewebe zu finden ist, verglichen.

N-Cadherin

Das neurale Cadherin (N-Cadherin) wurde zuerst im Muskel und neuralen Gewebe, wo es unter anderem das Neuritenwachstum und die Synaptogenese reguliert, entdeckt (Rabb, 1994; Nollet et al., 2000). Weitere Funktionen in unterschiedlichen Organen, wie z. B. der Einfluß auf die Entwicklung der Retina oder die Nephrogenese, wurden beschrieben (Paradies et al., 1993; Nouwen et al., 1993).
Im adulten Nierengewebe sind E- und N-Cadherin in unterschiedlichen Abschnitten des Tubulussystems exprimiert, wobei N-Cadherin auf Epithelzellen des gewundenen und geraden Teils des proximalen Tubulus beschränkt ist (siehe Abb.2). Nach Shimazui et al. (2000) soll N-Cadherin ebenso auf dem dünnen Anteil der Henle'schen Schleife entdeckt worden sein. Dennoch scheint es das dominierende beider Cadherine im gesunden Nierengewebe zu sein (Müller et al., 1996).
Auch bei NZK scheint die Expression von N-Cadherin dominant zu sein gegenüber E-Cadherin, dessen Expression in verschiedenen Studien signifikant variiert (Markovic-Lipkovski et al., 2001; Shimazui et al., 1998).
In vitro konnte gezeigt werden, daß die Funktion von N-Cadherin unter bestimmten Bedingungen gestört werden kann, aber gleichzeitig die phänotypische Expression erhalten bleibt. Demzufolge könnte die N-Cadherin vermittelte Zelladhäsion unter bestehender Expression im Tumorgewebe eingeschränkt sein (O'Donnel et al., 1995).
Andere Ergebnisse wiederum zeigen eine deutliche Korrelation zwischen dem Verlust der N-Cadherin-Expression bei höhergradig malignen NZK und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen (Heicappel, 1999).

Abbildung 2:
Struktur eines Nephron mit Expression von E- und N-Cadherin entlang dem Tubulusepithel



Das Glomerulum (1) zeigt keine Cadherinexpression, auf dem gewundenen (2) und geraden (3) Abschnitt des proximalen Tubulus wird N-Cadherin (grün) exprimiert. E-Cadherin (gelb) wird dagegen entlang dem dünnen Anteil der Henle'schen Schleife (4), dem geraden (5) und gewundenen (6) distalen Tubulus sowie dem Sammelrohr (7) gefunden.

(aus: Taschenatlas der Anatomie, Thieme Verlag, 1991, modifiziert)

P-Cadherin

P-Cadherin oder Cadherin-3 zählen zusammen mit E- und N-Cadherin zu den klassischen Typ-I-Cadherinen. P-Cadherin wurde zuerst in der Plazenta bei Mäusen entdeckt. Während der Entwicklung kommt es vorübergehend in unterschiedlichen proliferativen Geweben vor. Später aber ist P-Cadherin vorwiegend in epithelialen Strukturen, speziell in der Basalzellschicht, z. B. der menschlichen Epidermis oder der Brustdrüse, zu finden (Rabb, 1994; Nollet et al., 2000).

In der Brustdrüse wurde P-Cadherin in myoepithelialen Zellen, am Rand von in situ Karzinomen und in einem einzelnen Mammakarzinom dargestellt (Rasbridge et al., 1993). In anderen Studien konnte überhaupt keine Expression in Mammatumoren festgestellt werden (Birchmeier et al., 1994).

Eine weitere Untersuchung zeigte hingegen bei einigen infiltrierend wachsenden und wenig differenzierten ductalen Mammakarzinomen die Expression von P-Cadherin bei gleichzeitig herunterregulierter E-Cadherin-Expression (Palacios et al., 1995).

Bei Urothelkarzinomen dagegen gibt es Hinweise, daß E- und P-Cadherin in vitro direkt miteinander korrelieren können (Giroldi et al., 1999).

Es gibt nur wenige Studien, die eine P-Cadherin-Expression bei renalen Karzinomen in vivo beschreiben. Keine oder nur eine sehr geringe Anzahl der untersuchten Tumore exprimieren P-Cadherin (Shimazui et al., 1996; Markovic-Lipkovski et al., 2001)

VE-Cadherin

VE-Cadherin, auch Cadherin-5 genannt, gehört zur Subfamilie der Typ-II-Cadherine (Nollet et al., 2000).

Da es ausschließlich auf Endothelzellen verschiedener Gefäße exprimiert wird, stellt VE-Cadherin eines der Moleküle mit höchster Spezifität für Endothelzellen dar (Liao et al., 2000). Nebst dem Erhalt der normalen Gefäßstrukturen ist VE-Cadherin an der Regulation der endothelialen Permeabilität, der Zellmigration und der Angiogenese beteiligt (Brevario et al., 1995; Corada, 1999; Liao et al., 2002).

Die Bildung von Kapillaren aus vorbestehenden Gefäßen ist ein wesentlicher Prozess für das Wachstum solider Tumore und deren Metastasen, in welchem - unter anderen - VE-Cadherin eine besondere Rolle zukommt. Nach Brevario et al. (1995) korreliert die Migration von Endothelzellen, als ein bekanntermaßen wichtiger Vorgang während der Angiogenese, mit dem Verlust oder der Umverteilung von VE-Cadherin in vitro. So könnte während Tumorwachstum und -expansion die Angiogenese mit einer verminderten Expression von VE-Cadherin einhergehen, wie es auch in Untersuchungen bei NZK gezeigt wurde (Markovic-Lipkovski et al., 2001). Dagegen ergaben Untersuchungen von Lungen- und Hautkarzinomen am Mausmodel, daß VE-Cadherin auf Gefäßen im Gesunden wie im Tumorgewebe gleichermaßen exprimiert wird (Liao et al., 2000).

Da für renale Tumoren nur wenige Studien darüber vorliegen, sollte die VE-Cadherin-Expression beim Nierenzellkarzinom überprüft werden.

1.2.2 Syndecan-1

Die Syndecane 1 bis 4 bilden eine Familie von Heparan-Sulfat-Proteoglykanen. Das Core-Protein der Syndecanmoleküle besteht, ähnlich den Cadherinen und Integrinen, aus einer extrazellulären, einer transmembranären und einer intrazellulären Domäne (siehe Abb.3).

Im Gegensatz zur Transmembran- und zytoplasmatischen Domäne weist der extrazelluläre Teil der Syndecanmoleküle nur partiell an den Abschnitten, die mit Seitenketten verknüpft sind, homologe Aminosäuresequenzen untereinander auf.

Die Seitenketten der Syndecane sind sulphatierte, unverzweigte Kohlenhydratmoleküle, sog. Glykosaminoglykane (GAGs), die kovalent an die Ectodomäne gebunden sind. Ihre Anzahl und Struktur kann je nach Zelltyp variieren, was zu zellspezifischen Bindungseigenschaften führt (siehe Abb.3) (Inki und Jalkanen, 1996; Couchman, 2003).

Das in dieser Studie untersuchte Syndecan-1 wird während bestimmter Stadien der Organogenese vorübergehend in verschiedenen embryonalen Strukturen gefunden, die sich zu adulten, Syndecan-1 positiven Epithelien ausdifferenzieren.

Syndecan-1 spielt hierbei eine wichtige Rolle, da es unter anderem mit einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Enzymen, Matrix- und Zelladhäsionsmolekülen interagieren kann (Carey, 1997; Couchman et al., 2001).

Wichtige Funktionen von Syndecan-1 im normalen Gewebe sind, z.B. bei der Wundheilung, die Stabilisierung der epithelialen Zellschichten durch Bindung von Wachstumsfaktoren und extrazellulären Matrixmolekülen sowie sein Einfluß auf Wundproteasen (Kainulainen et al., 1998).

Auch ohne offensichtliche Matrixliganden läßt sich Syndecan-1 in Plattenepithelien, wie Epidermis und Mundschleimhaut, auf der gesamten Zelloberfläche, aber vor allem in den Zellzwischenräumen nachweisen. Das könnte auf eine Beteiligung an homophilen Zell-Zell-Interaktionen hindeuten (Inki und Jalkanen, 1996).

Ebenso konnte Syndecan-1 im normalen Gewebe der Dickdarmschleimhaut einerseits basal als Matrixrezeptor, aber auch an der lateralen Zelloberfläche in Ko-Expression mit E-Cadherin lokalisiert werden.

Dagegen ist unter zunehmender Malignität, wie es bei der Karzinogenese vom kolorektalen Adenom zum Karzinom gezeigt wurde, die Expression beider Proteine rückläufig und damit die intakte Zelladhäsion aufgehoben (Day et al., 1999). Auch am Larynxkarzinom konnte mit signifikanter Korrelation zu Tumorgröße und histologischem Grading diese Beobachtung bestätigt werden (Li et al., 2004).

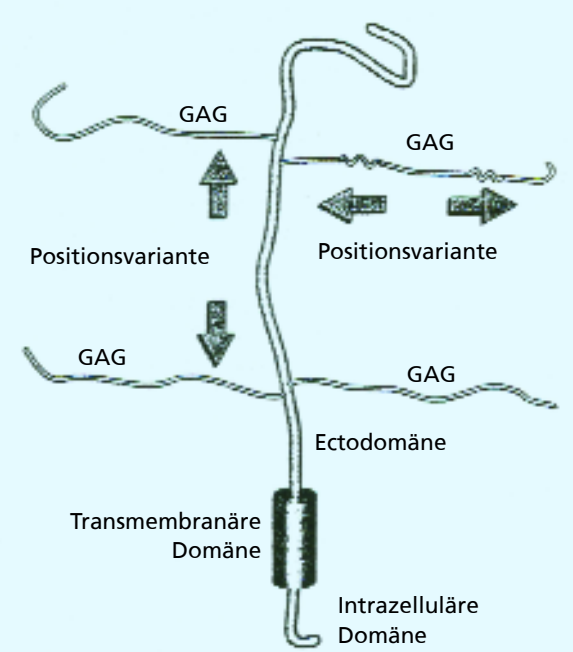
In weiteren Untersuchungen an Plattenepithelkarzinomen (Antonnen et al., 1999), Mesotheliomen (Kumar-Singh et al., 1998) und Cholangiokarzinomen (Harada et al., 2003) gingen ungünstige Überlebensrate und schlechte Prognose mit geringer oder fehlender Syndecan-1-Expression einher.

Hirayabashi und Mitarbeiter (1998) konnten aber bei Mäusen nach Re-Implantation von Plattenepithelkarzinomen der Lunge zeigen, daß gerade Syndecan-1 positive Zellen ein größeres Potential zur Bildung von Tumoren und Metastasen aufwiesen als Syndecan-1 negative.

Ebenso war bei Mammakarzinomen eine starke Syndecan-Expression mit höherer Malignität, größerer Tumorausdehnung und weiteren ungünstigen Faktoren assoziiert (Barbareschi et al., 2003). Diese kontroversen Ergebnisse erfordern weiterführende immunhistochemische Analysen im Bereich der bisher auf Syndecan-1 untersuchten Tumoren.

Da Syndecan-1 in frühen Entwicklungsphasen, auch in den embryonalen Nierenanlagen, und im normalen adulten renalen Gewebe vorkommt, scheint es interessant, zu beobachten, ob für NZK spezifische Änderungen in der Expression von Syndecan-1 auftreten können. Für diese Entität von Tumoren liegen bislang keine bekannten Untersuchungen über die Syndecan-1-Expression in vivo oder dessen prognostischen Wert vor.

Abbildung 3:
Molekülaufbau der Syndecane



Beschaffenheit und Position der Glycosaminoglycanseitenketten (GAGs) am Core-Protein (Pfeile) beeinflußen die Wechselwirkungen von Syndecan-1 mit extrazellulären Molekülen.

(aus: Salmivirta, M. und Jalkanen, M.: «Syndecan family of cell surface proteoglycans: developmentally regulated receptors for extracellular effector molecules», Experientia 51, Birkhäuser Verlag, 1995)

1.2.3 Integrine

Zur Familie der Integrine gehören heute 24 Glykoproteine, die homologe Strukturen aufweisen. Sie sind sowohl an heterophilen Zell-Zell- als auch Zell-Matrix-Interaktionen beteiligt und können ebenso Bindungen mit Plasmaproteinen eingehen.

Die Moleküle werden entweder in Vesikeln im Zytoplasma gespeichert, oder direkt an die Zelloberfläche transportiert, wo sie transmembranär mit einem langen extrazellulären und einem kurzen zytoplasmatischen Anteil, der meist weniger als 50 Aminosäuren lang ist, in die Zellmembran verankert werden.

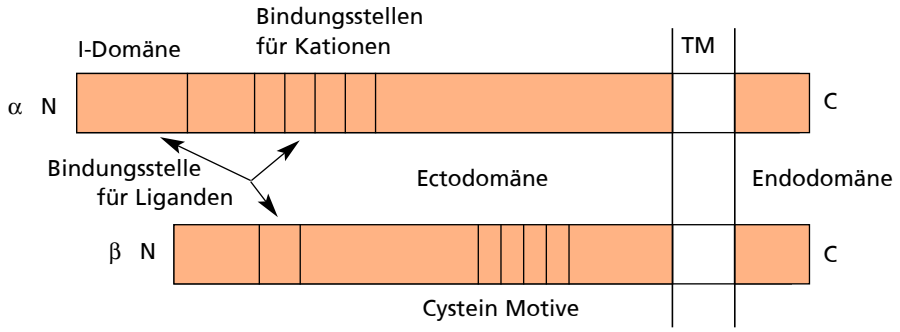
Als Heterodimere bestehen sie jeweils aus einer α- und einer β-Kette, die nicht-kovalent miteinander verbunden sind. Aufgrund ihrer β-Kette werden die Integrine in Untergruppen eingeteilt, wobei heute mittlerweile 8 verschiedene β- und 18 α-Ketten bekannt sind (Hillis und MacLeod, 1996; Hynes, 2002).

Die in dieser Arbeit untersuchten β1-Integrine, die auch VLA («very late activation»)-Integrine genannt werden, finden sich auf zahlreichen Zellarten, wie z. B. Lymphozyten, peripheren Nervenzellen und ebenso im Mesangium der Niere (Rabb, 1994).

Sie bestehen aus der β1-Kette (CD29) und werden in Kombination mit den meisten der 18 bekannten α-Ketten, wie α1-α6 (CD49a-f), α7-α11 oder αv (CD51), vorgefunden

(siehe Abb. 4) (van der Flier, 2001).
Wichtige Liganden der β1-Integrine sind unter anderen Moleküle der extrazellulären Matrix, wie Kollagene, Laminine, Tenascine, Fibronektin (Klein et al., 1995; Panizzut et al., 1997; van der Flier et al., 2001; Rissanen et al., 2003).
Künstlich transformierte Zellen zeigen eine geringe Integrinexpression mit spezifischen Veränderungen des Zytoskelettes und folglich eine gestörte Adhäsionsfähigkeit, so daß sie sich von der extrazellulären Matrix lösen können. Dabei kann es zum Verlust wichtiger Interaktionen kommen, die den natürlichen Zellzyklus mitbestimmen und zur Aufrechterhaltung der normalen Zellfunktion beitragen (Glukhova et al., 1995).
So könnten Integrine durch eine feste Verankerung von Zellen in der Matrix der Tumorenstehung entgegen wirken. Andererseits wurde beschrieben, daß Integrin vermittelte Funktionen in verschiedenen Stadien des Tumorwachstums und der Metastasierung zur Progression des Tumors genutzt werden könnten (Glukhova et al., 1995; Giancotti et al., 1999; Varner et al.,1996).
Brenner et al. (2000) beobachteten bei Zelllinien von NZK die Invasion von Zellen in das umgebende extrazelluläre Gewebe. Dieser Vorgang war deutlich von der Anwesenheit von β1-Integrinen abhängig, denn unter Zugabe eines gegen CD29 gerichteten Antikörpers wurde die Zellmigration zu 88% reduziert. Auf Tumorzellen von Metastasen von Melanomen konnte eine stärkere VLA-2-Expression nachgewiesen werden als auf den primären Melanomzellen (Anastassiou et al.,1995). Dieses Expressionsmuster wurde auch bei NZK und deren Metastasen beobachtet (Droz et al., 1995).
Weitere Untersuchungen an Zelllinien des proximalen Tubulus und von NZK niedriger Malignität (G1) konnten zeigen, daß die Adhäsion dieser Zellen an verschiedene Laminine (LN 1, LN 10, LN 11) hauptsächlich über α1β1-Integrin, neben nicht weiter definierten Integrinen, vermittelt wird. Dagegen schienen Tumorzellen höherer Malignität die Zelladhäsion über α3β1-Integrin zu steuern (Rissanen et al., 2003).
Auch Integrine, die im gesunden adulten Nierengewebe immunhistochemisch nicht nachgewiesen wurden, wie VLA-4- und VLA-5-Integrin, konnten in NZK beobachtet werden. Auch für eine Zunahme der Expression von VLA-αv-Integrin bei höhergradig malignen Tumoren scheint es Hinweise zu geben (Markovic-Lipkovski et al., 2001).
Nach wie vor gilt es herauszufinden, in wie weit die Expression verschiedener Integrine mit dem Tumorgrading und der Prognose korrelieren kann (Droz et al., 1995; Markovic-Lipkovski et al., 2001).

Abbildung 4: Struktur der Integrine



Integrine bestehen aus einer α-Kette mit Kationenbindungsstellen und einer β-Kette. Die Spezifität für einen bestimmten Liganden wird vorwiegend durch die α-Untereinheit bestimmt.

(aus: Tumour progression: the role of cadherins and integrins, Molecular Medicine Today, 1995)

1.3 Matrixmoleküle

Komplexe Interaktionen zwischen Tumorzellen und dem umgebenden Tumorstroma werden über Integrin-Rezeptoren sowohl in die Zelle als auch an verschiedene Liganden der extrazellulären Matrix vermittelt (van der Flier et al., 2001; Lohi et al., 1998). Dieses Phänomen ist als «inside-out-» und «outside-in-signalling» bekannt.

Die extrazelluläre Matrix ist ein komplexes Netzwerk aus interstitiellen Proteinen hohen Molekulargewichts und Polysacchariden, die von den Zellen selbst sezerniert und organisiert werden.

Das Tumorstroma variiert in der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix.

Im folgenden soll deshalb auf einige extrazelluläre Proteine, wie Laminin, Perlecan, Tenascin, Kollagen und Fibronektin eingegangen werden, die im neoplastischen Microenvironment vorkommen und mitverantwortlich sein können für Proliferation, Differenzierung und vaskuläre Versorgung von Tumorzellen (Lohi et al., 1998).

1.3.1 Tenascin

Von den fünf Mitgliedern der Tenascin-Familie ist Tenascin-C schon am längsten bekannt. Das Glykoprotein wurde 1983 zuerst in umgebendem Stroma von bestimmten Hirntumoren, den Gliomen, und im Sehnengewebe entdeckt.

Mittlerweile konnte nachgewiesen werden, daß es von verschiedenen Zellen, unter anderem von der Neuroglia, Osteoblasten sowie Fibroblasten des Tumorstromas produziert und in

die ECM sezerniert werden kann (Chiquet-Ehrismann, 2004b).
Tenascin-C ist aus sechs identischen Untereinheiten aufgebaut, die jeweils an den amino-terminalen Enden durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind und so die Form eines Hexamers bilden (siehe Abb. 5) (Chiquet-Ehrismann and Chiquet, 2003).
Die Untereinheiten enthalten jeweils vier verschiedene, aneinander gereihte Proteinmodule, die aus Heptad-Motiven, EGF- und Fibronectin-Typ-III-ähnlichen Domänen und einer Fibrinogen-homologen Domäne am C-terminalen Ende des Proteins bestehen (Jones und Jones, 2000). Die einzelnen Tenascine unterscheiden sich in der Anzahl ihrer Untereinheiten und in der Zahl der Repeats der jeweiligen Dömänen.
Durch alternatives Spleißen der mRNA finden sich verschiedene Isoformen des Tenascin-C mit variablen Wiederholungen speziell in den FN-ähnlichen Domänen (siehe Abb. 5).
Die verschiedenen Spleißvarianten scheinen für eine unterschiedliche Affinität von Tenascin-C zu spezifischen Rezeptoren oder Liganden, unter anderem zu $\alpha v\beta 3$- und $\alpha 5\beta 1$-Integrinen, Fibronektin und Syndecan-4 verantwortlich zu sein.
Dadurch können gegensätzliche Funktionen von Tenascin-C mit gleichzeitig fördernder oder hemmender Wirkung auf Adhäsion, Migration oder Proliferation unterschiedlicher Zellen verbunden sein (Jones et al., 2000).
So scheint diese paradoxe Wirkung über die Interaktion mit anderen ECM-Molekülen, wie Syndecan-1 und Fibronektin, vermittelt zu werden. Tenascin-C kann durch Hemmung der Bindung von Syndecan-4 an Fibronektin das Zellwachstum von Tumorzellen anregen, aber die Proliferation von normalen Zellen unterdrücken (Chiquet-Ehrismann and Tucker, 2004a; Huang et al., 2001).
Die stärkste Expression von Tenascin-C findet sich in der Embryonalentwicklung vor allem in neuronalen, mesenchymalen wie auch in einigen epithelialen Strukturen. Dabei ist es sowohl an der Formgebung einzelner Zellen wie auch an der Bildung von Geweben beteiligt. Während der Organogenese wird es nur vorrübergehend exprimiert, in entwickelten Organen dagegen schwach oder gar nicht mehr. Im adulten Organismus läßt sich Tenascin-C besonders in hoch regenerativen Geweben - wie z.B. Periost, Haut, Darm, Knochenmark, glatte Muskulatur und Teilen des ZNS - nachweisen (Chiquet-Ehrismann, 2004b). Unter pathologischen Bedingungen kann es in verschiedenen Organen zur Re-Expression des Proteins kommen (Chiquet-Ehrismann, 1995).
So ist die in der gesunden Niere ausschließlich auf das medulläre Interstitium beschränkte Expression unter den pathologischen Veränderungen einer Nephritis oder einer interstitiellen Fibrose zusätzlich auf Glomeruli und tubulointerstitielle Regionen ausgeweitet (Truong et al., 1996; Okada et al., 1996).
Bei NZK scheint die Tenascin-C-Expression bei niedrig malignen Tumoren nur noch auf bestimmte Strukuren - wie die Basalmembran und den Stromabereich um Blutgefäße -

beschränkt zu sein. Dagegen wurde Zunahme der Malignität eine verstärkte, bis weit in das Tumorstroma ausgedehnte Expression festgestellt (Lohi et al., 1995).
Mammakarzinome zeigten ebenso eine Zunahme der Expression bei steigendem Tumorgrading und ausgedehnter lokaler Infiltration (Adams et al., 2002). Bei vielen weiteren Untersuchungen, unter anderem an Gebärmutter- und Ovarialkarzinomen, sowie Plattenepitheltumoren des Larynx, schien eine starke Expression von Tenascin-C auf eine schlechte Prognose und hohe Invasivität hinzudeuten (Wilson et al., 1996; Regezi et al., 2002). Pilch et al. (1999) stellten jedoch fest, daß einige Fälle hoch maligner, aber Tenascin-C negativer Ovarialkarzinome eine besonders schlechte Prognose zeigten.
Zwar kommt Tenascin-C bei bestimmten Hirntumoren schon eine gewisse diagnostische und therapeutische Funktion zu, dennoch liegen gerade für das NZK und für andere Tumorarten nur wenige Daten wie auch einige kontroverse Ergebnisse vor (Chiquet-Ehrismann and Chiquet, 2003).

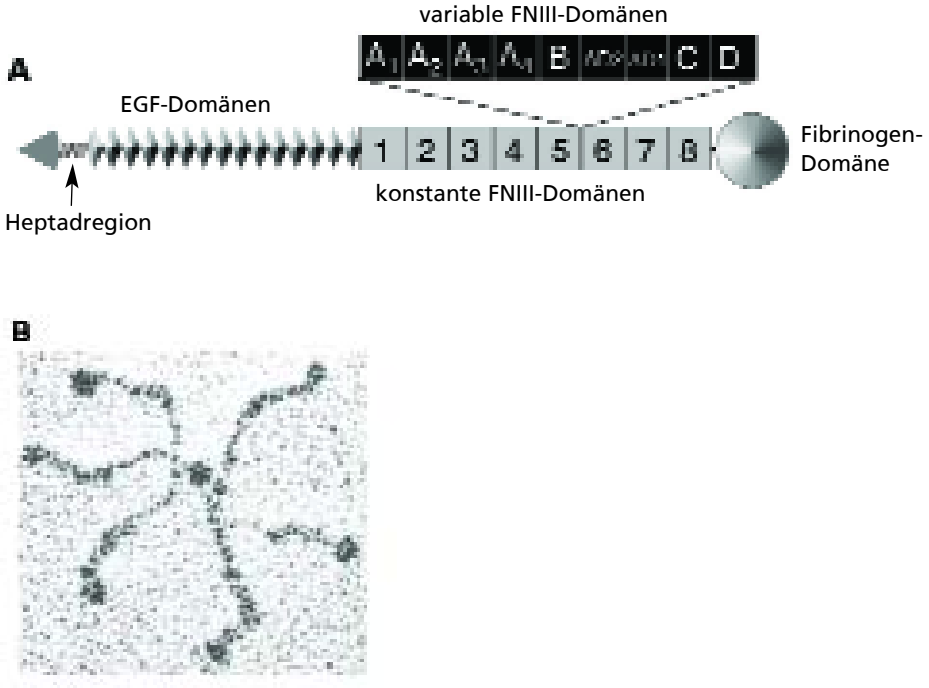


Abbildung 5: Strukturmodel von Tenascin-C

A) Einzelne Tenascin-C Untereinheit aus Heptad Domäne, EGF- und Fibronectin TypIII (FNIII) ähnlichen Domänen sowie C-terminal einer globulären fibrinogenartigen Region.
Neben 8 konstanten Domänen können durch alternatives mRNA-Spleißen 9 weitere variable FNIII-Domänen (schwarz) zu größeren Molekülvarianten führen.
B) Elektronenmikroskopische Darstellung des Tenascin-C-Hexamers

(aus: Chiquet-Ehrismann and Chiquet: «Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress», Journal of Pathology, 2003)

1.3.2 Perlecan

Perlecan gehört zur Familie der Heparan-Sulfat-Proteoglykane. Es besitzt ein großes Core-Protein, welches in fünf Domänen unterteilt werden kann, die weitgehend zu denen anderer bekannter Makromoleküle, wie z.B. Laminin oder Agrin, homolog sind. Am N-terminalen Ende der Hauptkette befinden sich drei Glykosaminoglycan-Seitenketten (siehe Abb. 6) (Olsen, 1999; Jiang et al., 2003).

Perlecan wird von Epithelzellen, aber ebenso von mesenchymalen Zellen wie den Hautfibroblasten synthetisiert. Als eine der Hauptkomponenten der Basalmembran bildet es ein hoch organisiertes molekulares Gerüst gemeinsam mit Kollagen und Lamininen.

Es entsteht eine extrazelluläre Versorgungs- und Schutzschicht, die Endothel- und Epithelzellen basalseitig umgibt und dort verschiedene Funktionen ausübt (Kurokawa et al., 2003). Die Seitenketten des Proteins können verschiedene Wachstumsfaktoren und Enzyme binden, die bei Bedarf kontrolliert freigegeben werden können, um Mechanismen zur Signalübertragung zwischen Epithelzellen und der Basalmembran zu regulieren.

Eine Vielzahl von Molekülen, z.B. Heparin, Laminin-1, Fibronektin, FGF-7 («keratinocyte growth factor»), FGF-2 («fibroblast growth factor») können direkt an das Core-Protein von Perlecan binden, ebenso Rezeptoren, wie β1/β3-Integrine, die adhäsive Interaktionen zwischen den Zellen und der ECM vermitteln (Olsen, 1999).

Im Gegensatz zu Fibroblasten und Endothelzellen wurden für hämatopoetische Zellen auch anti-adhäsive Eigenschaften von Perlecan beschrieben (Klein et al., 1995).

In der Tumorgenese scheint Perlecan über ein wachstumsförderndes Potential zu verfügen. An Melanomen und Kolonkarzinomen konnte gezeigt werden, daß eine Herunterregulierung der Expression von Perlecan das invasive Verhalten der Tumorzellen in vitro und die lokale Tumorausbreitung und Vaskularisation in vivo hemmen kann (Reiland et al., 2004; Sharma et al., 1998).

Eine vegleichende Studie an Mamma- und Larynxkarzinomen zeigte, daß es bei Mammatumoren unabhängig vom Tumorgrading zu einem Verlust der Expression aller BM-Komponenten, inclusive Perlecan, kommt. Dagegen war die Expression von Perlecan sowie anderer Basalmembranstrukturen beim vorwiegend loko-regional wachsenden Larynxkarzinom noch erhalten, nahm aber mit höherer Malignität ab (Nerlich et al., 1998).

Diese kontroversen Ergebnisse über die Funktion von Perlecan deuten darauf hin, daß das komplexe Zusammenspiel von Basalmembranen und Tumorzellen von vielen weiteren Faktoren, wie der Wirkung von Wachstumsfaktoren, Enzymen und Enzyminhibitoren mitbestimmt wird.

Für die Entwicklung von Tumoren der Niere, die ebenfalls von der Intaktheit der Basalmembranen vermutlich beeinflußt werden, stehen weitere Untersuchungen aus. Bisher liegen keine veröffentlichten immunhistochemischen Analysen von Perlecan bei NZK vor.

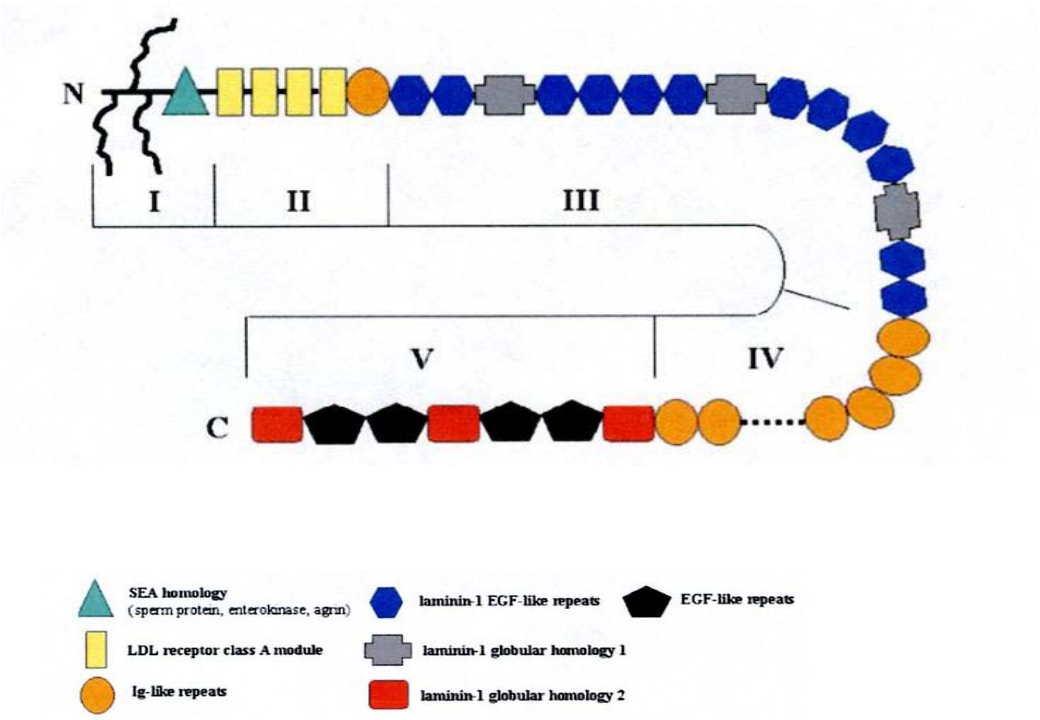


Abbildung 6: Molekülstruktur von Perlecan

Perlecan wird in fünf verschiedene Proteinmodule eingeteilt. Nur die N-terminale Domäne enthält Glycosaminoglycan-Seitenketten (schwarze Wellen).
Die Domäne IV enthält insgesamt 21 Ig-ähnliche Motive (angedeutet).

(aus: Olsen: «Life without perlecan has its problems», The Rockefeller University Press, 1999)

1.3.3 Laminin-10/11

Von der Glykoproteinfamilie der Laminine sind mittlerweile 15 verschiedene Isoformen bekannt, die aus je einer α-, β- und einer γ-Kette von bislang elf identifizierten Untereinheiten (fünf α-, drei β- und drei γ-Ketten) aufgebaut sind. Laminin-10 und -11 bestehen jeweils aus einer α5-, einer β1- bzw. β2-Kette und einer γ1-Kette, die aus unterschiedlichen Domänen gebildet werden (siehe Abb. 7).

Laminine kommen ubiquitär in allen Geweben vor und können zur Anordnung von Basalmembranen in eine supramolekulare Architektur beitragen. Innerhalb dieser Struktur können Lamininmoleküle sowohl untereinander große maschenartige Polymere formieren als auch in Wechselwirkung zu anderen netzartigen Polymeren (z.B. Netzen aus Kollagen IV) und vielen einzelnen Komponenten der ECM stehen (Colognato and Yurchenco, 2000). Für Laminine sind als zelluläre Rezeptoren und rezeptorähnliche Moleküle verschiedene β1- und β4-Integrine, Heparan-Sulphat-Proteoglykane und andere Zelloberflächenproteine nachgewiesen worden. Die Interaktionen von Lamininen mit zellulären Rezeptoren und Matrixmolekülen können zu Substratbindung, Migration und Differenzierung der Zellen maßgeblich beitragen. Diese Funktionen scheinen auch besonders während der embryonalen Entwicklung, vor allem beim Nervenzellwachstum, und bei der Zellregeneration wichtig zu sein (Luckenbill-Edds, 1997).

Das Vorkommen im Tumorgewebe scheint die meisten Karzinome einzuschließen. Zellen verschiedener menschlicher Tumore weisen durchwegs eine Lamininexpression auf, aber es werden unterschiedliche Varianten gefunden (Wewer et al., 1994).

Vor allem Laminin-10 konnte in einer Vielzahl humaner Karzinomzelllinien nachgewiesen werden. Der jeweilige Adhäsionsmechanismus zwischen der Zelle und den Lamininen 10 und 11 wird Zelltyp-spezifisch über unterschiedliche Rezeptoren, wie α3β1- bzw. α6β1-Integrin, reguliert (Tani et al., 1999).

In Versuchen zur Chemotaxis von NZK-Zellen konnte gezeigt werden, daß es unter dem Einfluß von Komponenten der ECM, wie Laminin, Kollagen IV und Fibronektin, und in Anwesenheit von β1-Integrinen zu einem beträchtlichen Anstieg der Invasivität von Tumorzellen kommt (Brenner et al., 2000).

Eine andere immunhistochemische Untersuchung konnte feststellen, daß ein Verlust in der Expression von Laminin und E-Cadherin sowohl mit der Zunahme der Tumorgröße als auch höherem zellulären Grading signifikant korrelierte (Morell-Quadreny et al., 2003). Bei NZK scheint jede Tumorart (hier: klarzellig, chromophil bzw. papillär, chromophob) für sich charakteristische extrazelluläre Komponenten zu exprimieren (Droz et al., 1994).Untersuchungen an NZK sind erforderlich, um diese Ergebnisse, die kontroverse Funktionen von LN zeigen, weiter zu differenzieren.

LN-1 wird häufig im Tumorgewebe exprimiert, jedoch in der Zusammensetzung mit einer α1-Kette als Untereinheit scheint es nur in wenigen Tumorzellinien vorzukommen, unter anderem aber in NZK und in wenigen anderen malignen epithelialen Geweben. Es wurde gezeigt, daß proximale Tubuluszellen der Niere α1-Untereinheiten produzieren, weshalb im Vergleich zu Oncozytomen auf einen vorwiegenden Zellursprung vor allem der klarzelligen NZK ausgehend vom proximalen Tubulusepithel ausgegangen wird (Rissanen et al., 2003).

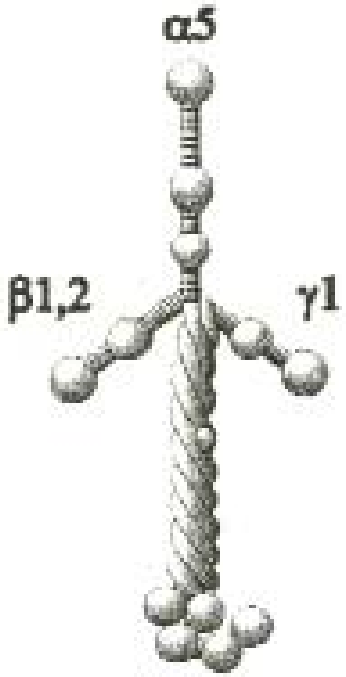


Abbildung 7: Struktur von Laminin-10/11

Die Laminine 10 und 11 bestehen aus einer α5, β1 bzw. β2 und einer γ1-Kette. Unterschiedliche Domänen sind durch Kugeln und Streifen angedeutet.

(aus: Colognato and Yurchenco: «Form and function: the laminin family of heterotrimers», Developmental Dynamics, 2000)

1.4 Zielsetzung

Wie schon erwähnt, stellen NZK eine besondere Entität von Tumoren dar, die sich klinisch oft erst in fortgeschrittenen Stadien der Metastasierung manifestieren. Zur Optimierung deren Therapie und Langzeitprognose sind heute molekulargenetische prognostische Parameter notwendig.

In der vorliegenden Arbeit sollten verschiedene Adhäsions- und Matrixmoleküle immunhistologisch analysiert werden, da ihre vielfältigen Interaktionen für das Verhalten der Nierenzellkarzinome pathogenetisch relevant zu sein scheinen.

Dabei sollte die zelluläre Expression der untersuchten Moleküle gezeigt und deren Konstellation untereinander erfaßt werden.

Die immunhistochemischen Merkmale der Tumore wurden mit dem TNM-Staging verglichen, um die Frage zu beantworten, ob bestimmte Expressionsmuster dieser Moleküle mit entsprechenden Stadien der Tumorausdehnung korrelieren können. Hierbei wurde die vierte Version der WHO-Klassifikation von NZK von 1992 verwendet, da die in den letzten Jahren immer wieder vorgenommenen Revisionen noch offen lassen, ob Veränderungen im Stagingsystem den prognostischen Wert und die Therapieplanung überhaupt beeinflussen und verbessern können (Moch et al., 2000).

Um Aussagen darüber treffen zu können, in wie weit spezifische Expressionsmuster mit der Malignität der NZK korrelieren, wurde die histopathologische Klassifikation nach Thoenes verwendet, da sie insbesondere Zelltyp, Wachstumsmuster und den zytologischen Malignitätsgrad erfaßt (Thoenes et al., 1986).

Aufgrund der besonderen histopathologischen Heterogenität der NZK wurden auch histologische Klassifizierungen immer wieder geändert, zuletzt 1997 mit Einbezug genetischer Merkmale.

Die Einteilung nach Thoenes scheint auch für einen phänotypischen Vergleich zwischen den Tumorzellen und ihren vermuteten Vorläuferzellen besonders geeignet zu sein, vor allem im Vergleich mit der Expression von verschiedenen Cadherinen, die Hinweise auf den Zellursprung der Tumore liefern könnten (Shimazui et al., 2000).

Desweiteren wurde die Expression von Adhäsions- und Matrixmolekülen in Gefäßzellen im Hinblick auf einen möglichen Einfluß dieser Proteine auf die für das Tumorwachstum wichtige Neovaskularisation beobachtet.

2 Material und Methoden

2.1 Bezugsfirmen

Bend und Hobein	Zürich, CH
Biohit	Helsinki, Finnland
Böhringer	Mannheim, BRD
DAKO	Hamburg, BRD
Dianova	Hamburg, BRD
Eppendorf AG	Hamburg, BRD
Falcon	Heidelberg, BRD
Gibco BRL	Eggenstein, BRD
Greiner und Söhne	Frickenhausen, BRD
Hermann Biermann GmbH Diagnostika	Bad Nauheim, BRD
IKA-Labortechnik	Staufen i. Br., BRD
Immunotech	Marseille, Frankreich
Kimberly und Clark	Surrey, UK
Kodak Company	Rochester, USA
Laboserve Eurodiagnostik	Staufenberg, BRD
Langenbrink	Emmendingen, BRD
Leica	Nussloch, BRD
Merck	Darmstadt, BRD
Millipore	Molsheim, Frankreich
Pharmingen	Hamburg, BRD
Sartorius	Göttingen, BRD
Science Services (SCI)	München, BRD
Serotec	Kidlington, Oxford, BRD
Sigma	Deisenhofen, BRD
Takara Biomedicals	Kyoto, Japan
Transduction	Kentucky, USA
VIVA Diagnostika	Hürth, BRD
Wissenschaftlich Technische Werkstätten (WTW)	Weilheim, BRD
Zeiss	Oberkochen, BRD

2.2 Reagenzien

Aceton	Merck
Aqua bidest.	laboreigen
Bovines Serum Albumin (BSA)	Böhringer
3'-3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB)	Merck
4',6-Diamino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI)	Merck
Elvanol mit 1,4-Diazabicyclo-[2,2,2]-Oktan (DABCO) als Antifadingreagenz	Merck
Humanes AB-Serum	Blutspender der Blutgruppe AB
Mayer's Hämalaun Lösung	Merck
HCl	Merck
H_2O_2, 30%-ig	Merck
Kaninchen-anti-Maus-IgG, Peroxidase-konjugiert	DAKO
Kaninchenserum, normal	DAKO
Natriumchlorid	Merck
Phosphate buffered saline (PBS)	laboreigen
Schnelleindeckmedium «Entellan»	Merck
Schwein-anti-Kaninchen-IgG, Peroxidase-konjugiert	DAKO
Schweineserum, normal	DAKO
Tris	Merck

2.3 Materialien

Deckgläser	Langenbrinck
Einfrierröhrchen	Greiner
Eppendorfröhrchen 1 ml	Eppendorf
Falcon Tube	Falcon
Kimwipe Tücher	Kimberley und Clark
Inkubationskammer	laboreigen
Markierstift «PAP Pen»	SCI
Objektträger unbehandelt	Langenbrinck
Pipetten 1-10 µl, 10-100 µl, 200-1000 µl	Eppendorf

Pipettenspitzen weiß (1-10 µl)	Greiner
Pipettenspitzen gelb (10-100 µl)	Greiner
Pipettenspitzen blau (200-1000 µl)	Greiner
Sterilfilter Millex HA 0,45 µm	Millipore
Tauchbecken	laboreigen
Tauchständer	laboreigen
Tissue Tek	Merck
Tuncsten 64 ASA Diapositiv Film	Kodak Company

2.4 Geräte

Auflichtmikroskop «Axiophot»	Zeiss
Gefriermikrotom «Frigocut» Mod 2700	Leica
pH-Meter	WTW
Magnetrührgerät	IKA Labortechnik
Waage	Sartorius
Vortex	Bend und Hobein

2.5 Verwendetes Gewebe

2.5.1 Herkunft

Die Gewebeproben wurden in der Zeit von 1994 bis 1996 bei Tumornephrektomien entnommmen und freundlicherweise von der Urologischen Abteilung der Universitätsklinik Tübingen für diese Studie mit dem Einverständnis der Patienten zur Verfügung gestellt.
Die wesentlichen Anteile des entfernten Tumorgewebes wurden für die routinemäßige histologische Analyse verwendet. Restproben aus eventuell gesunden Anteilen der Niere sowie aus Tumorgewebe wurden für die weitere immunhistologische Untersuchung eingesetzt.

2.5.2 Aufbewahrung

Die bereitstehenden Präparate wurden bis zur Verarbeitung in Gefrierröhrchen bei -194°C in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.5.3 Histopathologische, morphologische und klinische Beurteilung

Die in dieser Arbeit hergestellten Tumorschnitte wurden dankenswerterweise von Frau Prof. Dr. J. Markovic-Lipkovski (Pathologisches Institut der Universität Belgrad) beurteilt und nach den histologischen und zytologischen Kriterien nach Thoenes klassifiziert (Thoenes et al., 1986).

Tumorzellart (Histologie)	Präparat	Morphologie	Zellulärer Tumorgrad (G)	TNM-Staging
klarzellig	S 1779 (1)	solide		T2 N0 MX
	S 1987 (2)	solide/trab./tub.	1	T1 N0 M0
	S 1989 (3)	solide		T2 N0 M0
	S 2337 (4)	solide	1-2	T3b N0 MX
	S 2315 (5)	zyst./solide/trab./pap.	1-2	T3 NX MX
	S 2197 (6)	solide/trab./zyst.		T2 NX MX
	S 2393 (7)	solide/trab./pap.		T2 NX MX
	S 2431 (8)	solide		T3a NX MX
	S 2374 (9)	solide/trab.		T2 NX MX
	S 2199 (10)	solide/tub./zyst.		T2 NX MX
	S 2333 (11)	trab./zyst./solide		T2 NX MX
	S 2381 (12)	trab./solide	2	T2 N0 MX
	S 1931 (13)	solide/tub./pap.		T3a NX M1
	S 1922 (14)	solide/zyst.		T1 N0 M0
	S 2037 (15)	solide/zyst./trab./tub.		T2 NX M1
	S 836 (16)	solide/tub./pap.		T2 N0 MX
	S 1745 (17)	solide		T3a NX MX
	S 2310 (18)	solide/tub./azinös	3	T2 NX MX
chromophil (eo)	S 1933 (I)	solide/tub./pap.		T1 N0 MX
(eo)	S 2356 (II)	tub./zyst./solide	2	T2 NX M1
(ba)	S 2435 (III)	pap./azinös/tub.		T2 N0 MX
(eo)	S 2702 (IV)	azinös/trab./solide		T2 NX MX
chromophob	S 1461 (V)	solide	2	T3b N2MX
	S 2157 (VI)	solide/tub./pap.	2-3	T2 NX MX
spindelzellig	S 2355 (VII)	trab./solide/tub.		T3a N2 MX
	S 2277 (VIII)	solide	3	T3 N0 MX
	S 2471 (IX)	trab./solide		T2 NX M1

Tabelle 1: Einteilung der Tumorpräparate nach Thoenes (1986) nach zytologischen und histologischen Kriterien unter Einbezug des Tumorstaging

2.6 Verwendete Antikörper

2.6.1 Einteilung und Spezifität der Antikörper

monoklonale Antikörper	Klon	Nomenklatur	Spezifität	Verdünnung	Bezug
E-Cadherin	HECD-1		E-Cadherin	1:30	Takara, Biomedicals
N-Cadherin	GC-4		N-Cadherin	1:400	Sigma
P-Cadherin	56		P-Cadherin	1:10	Transduction
VE-Cadherin	BV 6	CD144	Cadherin-5	1:5	VIVA
VLA-1	HP2B6	CD49a	α1-Integrin	1:10	Immunotech
VLA-2	Gi 9	CD49b	α2-Integrin	1:40	Immunotech
VLA-3	M-KID 2	CD49c	α3-Integrin	1:100	Immunotech
VLA-4	HP2/1	CD49d	α4-Integrin	1:5	Immunotech
VLA-5	SAM 1	CD49e	α5-Integrin	1:5	Immunotech
VLA-6	4F10	CD49f	α6-Integrin	1:50	Serotec
αv	AMF 7	CD51	αv-Integrin	1:50	Immunotech
Syndecan	BB-4	CD138	Syndecan-1	1:20	Biermann
Tenascin	DB7		Tenascin-C	1:200	Biohit OY
polyklonale Antikörper	Lot				
Laminin	FJ9B03		Laminin-10/11	1:250	GibcoBRL
Perlecan			Perlecan	1:500	G.Klein

Tabelle 2: Einteilung und Spezifität der Antikörper zur Darstellung von Adhäsions- und Matrixmolekülen

Antikörper als Positiv- und Negativkontrolle

W6/32.HL: Monoklonaler Antikörper, der die schwere Kette der HLA-A, -B, -C-Antigene bindet. Dieser Antikörper diente hier unverdünnt als Positivkontrolle (Barnstable et al., 1978; Ziegler und Milstein, 1979).
Laboreigen (Prof. Dr. C. A. Müller)

W6/32.HK: Inaktive Variante von W6/32. HLK, die ebenso unverdünnt als Negativkontrolle eingesetzt wurde (Ziegler und Milstein, 1979).
Laboreigen (Prof. Dr. C. A. Müller)

Zweitantikörper konjugiert mit Peroxidase

Kaninchen-anti Maus-IgG: Im Kaninchen produzierter polyklonaler Antikörper, der zur Detektion der Bindung der monoklonalen murinen Primärantkörper 1:20 verdünnt verwendet wurde (siehe Tab. 2).

Schwein-anti-Kaninchen-IgG: Im Schwein produzierter polyklonaler Antikörper, der zur Detektion der Bindung von polyklonalen Erstantkörpern, die im Kaninchen produziert wurden, in einer Verdünnung von 1:20 eingesetzt verwendet wurde (siehe Tab. 2).

2.7 Immunhistochemie

2.7.1 Die indirekte Immunperoxidasefärbung

Das Prinzip der indirekten Immunperoxidasefärbung beruht darauf, daß ein unkonjugierter Antikörper, auch Primär- oder Erstantikörper, im Präparat an ein Antigen bindet.
Um diese Anlagerung lokalisieren zu können, wurde ein Enzym-konjugierter Zweitantikörper benutzt, der mit dem konstanten Anteil des Erstantikörpers eine Bindung eingeht.
Für dieses Verfahren wurden in der vorliegenden Arbeit Zweitantikörper verwendet, an die das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt worden war. Unter Zusatz von H_2O_2 und einem Chromogen (DAB) als Substrat bildeten sich Farbmoleküle aus.
Hierbei entstand eine braune Färbung, die zeigte, wo die Bindungsreaktion des Erst- und Zweitantikörpers stattgefunden hatte.
Der Zweitantikörper mußte gegen Immunglobuline der Tierspezies gerichtet sein, aus welcher der Primärantikörper gewonnen wurde (siehe Kap. 2.6.1).

2.7.2 Vermeiden von Hintergrundfärbungen

Vor der eigentlichen Färbung wurde eine Inkubation der Schnitte mit einer Serumlösung durchgeführt, die verhindern sollte, daß sich Primär- bzw. Sekundärantikörper unspezifisch

an Gewebestrukturen im Präparat anlagerten.
So sollten insbesondere durch die Serumimmunglobuline unspezifische Reaktionen der Testantikörper mit Fc-Rezeptoren blockiert werden. Auch mögliche andere unspezifische Interaktionen der Testantikörper mit Gewebeproteinen sollten damit verhindert werden.
Für die Behandlung der Gewebeschnitte wurden daher zur optimalen Blockierung unspezifischer Bindungen Seren aus Tieren eingesetzt, in denen die verwendeten Zweitantikörper hergestellt worden waren.
Um auch bei den weiteren Inkubationsschritten falsch positive Bindungsreaktionen ausschließen zu können, wurden für die Verdünnung der Erstantikörper noch Rinderserumalbumin (BSA) und für diejenige der Zweitantikörper männliches Humanserum der Blutgruppe AB, das vor Anwendung mit Filtern (Millipore 0,45 µm) aufgereinigt wurde, zugefügt.

2.7.3 Lösungen und Puffer

Stammlösung:	6 g Tris und 5,8 g NaCl wurden in 1000 ml Aqua bidest. gelöst und anschließend mit 1 M HCl auf pH 7,4 eingestellt
Spülpuffer:	1 Teil Stammlösung wurde mit 9 Teilen 0,9%iger NaCl-Lösung gemischt
Verdünnungspuffer für das Blocking-Reagenz:	Das entsprechende Tierserum (vom Schwein bzw. Kaninchen) wurde zur Vermeidung unspezifischer Antikörperbindungen mit Spülpuffer 1:10 verdünnt verwendet.
Verdünnungspuffer für die Primärantikörper:	0,1% BSA wurde einer 1%igen PBS-Lösung hinzugefügt.
Verdünnungspuffer für die Zweitantikörper:	Zunächst wurde menschliches AB-Serum 1:5 mit Spülpuffer verdünnt und mit 0,1 M HCl auf pH 7,4 eingestellt. Im Verhältnis von 1:20 wurde der entsprechende Zweitantikörper anschließend zugegeben.
DAB-Lösung:	Es wurde 1 Tabl. DAB in 10 ml Aquadest, in einem lichtgeschützten (Alufolie) Falcon Tube, aufgelöst. Kurz vor der Färbung wurden 3 µl von 30%igem H_2O_2 zugegeben und die Lösung geschüttelt.

2.7.4 Herstellen der Gefrierschnitte

Die Tumorbiopsien wurden aus den Stickstofftanks entnommen.

Um das Material dann möglichst gewebeschonend aus den Gefrierröhrchen herausschieben zu können, wurde jeweils der Schraubverschluß entfernt, das ins Lumen ragende Gewinde mit Klemme und Skalpel abgetrennt und das Ende des Röhrchens eröffnet.

Damit das Gewebe während dieses Vorgangs nicht auftaute, wurden die Ampullen immer wieder in einen kleinen Sticksstoffbehälter eingetaucht.

Das Tumormaterial konnte nun bei einer Temperatur von -25°C im Gefriermikrotom weiterbearbeitet werden. Die Objekthalterung selbst war auf -20°C eingestellt.

Mit ein paar Tropfen Einbettmedium (Tissue Tek) ließ sich das Gewebe darauf befestigen und dann mit einem Vorschub von 3-5 µm schneiden.

Die Schnitte wurden direkt vom Messer auf unbehandelte Objektträger aufgenommen und zum Trocknen 2,5 Stunden bei Raumtemperatur belassen. Danach erfolgte die Fixierung der Präparate über 10 min. im Azetonbad bei -20°C.

Anschließend trockneten die Nierenschnitte nochmals eine halbe Stunde bei Raumtemperatur.

Die Schnittpräparate konnten so entweder bis zum Gebrauch bei -20°C über mehrere Tage aufbewahrt oder gleich gefärbt werden.

2.7.5 Durchführung der Färbung

Vorbereitungen

Die Schnitte wurden mit einem Fettstift (PAP Pen) auf den Objektträgern umrandet, damit sich die jeweils aufgetragene Flüssigkeit gleichmäßig auf den Präparaten verteilte und nicht so leicht abfließen konnte.

Um das Gewebe während des gesamten Färbevorgangs vor Austrocknung zu schützen und damit Färbeartefakte zu vermeiden, wurde eine dunkle feuchte Kammer angefertigt (Glaswanne mit befeuchtetem Zellstoff und Deckel).

Blockierungsreaktion unspezifischer Antikörperbindungen

Die direkt nach dem Azetonbad oder nach dem Auftauen getrockneten Schnitte wurden mit dem verdünnten, zum jeweiligen Zweitantikörper passenden Prä-Immunserum bedeckt (siehe Kap. 2.7.3), um eventuelle unspezifische Kreuzreaktionen des Zweitantikörpers mit dem Gewebe zu unterbinden.

Je nach Größe der Präparate war es nötig, zwischen 80 und 150 µl der entsprechenden Lösungen aufzutragen, um das gesamte Gewebe gleichmäßig zu bedecken. Sowohl das

Pipetieren als auch die folgende 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur wurde in der feuchten Kammer vorgenommen.
Nach dieser Einwirkzeit wurde die Flüssigkeit von den Objektträgern abgeklopft und mit einem fusselfreien Zellstoff (Kimwipe) am Schnittrand aufgesaugt, ohne jedoch das Gewebe dabei zu berühren. Der auf diese Weise sehr dünn erhaltene Flüssigkeitsfilm zeigte keinen Verdünnungseffekt beim Hinzufügen des
Primärantikörpers. Die auf dem Gewebe verbleibende dünne Schicht der Serumlösung sollte weiterhin unspezifische Bindungsreaktionen verhindern.

Primärantikörper

Die verschiedenen Erstantikörper wurden nach den in Tabelle 2 beschriebenen Verdünnungen eingesetzt und kurz vor bzw. frühestens am Tag vor der Färbung mit dem Verdünnungspuffer gemischt.
Beim Auftragen der Antikörperlösungen und bei der in diesem Schritt ebenso 30-minütigen Inkubationzeit wurde wie schon bei der Blockierungsreaktion vorgegangen. Im Unterschied dazu erfolgte hier nach dem Abkippen des Antikörpers ein gründliches Spülen der Präparate, um Färbeartefakte aufgrund von ungebundenen Antikörpern zu vermeiden.
Es war ausreichend, die Objektträger in den Tauchständern jeweils nach 4 Minuten in das nächste der 3 mit Spülpuffer gefüllten Becken zu geben.
Danach wurde der Spülpuffer aus dem ersten Tauchbecken erneuert, aber dieses Becken dann als letztes in die Spülreihe wieder eingefügt, so daß bei jedem folgenden Spülvorgang am Ende ein frischer Puffer stand. Die überschüssige Flüssigkeit wurde wieder durch Abklopfen und mittels Zellstoff vorsichtig vom Geweberand entfernt, um den folgend aufgetragenen Zweitantikörper nicht weiter zu verdünnen.

Zweitantikörper

Die Inkubationszeit in der feuchten Kammer betrug für diese Antikörper bei Raumtemperatur ebenso 30 Minuten. Nach der gleichen Vorgehensweise wie beim Erstantikörper wurde das Spülen, Abklopfen und Abtupfen wiederholt. Auch der Zweitantikörper wurde frühestens einen Tag vorher verdünnt (siehe Kap. 2.7.3).

Substratlösung

Da die DAB-Lösung nur kurze Zeit verwendbar und sehr lichtempfindlich ist, konnte sie höchstens 15 Minuten vor Gebrauch hergestellt werden und mußte in einem lichtgeschützten Gefäß aufbewahrt werden.
Hier dauerte die Inkubation 10 Minuten. Anschließend wurden die Präparate wieder gespült, aber der restliche Spülpuffer von den Objektträgern nur abgekippt, um vor Austrocknung sicher zu sein.

Gegenfärben

Die noch gut befeuchteten Schnitte konnten jetzt im Ständer in das unverdünnte Hämalaun getaucht werden.

Nach acht Sekunden wurden die Präparate in einem mit Wasser gefüllten Becken kurz geschwenkt und solange in einem zweiten mit fließendem Wasser belassen, bis keine blaue Farbe mehr an das Wasser abgegeben wurde.

Eindeckeln der Präparate

Die Schnitte mußten vor dem Auftragen des Eindeckmediums jetzt vollständig getrocknet sein. Es genügte, einen kleinen Tropfen Eindeckmedium mit einer Pipettenspitze möglichst in die Mitte der Präparate zu applizieren.

Dann sollte das Deckglas, ohne Luftblasen zu bilden, vorsichtig aufgelegt und leicht angedrückt werden.

2.7.6 Mikroskopische Auswertung und Fotographieren der Präparate

Die Präparate wurden lichtmikroskopisch (Axiophot, Zeiss) bei Vergrößerungen von 1:225 bis 1:1000 betrachtet und mit Graufilter und Kondensator bei kleinstmöglicher Belichtungszeit fotographiert. Die Vergrößerung wurde jeweils unter den Bildern angegeben.

Die semiquantitative Beurteilung der Gewebefärbung in den NZK erfolgte jeweils bezogen auf eine Zellart (meist Tumorzellen, Stromazellen und Zellen Tumor versorgender Gefäße). Bei der semiquantitativen Analyse von gesunden Nieren wurde in den Ergebnistabellen die entsprechend untersuchte Zellart aufgelistet und im Tumorgewebe durch Symbole angegeben. Die Färbereaktion wurde nach folgendem Schema dargestellt:

0 : kein Präparat vorhanden
- : keine Anfärbung von Tumorzellen
+ : bis 50% der Tumorzellen bzw. der Zellen einer angegebenen Zellart in der Normalniere zeigen eine Farbreaktion
++ : über 50% der Tumorzellen bzw. der Zellen einer angegebenen Zellart in der Normalniere reagieren
V : Expression auf Gefäßzellen
S : Expression auf Zellen des Tumorstromas

3 Ergebnisse

3.1 Expression von Adhäsionsmolekülen

Alle untersuchten Adhäsionsmoleküle wie E-, N-, P- und VE-Cadherin und Syndecan-1 konnten in den NZK mit unterschiedlicher Häufigkeit gefunden werden.
Dabei zeigte sich, daß besonders E-Cadherin auf einer großen Zahl von Tumoren und mit 88% deutlich häufiger noch als N-Cadherin (62%) exprimiert wurde. Auch Syndecan-1 war in fast allen Fällen (95%) positiv und in 75% der Tumoren häufiger mit E-Cadherin im gleichen Tumorpräparat als N-Cadherin exprimiert. VE-Cadherin war in 20% der renalen Karzinome selektiv auf Gefäßzellen positiv (siehe Abb.12). P-Cadherin dagegen wurde nur in einem einzigen Präparat dargestellt (siehe Abb.11).
Korrelierte man die Expression von E- und N-Cadherin zum zellulären Malignitätsgrad (Tumorgrad) ging die Expression mit dem Tumorgrad zurück. Dabei war der Verlust von N-Cadherin in 60% der G3 Tumore häufig stärker (++) als bei E-Cadherin ausgeprägt.
Bei Tumoren höherer Malignität konnte eine Änderung des zellulären Verteilungsmusters von E- und N-Cadherin, sowie Syndecan-1 beobachtet werden. In G1-G2 Präparaten war eine zellmembrangebundene und in G3 Tumoren auch eine diffuse zytoplasmatische Anfärbung häufig zu sehen.
Bei Einbezug des TNM-Staging wurde bei größerer Tumorausdehnung eher eine Zunahme der Expression von E- und N-Cadherin sowie von Syndecan-1 festgestellt, wobei der Unterschied von den T3 zu den T1-T2 Tumoren bei N-Cadherin besonders ausgeprägt war. Vor allem war bei T3 Tumoren ein gleichzeitiges Vorkommen beider Cadherine deutlich häufiger mit einer Anfärbung von vielen Zellen (++) zu finden.
Von den wenigen hier untersuchten E-Cadherin negativen Tumoren (N=3) wiesen zwei bei Diagnosestellung Metastasen (M1) auf. Gleichzeitig waren diese Präparate N-Cadherin negativ. Dies schien eine stärkere Invasivität bei E-Cadherin negativem Expressionsmuster anzudeuten.

3.1.1 Darstellung von Expressionsmustern der einzelnen Cadherine

E- und N-Cadherin

Im normalen Nierengewebe

Eine Anfärbung mit dem E-Cadherin-Antikörper zeigte sich in Schnitten gesunder Nieren und den Normalanteilen von Tumorbiopsien sowohl am Endteil der Henle'schen Schleife, dem geraden und gewundenen Anteil des distalen Tubulus, als auch dem Überleitungsstück und den Sammelrohren.

N-Cadherin wurde hingegen von Epithelien der gestreckten und gewundenen proximalen Tubuli präsentiert (siehe Tab.3).

Im Tumorgewebe

In 23 von 26 Fällen (88%) wurde E-Cadherin von den Tumorzellen der verschiedenen Nierenzellkarzinome exprimiert und 16 Tumore (62%) zeigten eine positive Reaktion für N-Cadherin bei gleichzeitigem Vorkommen von E-Cadherin (siehe Abb.8,10). Beide Proteine konnten in 3 Fällen nicht nachgewiesen werden (siehe Tab.6).

Vergleich mit dem TNM-Staging

E- und N-Cadherin wurden beide häufiger in T3 als in T1-T2 Tumoren mit einem starken Expressionslevel beobachtet, wobei der Unterschied in beiden Staging-Gruppen für N-Cadherin deutlich ausgeprägter war:

Während N-Cadherin in 47% der T1-T2 klassifizierten NZK überhaupt nicht exprimiert wurde und nur in einigen Präparaten (37%) eine starke Reaktion zeigte (++), wurde eine deutlich häufigere diffuse Expression in 86% der T3 Tumoren festgestellt (siehe Abb.10).

E-Cadherin wurde dagegen schon in 82% aller T1-T2 Tumoren dargestellt, von denen wiederum 58% (11 aus 19) eine starke Färbereaktion zeigten (siehe Abb.9). In den untersuchten T3 Tumoren wurde E-Cadherin in allen Präparaten diffus exprimiert (siehe Tab.1, Tab.6).

Ein Vorkommen beider Proteine im gleichen Tumorpräparat (siehe Abb.8, 10) zeigte sich in beiden Staging-Gruppen mit deutlicher Differenz von 47% bei T1-T2 und 86% bei T3 Karzinomen. 5 von 7 T3 Tumoren (70%) wiesen gleichzeitig eine starke (++) Expression von E- und N-Cadherin auf.

Die Ausbreitung der T3 Tumore schien loko-regional begrenzt zu sein, da eine Fernmetastasierung (M1) nur bei einem einzigen T3 Karzinom und regionale Lymphknotenmetastasen (N2) bei 2 Präparaten dieser Gruppe bekannt waren.

Da bei den meisten untersuchten NZK zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ein Lymphknotenbefall oder eine Fernmetastasierung unbekannt waren, könnte dies auch auf eine potentiell geringere Invasivität von T3 klassifizierten Tumoren mit gleichzeitiger Expression von E- und N-Cadherin hindeuten.

Vergleich zur Histopathologie

Bei zunehmender zellulärer Malignität (G1-G3) konnte ein deutlicher Rückgang der Expression beider Cadherine festgestellt werden:

E-Cadherin war bei G1 und G2 Tumoren zu 100% bzw. 90% ähnlich häufig positiv (siehe Abb.9) und zu 60% bei G3 Tumoren.

Bei N-Cadherin zeigte sich ein stärkerer Abfall von 80% (4 von 5) bei G1, über 63% (10 von 16) der G2, auf nur 40% (2 von 5) bei G3 Tumoren. N-Cadherin war somit bei 60% der G3 Tumoren häufiger negativ als bei G2 (37%) oder G1 Tumoren (20%).

Von den G1-G2 Tumoren zeigten 70% der Präparate ein gleichzeitiges Vorkommen beider Cadherine, wovon 45% eine starke Färbereaktion für beide Proteine vorwiesen.

Da man nur bei 40% der G3 Karzinome ebenso ein starkes gleichzeitiges Vorkommen von E- und N-Cadherin positiven Tumorzellen (++) feststellen konnte, schien mit zunehmendem zellulären Malignitätsgrad die Expression beider Cadherine abzunehmen.

Die Expression von E-Cadherin lies sich in Präparaten aller morphologisch unterschiedlicher Tumorsubtypen nachweisen (siehe Abb.8,9). Dagegen wurde N-Cadherin nicht in chromophoben und nur in geriger Zahl in chromophilen Präparaten gefunden. Auch hier konnte keine deutliche Korrelation zwischen Zelltyp oder Wachstumsstruktur (solide oder gemischt solide mit tubulopapillären Einschlüssen) und der Expression von E- und N-Cadherin nachgewiesen werden (siehe Abb.28).

Die meisten Nierenzellkarzinome zeigten eine an die Zelloberfläche gebundene, umschriebene Expression beider Moleküle. Mit Zunahme der Malignität änderte sich die Verteilung der Antikörper innerhalb der Tumorzellen deutlich, sodaß bei G3 Tumoren vorwiegend eine diffuse Anfärbung des Zytoplasmas zu sehen war.

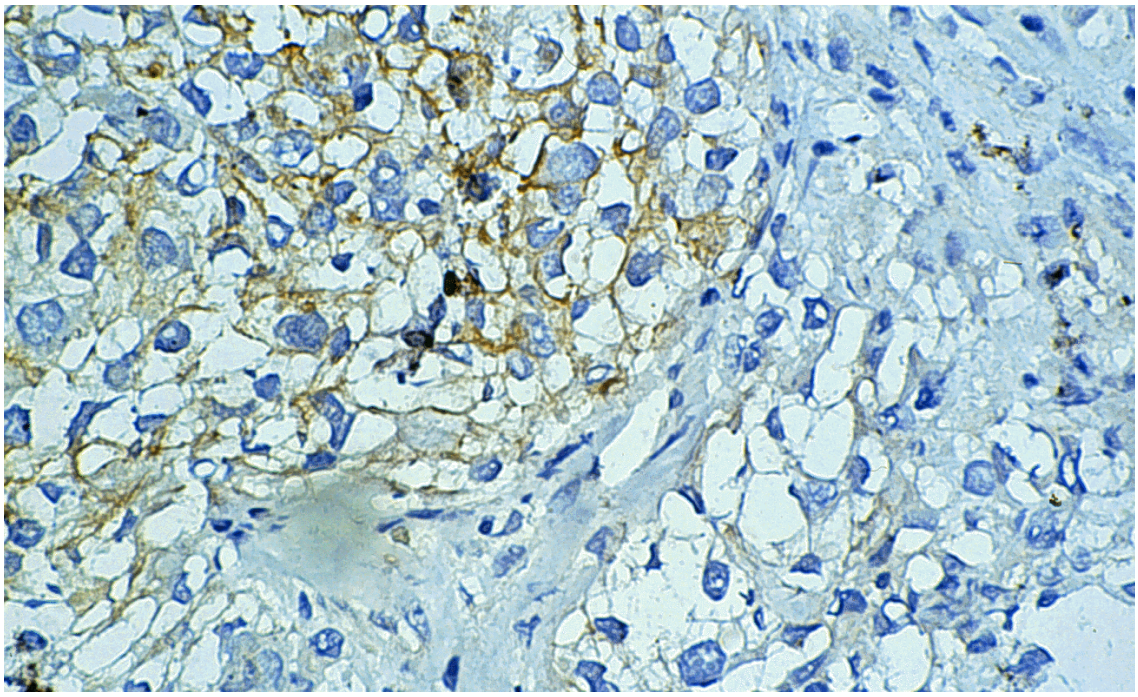


Abbildung 8: E-Cadherinfärbung von Tumorzellen eines spindelzelligen T3 Präparates (S2355) mit zellulärem Tumorgrad G3, Vergrößerung 1:500

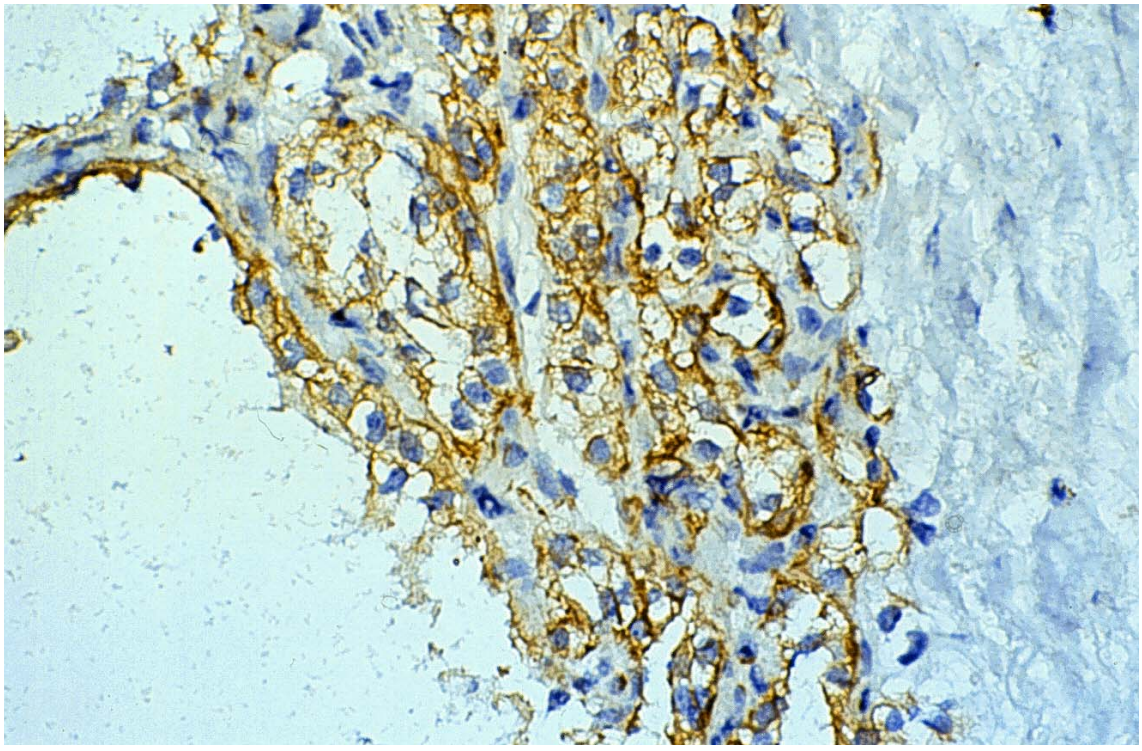


Abbildung 9: E-Cadherinfärbung von Tumorzellen ohne Reaktion des Tumrstromas bei einem klarzelligen T2 Präparat (S2333), TumorgradingG2, Vergrößerung 1:500

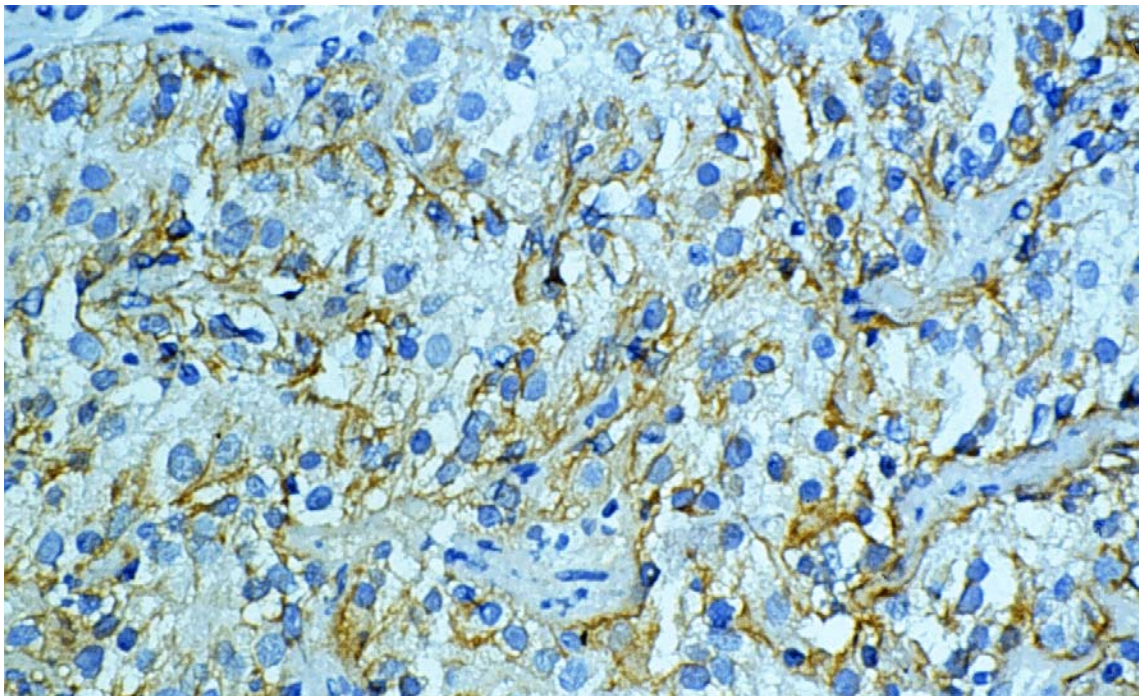


Abbildung 10: N-Cadherinfärbung mit Reaktion vieler Tumorzellen (++), T3 Tumorpräparat (S2355) mit zellulärem Tumorgrad G3 und gemischt solider Morphologie, Vergrößerung 1:500

P-Cadherin

Im normalen Nierengewebe

P-Cadherin wurde auf der Intima größerer Gefäße, auf einigen (+) proximalen Tubuluszellen sowie auf Zellen im Mesangium des Glomerulums exprimiert (siehe Tab.3).

Im Tumorgewebe

In fast keinem der untersuchten Tumoren zeigte sich eine Expression von P-Cadherin, außer in einem einzigen, extrem malignen Gewebe färbte sich das Zytoplasma von einzelnen Tumorzellen stark an. Eine diffuse Anfärbung des Zytoplasmas wurde bei NZK höherer Malignität häufiger beobachtet, wobei eine zusätzliche membranständige Expression nicht augeschlossen werden kann. Gefäßzellen zeigten im Gegensatz zum normalen Gewebe im Tumor keine Reaktion (siehe Abb.11).

Der P-Cadherin positive T3 Tumor wies regionale Lymphknotenmetastasen (N2) mit einer bei Diagnosestellung unbekannten Metatasierung (MX) auf. Der zur Gruppe der spindelzelligen NZK zählende Tumor zeigte massive Zellkernatypien (G3)(siehe Abb.11) und ein gemischtes, vorwiegend trabekulär-solides Wachstum .

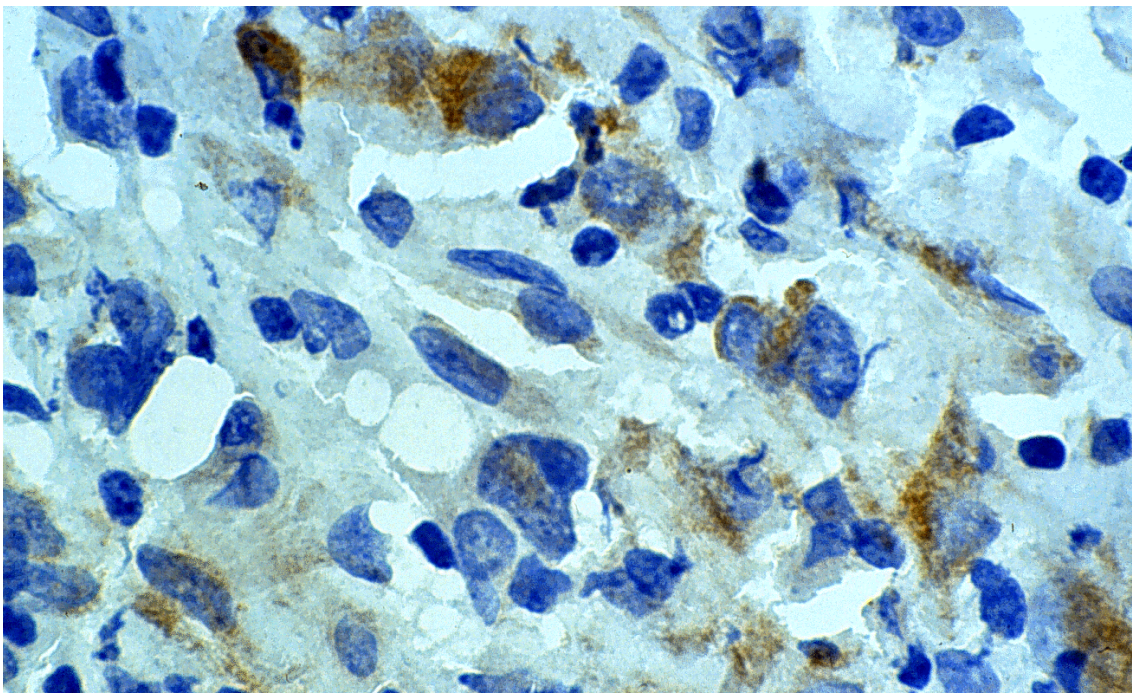


Abbildung 11: P-Cadherinfärbung eines spindelzelligen Tumorpräparates (S2355) mit Anfärbung des Zytoplasmas, Vergrößerung 1:1000

VE-Cadherin

Im normalen Nierengewebe

Eine positive Reaktion für VE-Cadherin ließ sich auf Endothelzellen von größeren arteriellen Blutgefäßen, den meisten Kapillaren im Interstitium und ebenso von Glomeruli finden (siehe Tab.3).

Im Tumorgewebe

Nur bei 5 von 24 Präparaten (20%) wurde eine Färbung des Gefäßendothels durch VE-Cadherin-Antikörper erhalten, wobei sich die Verteilung gewöhnlich auf Blutgefäße in nur einem Teil des Tumors konzentrierte (siehe Tab.6, Abb.12).
Endothelzellen einzelner, isoliert liegender Gefäße war selten positiv für VE-Cadherin. Tumorzellen zeigten keine Reaktion für VE-Cadherin.
Aufgrund der geringen Zahl positiver Fälle konnte keine Aussage über eine Korrelation zum TNM-Staging oder zum zellulären Grading und den histomorphologischen Merkmalen getroffen werden.
Einzig auffällig schien zu sein, daß nur G1 und G2, vorwiegend klarzellige Tumore, positiv reagierten und kein G3 Tumor unter diesen Präparaten zu finden war (siehe Abb.28). Die Anzahl positiver Tumore war allerdings zu gering für eine signifikante Aussage.

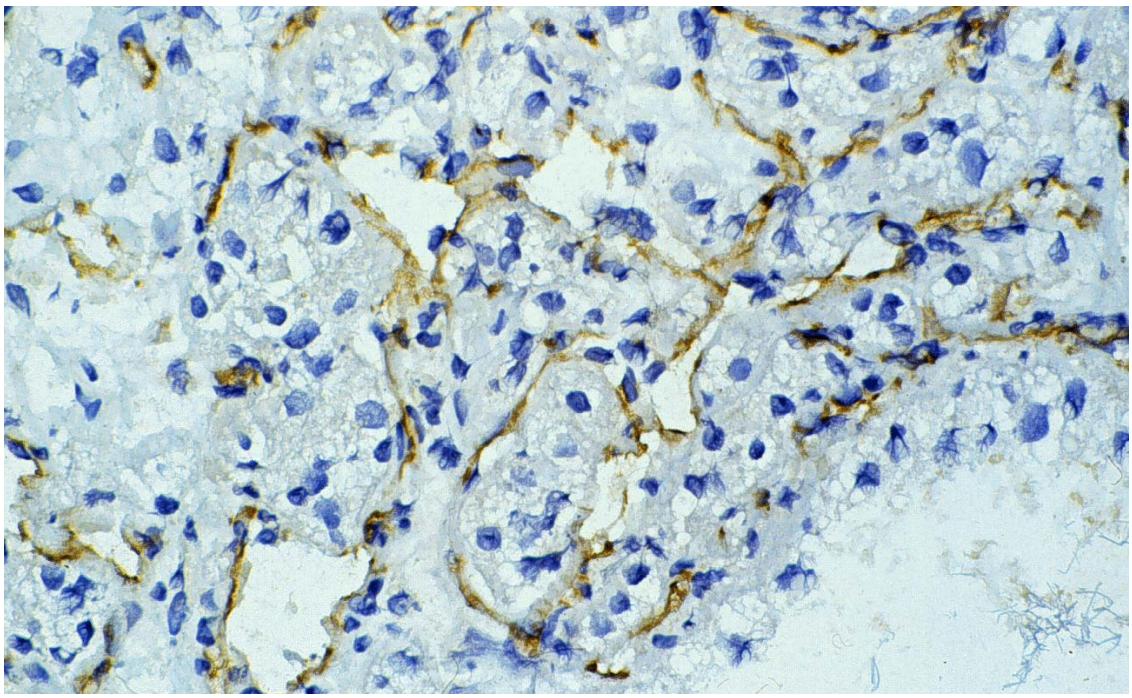


Abbildung 12: VE-Cadherinfärbung von Endothelzellen gruppierter Blutgefäße eines klarzelligen G2 Tumors (S2333), Vergrößerung 1:500

3.1.2 Darstellung von Syndecan-1

Im normalen Nierengewebe

Im Gesunden war Syndecan-1 auf allen Tubulusabschnitten (proximal, Henle'sche Schleife, distal und auf Sammelrohren) stark exprimiert (++). Im Stroma zeigten auch einzelne Fibroblasten eine Anfärbung mit dem Syndecan-1-Antikörper (siehe Tab.3).

Im Tumorgewebe

Bis auf ein Präparat exprimierten 95% aller Nierenzellkarzinome Syndecan-1 auf Tumorzellen (19 von 20), von denen wiederum 70% eine schwache und 25% eine starke Anfärbung zeigten. Das Färbemuster war häufig fokal auf Gruppen einiger Tumorzellen begrenzt und nicht diffus verteilt (siehe Abb.13).

Vergleich zum TNM-Staging

Von den T1 und T2 Tumoren zeigten nur 13 % eine starke Syndecan-1-Expression (2 von 15), dagegen waren es bei den T3 Tumoren 60% (siehe Abb.13).

Vergleich zur Histopathologie

Beim Vergleich zum zellulären Tumorgrading ergab sich eine leichte Zunahme der Syndecan-1 Expression bei Tumoren höherer zellulärer Malignität, denn nur 19% (3 von 16) der G1-G2 eingestuften Tumore (siehe Abb.13) und 50% aller G3 Tumore waren stark, aber eben soviele G3 Karzinome schwach positiv (2 von 4).

Bei den G3 Tumoren vom Spindelzelltyp fiel eine diffuse zytoplasmatische Anfärbung auf, im Gegensatz zur membranständigen Expression der übrigen NZK.

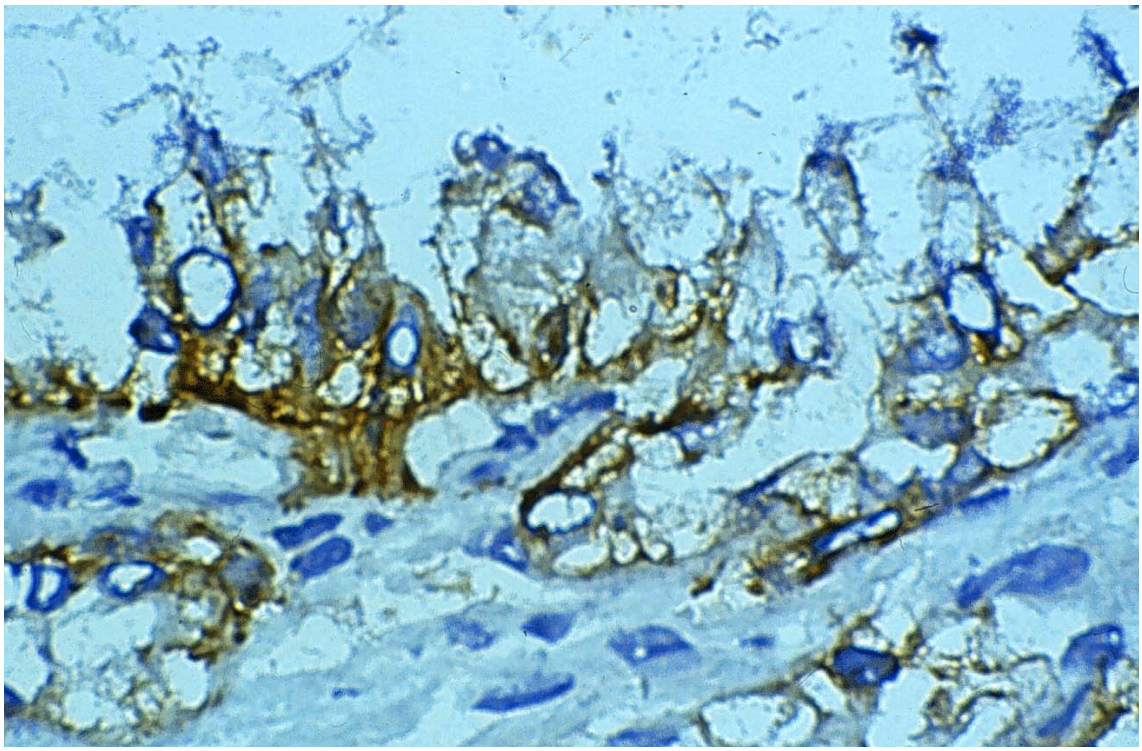


Abbildung 13: Syndecan-1-Expression auf mehr als 50% der Tumorzellen (++) eines G1-2 und T3 klassifizierten NZK (S2315), Vergrößerung 1:1000

3.2. Expression von Integrinen

Die hier untersuchten β1-Integrine wurden alle in NZK gefunden, wobei die Häufigkeit positiver Tumorpräparate zwischen 13% bei der α4-Kette und 92% bei der αv-Kette variierte. α3 und α6 wurden ähnlich häufig exprimiert wie αvβ1-Integrin, aber α3-Integrin zeigte dabei in weit mehr als 50% der positiven Fälle eine starke, diffuse Expression.
Auch im normalen Nierengewebe konnte eine Expression der α1-α6-Untereinheiten in β1-Integrinen festgestellt werden: α1 und α6 wurden auf allen Tubulusabschnitten gefunden, α2 und α3 wurden dagegen auf distalen und αv vorwiegend auf proximalen Tubulusepithelien exprimiert.
α4 und α5 waren in der Normalniere nur sehr schwach in der Media größerer und α5 zusätzlich in Endothelzellen arterieller Blutgefäße unterschiedlicher Größe zu beobachten.
In den Tumorpräparaten wurden alle Integrine, mit Ausnahme αv-Kette, neben den Tumorepithelien auch von Zellen im Stroma und auf Gefäßendothelien exprimiert. VLA-4 zeigte in diesem Bereich mit 96% die häufigste Expression.
Bei histomorphologischen Vergleichen konnte gezeigt werden, daß VLA-2 in der Mehrzahl klarzelliger NZK (69%) deutlich herunterreguliert war gegenüber anderen histologischen Tumorsubtypen.
Die Abwesenheit von bestimmten Integrinen war häufiger in Tumorpräparaten mit einem gemischten als einem rein soliden Wachstumsmuster zu beobachten. Dennoch wurde als einziges Integrin VLA-2 in rein soliden NZK deutlich weniger oft exprimiert (66%) als in gemischt gewachsenen (42%) Präparaten.
Bei zunehmender zellulärer Malignität der Tumoren fiel sowohl ein Verlust von VLA-1 als auch eine deutliche Zunahme der Expression der αv-Kette auf.
Zum einen war eine Zunahme in der Expressionsintensität mit einer schwachen Färbung von G1 Tumoren (66%), aber einer starken Färbereaktion schon bei 47% der positiven G2 Tumoren (76%) und bei 100% der G3 Präparate zu sehen.
Zum anderen konnte neben den Unterschieden im Expressionsniveau auch das zelluläre Expressionsmuster in Relation zum Tumorgrading variieren. So wurde bei G1 Karzinomen, die noch eine erhaltene Zellpolarität aufwiesen, eine membranständige, basal lokalisierte und bei G3 Tumoren eine diffus im Zytoplasma verteilte Expression beobachtet. Bei VLA-6 konnte in einem einzigen spindelzelligen G3 Präparat ein diffuses Färbemuster festgestellt werden. Eine Korrelation zum zellulären Grading war nicht beobachtbar. Auch für VLA-2 sowie für VLA-5, das auf Tumorzellen der beiden chromophoben Malignome, einem spindelzelligen und einem klarzelligen zu finden war, konnte nur eine geringe Veränderung mit zunehmender zellulärer Malignität festgestellt werden.

Der Vergleich der verschiedenen TNM-Staging-Gruppen zeigte für Tumore größerer Ausdehnung die Tendenz, VLA-1 mit 17% deutlich weniger häufig zu exprimieren als T1/T2 Tumore mit 44%. Unter Ausschluß von G1 Tumoren zeigte sich für T3 Karzinome mit höherer Malignität häufiger (75%) eine starke diffuse Expression der αv-Kette als bei T1/T2 Tumoren (53%).
Die Analyse der Integrin-Untereinheiten α2-α6 ergab in Relation zum TNM-Staging nur geringe Veränderungen.

3.2.1 Darstellung der Expressionsmuster der einzelnen Integrine

VLA-1

Im normalen Nierengewebe
Im gesunden Gewebe zeigte sich eine deutliche Anfärbung aller Tubulusstrukturen und eine leichte Färbung im Mesangium von Glomeruli sowie in der Media größerer arterieller Gefäße.

Im Tumorgewebe
VLA-1 zeigte sich schwach positiv auf Tumorzellen bei 11 von 24 Präparaten (45%) (siehe Tab.7). Mit einer Häufigkeit von 63% konnte es in Stromazellen und Gefäßendothelien nachgewiesen werden (15 von 24).

Vergleich zum TNM-Staging
In 5 von 6 T3 Karzinomen (83%) konnte keine Expression von VLA-1 in den Tumorzellen festgestellt werden. Zellen des umgebenden Tumorstromas und der Gefäße im Stroma waren in 33% der T3 Tumoren positiv, wie in Abb.14 zu sehen ist. Das dargestellte Karzinom veranschaulicht als einziges T3 Präparat neben VLA-1 positiven Stroma- und Gefäßzellen auch positive Tumorzellen (siehe Tab.7).
Im Gegensatz dazu exprimierten T1/T2 Tumore deutlich häufiger VLA-1 in Tumorzellen (55%) und zu 72% in Stroma- und Gefäßzellen (13 von 18). Dies könnte zeigen, daß Tumore von größerem lokalen Ausmaß VLA-1 weniger häufig exprimieren.

Vergleich zur Histopathologie

In keinem der G3 Karzinome wurde VLA-1 von Tumorzellen exprimiert und in 25% der Tumorproben waren Stromazellen positiv, ähnlich der Verteilung bei T3 Tumoren. Somit konnte ein deutlicher Verlust von VLA-1 auf Tumorzellen im höhergradig malignen Gewebe festgestellt werden. Beim Vergleich solider oder gemischter Wachstumsformen konnte für VLA-1 kein eindeutiger Unterschied beobachtet werden.

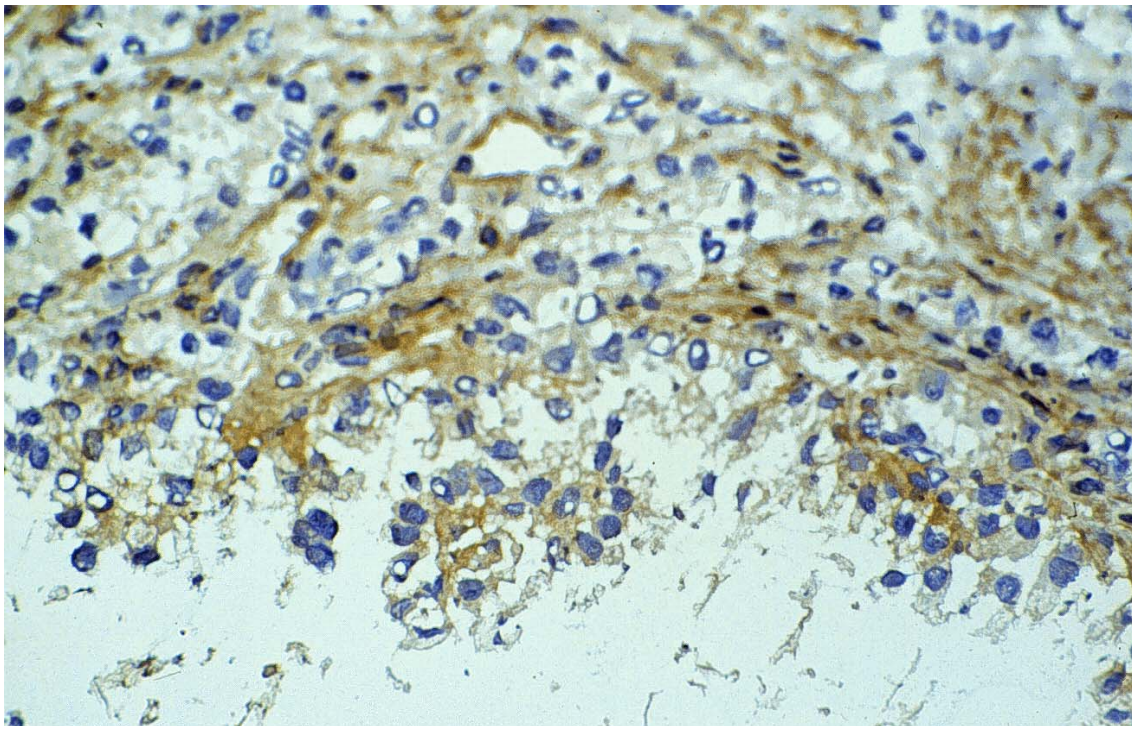


Abbildung 14: VLA-1-Expression in einem gemischt-solide gewachsenen G1-2 NZK (S2315). Einziges T3 eingestuftes Tumorgewebe, daß neben positiven Gefäß- und Stromazellen auch eine Anfärbung für VLA-1 auf Tumorzellen (+) zeigt. Vergrößerung 1:500

VLA-2

Im normalen Nierengewebe

In der normalen Niere wurde α2-Integrin im Mesangium schwach sowie auf den Epithelien der Henle'schen Schleife im gesamten distalen und intermediären Tubulus (Überleitungsstück) stark exprimiert (siehe Tab.4).

Im Tumorgewebe

α2-Integrin wurde in 13 von 25 Fällen auf Tumorzellen exprimiert (52%) und in 68% auf Stroma- und Gefäßzellen, ähnlich der Verteilung von VLA-1(siehe Tab.1, Tab.7).

Vergleich zum TNM-Staging

Hier konnten keine deutlichen Unterschiede der Expressionshäufigkeit bei T1/2 und T3 Tumoren festgestellt werden, wie sie für die Expression von VLA-1 vorzuliegen schienen (siehe Tab.7).

Vergleich zur Histopathologie

Tumore der verschiedenen zellulär definierten Tumorgrade wiesen in der Anfärbung von Tumorzellen keine deutlichen Unterschiede auf. Stromazellen färbten sich in einem einzigen G3 Präparat, wohingegen die Mehrzahl der G1/2 Tumore für VLA-2 auf Stroma- und Gefäßzellen (80%) positiv war. Die meisten klarzelligen Nierenzellkarzinome waren auffallend häufig negativ (69%) oder nur schwach positiv. Dagegen zeigten alle chromophoben und chromophilen Tumore eine positive Färbereaktion, ebenso die Mehrheit spindelzelliger Präparate (66%)(siehe Abb.16).

Bei diesen Tumorzellarten konnte auch häufiger eine stärkere Färbereaktion festgestellt werden als bei klarzelligen Karzinomen.

Abb.16 zeigt eine Anfärbung vieler Tumorzellen (++) eines spindelzelligen Präparates im Vergleich zur vorwiegenden Anfärbung von positiven Stroma- und Gefäßzellen in einem klarzelligen NZK (siehe Abb.15, Tab.7).

Desweiteren schienen rein solide gewachsene Tumoren weniger oft VLA-2 (33%) zu exprimieren als NZK mit gemischtem Wachstum (58%).

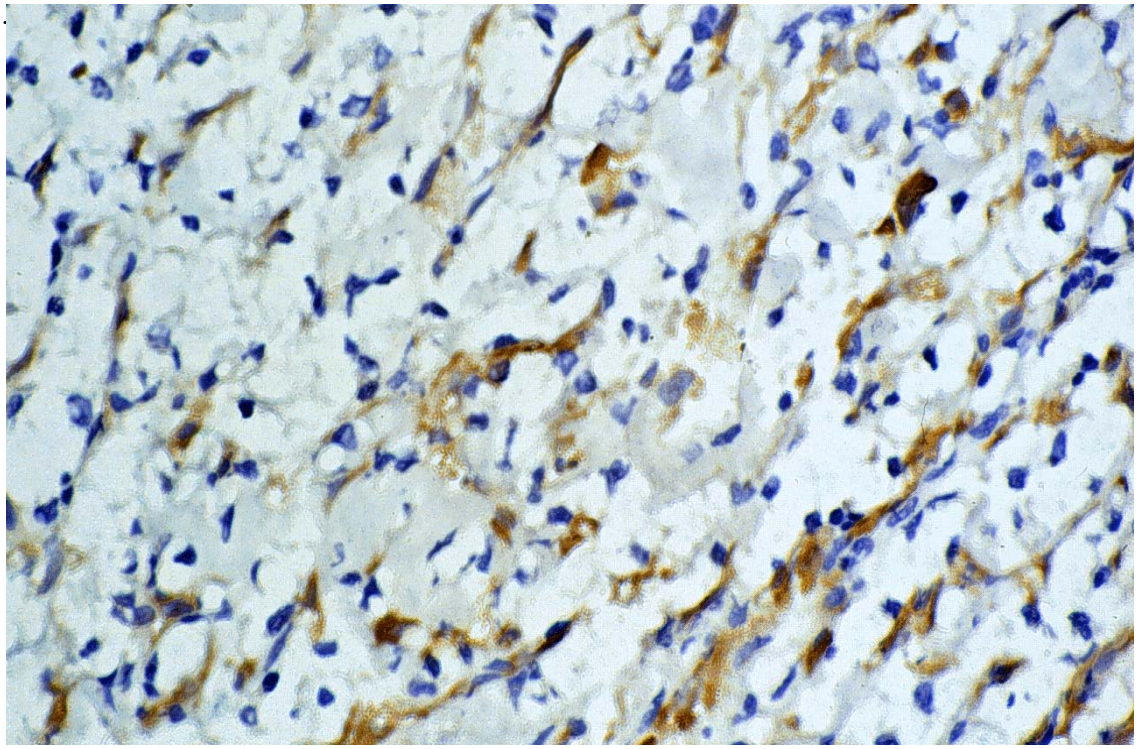


Abbildung 15: VLA-2-Färbung in einem klarzelligen NZK (S1922) vom zellulären Tumorgrad G2, vorwiegend Expression auf Stroma- und Gefäßzellen, Vergrößerung 1:500

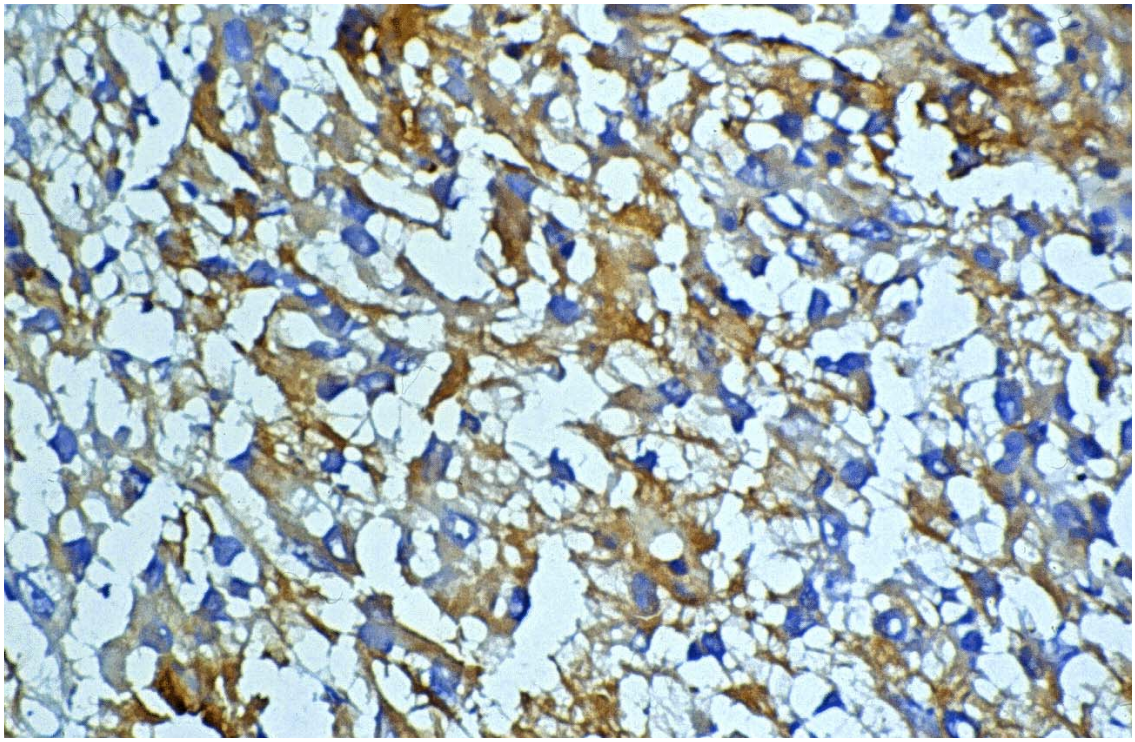


Abbildung 16: VLA-2-Färbung eines spindelzelligen G3 Tumors mit häufiger Expression auf Tumorzellen (S2355), Vergrößerung 1:500

VLA-3

Im normalen Nierengewebe

VLA-3 wurde von Endothelzellen der Glomeruli und ähnlich wie VLA-2 von Epithelien des distalen Tubulus exprimiert. Eine schwächere Anfärbung zeigten Sammelrohre und intermediäre Tubulusabschnitte (siehe Tab.4).

Im Tumorgewebe

Unabhängig vom zellulären Grading, weiteren histomorphologischen Merkmalen und TNM-Staging zeigten fast alle Karzinome (92%) eine starke positive Reaktion mit einer vorwiegend häufigen (++) Expression auf Tumorzellen in den jeweiligen Präparaten .
Die Verteilung von VLA-3 in den einzelnen Tumorzellen war auf die Zellmembran lokalisiert (siehe Abb.17). Zusätzlich fanden sich VLA-3 positive Zellen im Tumorstroma (13 von 24) und einzelnen Blutgefäßen (siehe Tab.7).

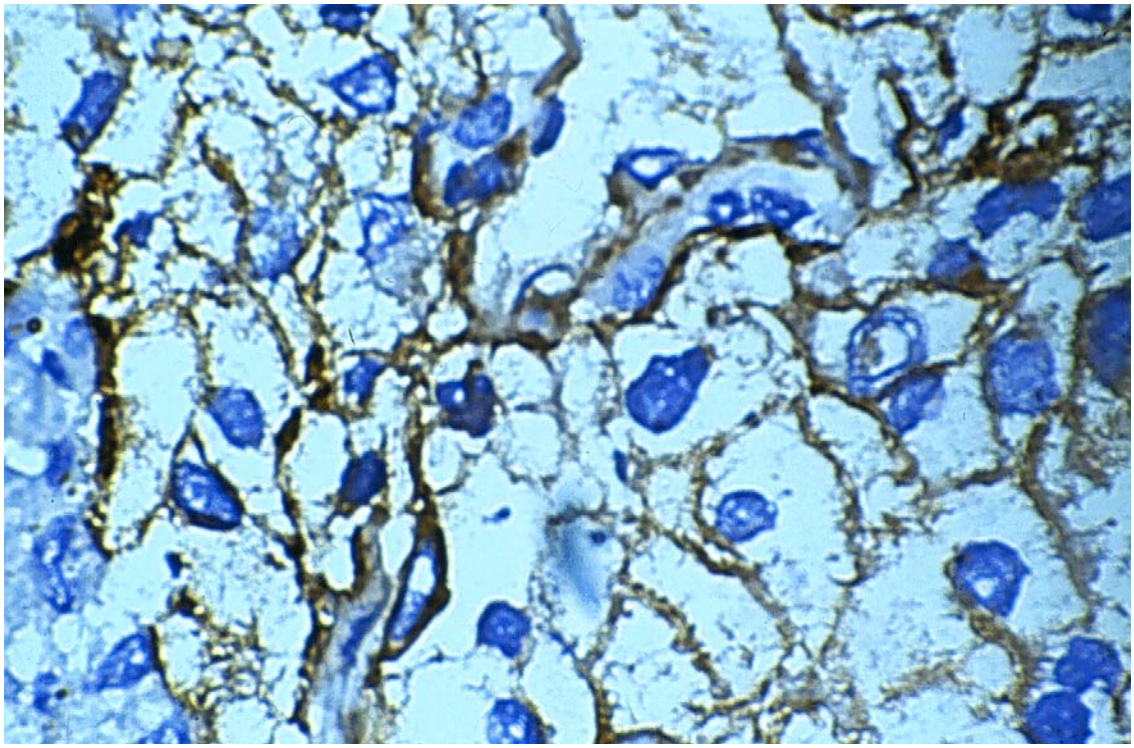


Abbildung 17: VLA-3-Färbung eines klarzelligen NZK (S2337), zellulärer Tumorgrad G1-2, membranständige Färbung von Tumorzellen, Vergrößerung 1:1000

VLA-4

Im normalen Nierengewebe

In der Normalniere fand sich eine Expression von VLA-4 auf wenigen Zellen der Media größerer arterieller Gefäße (siehe Tab.4).

Im Tumorgewebe

VLA-4 konnte hauptsächlich auf Zellen des Stromas und in Blutgefäßen bei fast allen untersuchten Tumoren gezeigt werden (22 von 23), wobei in einigen Präparaten auch isoliert nur Gefäßzellen (siehe Abb.18) oder Stromazellen angefärbt waren.
In 13% der Präparate exprimierten wenige(+) Tumorzellen VLA-4 (siehe Abb.19).
Es konnte für VLA-4 keine Korrelation zur Histopathologie und -morphologie oder zellulärem Grading festgestellt werden. Dennoch gehörten 2 von 3 der wenigen, schwach positiven Tumore zur Gruppe der T3 klassifizierten NZK (siehe Tab.1, Tab.7).

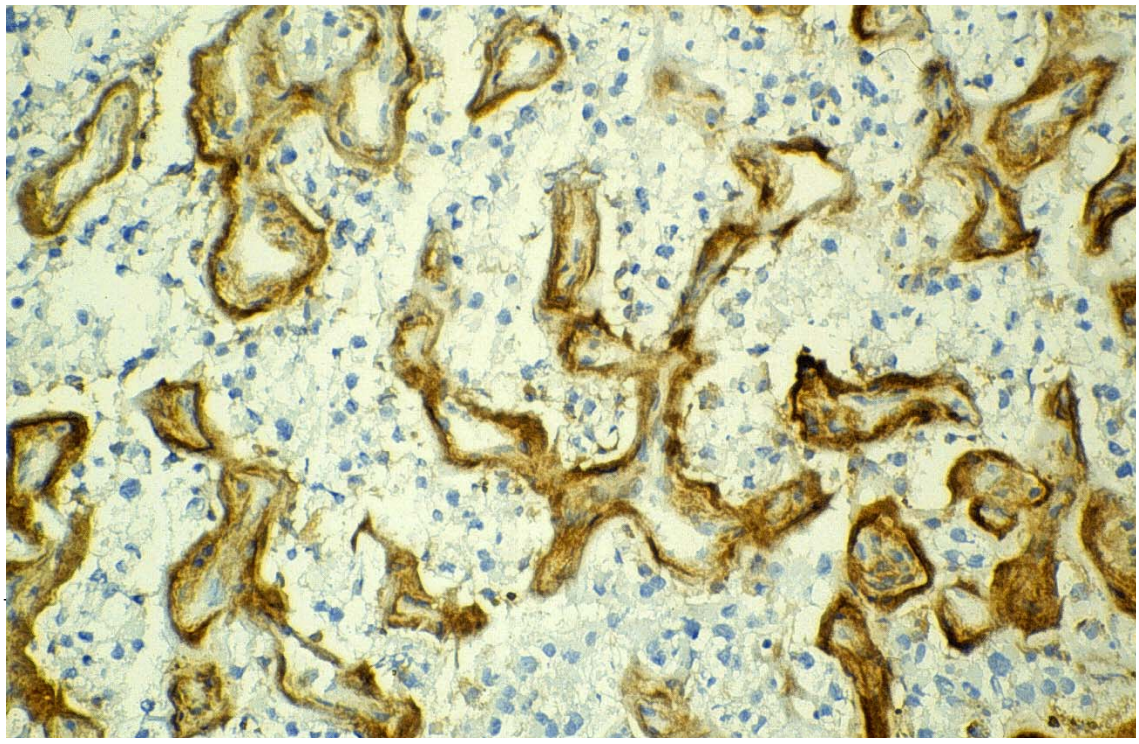


Abbildung 18: VLA-4-Expression vorwiegend auf Gefäßendothelien. Klarzelliges, solides Tumorpräparat (S2431), Vergrößerung 1:225

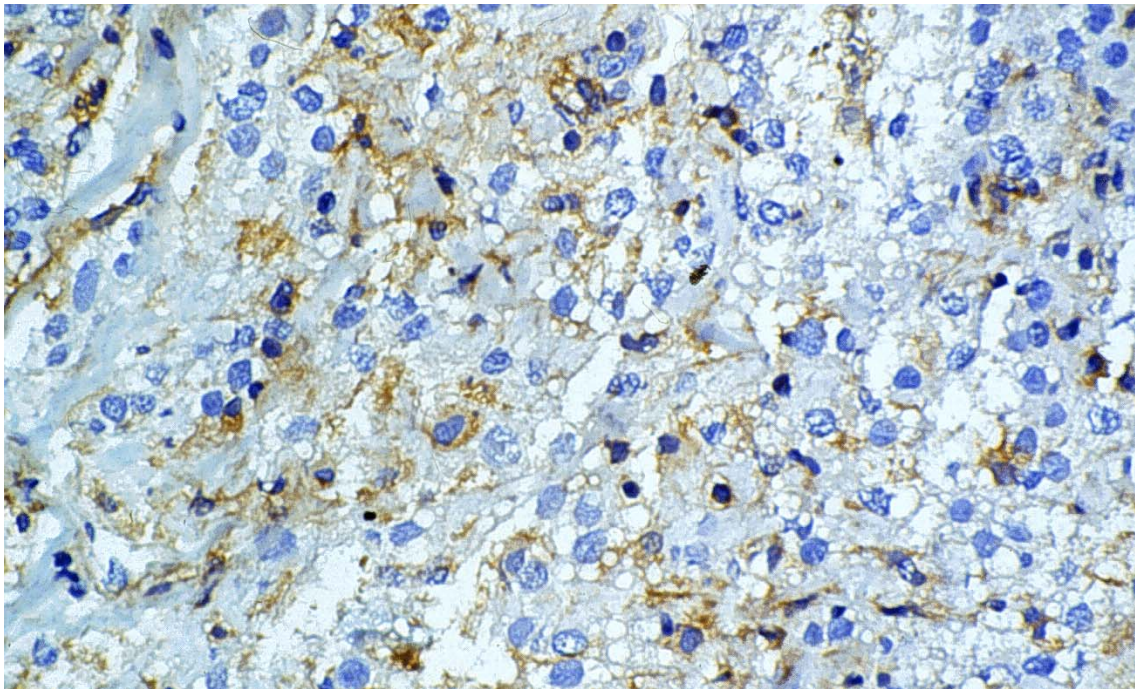


Abbildung 19: VLA-4-Expression auf wenigen Tumorzellen und Stromazellen. Klarzelliges, rein solides NKZ (S2337), zelluläres Grading G1-2, Vergrößerung 1:500

VLA-5

Im normalen Nierengewebe

Im normalen Gewebe war die Expression von VLA-5 ähnlich der Expression von VLA-4 auf wenige Gefäßzellen beschränkt. Im Unterschied zu VLA-4 waren nicht nur Zellen der Media größerer Gefäße positiv für VLA-5, sondern auch Endothelzellen größerer und kleinerer arterieller Blutgefäße (siehe Tab.4).

Im Tumorgewebe

Im Tumorstroma wurde VLA-5 mit 57% (13 von 23) weniger häufig nachgewiesen als VLA-4 (siehe Tab.7). Aber auch hier variierte die Verteilung auf Stroma- und Gefäßzellen. Einige Präparate zeigten eine Expression nur auf Gefäßendothelien (siehe Abb.21).
Bei der Expression auf Tumorepithelien zeigten sich in der Anzahl positiver Präparate keine deutlichen Unterschiede zu VLA-4. VLA-5 konnte ebenso nur auf wenigen Tumorzellen einer geringen Anzahl von Nierenzellkarzinomen (4 von 24) nachgewiesen werden (siehe Abb20).

Vergleich zur Histopathologie

Bei der Expression von VLA-5 auf Tumorzellen handelte es sich bei 66% (2 von 3) dieser positiven Karzinome um Tumoren höherer Malignität (G3) vom chromophoben und spindelzelligen Subtyp, wobei keine G1 Tumoren darunter waren. Tumorzellen klarzelliger NZK waren nur in einem einzigen Fall positiv (siehe Abb.20).

Vergleich zum TNM-Staging

Auch beim Vergleich zum Tumorstaging konnte gezeigt werden, daß sich unter den positiven Tumoren, die VLA-5 auf Tumorzellen exprimierten, NZK größerer lokaler Ausdehnung (T2/T3) befanden (siehe Tab.1). Aufgrund der geringen Fallzahl positiver Präparate (N=3) konnte keine Korrelation abgeleitet werden.

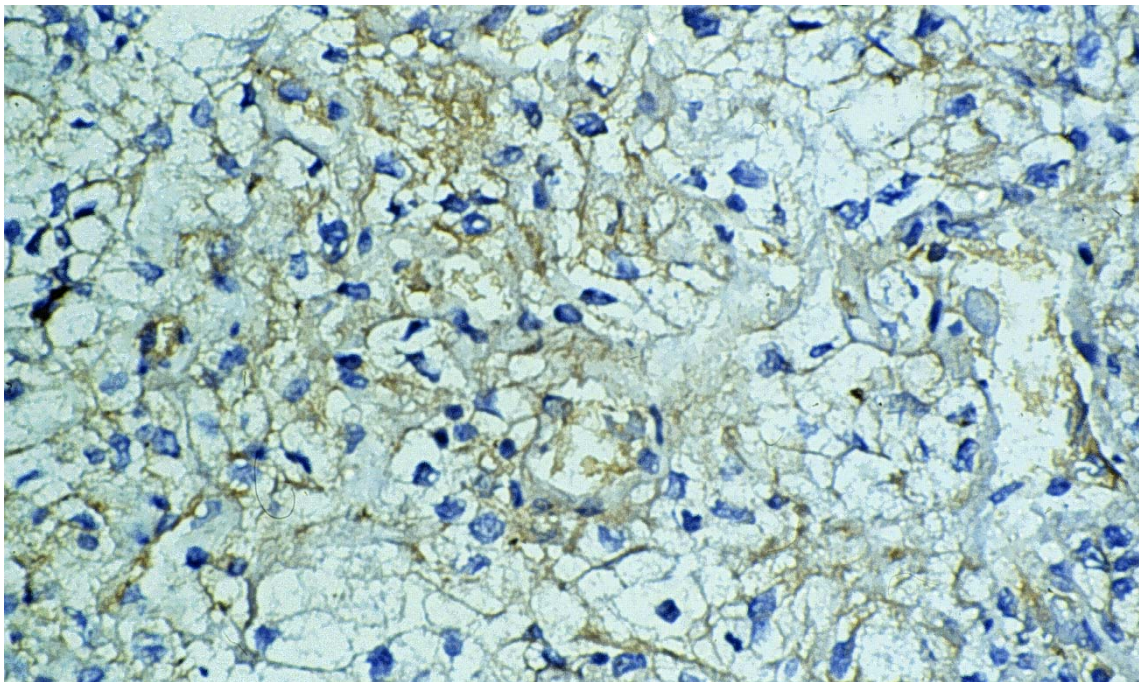


Abbildung 20: VLA-5-Färbung von wenigen positiven Tumorepithelzellen, sowie Stroma- und Gefäßzellen. Klarzelliger Tumor mit zellulärem Tumorgrading G2 und TNM-Staging T2 (S2393), Vergrößerung 1:500

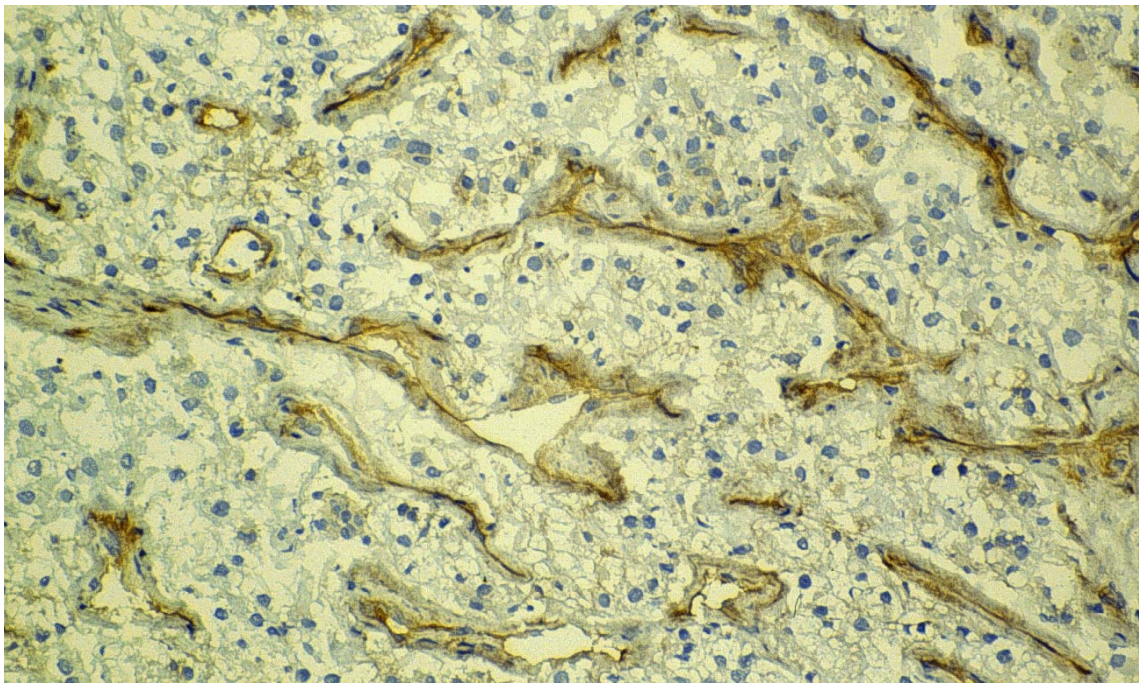


Abbildung 21: VLA-5-Expression ausschließlich auf Gefäßendothelien. Klarzelliges G2 und T3 eingestuftes Karzinom (S2431), Vergrößerung 1:225

VLA-6

Im normalen Nierengewebe

Im Gesunden konnte keine Expression auf Blutgefäßen festgestellt werden. Dagegen färbten sich wenige Zellen(+) des Mesangium und des parietalen Blatts der Bowmann'schen Kapsel an. Epithelzellen proximaler Tubulusabschnitte sowie distale Tubulusepithelien zeigten eine starke Färbung (++), die besonders im proximalen Bereich auf den basalen Zellpol und die Basalmembran lokalisiert war (siehe Tab.4).

Im Tumorgewebe

In fast allen Tumorpräparaten (21 von 23) konnte die Expression der α6-Kette auf Tumorzellen und zu 61% der untersuchten Präparate im Tumorstroma und auf Gefäßendothelien festgestellt werden (siehe Tab.7).

Vergleich zur Histopathologie

Das Verteilungsmuster von VLA-6 variierte mit zunehmender zellulärer Malignität.
In Geweben von weniger malignen klarzellligen G1 (siehe Abb.22) wie auch G2 klassifizierten Tumoren fiel eine umschriebene, an die Zellmembran gebundenene Expression von VLA-6 auf.
Eine diffuse Anfärbung des Zytoplasma zeigte sich bei einzelnen extrem malignen Tumoren vom chromophoben und spindelzelligen Subtyp. Dennoch konnte keine Korrelation zum zellulären Grading und zum TNM-Staging beobachtet werden.

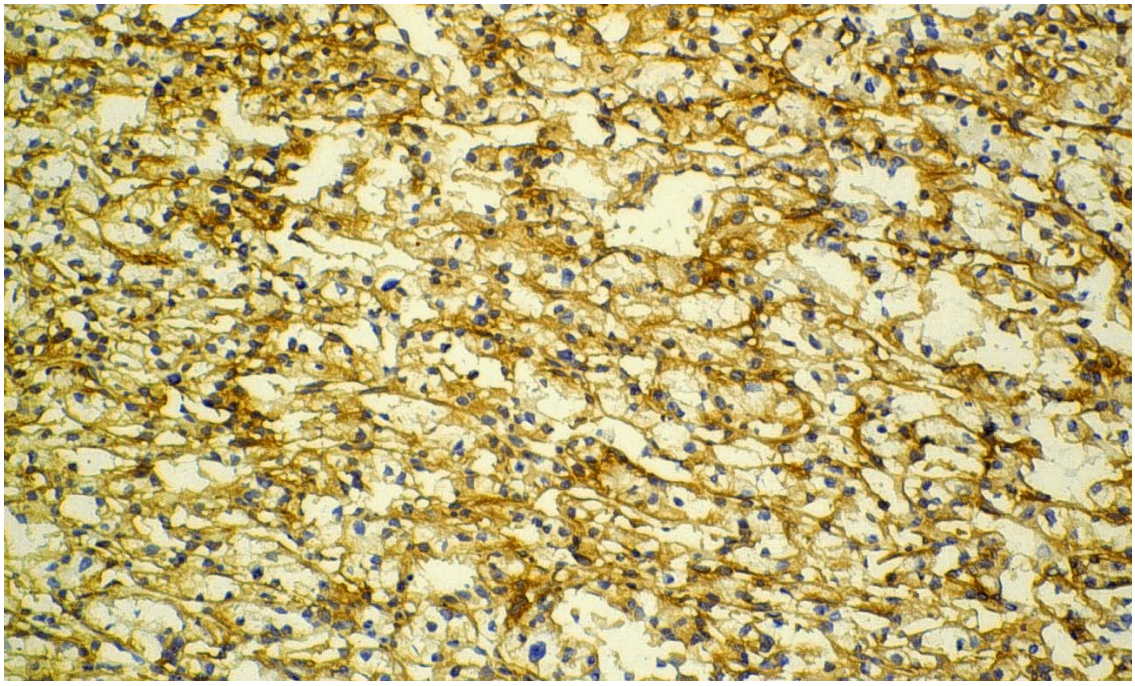


Abbildung 22: Basale VLA-6-Expression auf Tumorzellen eines klarzelligen G1 eingestuften NZK (S1987) bei weitgehend erhaltener Zellpolarität, Vergrößerung 1:225

αv-Integrin

Im normalen Nierengewebe

Präparate gesunder Nieren zeigten eine Anfärbung von proximalen Tubuluszellen für αv-Integrin. Zusätzlich waren wenige Zellen des Mesangiums und des parietalen Blatts der Bowmannschen Kapsel der Glomeruli für VLA-αv positiv, sowie einige Kapillaren und die Media größerer arterieller Blutgefäße im Interstitium (siehe Tab.4).

Im Tumorgewebe

αv-Integrin wurde in 21 von 23 untersuchten Karzinomen mit 91% ähnlich häufig exprimiert wie VLA-3 und VLA-6 (siehe Tab.7). Es konnte hier jedoch keine Anfärbung von Stroma- und Gefäßzellen festgestellt werden (siehe Abb.23).

Vergleich zur Histopathologie

In der semiquantitativen Analyse zeigte sich eine Korrelation zwischen der Expression der αv-Kette, dem intrazellulären Verteilungsmuster und dem zellulären Tumorgrading:
Nierenzellkarzinome vom Tumorgrad G1 zeigten eine schwache Anfärbung von wenigen Zellen(+). Für diese im zellulären Grading als niedrig maligne eingestufte Gruppe von Tumoren konnte eine membrangebundene und - bei z.T. noch erhaltener Zellpolarität - basale Expression festgestellt werden. Abbildung 23 stellt die membrangebundene Expression der αv-Kette bei einem klarzelligen G1-2 klassifizierten Tumor dar. Dabei waren von den G1 klassifizierten renalen Karzinomen 66% zwar positiv, aber die Expression war nur auf wenigen Tumorzellen zu finden (+).
Unter den 76% positiven G2 Tumoren zeigten 41% (7 von 17) der Präparate eine häufige Färbereaktion der Tumorzellen (++) mit mehr als 50% reagierender Tumorzellen (siehe Tab.7). Dagegen wurde αv-Integrin in allen hochgradig malignen G3-Tumoren (100%) stark exprimiert (++) mit einer Färbereaktion in mehr als 80% der Tumorepithelien jedes NZK. Dabei konnte eine diffuse zytoplasmatische Anfärbung beobachtet werden.

Vergleich zum TNM-Staging

T1/T2 Tumore zeigten mit 47% in ähnlicher Häufigkeit eine starke Expression von αv-Integrin wie T3 klassifizierte NZK (50%), sodaß hieraus keine deutliche Korrelation zum TNM-Staging abgeleitet werden konnte (siehe Tab.7). Um höhergradig maligne NZK in ihrer Tumorausdehnung beurteilen zu können, zeigte sich unter Ausschluß von G1 Tumoren eine Zunahme der diffusen Expression unter den T3 Präparaten von 50% auf 75% und bei den T1/T2 Tumoren von 47% auf 53%, so daß sich unter den αv-Integrin positiven maligneren NZK eine größere lokale Ausdehnung andeuten könnte.

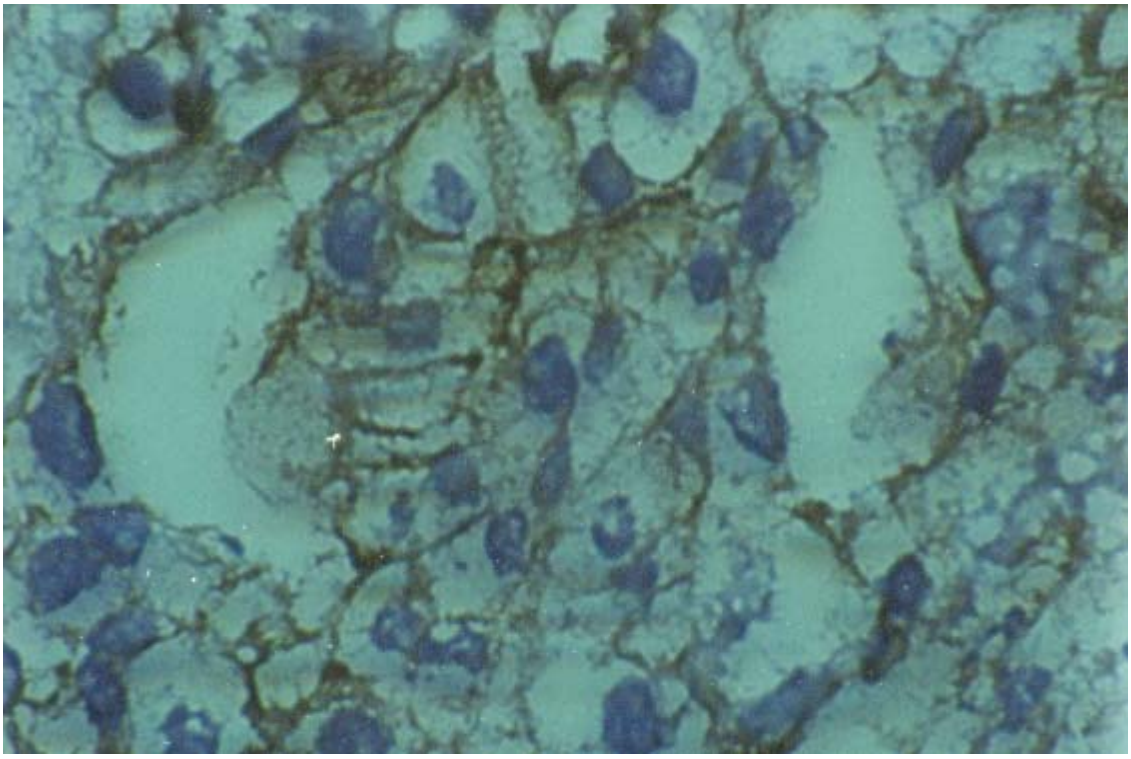


Abbildung 23: Expression von αv- Integrin auf der Zellmembran weniger Tumorzellen (+). Klarzelliges G1-2 klassifiziertes NZK (S2337), Vergrößerung 1:1000

3.3 Expression von extrazellulären Matrixmolekülen

Um eine gestörte Adhäsion zwischen Zellen und Matrix bei NZK genauer zu analysieren, wurden in der vorliegenden Untersuchung die Expressionsmuster von Laminin-10/11 (Wewer et al., 1994), Perlecan (Klein et al., 1995) und Tenascin (Truong et al., 1994) verglichen. Alle diese Komponenten der extrazellulären Matrix waren in der überwiegenden Anzahl der untersuchten NZK zu finden.

Gut differenzierte Tumoren zeigten die Tendenz, ähnlich dem gesunden Gewebe, Basalmembranen mit Laminin- und Perlecanexpression auszubilden. In diesen Fällen schienen die einzelnen Tumorzellen ihre epitheliale Polarisierung beizubehalten, da auch bestimmte Liganden, wie α6-Intergrin, eine basale oder basolaterale zelluläre Expression aufwiesen.

Bei wenig differenzierten Tumoren dagegen schien diese Zell-Matrix-Interaktion zum einen dadurch verloren zu gehen, daß α6-Integrin entweder nicht mehr oder nur begrenzt auf der Zelloberfläche präsentiert wurde oder aber Laminin-10/11 fehlte.

Das Expressionsmuster von Tenascin-C variierte untereinander und innerhalb einzelner Tumorpräparate.

Tenascin-C wurde häufig ebenso im Bereich der die Tumorzellen umgebenden Basalmembran lokalisiert und in einem dem Laminin-10/11 ähnlichen Netzmuster exprimiert. Es konnte aber auch beobachtet werden, daß Tenascin-C auch in fibrotischen Arealen, in denen Laminin-10/11 negativ war, exprimiert wurde.

Zusätzlich zeigte sich im Vergleich zur Normalniere eine deutlich schwächere Expression von Perlecan in den entdifferenzierteren NZK, was auf weitere Veränderungen in den Komponenten der Basalmembran hinwies.

3.3.1 Darstellung von Expressionsmustern der einzelnen Matrixmoleküle

Laminin-10/11

Im normalen Nierengewebe

Im Bereich glomerulärer Strukturen wurde Laminin-10/11 von Zellen des Mesangiums und der parietalen Basalmembran exprimiert, sowie der Basalmembran der gesamten tubulären Abschnitte. In der Media größerer arterieller Blutgefäße zeigte sich ebenfalls eine Anfärbung für Laminin-10/11 (siehe Tab.5).

Im Tumorgewebe

In allen analysierten Präparaten wurde Laminin-10/11 in der Basalmembran von tumorversorgenden Gefäßen mit einem vom zellulären Grading und vom Staging unabhängigen Verteilungsmuster exprimiert (siehe Abb.24).

Bei einigen Nierenzellkarzinomen zeigte sich ein sehr dichtes, zum Teil einzelne oder wenige Zellen, auch Nester von Tumorzellen umgebendes Netzmuster. In einigen Fällen war auch eine feine filamentartige Verteilung um maligne Zellen zu sehen (siehe Abb.24).

In den meisten Tumoren konnte eine Korrelation in der Expression von α6-Integrin und Laminin-10/11 gezeigt werden. Eine Ausnahme bildeten drei Präparate:

Gewebe eines jeweils klarzelligen und eines chromophoben G2 eingestuften NZK zeigten eine feine Netzstruktur des Laminins um Tumorzellen verteilt, ohne aber α6-Integrin zu exprimieren.

Ein einziger höhergradig maligner klarzelliger G3 Tumor wies dagegen eine starke, diffuse Anfärbung für α6-Integrin bei gleichzeitig fehlender Expression von Laminin-10/11 auf (siehe Tab.7, Tab.8).

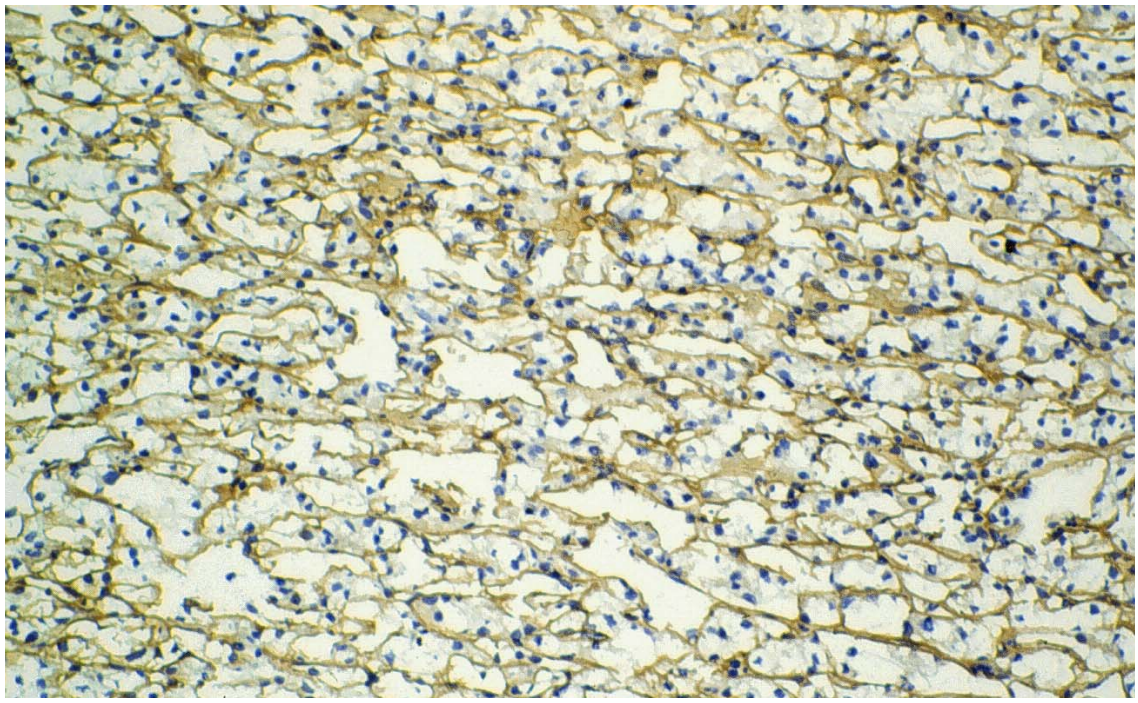


Abbildung 24: Expression von Laminin-10/11 in der Basalmembran von Blutgefäßen und in einem Basalmembrannetz, das vorwiegend Gruppen von Tumorzellen umgibt. Niedrig malignes klarzelliges NZK (S1987), zelluläres Grading G1, Tumorstaging T1, Vergrößerung 1:225

Tenacin-C

Im normalen Nierengewebe

In der normalen Niere wurde Tenascin-C stark im Mesangium exprimiert, dem parietalen Blatt der Bowmann'schen Kapsel, in der Media arterieller Blutgefäße und teilweise in der extrazellulären Matrix (siehe Tab.5).

Im Tumorgewebe

Die ebenso netzartige Expression von Tenascin-C war meist auf die Basalmembran von Tumor versorgenden oder umgebenden Blutgefäßen beschränkt (siehe Abb.25).

Trotz der Ähnlichkeit zur Expression von Laminin-10/11 erschien die Netzstruktur von Tenascin-C um Tumorzellen herum teilweise schwächer (+) und in wenigen Präparaten stärker als bei Laminin-10/11 ausgeprägt zu sein (siehe Abb.26, Tab.8).

Fibrotische Areale und Septen jedoch, die in vielen Tumorpräparaten auffielen, färbten sich besonders stark mit dem Antiköper gegen Tenascin-C an.

Bei Tumoren, in deren Stroma sich kein Tenascin nachweisen ließ (N=3), konnte keine Korrelation zum zellulären Grading oder TNM-Staging festgestellt werden.

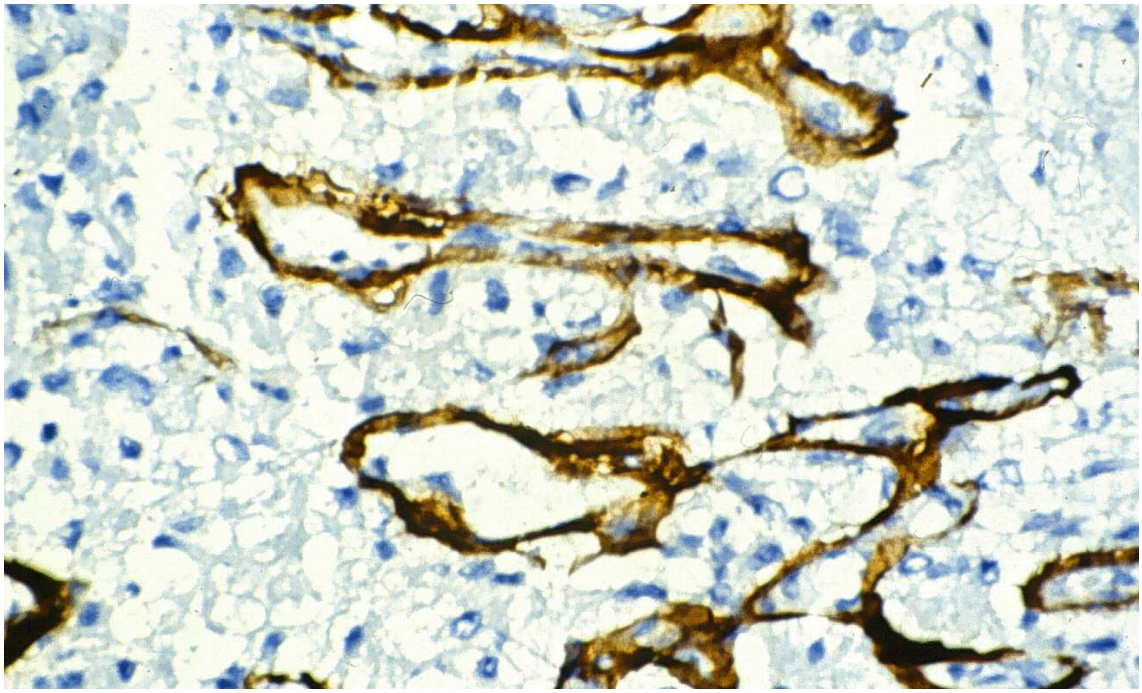


Abbildung 25: Tenascin-C-Expression in der Basalmembran tumorversorgender Gefäße. Klarzelliges G2 eingestuftes Tumorpräparat, Tumorstaging T3a (S2431), Vergrößerung 1:500

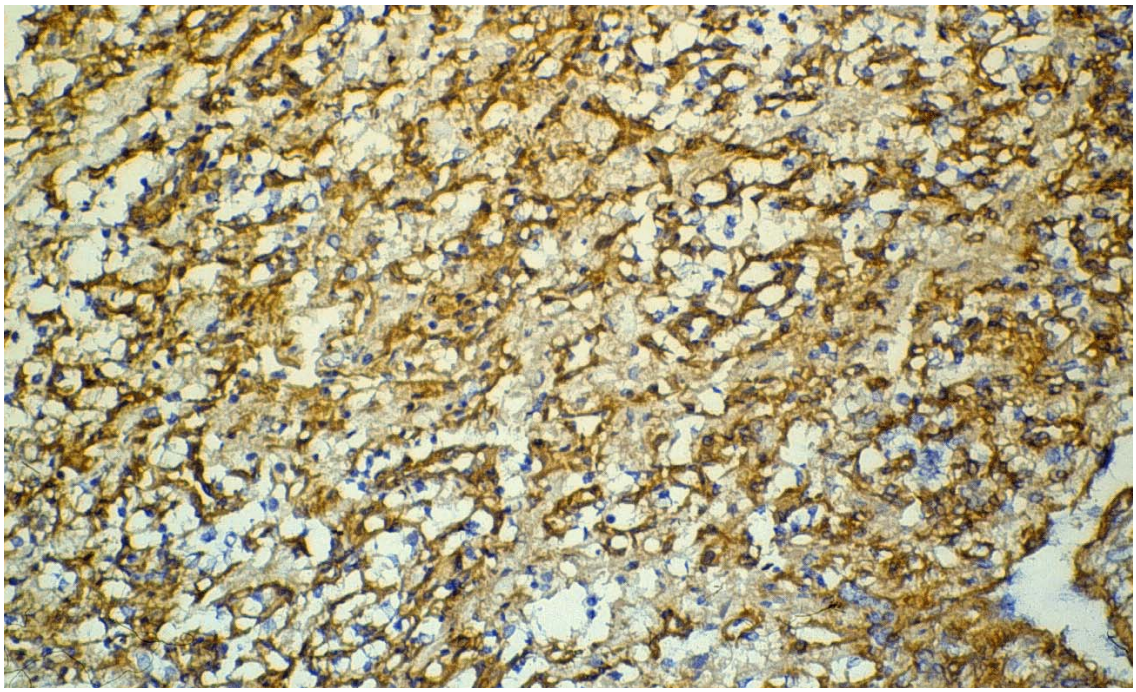


Abbildung 26: Starke Tenascin-C-Expression um Tumorzellen herum. Klarzelliges NZK, Tumorgrad G2, Staging T2 (S2381), Vergößerung 1:225

Perlecan

Im normalen Nierengewebe

Ähnlich der Expession von Laminin-10/11 wurde Perlecan im Bereich glomerulärer Strukturen von Zellen des Mesangiums und dem parietalen Blatt der Basalmembran exprimiert, sowie der Basalmembran der gesamten tubulären Abschnitte.
In der Media größerer arterieller Blutgefäße zeigte sich ebenfalls eine Anfärbung für Perlecan (siehe Tab.5)

Im Tumorgewebe

In gut ausdifferenzierten NZK waren die Netzmuster der mit Laminin und Perlecan reagierenden Basalmembran der Tumor versorgenden Gefässe sehr ähnlich oder identisch (siehe Abb.27). Bei wenig differenzierten Geweben dagegen zeigten sich bei der Perlecanfärbung, verglichen mit Laminin, nur spärliche Netzstrukturen um maligne Zellen herum.

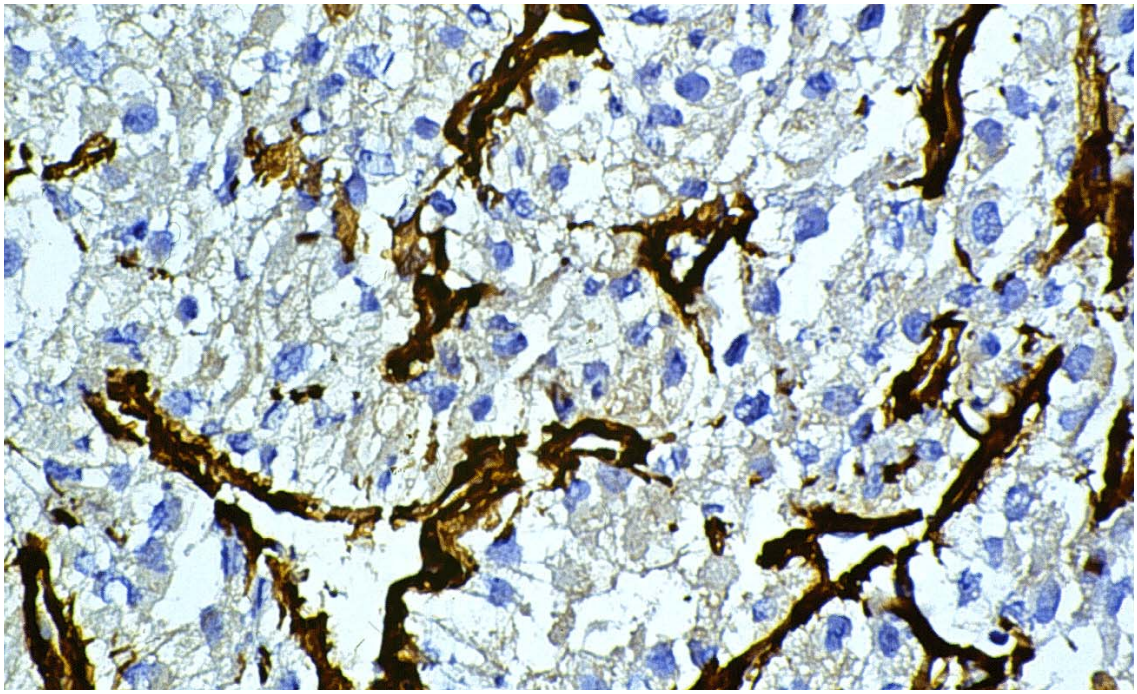


Abbildung 27: Expression von Perlecan vorwiegend in der Basalmemran von Blutgefäßen. Klarzelliges G2 eingestuftes NZK mit einem T2 Tumorstaging (S2431), Vergrößerung 1:500

Histologische Strukturen	Cadherine				Syndecan-1
	E	N	P	VE	
Glomerulum					
Mesangium			++		
Endothel				+	
Bowmann'sche Kapsel visceral/parietal					
Basalmembran					
visceral/parietal					
Tubuli					
proximal		++	+		++
distal	++				++
Henle'sche Schleife	++				++
Sammelrohre	++				++
arterielle Blutgefässe					
grössere Endothel/Media			++/-	++/-	++/++
kleinere Endothel/Media					++/++
Stroma					
interstitielle Matrix					
Kapillaren				++	
Fibroblasten					+

Tabelle 3: Expression von Cadherinen und Syndecan-1 in der normalen Niere

Erläuterungen:

- : keine Anfärbung von Zellen
+ : bis 50% der Zellen der angegebenen Struktur in der Normalniere zeigen eine Färbung
++: über 50% der Zellen der angegebenen Struktur in der Normalniere reagieren

Histologische Strukturen	Integrine						
	VLA-1	VLA-2	VLA-3	VLA-4	VLA-5	VLA-6	VLA-αv
Glomerulum							
Mesangium	+	+				+	+
Endothel			+				+
Bowmann'sche Kapsel visceral/parietal						-/+	-/+
Basalmembran							
visceral/parietal							
Tubuli							
proximal	+					++/BM	++
distal	+	++	++			++	
Henle'sche Schleife	+	++	+			++	
Sammelrohre	+		+			++	
arterielle Blutgefässe							
grössere Endothel/Media	-/+		+/+	-/+	+/+		-/+
kleinere Endothel/Media					+/-		
Stroma							
interstitielle Matrix							
Kapillaren							
Fibroblasten							

Tabelle 4: Expression von Integrinen in der normalen Niere

Erläuterungen:

- : keine Anfärbung von Zellen
+ : bis 50% der Zellen der angegebenen Struktur in der Normalniere zeigen eine Färbung
++: über 50% der Zellen der angegebenen Struktur in der Normalniere reagieren
BM: Anfärbung der Basalmembran

Histologische Strukturen	Matrixstrukturen		
	Tenascin-C	Perlecan	Laminin-10/11
Glomerulum			
Mesangium	++	++	+
Endothel			
Bowmann'sche Kapsel visceral/parietal	-/+		
Basalmembran			
visceral/parietal		-/+	-/+
Tubuli			
proximal		+BM	+BM
distal		+BM	+BM
Henle'sche Schleife		+BM	+BM
Sammelrohre		+BM	+BM
arterielle Blutgefässe			
grössere Endothel/Media	-/++	-/+	-/+
kleinere Endothel/Media			
Stroma			
interstitielle Matrix	+		
Kapillaren			
Fibroblasten			

Tabelle 5: Expression von Matrixmolekülen in der normalen Niere

Erläuterungen:

- : keine Anfärbung von Zellen
+ : bis 50% der Zellen der angegebenen Struktur in der Normalniere zeigen eine Färbung
++: über 50% der Zellen der angegebenen Struktur in der Normalniere reagieren
BM: Anfärbung der Basalmembran

Präparat	Cadherine				Syndecan-1
	E	N	P	VE	
klarzellig					
S1779 (1)	+	-	-	V	0
S1987 (2)	++	++	-	-	+
S1989 (3)	++	++	-	-	+
S2337 (4)	++	++	-	0	0
S2315 (5)	++	++	-	-	++
S2197 (6)	++	++	-	-	+
S2393 (7)	+	+	-	-	+
S2431 (8)	++	++	-	V	++
S2374 (9)	+	+	-	-	++
S2199 (10)	++	++	-	-	+
S2333 (11)	++	-	-	V	+
S2381 (12)	++	++	-	V	-
S1931 (13)	+	++	-	-	+
S1922 (14)	+	++	-	-	0
S2037 (15)	-	-	-	-	+
S836 (16)	+	+	-	-	+
S1745 (17)	0	0	0	0	0
S2310 (18)	-	-	-	-	+
chromophil					
S1933 (I)	++	++	-	-	+
S2356 (II)	++	-	-	V	0
S2435 (III)	++	-	0	-	+
S2702 (IV)	+	-	-	-	0
chromophob					
S1461 (V)	++	-	-	-	+
S2157 (VI)	+	-	0	-	+
spindelzellig					
S2355 (VII)	++	++	++	-	++
S2277 (VIII)	++	++	0	0	0
S2471 (IX)	-	-	-	-	++

Tabelle 6: Expression von Adhäsionsmolekülen in Nierenzellkarzinomen

Erläuterungen:

0 : kein Präparat vorhanden
- : keine Anfärbung von Tumorzellen
+ : bis 50% der Tumorzellen zeigen eine Farbreaktion
++: über 50% der Tumorzellen zeigen eine Farbreaktion
V : Expression auf Gefäßzellen
S : Expression auf Zellen des Tumorstromas

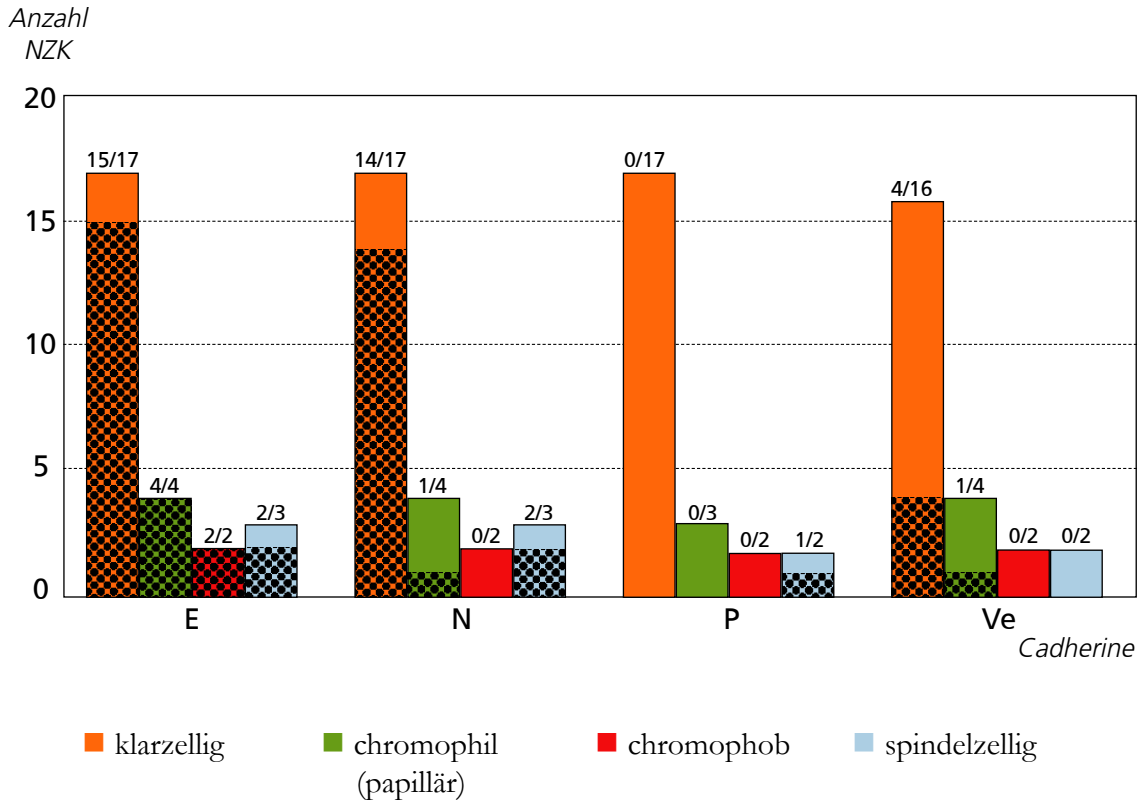


Abbildung 28: Expression von Cadherinen in Nierenzellkarzinomen in Korrelation zum histologischen Subtyp

Erläuterungen:

Die farbigen Balken stellen jeweils die Gesamtzahl der untersuchten NZK eines spezifischen Tumorsubtyps dar. Die mit Punkten innerhalb des einzelnen Balkens markierten Flächen sollen die Anzahl der für das entsprechende Cadherin positiven NZK aufzeigen. Die Zahlen über den Balken geben jeweils an, wieviele Tumoren von der Gesamtzahl der untersuchten NZK positiv waren.

In dieser Darstellung soll die Verteilung der Cadherine auf die unterschiedlichen Tumorzellarten verdeutlicht werden. E-Cadherin wird in allen histologischen Unterarten von NZK in hohem Maße exprimiert, während N-Cadherin vorwiegend in klarzelligen und spindelzelligen Präparaten zu finden ist. Von den weniger häufig exprimierten Cadherinen scheint VE-Cadherin tendenziell häufiger in klarzelligen Tumoren präsentiert zu werden. Der einzige für P-Cadherin positive Tumor war in einem spindelzelligen Präparat zu finden.

Präparat		Integrine						
		VLA-1	VLA-2	VLA-3	VLA-4	VLA-5	VLA-6	VLA-αv
klarzellig								
S1779	(1)	+SV	- V	++S	-SV	-V	+V	0
S1987	(2)	-	+SV	++S	-SV	-V	+V	+
S1989	(3)	+	- V	++	-SV	-SV	+V	+
S2337	(4)	-	-	++S	+S	-V	+V	+
S2315	(5)	+SV	-	++S	-V	-	+	+
S2197	(6)	+SV	+ V	++S	-SV	-SV	+V	-
S2393	(7)	-SV	+SV	++S	-SV	+SV	+	++
S2431	(8)	- V	- V	++S	-V	-V	+V	++
S2374	(9)	-SV	-SV	++S	-V	-	+	++
S2199	(10)	+SV	+	++S	-SV	-V	+	+
S2333	(11)	+SV	+SV	++S	-SV	-SV	+V	+
S2381	(12)	+SV	-SV	++S	+S	-	+V	++
S1931	(13)	-	- S	++S	-V	-	+V	+
S1922	(14)	+SV	-SV	- SV	-SV	-SV	-V	+
S2037	(15)	0	- V	0	0	0	0	+
S836	(16)	-	0	++	0	0	0	0
S1745	(17)	0	0	0	0	0	0	0
S2310	(18)	-	-	++	-SV	-	++	++
chromophil								
S1933	(I)	+ V	++SV	++	-SV	-	+V	++
S2356	(II)	+SV	+ V	++	-S	-	+V	-
S2435	(III)	- V	+ V	- V	-S	-V	+V	+
S2702	(IV)	-SV	+	++	-V	-	+	++
chromophob								
S1461	(V)	-	++V	++V	-SV	+	-	++
S2157	(VI)	-SV	+ S	++V	-	+SV	+	++
spindelzellig								
S2355	(VII)	-	++	++	+SV	+SV	+V	++
S2277	(VIII)	0	+	0	0	0	0	0
S2471	(IX)	+	-	++	-V	-	++	++

Tabelle 7: Expression von Integrinen in Nierenzellkarzinomen

Erläuterungen:

0 : kein Präparat vorhanden
- : keine Anfärbung von Tumorzellen
+ : bis 50% der Tumorzellen zeigen eine Farbreaktion
++: über 50% der Tumorzellen zeigen eine Farbreaktion
V : Expression auf Gefäßzellen
S : Expression auf Zellen des Tumorstromas

Präparat		Matrixstrukturen		
		Tenascin-C	Perlecan	Laminin-10/11
klarzellig				
S1779	(1)	-𝕍	0	-𝕍
S1987	(2)	+𝕍	++𝕍	++𝕍
S1989	(3)	-𝕍	-𝕍	-𝕍
S2337	(4)	-𝕊𝕍	0	+𝕍
S2315	(5)	-	-𝕍	0
S2197	(6)	0	+𝕍	++𝕍
S2393	(7)	+𝕍	-𝕍	-𝕍
S2431	(8)	-𝕍	-𝕍	-𝕍
S2374	(9)	-	+𝕍	+𝕍
S2199	(10)	-𝕊𝕍	-𝕍	+𝕍
S2333	(11)	-𝕍	+𝕍	-𝕍
S2381	(12)	++𝕍	0	-𝕍
S1931	(13)	-𝕊	-𝕍	-𝕍
S1922	(14)	+𝕍	+	+𝕍
S2037	(15)	0	+	0
S836	(16)	0	0	0
S1745	(17)	0	0	0
S2310	(18)	+𝕊𝕍	+𝕍	-
chromophil				
S1933	(I)	+𝕍	+𝕍	++𝕍
S2356	(II)	-𝕊𝕍	0	-𝕍
S2435	(III)	-	-𝕍	-𝕍
S2702	(IV)	+𝕍	+𝕍	-𝕍
chromophob				
S1461	(V)	+𝕍	+𝕍	++𝕍
S2157	(VI)	-𝕊𝕍	0	+𝕍
spindelzellig				
S2355	(VII)	-𝕊𝕍	+𝕍	-𝕍
S2277	(VIII)	0	0	0
S2471	(IX)	++𝕍	0	+𝕍

Tabelle 8: Expression von Matrixmolekülen in Nierenzellkarzinomen

Erläuterungen:

Um in dieser Tabelle die Färbereaktion von Basalmembranen von der Expression auf den Zellen unterscheiden zu können, wurden die Symbole für die entsprechende von BM umgebene Zellart konturiert dargestellt.

0 : kein Präparat vorhanden
- : keine Anfärbung der BM um Tumorzellen
+ : bis 50% der dieTumorzellen umgebenden BM zeigen eine Farbreaktion
++: über 50% der dieTumorzellen umgebenden BM zeigen eine Farbreaktion
𝕍 : Expression der BM von Gefäßzellen
𝕊 : Expression der BM von Zellen des Tumorstromas

4 Diskussion

Adhäsionsmoleküle können sowohl am Tumorwachstum als auch an der Metastasierung beteiligt sein (Bussemaker et al., 1996; Cairns et al., 2003). In der hier vorliegenden Arbeit wurde die diagnostische Relevanz der veränderten Expression von E-, N-, VE- und P-Cadherin, sowie der Integrinketten α1-α6 und αv bei NZK unterschiedlicher Malignitätsgrade untersucht. Die Ergebnisse wurden mit der Verteilung extrazellulärer Matrixkomponenten, die ebenso in die normale epitheliale Zelladhäsion und -proliferation involviert sind, wie Tenascin, Laminin und Perlecan, verglichen. Die Expression des Proteoglycans Syndecan-1, dem ebenso eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion und bei der Differenzierung von Epithelzellen in der Entwicklung der gesunden Niere zukommt (Couchmann et al., 2001), wurde als ein weiterer möglicher Marker für die epitheliale Umwandlung in malignes Nierengewebe untersucht.

4.1 Expression von Adhäsionsmolekülen

4.1.1 Expression von E- und N-Cadherin

Expression in normalem Gewebe

Auf normalen Epithelzellen der Niere sind E- und N-Cadherin in ihrem typischen Expressionsmuster entlang des Tubulus zu finden. In der hier vorgelegten Studie wurde E-Cadherin von epithelilen Zellen des dünnen Mittelteils der Henle'schen Schleife, des aufsteigenden und gewundenen distalen Tubulus und der Sammelrohre (Tubulus rectus distalis, Tubulus contortus distalis, Tubulus renalis colligens) exprimiert. Nach Nouwen et al. (1993) können wohl auch Zellen der Bowmann'schen Kapsel für E-Cadherin positiv sein. In keiner weiteren Untersuchung wurde dieses Expressionsmuster bestätigt, sondern eine streng auf die Epithelien des Tubulussystems begrenzte Expression von E-Cadherin im Gesunden beschrieben (Heicappel, 1999).

Die Expression von N-Cadherin zeigte sich hingegen im proximalen Tubulus (Tubulus contortus proximalis, Tubulus rectus proximalis). In einer Untersuchung von Biddlestone et al. (1991) war N-Cadherin als das dominierende Cadherin der Niere gezeigt worden. Wie in der vorliegenden Studie konnte auch in nachfolgenden Analysen eine Expression sowohl von N- als auch E-Cadherin immunhistochemisch festgestellt werden (Heicappel, 1999).

Expression in Tumorgewebe

Die Tumorprogression impliziert häufig einen Verlust oder eine veränderte Expression verschiedener Cadherine (Shimazui al., 1996). N-Cadherin scheint auch im Tumorgewebe renaler Karzinome das vorherrschend exprimierte Cadherin zu sein, denn in verschiedenen Untersuchungen konnte ein Verlust bzw. Fehlen der E-Cadherin-Expression beobachtet werden (Katagiri et al., 1995; Shimazui et al., 2000).

In dieser Arbeit wurde E-Cadherin mit 88% dennoch häufiger exprimiert als N-Cadherin, das nur bei 62% der Tumore positiv war.

Auch bei Präsenz von E- und N-Cadherin könnte ein Verlust normaler interzellulärer Adhäsion stattfinden, wie bei in vitro Experimenten zu sehen war (O'Donnel et al., 1995).

In frühen Analysen wie auch in dieser Studie wurde jedoch nicht durch entsprechende Doppelfärbung eindeutig belegt, daß die in den Tumorpräparaten beobachteten E- und N-Cadherin positven malignen Zellen diese Moleküle tatsächlich auf ihrer Membran immer co-exprimierten (Shimazui et al., 1996; Tani et al., 1995; Markovic-Lipkovski et al., 2001). Verschiedene NZK schienen auch maligne Zellen zu enthalten, die nur für E- und N-Cadherin Positivität aufwiesen und damit vielleicht eine unterschiedliche Differenzierung von tubulären Epithelien repräsentierten.

Vergleich mit dem Tumorstaging

In Korrelation zum TNM-Staging konnte hier beobachtet werden, daß besonders T3 Tumore beide Cadherine auf mehr als 50% der Zellen (++) exprimierten. Selbst bei Ausschluß von G1 eingestuften Präparaten zeigten die aggressiveren G2 und G3 Karzinome innerhalb der T3 Gruppe deutlich ein gleichzeitiges Vorkommen beider Proteine.

Die untersuchten T3 Tumore (N=7) schienen lokal begrenzt zu sein, da eine Fernmetastasierung (M1) nur bei einem einzigen T3 Karzinom und regionale Lymphknotenmetastasen (N2) bei 2 Präparaten dieser Gruppe zum Zeitpunkt der Probenentnahme bekannt waren. Ob wie in einer anderen Arbeit beschrieben eine geringere Metastasierungstendenz bei renalen Karzinomen mit Expression von E- und N-Cadherin zu finden ist, ließ sich in dieser Studie nicht feststellen (Markovic-Lipkovski, 2001).

Verschiedene Mechanismen, die zur Entstehung dieses Expressionsmusters von E- und N-Cadherin beitragen könnten, wurden postuliert. So sollen Cadherine auch an der Regulation des Apoptoseverhaltens von Tumorzellen beteiligt sein. An humanen Ovarialzellen wurde gezeigt, daß durch die Expression von N-Cadherin auf der Zelloberfläche der Vorgang der Apoptose verhindert werden konnte, während bei Verlust der Expression die Zellaggregation vermindert und gleichzeitig die Apoptoserate erhöht wurde (Makrigiannakis et al., 1999).

Andererseits könnte auch bei Erhalt der Cadherin-Expression die Funktion von Cadherinen

aufgehoben sein. Denn durch den Verlust intakter E-Cadherin/Catenin-Komplexe im Tumorgewebe, kam es in vitro zur Abnahme der Apoptoserate in Karzinomzellen des Pankreas (Lowy et al., 2002).
Daher könnte das häufig beobachtete gleichzeitige Vorkommen von E- und N-Cadherin auf renalen Karzinomen in dieser Studie auf Störungen der Apoptose vor allem bei T3 Tumoren hinweisen.
Weiterhin können Catenine zu einer Funktionsstörung der Cadherine ohne Verlust des Expressionsmusters führen. α- und β-Catenin können sowohl durch Phosphorylierung über spezifische Tyrosinkinasen wie auch aufgrund von Genmutationen inaktiviert werden (Hirohashi, 2000).
Bei den hier untersuchten E-Cadherin negativen Tumoren konnte auch keine Expression von N-Cadherin nachgewiesen werden. 66% dieser Karzinome zeigten bei Diagnosestellung Metastasen (M1). Dies könnte auf eine erhöhte Metastasierungstendenz E- und N-Caderin negativer Tumore hinweisen. In frühen Untersuchungen von Zellen aus Tumormetastasen renaler Karzinome wurde ein signifikanter Verlust von E-Cadherin festgestellt (Katagiri et al., 1995). Cadherin-6, das ebenso wie N-Cadherin in proximalen Tubuluszellen lokalisiert ist, erwies sich in E-Cadherin negativen Tumoren als ungünstiger prognostischer Faktor (Paul et al., 2004). Aufgrund der geringen Anzahl E- und N-Cadherin negativer Präparate (N=3) konnte in dieser Studie für N-Cadherin eine solche Aussage nicht getroffen werden.

Vergleich mit der Histopathologie der Tumore

Der Vergleich der Cadherin-Expression mit den histopathologischen Merkmalen der NZK ergab, daß die Expression beider Cadherine mit zunehmender zellulärer Malignität abnahm. Alle G1 Tumore waren für E-Cadherin positiv, 90% der G2 und 60% aller G3 Tumore. Die Zahl der N-Cadherin positiven Tumore sank deutlicher mit 80% der G1 Tumore, 60% und 40% bei solchen von höherem Grading.
Obwohl drei G2 bzw. G3 Tumore für beide Cadherine tatsächlich negativ waren, war dennoch bei anderen Präparaten vom selben Malignitätsgrad eine recht starke diffuse Expression zu beobachten. Die geringe Anzahl der untersuchten G3 Tumore ließ keine Korrelation zwischen dem Herunterregulieren der E- und N-Cadherin Expression und der zellulären Entdifferenzierung zu, wie sie in Ergebnissen einiger anderer Untersuchungen postuliert worden war (Shimazui et al., 1996; Katagiri et al., 1995).
Nach Shimazui et al. (2000) könnte in Anbetracht der Tatsache, daß E-Cadherin nicht auf proximalen Tubuluszellen zu finden ist und diese als Tumorursprungszellen postuliert werden, eine fehlende Expression in NZK nicht als Verlust betrachtet werden. In den wenigen E-Cadherin positiven NZK könnte die Expression während der Karzinogenese eher abnorm hochreguliert sein (Shimazui et al., 2000).

Die Expression von N-Cadherin zeigte ebenfalls keine eindeutige Spezifität für eine bestimmte Tumorzellart oder ein bestimmtes Wachtumsmuster (solide, papillär, tubulär oder trabekulär, etc.). Dennoch schien auffällig, daß keiner der chromophoben (N=2) und nur einer der chromophilen (papillären) Tumore (N=4) N-Cadherin exprimierte (siehe Abb.28), was in weiteren Analysen mit größeren Tumorzahlen untersucht werden sollte.

4.1.2 Expression von P-Cadherin

Die Expression von P-Cadherin ist bisher nur bei einer geringen Zahl von menschlichen Tumoren untersucht worden.

Bei den NZK konnte in der vorliegenden Untersuchung P-Cadherin nur in einem einzigen hochmalignen Tumor gefunden werden, der ebenso für E- und N-Cadherin stark positiv war. Dieser Tumor wurde in seiner Ausdehnung als T3 mit regionalen Lymphknotenmetastasen (N2) und in seiner Zellkernatypie als hoch maligne (G3) eingestuft.

Es ist nicht bekannt, ob das Auftreten der P-Cadherinexpression die zelluläre Umwandlung zu höherer Malignität begleitet oder einen spezifischen zellulären Ursprung markiert.

Dennoch werden P- und E-Cadherin unter anderem in mehrschichtigen, hochregenerativen Geweben, wie z.B. in der proliferierenden Basalzellschicht der Haut exprimiert.

Hier kommt E-Cadherin auch in den anderen epidermalen Schichten differenzierter Epithelzellen vor, während P-Cadherin ausschließlich in der basalen Zelllage zu finden ist (Glukhova et al., 1995).

Dies könnte andeuten, daß vor allem P-, aber auch E-Cadherin gleichzeitig in Zellen mit hohem Proliferationpotential exprimiert werden können. Ein Verlust von P-Cadherin könnte den Zellen die Migration in äußere Zellschichten der Haut erleichtern (Johnson et al., 1993; Nollet et al., 2000).

Auch im normalen Brustdrüsengewebe wird P-Cadherin in der Basalzellschicht exprimiert, während E-Cadherin wiederum in allen Schichten vorkommt. In der Brustdrüse setzt sich die basale Zelllage aus myoepithelialen Zellen und Vorläuferzellen zusammen. Da Mammakarzinomzellen eher luminalen Epithelzellen ähneln, schienen diese Zellen P-Cadherin nicht zu exprimieren (Birchmeier et al., 1994).

Eine weitere Untersuchung zeigte wiederum bei einigen infiltrierend wachsenden und wenig differenzierten ductalen Mammakarzinomen die Expression von P-Cadherin bei gleichzeitig herunterregulierter E-Cadherin-Expression. Dieses Expressionsmuster könnte mit einer schlechten Prognose bei diesen höhergradig malignen Tumoren einhergehen (Palacios et al., 1995).

In einigen Melanomen und bei Urothelkarzinomen scheinen E- und P-Cadherin in vitro miteinander zu korrelieren. Die Expression von P-Cadherin in Urothelzelllinien wurde

häufig festgestellt, nicht jedoch in E-Cadherin negativen Zellen (Giroldi et al., 1999).
In diesen Fällen lies sich auch auf molekulargenetischer Ebene keine mRNA der beiden Cadherine nachweisen. Das könnte daran liegen, daß die Genorte beider Proteine auf dem Chromosom 16 eng benachbart sind und den gleichen Regulationsmechanismen unterliegen könnten (Bussemakers et al., 1994; Nollet et al., 2000).
Auf NZK-Zelllinien konnte P-Cadherin nicht gefunden und auch keine Korrelation zur Expression von E-Cadherin festgestellt werden (Shimazui et al., 1996).
Es gibt nur wenige Studien, die sich mit der P-Cadherin-Expression bei renalen Karzinomen in vivo befaßt haben. Auch hier ließ sich nur für eine sehr geringe Anzahl eine P-Cadherin Expression aufzeigen (Markovic-Lipkovski et al., 2001).
P-Cadherin könnte ein Merkmal undifferenzierter epithelialer Stammzellen repräsentieren. Darin könnte es anderen im Tumorgewebe hochregulierten Adhäsionsmolekülen ähnlich sein (z.B. α4-Integrin), die während spezifischer Entwicklungsphasen im fetalen Gewebe oder in embryonalen Vorläuferzellen der selben Zellart exprimiert werden und möglicherweise als onkofetale Marker in Betracht kommen (Glukhova et al., 1995).
Da P-Cadherin auch in der normalen Niere nur auf wenigen proximalen tubulären Epithelzellen zu finden war, könnte seine Bedeutung für die Tumorgenese beim NZK begrenzt sein.

4.1.3 Expression von VE-Cadherin

Da das Wachstum solider Tumoren auch von der Neubildung von Blutgefäßen, der Angiogenese abhängig ist, war es von Interesse verschiedene Adhäsionsmoleküle, die von Endothelzellen exprimiert werden können, wie VE-Cadherin und einige Integrine, in Nierenzellkarzinomen zu untersuchen (Corada et al., 1999; Liao et al., 2002)
Im Gesunden war VE-Cadherin auf dem Endothel interstitieller Kapillaren und Glomeruli zu finden, wohingegen die Mehrzahl der NZK negativ war (79%). In nur wenigen Präparaten wurde VE-Cadherin auf bestimmten Blutgefäßen exprimiert, die im Tumorgewebe fokal gruppiert waren. Dabei konnte eine Verteilung über die gesamte Oberfläche der Endothelzellen beobachtet werden.
Andere Autoren wiederum postulieren eine exklusiv auf spezifische interzelluläre Verbindungsstellen (sog. «adherens junctions») beschränkte Expression von VE-Cadherin (Distler et al., 2003). In einer weiteren in vitro Untersuchung schien VE-Cadherin auch auf der apikalen Zelloberfläche von Endothelzellen einer einfachen Zellschicht exprimiert zu sein, um einzelne Endothelzellen einer Suspension adhärieren zu können (Breviario et al., 1995).
Ebenso kann durch Umverteilung oder Verlust der Expression von VE-Cadherin die Migration der Endothelzellen als ein bekanntermaßen wichtiger Vorgang während der

Angiogenese beeinflußt werden, da hierdurch die Loslösung der Zellen begünstigt wird (Breviario et al., 1995). Deshalb könnte eine verminderte Expression von VE-Cadherin auf den tumorversorgenden Gefäßen, wie es bei den meisten NZK hier beobachtet wurde, zur endothelialen Zellmigration und -proliferation in Beziehung stehen und über die Angiogenese das Tumorwachstum begünstigen.

Liao et al. (2000) konnte dagegen eine Expression von VE-Cadherin gleichermaßen auf Gefäßen im Gesunden wie im Gewebe von Lungentumoren und epidermoiden Tumorxenografts nachweisen, was für eine Angiogenese unter erhaltener VE-Cadherin-Expression sprechen könnte. Denn es wurde gezeigt, daß es unter dem Einfluß von VEGF zur Phosphorylierung von β-Catenin kommen kann, was zur Destabilisierung des Cadherin/Catenin-Komplexes und über die nachfolgende spezifische Signaltransduktion zur Zellproliferation führt.

Unter physiologischen Bedingungen wird, sobald die Zellen einen Zellverband formiert haben, über eine Kontaktinhibition die Phosphorylierung drastisch reduziert, sodaß sich die Cadherin/Catenin-Komplexe wieder stabilisieren können.

In verschiedenen Studien wurde festgestellt, daß sich Tumorgefäße durch einen irregulären Blutfluß, auch Merkmale der Unreife, eine gewundene Architektur und durch eine Hyperpermeabilität von gesunden Gefäßen unterscheiden können (Benjamin et al., 1999; Liao et al., 2000). Es wurde eine eingeschränkte Funktion von VE-Cadherin, das die Intaktheit der Gefäßwände erhält, postuliert (Distler et al., 2003). Dafür könnte ebenso die verminderte Expression von VE-Cadherin in den untersuchten NZK sprechen.

Es liegen nur wenige immunhistologische Analysen von VE-Cadherin in renalen Karzinomen vor, dennoch konnten auch andere Autoren das Fehlen von VE-Cadherin in der Mehrheit der NZK feststellen (Markovic-Lipkovski et al., 2001).

4.1.4 Expression von Syndecan-1

Als Transmembran-Proteoglycan der Zelloberfläche kommt Syndecan-1 eine wichtige Funktion bei der Signalübermittlung zwischen Zelle und Matrix zu. Es scheint auch grundlegenden Einfluß sowohl auf die Zellform als auch auf die Zellproliferation zu haben. Die Expression von Syndecan-1 verändert sich während der Entwicklung, Karzinogenese und Geweberegeneration (Salmivirta and Jalkanen, 1995; Couchman et al., 2001).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß Syndecan-1 in der normalen Niere in Epithelzellen der verschiedenen Tubulusabschnitte stark exprimiert wird. Im Stroma zeigten auch einzelne Fibroblasten eine Anfärbung mit dem Syndecan-1-Antikörper.

Eine mögliche Erklärung könnte darin liegen, daß Syndecane als Co-Rezeptoren für eine stabile Bindung zwischen Fibroblasten und Fibronektin benötigt werden, worauf sich die Zellen ausbreiten und über aktivierte intrazelluläre Mechanismen ihre Zellform ändern

können. Hierbei spielen zusätzlich auch Integrine als Zell-Matrix-Rezeptoren eine wichtige Rolle (Couchman et al., 2001; Chiquet-Ehrismann and Chiquet, 2003).
In einer neueren Studie wurde auch im Tumorgewebe festgestellt, daß Zellen des tumorumgebenden Stroma in verschiedenen Karzinomen Syndecan-1 exprimieren können. Diese spindelzellförmigen Zellen zeigen eine myofibroblastische Differenzierung und könnten an der Dedifferenzierung von Tumorzellen beteiligt sein (Mennerich et al., 2004)
Verglichen mit normalem Tubulusepithel, das eine starke Färbung mit dem Antikörper aufwies, zeigten von 95% aller Syndecan-1-positiven NZK 70% eine schwache Anfärbung, welche auf eine Abnahme der Syndecan-1-Expression im Tumorgewebe hinzuweisen schien. Das Färbemuster war häufig fokal auf Gruppen einiger Tumorzellen begrenzt und nicht diffus auf alle Tumorepithelzellen verteilt.
Auch in anderen Karzinomen, wie Plattenepithel- oder Rektumkarzinomen wurde im Vergleich zu den entsprechenden gesunden Strukturen eine Verminderung von Syndecan-1 festgestellt (Inki et al., 1996; Day et al., 1999).
In den hier untersuchten wenigen T3 Tumoren (N=5) fiel aber häufiger (60%) eine starke Expression von Syndecan-1 auf als in T1-T2 Tumoren (13%). Ebenso konnte auch für G3 Tumore eine Zunahme der stark positiven Reaktion beobachtet werden (50%), verglichen mit G1/G2 Tumoren (19%). Aus diesen Ergebnissen könnte sich ablesen lassen, daß bei NZK höheren Malignitätsgrades eher eine Zunahme der Syndecan-1-Expression zu finden ist. Diese Beobachtung wird auch von Untersuchungen an Mammakarzinomen unterstützt, die eine Korrelation zwischen einer starken Expression von Syndecan-1 mit hohem histologischen Grading, größerer Tumorausdehnung und weiteren ungünstigen Faktoren feststellen konnten (Barbareschi et al., 2003).
Bei den aggressiveren G3 Tumoren vom Spindelzelltyp fiel außerdem auch eine diffuse zytoplasmatische Anfärbung auf, im Gegensatz zur vorwiegend membranständigen Expression bei weniger malignen NZK.
In anderen Studien zur Funktion von Syndecan-1 während der malignen Umwandlung konnte an Plattenepithelien gezeigt werden, daß das Merkmal einer membrangebundenen Expression auf der gesamten Zelloberfläche in vitro unter Zunahme der Malignität zurückging (Inki et al., 1996).
Es gibt Hinweise, daß Syndecan-1 bei Plattenepithelkarzinomen eine gewisse prognostische Signfikanz zukommt (Antonnen et al., 1999). Für NZK jedoch sind noch weitere Untersuchungen mit höheren Fallzahlen nötig.

4.2 Expression von Integrinen

Die hier untersuchten α-Integrin-Untereinheiten wurden alle sehr unterschiedlich sowohl im Ausmaß wie in der Intensität als auch in der verhältnismäßigen Verteilung auf Tumor- und Stromazellen oder Blutgefäßen in den untersuchten NZK exprimiert. Das Expressionsmuster desselben Integrins konnte auch innerhalb einzelner Tumore variieren.
Trotzdem wurden einige Integrine, wie α3, α6 und αv, scheinbar durchgehend exprimiert.
VLA-4 und VLA-5 wiederum wurden selten und in geringer Stärke auf Tumorzellen der renalen Karzinome festgestellt. Da diese Integrin-Untereinheiten auch in der Normalniere ausschließlich im Gefäßendothel und nicht in spezifischen Epithelzellen, die als mögliche Tumorursprungszellen postuliert werden, exprimiert wurden, konnte auch im malignen Gewebe vorwiegend in Tumor versorgenden Gefäßen eine Expression beobachtet werden.
Über die Häufigkeit der Expression von VLA-4 und VLA-5 bei NZK liegen aus anderen Studien unterschiedliche Ergebnisse vor: zum Teil wurde das Fehlen beider Integrine festgestellt oder es wurde eines von beiden exprimiert (Markovic-Lipkovski et al., 2001; Tomita et al., 1995)
Dennoch könnten die wenigen Präparate mit VLA-4 positiven Tumorzellen die Re-Expression des Proteins, das sonst nur vorrübergehend in einer frühen fetalen Entwicklungphase in der Niere vorkommt, wiederspiegeln (Glukhova et al., 1995). Da VLA-4 auch in embryonalen Vorläuferzellen von Melanozyten beobachtet werden konnte und die Expression in Melanomen im Vergleich zur schwachen oder abwesenden Expression im normalen Hautgewebe signifikant hochreguliert war, wurde das Integrin als möglicher onkofetaler Marker postuliert (Glukhova et al., 1995).
Da für α5-Integrin eine Expression im fetalen renalen Gewebe nicht bekannt ist, könnte die Expression von VLA-5 auch auf die Fähigkeit von Tumorzellen, aberrante Integrine de novo exprimieren zu können, hinweisen (Anastassiou et al., 1995).
Eine Korrelation zwischen der Expression von α-Ketten der Integrine und dem Tumorgrading wurde in verschiedenen frühen Arbeiten postuliert:
Die Ergebnisse der Untersuchung hier konnten die Schlüsse von Terpe et al. (1993), daß α5-Integrin hauptsächlich im hochgradig malignen Gewebe exprimiert wird, aufgrund einer geringen Fallzahl (N=3) nur stützen, aber nicht eindeutig bestätigen.
Jedoch zeigten auch andere Arbeiten eine signifikante Zunahme der VLA-5-Expression in G2 und G3 Tumoren (Anastassiou et al., 1995), besonders in Karzinomen, die trotz höhergradiger Malignität keine Metastasen aufwiesen (Markovic-Lipkovski et al., 2001).
Diese Beobachtung könnte u.a. auf der hemmenden Wirkung von VLA-5 auf die Zellmigration beruhen. An diesem Effekt könnte auch die Expression von N-Cadherin beteiligt sein, das in Synergie mit VLA-5 durch Kontaktinhibition die Migration und Motilität von Zellen regulieren kann (Huttenlocher et al., 1998).

Schlußfolgerungen von Terpe et al. (1993), daß sich die α2-Integrinexpression bei Zunahme der Tumormalignität reduziert, konnten die Beobachtungen der vorliegenden Untersuchung nicht bestätigen. Hier war die Expression sowohl vom TNM-Staging als auch vom Tumorgrading unabhängig, wie auch von anderen Autoren beobachtet wurde (Droz et al., 1995; Markovic-Lipkovski et al., 2001).

Es fiel auf, daß VLA-2 als einzige Integrinkette in rein soliden NZK seltener exprimiert wurde und gegenüber anderen histologischen Tumorsubtypen ebenso in klarzelligen NZK deutlich herunterreguliert war. In einer anderen Arbeit konnte dies bestätigt und ebenso für VLA-6 eine Korrelation zu den histologischen Tumorzellsubtypen festgestellt werden, wobei hier eine Zunahme der Expression bei klarzelligen Tumoren beobachtet wurde (Markovic-Lipkovski et al., 2001).

Droz et al. (1995) konnten ähnlich wie in diesen Beobachtungen aufgezeigt, keine Expression für VLA-2 in klarzelligen Karzinomen feststellen. Sie postulierten ebenfalls, daß die Verteilung von VLA-2 zu den histologisch definierten Tumorsubtypen und nicht zum zellulären Malignitätsgrad korrelierte und damit Rückschlüsse auf den möglichen Zellursprung zulassen könnte. Es konnte beobachtet werden, daß sich die Integrinverteilung konkordant nach den entsprechenden Integrinliganden und der Zusammensetzung der Matrix, die spezifisch nach Tumorzellart von den Tumorzellen exprimiert wurde, richtete.

Auch VLA-6 und VLA-3 wurden in dieser Studie unabhängig von der Tumormalignität und -ausdehnung in den meisten Tumoren exprimiert. Diese Beobachtungen widersprechen Befunden von Korhonen et al. (1992), die zwischen der Expression von α6-Integrin und dem Grad der zellulären Malignität eine inverse Korrelation ergaben.

VLA-6, VLA-3 und die αv-Kette zeigten alle eine ähnliche häufige Anfärbung, wobei nur bei VLA-6 und αv-Integrin mit zunehmender Malignität vermehrt das Zytoplasma der Tumorzellen eine positive Reaktion zeigte. Die Änderung der membranständigen Verteilung der Expression konnte in dieser Arbeit bei verschiedenen Proteinen, wie E- und N-Cadherin sowie Syndecan-1, festgestellt werden. Die zytoplasmatische Expression spezifischer Proteine könnte ein mögliches Merkmal von hoch malignen G3 Karzinomen sein, im Gegensatz zu G1 Tumoren, die durchweg eine Anfärbung verschiedener Adhäsionsmoleküle nur an der Zelloberfläche zeigten.

Bei zunehmender zellulärer Entdifferenzierung der Tumore fiel sowohl ein Verlust von VLA-1 wie auch eine deutliche Zunahme der Expression der αv-Kette auf. Hierüber liegen aus anderen Studien unterschiedliche Angaben vor, die zum einen keine Beziehung zwischen Integrinen und Tumorgrading beschreiben (Droz et al., 1994), und zum anderen aber auch besonders bei der Expression der αv-Kette zum selben Schluß kommen (Markovic-Lipkovski et al., 2001). Die gleiche Beobachtung geht auch aus der Studie von Korhonen et al. (1992) hervor, worin das Auftreten der αv-Untereinheit mit der histologischen

Gradeinteilung der zellulären Maligntät nach traditionellen morphologischen Kriterien zunimmt.
Im Hinblick auf das TNM-Staging konnte gezeigt werden, daß αv-Integrin besonders häufig in den höhergradig malignen Tumoren der T3 Karzinome exprimiert wurde.
Da in Tumoren mit größerer Ausbreitung eine vermehrte Neovaskularisation stattfindet, könnte u.a. der fördernde Einfluß von αv-Integrin auf die Angiogenese zu einer stärkeren Expression führen (Varner et al., 1996). Jedoch wurden unterschiedliche Ansichten über die Funktionen von αv-Integrin geäußert, die womöglich auch durch die Bindung an verschiedene β-Untereinheiten variieren könnten. So wurde gezeigt, daß es bei Hemmung der Expression von αvβ3- und αvβ5-Integrinen nicht zur Einschränkung der Angiogenese, sondern zu einem verstärkten Gefäßwachstum kam, so daß auch eine negative Regulierung der Angiogenese durch diese Integrine postuliert wurde (Hynes, 2002). Weitere Analysen über die Co-Expression der αv-Untereinheit mit unterschiedlichen β-Integrinketten im Vergleich zum Tumorgrading und -staging könnten weiteren Aufschluß über die Bedeutung dieser Integrine beim NZK bringen.
Bei Analysen zur Tumormetastasierung von NZK konnte gezeigt werden, daß eine Herunterregulierung der α3- und α6-Integrinketten bei Tumoren mit Metastasen vorlag und VLA-5, wie zuvor schon erwähnt, wurde nur in M0 eingestuften Tumoren exprimiert (Markovic-Lipkovski et al., 2001). Obwohl in einer anderen Studie wiederum eine große Anzahl von Tumoren α3-Integrin positiv waren und bei VLA-6 gegensätzliche Funktionen beobachtet wurden, könnte die reduzierte Expression von VLA-3 und VLA-6 mit einer verminderten Bindung zu Basalmembranproteinen einhergehen.
Andere Studien postulierten auch, daß α4-Integrin für die Metastasierung der NZK signifikant sein könnte (Tomita et al., 1995; Gilcrease et al., 1996). Keines dieser Ergebnisse konnte in der hier vorgelegten Untersuchung bestätigt werden. Ob auch das Metastasierungspotential von NZK bestimmten Expressionsmustern von Integrinen eindeutig zugeordnet werden kann, erfordert weitere immunhistochemische Analysen mit größeren Fallzahlen. Aufgrund noch vieler gegensätzlicher Daten können zwar, wie hier beschrieben, gewisse Tendenzen aufgezeigt werden, dennoch lassen sich aus der beobachteten Expression von Integrinen noch keine eindeutigen prognostischen Faktoren ersehen.
Um also Marker für die Tumorprogression der NZK zu charakterisieren, wäre es wichtig, Metastasen und Primärtumore im Vergleich genauer auf Integrine zusammen mit anderen Adhäsionsmolekülen zu analysieren.

4.3 Expression von Matrixmolekülen

Um eine gestörte Adhäsion zwischen Zellen und Matrix in NZK genauer zu analysieren, wurden in der vorliegenden Untersuchung die Expressionsmuster von Laminin (Wewer et al., 1994), Perlecan (Klein et al., 1995) und Tenascin (Truong et al., 1994) verglichen.

Diese Komponenten der extrazellulären Matrix waren auf einer signifikanten Anzahl von NZK zu finden. Gut differenzierte Tumoren zeigten die Tendenz, ähnlich dem gesunden Gewebe, Basalmembranen mit Laminin-10/11- und Perlecan-Expression auszubilden.

In diesen Fällen schienen die einzelnen Tumorzellen ihre epitheliale Polarisierung beizubehalten. Dies zeigte auch die weiterhin vorhandene basale bzw. basolaterale Expression von $\alpha 6\beta 1$-Integrin, das neben $\alpha 3\beta 1$-Integrin als spezifischer Rezeptor die Adhäsion zwischen den Zellen und Laminin-10/11 reguliert, auf den Tumorzellen (Tani et al., 1999). Ob ein Funktionsverlust bestimmter Integrine wie VLA-6 durch andere Integrine wie VLA-3 in ihrer Bindung an Laminin-10/11 in NZK kompensiert werden kann, ließ sich in dieser Studie nicht klären (van der Flier et al., 2001).

Es ist bekannt, daß die $\alpha 6$-Untereinheit der Integrine mit dem an der Bildung der Tumorbasalmembran beteiligten Laminin-1 (Droz et al., 1994) und Laminin-10/11 interagieren kann (Colognato and Yurchenco, 2000). Bei wenig differenzierten Tumoren, die in der vorliegenden Studie untersucht wurden, schien dagegen diese Zell-Matrix-Interaktion zum einen dadurch verloren zu gehen, daß $\alpha 6$-Integrin entweder nicht mehr oder begrenzt auf der Zelloberfläche präsentiert wurde oder aber Laminin-10/11 fehlte. Es konnte bei dem einzigen Laminin-10/11 negativen Präparat eines hoch malignen Tumors in dieser Studie auch ein Fehlen von E-Cadherin festgestellt werden. Eine ähnliche Beobachtung wurde in einer anderen Studie berichtet, die einen signifikanten Verlust von E-Cadherin, Laminin (Spezifität nicht definiert) und Kollagen IV bei NZK zeigen konnte, womit eine starke Fragmentierung der BM und eine starke Expression von spezifischen Matrixmetalloproteinasen einherging (Morell-Quadreny et al., 2003). Dabei zeigte der Verlust von Kollagen IV und E-Cadherin einen prognostischen Wert.

Die Expression von Perlecan korrelierte in der vorliegenden Arbeit weitgehend zum Vorkommen von Laminin-10/11. Außer in einem stark entdifferenzierten Tumor, in dem Laminin-10/11 fehlte, wurde Perlecan nur sehr schwach exprimiert. Zusätzlich zeigte sich im Vergleich zur Normalniere eine deutlich schwächere Expression von Perlecan mit deutlich weniger Netzstrukturen als bei Laminin-10/11 in den entdifferenzierteren NZK. Dies scheint auf weitere Veränderungen in den Komponenten der Basalmembran hinzuweisen. Eine Herunterregulierung von Perlecan mit zunehmender Malignität wurde auch in Untersuchungen von Larynxkarzinomen festgestellt (Nerlich et al., 1998)

Tenascin-C, als weiteres Mitglied der Gruppe der Glykoproteine der extrazellulären Matrix, wird speziell in Geweben mit hoher Zellregeneration selektiv exprimiert. Unter pathologi-

schen Bedingungen aber wurde in Nieren eine starke, über den gesamten Bereich interstitieller Fibrosen verteilte Expression beobachtet (Truong et al., 1994). In NZK war Tenascin-C in allen Präparaten zu finden, das Expressionsmuster variierte jedoch zwischen den verschiedenen histologischen Tumorsubtypen und innerhalb der einzelnen Tumore.
Tenascin-C wurde in einem dem Laminin-10/11 ähnlichen Netzmuster exprimiert und war im Bereich der Basalmembran um Tumorzellen herum lokalisiert. Im Unterschied zu Laminin-10/11 aber wurde Tenascin-C in fibrotischen Arealen und Septen, in denen Laminin negativ war, stark exprimiert.
Lohi et al. (1998) konnten feststellen, daß die Tenascin-C Expression besonders bei niedrig-malignen Geweben vorwiegend noch auf bestimmte Strukuren - wie die Basalmembran und den Stromabereich um Blutgefäße - beschränkt zu sein scheint. Dagegen wurde unter Zunahme der Malignität eine verstärkte, bis weit in das Tumorstroma ausgedehnte Expression beschrieben. Die vorliegenden Ergebnisse konnten jedoch keine deutliche Zunahme der Expression mit dem Grad der Entdifferenzierung bestätigen, jedoch zeigten einige maligne G3 Präparate ausgeprägtere fibrotische Bereiche, in denen vermehrt Tenascin-C beobachtet werden konnte.
Eine andere Untersuchung zeigte in situ, auf Zelllinien und unter Verwendung von Xenografts, daß das Fehlen von Tenascin-C im Tumorstroma mit dem Malignitätsgrad korrelierte (Lohi et al., 1995). Auch Pilch et al. (1999) stellten bei Ovarialkarzinomen fest, daß das Fehlen von Tenascin-C mit höherer Malignität und besonders schlechter Prognose korrelieren konnte.
Dagegen schienen Mammakarzinome eine Zunahme der Expression mit steigendem Tumorgrading und ausgedehnter lokaler Infiltration zu zeigen (Adams et al., 2002). Bei vielen weiteren Untersuchungen, unter anderem an Gebärmutter- und Ovarialkarzinomen, sowie Plattenepitheltumoren des Larynx, schien eine starke Expression von Tenascin-C auf eine schlechte Prognose und hohe Invasivität hinzudeuten (Wilson et al., 1996; Regezi et al., 2002).
Es liegen viele weitere Untersuchungen zur Expression von Tenascin-C mit gegensätzlichen Ergebnissen vor. Hier könnte eine genaue Unterscheidung zwischen den verschiedenen Spleißvarianten von Tenascin-C, die für eine unterschiedliche Affinität zu spezifischen Rezeptoren und Liganden verantwortlich sein können, Aufschluß über unterschiedliche Funktionen des Proteins bei der Tumorgenese des NZK wie auch anderer Tumoren geben.

5 Zusammenfassung

Durch die intakte Funktion diverser Adhäsions- und Matrixmoleküle wird im Gesunden der Zellverband organisiert und so eine Homöostase im Zusammenspiel vieler molekularer Wechselwirkungen zwischen den Zellen und dem extrazellulären Gewebe hergestellt. Die spezifische Anordnung der Moleküle sorgt für eine normale apikale-basale Polarisation epithelialer Zellen, die im Tumorgewebe häufig einer Dysregulation unterliegt und die normale Verbindung der Zellen zur Basalmembran aufheben kann.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob bei renalen Karzinomen ein pathologisch verändertes Expressionsmuster von Adhäsionsmolekülen in Abhängigkeit vom Tumorstadium, vom zellulären Malignitätsgrad und der Histologie aufgezeigt werden kann.

E- und N-Cadherin, die in der normalen Niere im Bereich distaler Tubulusanteile und der Sammelrohre bzw. auf Zellen des proximalen Tubulusepithels selektiv zu finden sind, wurden im Tumorgewebe in den meisten Fällen gleichzeitig exprimiert. Drei Tumore waren für beide Moleküle negativ. Bei einigen entdifferenzierten Tumoren wechselte die Expression von einer umschriebenen Verteilung auf der Zelloberfläche zu einer diffusen Anfärbung auch des Zytoplasmas. Die Mehrzahl der NZK zeigte keine VE-Cadherin-Expression. VE-Cadherin konnte im normalen Nierengewebe auf Endothelzellen verschiedener Blutgefäße, interstitieller Kapillaren und Glomeruli, im Tumorgewebe nur im Bereich von fokal gruppierten Gefäßen detektiert werden. Die meisten Endothelien waren in den NZK vermutlich als Hinweis für ihre geringe Ausreifung für VE-Cadherin negativ. P-Cadherin mit einer beschränkten Expression auf wenigen proximalen Tubuluszellen, mesangialen Zellen in Glomeruli und auf der Intima größerer Gefäße in der Normalniere, war nur im Zytoplasma einzelner, epithelialer Zellen eines einzigen extrem malignen Tumors zu finden.

Syndecan-1, das zur kontrollierten Verankerung von Zellen an die umgebende Matrix beitragen kann, zeigte sich in den meisten Tumoren in einer im Vergleich zum gesunden renalen Gewebe reduzierten Expression und membranständiger, fokal begrenzter Anordnung. In entdifferenzierten NZK konnte aber auch eine diffuse, zytoplasmatische Anfärbung vorliegen.

Obwohl die untersuchten Integrine auf den Tumorzellen der verschiedenen NZK individuell variieren konnten, waren α3-, α6- und αv-Integrin durchgehend auf Tumorzellen und α4 selektiv auf Stromazellen und Blutgefäßen zu finden.

Wie in den tubulären Basalmembranen der Normalniere zeigten auch NZK niedrigen Malignitätsgrades Basalmembranen mit Laminin-10/11- und Perlecan-Expression. Ein Verlust dieser Basalmembrankomponenten zeigte sich bei wenig differenzierten Tumoren, denen Laminin-10/11 fehlte und in denen Perlecan äußerst schwach exprimiert wurde. Tenascin-C hingegen, ließ sich als weitere Basalmembrankomponente in einzelnen

Tumoren, auch bei Fehlen von Laminin-10/11 und Perlecan, im Tumorstroma zeigen. Insgesamt konnte für die verschiedenen Adhäsions- und Matrixmoleküle keine eindeutige Korrelation zwischen zellulärem Grading der Tumoren und ihrem Expressionsmuster beschrieben werden. Für die Beurteilung ihrer Bedeutung in der Tumorgenese des renalen Karzinoms bedarf es weiterer in situ und funktioneller in vitro Analysen.

6 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ba	basophil
BM	Basalmembran
CD	Cluster of Differentiation
ECM	extrazelluläre Matrix
EGF	epidermal growth factor
eo	eosinophil
FGF-2	fibroblast growth factor
FGF-7	keratinocyte growth factor
FN III	Fibronectin Typ III
GAGs	Glycosaminoglycane
HLA	Human Leukocyte Antigen
Ig	Immunglobulin
Kap.	Kapitel
LN	Laminin
mono	monoklonal
NZK	Nierenzellkarzinom
pap.	papillär
poly	polyklonal
pT1-3b	postoperativ festgelegte Tumorgröße
S	Stromazelle
T	Tumorzelle
Tab.	Tabelle
TNM	Stagingeinteilung nach Tumorgröße, Anzahl Lymphknoten (nodes) und Metastasen (metastasis)
trab.	trabekulär
tub.	tubulär
V	vessel cell (Zelle des Gefäßendothels)
VEGF	vascular endothelium growth factor
VLA	Very Late Activation (Antigen)
zyst.	zystisch

7 Literaturverzeichnis

Adams, M., Jones, J.L., Walker, R.A., Pringle, J.H., Bell, S.C. (2002) Changes in tenascin-C isoform expression in invasive and preinvasive breast disease. Cancer Res. 62, 3289-3297

Albelda, S.M. (1993) Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumour progression and metastasis. Lab. Invest. 68, 4-17

Alattia, J.R., Kurokawa, H., Ikura, M. (1999) Structural view of cadherin-mediated cell-cell adhesion. Cell. Mol. Life Sci. 55, 359-367

Anastassiou, G., Duensing, S., Steinhoff, G., Kirchner, H., Ganser, A., Atzpodien, J. (1995) In vivo distribution of integrins in renal cell carcinoma: Integrin-phenotype alteration in different degrees of tumour differentiation and VLA-2 involvement in tumour metastasis. Cancer Biotherapy 10, 287-292

Anttonen, A., Kajanti, M., Heikkila, P. Jalkanen, M., Joensuu, H. (1999) Syndecan-1 expression has prognostic significance in head and neck carcinoma. Br. J. Cancer 79, 558-564

Barbareschi, M., Maisonneuve, P., Aldovini, D., Cangi, M.G., Pecciarini, L., Angelo Mauri, F., Veronese, S., Lucenti, A., Palma, P.D., Doglioni, C. (2003) High syndecan-1 expression in breast carcinoma is related to aggressive phenotype and to poorer prognosis. Cancer 98, 474-483

Barth, A.I.M., Näthke, I.S., Nelson, W.J. (1997) Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signalling pathways. Curr. Opin. Cell Biol. 9, 683-690

Barnstable, C.J., Bodmer, W.F., Brown, G., Galfré, G., Milstein, C., Williams, A.F., Ziegler, A. (1978) Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens - new tools for genetic analysis. Cell 14, 9-20

Becker, K.F., Atkinson, M.J., Reich, U., Becker, J., Nekarda,H., Siewert, J.R., Höfler, H. (1994) E-cadherin gene mutations provide clues for diffuse type gastric carcinoma. Cancer Res. 54, 3845-3852

Behrens, J. (1993) The role of cell adhesion molecules in cancer invasion and metastasis. Breast Cancer Res. Treat. 24, 175-184

Benjamin, L.E., Golijanin, D., Itin, A., Pode, D., Keshet, E. (1999) Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. J. Clin. Invest. 103, 159-165

Biddlestone, L.R., Fleming, S. (1992) Calcium dependence of A-CAM function in human renal epithelium. J. Pathol. 166, 163-169

Birchmeier, W., Hülsken, J., Behrens, J. (1995) E-cadherin as an invasion suppressor. Cell adhesion and human disease 189, 124-141

Brenner, W., Gross, S., Steinbach, F., Hohenfellner, R., Turhoff, J. (2000) Differential inhibition of renal cell cancer cell invasion mediated by fibronectin, collagen IV and laminin. Cancer Lett. 155, 199-205

Breviario, F., Caveda, L., Corada, M., Martin-Padura, I., Navarro, P., Golay, J., Introna, M., Gulino, D., Lampugnani, M.G., Dejana, E. (1995) Functional properties of human vascular endothelial cadherin (7B4/cadherin-5), an endothelium-specific cadherin.
Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 15, 1229-1239

Bussemakers, M.J., Schalken, J.A. (1996) The role of cell adhesion molecules and proteases in tumor invasion and metastasis. World J. Urol. 14, 151-156

Cairns, R.A., Khoka, R., Hill, R.P. (2003) Molecular mechanisms of tumour invasion and metastasis: an integrated view. Curr. Mol. Med. 7: 659-671

Carey, D.J. (1997) Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors.
Biochem. J. 327, 1-16

Chiquet-Ehrismann, R. (1995) Tenascin, a growing family of extracellular matrix proteins.
Experientia 51, 853-862

Chiquet-Ehrismann, R., Chiquet, M. (2003) Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress. J. Pathol. 200, 488-499

Chiquet-Ehrismann, R., Tucker, R. (2004a) Connective tissue: signalling by tenascins.
Int. J. Biochem. Cell Biol. 36, 1085-1089

Chiquet-Ehrismann, R. (2004b) Tenascins. Int. J. Biochem. Cell Biol. 36, 986-990

Colognato, H., Yurchenco, P.D. (2000) Form and function:
the laminin family of heterotrimers. Dev. Dyn. 218, 213-234

Corada, M., Mariotti, M., Thurston, G., Smith, K., Kunkel, R., Brockhaus, M., Lampungnani, M.,G., Martin-Padura, I., Stoppacciaro, A., Dejana, E. (1999) VE-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 9815-9820

Couchmann, J.R, Chen, L., Woods, A. (2001) Syndecans and cell adhesion.
Int. Rev. Cytol. 207, 113-150

Couchmann, J.R. (2003) Syndecans: proteoglycan regulators of cell surface microdomains?
Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 4, 926-937

Day, R.M., Hao, X., Ilyas, M., Daszak, P., Talbot, I.C., Forbes, A. (1999) Changes in the expression of syndecan-1 in colorectal adenoma-carcinoma sequence.
Virchows Arch. 434, 121-125

Dimopoulos, M.A., Logothetis, C.J., Markovitz, A., Sella, A., Amato, R., Ro, J. (1993) Collecting duct carcinoma of the kidney. Br. J. Urol. 71; 388-391

Distler, J.H., Hirth, A., Kurowska-Stolarska, M., Gay, R.E., Gay, S., Distler, O. (2003) Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis.
Q. J. Nucl. Med. 47, 149-161

Droz, D., Patey, N., Paraf, F., Chrétien, Y., Gogusev, J. (1994) Composition of extracellular matrix and distribution of cell adhesion molecules in renal cell tumors.
Lab. Invest. 71, 710-718

Fleming, S. (1991) Cell adhesion and epithelial differentiation. J. Pathol. 164, 95-100

Gelb, A., Shibuya, R, Weiss, L., Medeiros, L. (1993) Stage I renal cell carcinoma.
Am. J. Surg. Pathol. 17; 275-286

Germenis, M., Dimopoulos, A., Fertakis, A. and Dimopoulos, C. (1984) Genetic markers in renal adenocarcinoma. J. Urol. 132, 173-174

Giancotti, F.G., Ruoslahti, E. (1999) Integrin signaling. Science 285, 1028-1032

Gilcrease, M.Z., Truong, L., Brown, R.W. (1996) Correlation of very late activation integrin and CD44 expression with extrarenal invasion and metastasis of renal cell carcinomas.
Hum. Pathol. 27, 1355-1360

Giroldi, L.A., Bringuier, P.P., Schalken, J.A. (1996) Defective E-cadherin function in urological cancers: clinical implications and molecular mechanisms. Invasion Metastasis 14, 71-81

Giroldi, L.A., Shimazui, T., Schalken, J.A., Yamasaki, H., Bringuier, P.P. (2000) Classical cadherins in urological cancers. Morphologie 84, 31-38

Glukhova, M., Deugnier, M.-A., Thiery, J.P. (1995) Tumour progression: the role of cadherins. Mol. Med. Today 4, 84-89

Goodley, P., Kim, S.W. (2002) Renal cell carcinoma. Curr. Opin. Oncol. 14; 280-285

Griffioen, A.W., Damen, C.A., Martinotti, S., Blijham, G.H., Groenewegen, G. (1996) Endothelial intercellular adhesion molecule-1 expression is suppressed in human malignancies: the role of angiogenic factors. Cancer Res. 56, 1111-1117

Goldblum, J.R. and Lloyd, R.V. (1993) Primary renal carcinoid.
Arch. Pathol. Lab. Med. 117, 855-858

Guan, J.L., Shallow, D. (1992) Regulation of focal adhesion-associated protein thyrosine kinase by both cellular adhesion and oncogenic transformation. Nature 358, 690-692

Guinan, P., Sobin, L.H., Algaba, F. (1997) TNM staging of renal cell carcinoma.
Cancer 80; 992-993

Gumbiner, B.M. (1996) Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. Cell 84; 345-357

Harada, K., Masuda, S., Hirano, M., Nakanuma, Y. (2003) Reduced expression of syndecan-1 correlates with histologic dedifferentiation, lymph node metastasis, and poor prognosis of intrahepatic cholangiocarcinoma. Hum. Pathol. 34, 857-863

Hashimura, T., Tubbs, R.R., Connelly, R., Caulfield, M.J., Trindade, C.S., McMahon, J.T., Prayer Galetti, T., Edinger, M., Sandberg, A.A., Dal Cin, P., Sait, S.J., Pontes, J.E. (1989) Characterization of two cell lines with distinct phenotypes and genotypes established from a patient with renal cell carcinoma. Cancer Res. 49, 7064-7071

Heicappel, R. (1999) Cadherins in renal cell carcinoma. Anticancer Res. 19, 1501-1504

Hillis, G.S., MacLeod, A.M. (1996) Integrins and disease. Clin. Sci. 91, 639-650

Hirayabashi, K., Numa, F., Suminami, Y., Murakami, A., Murakami, T., Kato, H. (1998) Altered proliferative and metastatic potential associated with increased expression of syndecan-1. Tumour Biol. 19, 454-463

Hirohashi, S. (2000) Molecular aspects of adhesion-epigenetic mechanisms for inactivation of E-cadherin-mediated cell adhesion system in cancers.
Verh. Dtsch. Ges. Pathol. 84, 28-32

Huang, W., Chiquet-Ehrismann, R., Moyano, J.V., Garcia-Pardo, A., Orend, G. (2001) Interference of tenascin-C with syndecan-4 binding to fibronectin blocks cell adhesion and stimulates tumor cell proliferation. Cancer Res. 61, 8586-8594

Huttenlocher, A., Lakonishok, M., Kinder, M., Wu, S., Truong, T., Knudson, K.A., Horwitz, A.F. (1998) Integrin and cadherin synergy regulates contact inhibition of migration and motile activity. J. Cell Biol. 141, 515-526

Hynes, R.O. (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. Cell 110, 673-687

Inki, N., Jalkanen, M. (1996) The role of Syndecan-1 in malignancies. Ann. Med. 28, 63-67

Javidan, J., Stricker, H.J., Tamboli, P. et al (1999) Prognostic significance of the 1997 TNM classification of renal cell carcinoma. J. Urol. 162: 1277-1281

Jiang, X., Couchman, J.R. (2003) Perlecan and tumor angiogenesis.
J. Histochem. Cytochem. 51, 1393-1410

Johnson, K.R., Lewis, J.E., Li, D., Wahl, J., Soler, A.P., Knudsen, K.A., Wheelock, M.J. (1993) P-and E-cadherin are in seperate complexes in cells expressing both cadherins.
Exp. Cell Res. 207, 252-260

Jones, P.L., Jones, F.S. (2000) Tenascin-C in development and disease: gene regulation and cell function. Matrix Biol. 19, 581-596

Kainulainen, V., Wang, H., Schick, C., Bernfield, M. (1998) Syndecans, heparan sulfate proteoglycans, maintain the proteolytic balance of acute wound fluids.
J. Biol. Chem. 273, 11563-11569

Katagiri, A., Watanabe, R., Tomita, Y. (1995) E-cadherin expression in renal cell cancer and its significance in metastasis and survival. Br. J. Cancer 71, 376-379

Kemler, R. (1992) Classical cadherins. Semin. Cell Biol. 3, 149-155

Kinsella, A.R., Green, B., Lepts, G.C., Hill, C.L., Bowie, G., Taylor, B.A. (1993) The role of the cell-cell adhesion molecule E-cadherin in large bowel tumor cell invasion and metastasis. Br. J. Cancer 67, 904-909

Klein, G., Conzelmann, S., Beck, S., Timpl, R., Müller, C.A. (1995) Perlecan in human bone marrow: a growth-factor-presenting, but anti-adhesive, extracellular matrix component for hematopoietic cells. Matrix Biol. 14, 457-465

Korhonen, M., Laitinen, L., Ylänne, J., Gould, V.E., Virtanen, I. (1992)
Integrins in developing, normal and malignant human kidney. Kidney Int. 41, 641-644

Korhonen, M., Laitinen, L., Ylänne, J., Koukoulis, G.K., Quaranta, V., Juusela, H., Gould, V.E. and Virtanen, I. (1992) Integrin distributions in renal cell carcinomas of various grades of malignancy. Am. J. Pathol. 141, 1161-1171

Kumar-Singh, S., Jacobs, W., Dhaene, K., Weyn, B., Bogers, J., Weyler, J., Van Marck, E. (1998) Syndecan-1 expression in malignant mesothelioma: correlation with cell differentiation, WT1 expression, and clinical outcome. J. Pathol. 186, 300-305

Kurokawa, H., Katsube, K., Podyma, K.A., Ikuta, M., Iseki, H., Nakajima, M., Omura, K., Takagi, M., Yanagishita, M. (2003) Heparanase and tumor invasion patterns in human oral squamous cell carcinoma xenografts. Cancer Sci. 94, 277-285

Liao, F., Doody, J.F., Overholser, J., Finnerty, B., Bassi, R., Wu, Y., Dejana, E., Kussie, P., Bohlen, P., Hicklin, D.J. (2002) Selective targeting of angiogenic tumor vasculature by vascular endothelial-cadherin antibody inhibits tumor growth without affecting vascular permeability. Cancer Res. 62, 2567-2575

Liao, F., Li, Y., O'Connor, W., Zanetta, L., Bassi, R., Santiago, A., Overholser, J., Hooper, A., Dejana, E., Hicklin, J., Bohen, P., (2000) Monoclonal antibody to vascular endothelial-cadherin is a potent inhibitor of angiogenesis, tumor growth, and metastasis.
Cancer Res. 60, 6805-6810

Li, Y., Yang, C. (2003) The expression of cell adhesion molecule syndecan-1 and E-cadherin in laryngeal cancer. Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi 17, 736-738

Lohi, J., Tani, T., Laitinen, L., Kangas, L., Letho, V.P., Virtanen, I. (1995) Tenascin and fibronectin isoforms in human renal cell carcinomas, renal cell carcinoma cell lines and xenografts in nude mice. Int. J. Cancer 63, 442-449

Lohi, J., Leivo, I., Oivula, J., Lehto, V.P., Virtanen, I. (1998) Extracellular matrix in renal cell carcinomas. Histol. Histopathol. 13, 785-796

Lowy, A.M., Knight, J., Groden,J. (2002) Restoration of E-cadherin/beta-catenin expression in pancreatic cancer cells inhibits growth of induction of apoptosis.
Surgery 132, 141-148

Luckenbill-Edds, L. (1997) Laminins and the mechanism of neuronal outgrowth.
Brain Res. Brain Res. Rev. 23, 1-27

Makrigiannakis, A., Coukos, G., Chrisofidou-Solomidou, M., Gour, B.J., Radice, G.L., Blaschuk, O., Coutifaris, C. (1999) N-cadherin-mediated human granulosa cell adhesion prevents apoptosis. A role in follicular atresia and luteolysis? Am. J. Path. 153, 1347-1351

Markovic-Lipkovski, J., Brasanac, D., Todorovic, V., Müller, G.A. (1995) Immunmorphological characteristics of renal cell carcinoma. Histol. Histopathol. 10, 651-659

Markovic-Lipkovski, J., Brasanac, D., Müller, G.A., Müller, C.A. (2001) Cadherins and integrins in renal cell carcinoma. An immunmohistological study. Tumori 87, 173-178

Mattijssen, V., Van Moorselaar, J., De Mulder, P.H., Schalkwijk, L. and Ruiter, D.J. (1992) Human leucocyte antigen expression in renal cell carcinoma lesions does not predict the response to interferon therapy. J. Immunotherapy 12, 64-69

Mejean, A, Oudard, S., Thiounn, N. (2003) Prognostic factors of renal cell carcinoma.
J. Urol. 169, 821-827

Mennerich, D., Vogel, A., Klaman, I., Dahl, E., Lichtner, R.B., Rosenthal, A., Pohlenz, H.D., Thierauch, K.H., Sommer, A. (2004) Shift of syndecan-1 expression from epithelial to stromal cells during progression of solid tumours. Eur. J. Cancer 40, 1373-1382

Minervini, A., Lilas, L., Morelli, G., Traversi, C., Battaglia, S., Christofani, R, Minervini, R. (2001) Regional lymph node dissection in the treatment of renal cell carcinoma: useful in patients with no suscepted adenopathy before and during surgery.
Br. J. Urol. Int. 88, 169-172

Moch, H., Gasser, T., Amin, M.B., Torhorst, J., Sauter, G., Mihatsch, M.J. (2000) Prognostic utility of the recently recommended histologic classification and revised TNM staging system of renal cell carcinoma. Cancer 89, 604-614

Morell-Quadreny, L., Rubio, J., Lopez-Guerrero, J.A., Casanova, J., Ramos, D., Iborra, I., Solsona, E., Llombart-Bosch, A. (2003) Disruption of basement membrane, extracellular matrix metalloproteinases and E-cadherin in renal cell carcinoma.
Anticancer Res. 23, 5005-5010

Müller, C.A., Müller, G.A. (1983) Characterization of renal antigens on distinct parts of the human nephron by monoclonal antibodies. Klin. Wochenschr. 61, 893-902

Müller, G.A., Müller, C.A., Markovic-Lipkovski, J. (1996)
Adhesion molecules in renal disease. Renal Failure 18, 711-724

Nerlich, A.G., Lebeau, A., Hagedorn, H.G., Sauer, U., Schleicher, E.D. (1998) Morphological aspects of altered basement membrane metabolism in invasive carcinomas of the breast and the larynx. Anticancer Res. 18, 3515-3520

Nollet, F., Kools, P., Van Roy, F. (2000) Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members.
J. Mol. Biol. 299, 551-572

Nouwen, E.J., Dauwe, S., van der Biest, I., de Mroe, M.E. (1993) Stage and segment specific expression of cell adhesion molecules N-CAM, A-CAM and L-CAM in the kidney.
Kidney Int. 44, 147-158

O'Donnell, M., Fleming, S. (1995) Distribution of cell adhesion in renal epithelium without cadherin loss. J. Pathol. 175, 45-50

Okada, M., Takemura, T., Murakami, K., Hino, S., Yoshioka, Y. (1996) Expression of tenascin in normal and diseased human kidney. Jpn. J. Nephrol. 38, 213-219

Okegawa, T., Li, Y., Pong, R.C., Hsieh, J.T. (2002) Cell adhesion proteins as tumor suppressors. J. Urol. 4, 1836-1843

Olsen, B.R. (1999) Life without perlecan has its problems. J. Cell Biol. 147, 909-911

Palacios, J., Benito, N., Pizarro, A., Suarez, A., Espada, J., Cano, A., Gamallo, C. (1995) Anomalous expression of P-cadherin in breast carcinoma. Correlation with E-cadherin expression and pathological features. Am. J. Pathol. 146, 605-612

Panizzut, B., Carlevato, M.T., Ferro, S., Cavalot, A.L., Gervasio, C.F., Ricci, E., Trusolino, L., Marchisio, P.C., Cortesina, G. (1997) Adhesion molecules in squamous cell carcinoma of the larynx: possible indication of prognosis. Acta Otolaryngol. Ital. 17, 347-356

Pantel, G., Schlimok, M., Angstwurm, B., Passlicot, J. R., Izbicki, J. P., Johnson, J.P., Riethmüller, G. (1995) Early metastasis of human solid tumours: expression of cell adhesion molecules. Cell adhesion and human disease 189, 157-173

Paradies, N.E., Grunwald, G.B. (1993) Purification and characterization of NCAD90, a soluble endogenous form of N-cadherin, which is generated by proteolysis during retinal development and retains adhesive and neurite-promoting function. J. Neurosci. Res. 36, 33-45

Paul, R., Necknig, U., Busch, R., Ewing, C.M., Hartung, R, Isaacs, W.B. (2004) Cadherin-6: a new prognostic marker for renal cell carcinoma. J. Urol. 171, 97-101

Pilch, H., Schaffer, U., Schlenger, K., Lautz, A., Taner., B., Hockel, M., Knappstein, P.G. (1999) Expression of tenascin in human cervical cancer - association of tenascin expression with clinicopathological parameters. Gynecol. Oncol. 73, 415-420

Pitz, S., Moll, R., Storkel, S., Thoenes, W. (1987) Expression of intermediate filament proteins in subtypes of renal cell carcinomas. Lab. Invest. 56, 642- 653

Rabb, H.A.A. (1994) Cell adhesion molecules and the kidney.
Am. J. Kidney Diseases 23, 155-166

Rapraeger, A.C. (1993) The coordinated regulation of heparan sulfate, syndecans and cell behaviour. Curr. Op. Cell Biol. 5, 844-853

Rasbridge, S.A., Gillett, C.E., Sampson, S.A., Walsh, F.S., Millis, R.R. (1993) Epithelial (E-) and plazental (P-) cadherin cell adhesion molecule expression in breast carcinoma.
J. Pathol. 169, 245-250

Reiland, J., Sanderson, R.D., Waguespack, M., Barker, S.A., Long, R., Cars, D.D., Marchetti, D. (2004) Heparanase degrades syndecan-1 and perlecan heparan sulphate: functional implications for tumor cell invasion. J. Biol. Chem. 279, 8047-8055

Renshaw, A.A. and Corless, C.L. (1995) Papillary renal cell carcinoma: histology and immunhistochemistry. Am. J. Surg. Pathol. 19, 842-849

Renshaw, A.A., Richie, J.P. (1999) Subtypes of renal cell carcinoma: different onset and sites of metastatic desease. Am. J. Clin. Pathol. 111, 539-543

Regezi, J.A., Ramos, D.M., Pytela, R., Dekker, N.P., Jordan,R.C. (2002) Tenascin and beta 6 integrin are overexpressed in floor of mouth in situ carcinomas and invasive squamous cell carcinomas. Oral Oncol. 38, 332-336

Rissanen, J., Korhonen, M., Lehto, V.P., Virtanen, I. (2003) Laminin alpha 1 chain in human renal cell carcinomas and integrin-mediated adhesion of renal cell carcinoma cells to human laminin isoforms. J. Pathol. 200, 157-67

Salmivirta, M., Jalkanen, M. (1995) Syndecan family of surface proteoglycans: developmentally regulated receptors for extracellular effector molecules. Experientia 51, 863-872

Schipper, J.H., Frixen, U.H., Behrens, J., Unger, A., Jahnke, K., Birchmeier, W. (1991)
E-cadherin expression in squamous cell carcinomas of head and neck: inverse correlation with tumor dedifferentiation and lymph node metastasis. Cancer Res. 51, 6328-6337

Sharma, B., Handler, M., Eichstetter, I., Whitelock, J.M., Iozzo, R.V. (1998) Antisense targeting of perlecan blocks tumor growth and angiogenesis in vivo.
J. Clin. Invest. 102, 1599-1608

Shimazui, T., Giroldi, L.A., Bringuier, P.P., Oosterwijk, E., Schalken, J.A. (1996). Complex cadherin expression in renal cell carcinoma. Clin. Cancer Res. 56, 3234-3237

Shimazui, T., Oosterwijk, E., Akaza, H., Bringuier, P.P., Ruijter, E., van Berkel, H., Oosterwijk Wakka, J., van Bokhoven, A., Debruyne, FMJ., Schalken, J.A. (1998)
Expression of cadherin-6 as a novel diagnostic tool to predict prognosis in patients with E-cadherin-absent renal cell carcinoma. Clin. Cancer Res. 4, 2419-2424

Shimazui, T., Osterwijk-Wakka, J., Akaza, H., Bringuier, P.P., Ruijter, E., Debruyne, F.M., schalken, J.A., Oosterwijk, E. (2000) Alterations in expression of cadherin-6 and E-cadherin during kidney development and renal cell carcinoma. Eur.Urol. 38, 331-338

Simon, E.E., Liu, C.H., Das, M., Nigam S., Broekelmann, T., McDonald, J.A. (1994)
Characterization of integrins in cultured human renal cortical tubule epithelial cells.
Am. J. Physiol. 267, F612-F623

Tanihara, H., Kido, M., Obata, S., Heimark, R.L., Davidson, M., John, T.St., Suzuki, S. (1994)
Characterization of cadherin-4 and cadherin-5 reveals new aspects of cadherins.
J. Cell Sci. 107, 1697-1704

Takeichi, M. (1993) Cadherins in cancer.. Curr. Op. Cell Biol. 5, 806-811

Taki, A., Nakatani, Y., Misugi, K., Yao, M., Nagashima,Y. (1999) Chromophobe renal cell carcinoma: an immunohistochemical study of 21 Japanese cases. Mod. Pathol. 12, 310-317

Tani, T., Laitinen, L., Kangans, L., Letho, V.P., Virtanen, I. (1995) Expression of E- and N-cadherin in renal cell carcinoma, in renal cell carcinoma cell lines in vitro and their xenografts. Int. J. Cancer 64, 407-414

Tani, T., Lehto, V.P., Virtanen, I. (1999) Expression of laminins 1 and 10 in carcinoma cells and comparison of their roles in cell adhesion. Exp. Cell Res. 248, 115-121

Terpe, H.J., Tajrobehkar, K., Günthert, U., Altmannsberger, M. (1993) Expression of cell adhesion molecules $\alpha 2$, $\alpha 5$ and $\alpha 6$ integrin, E-cadherin, N-CAM and CD 44 in renal cell carcinomas. An immunohistochemical study. Virchows Archiv A Pathol. Anat. 422, 219-224

Thoenes, W., Störkle, S., Rumpelt, H.L. (1986) Histopathology and classification of renal cell tumors (adenomas, oncocytomas and carcinomas). The basic cytological and histological elements and their use for diagnostics. Pathol. Res. Pract. 181, 125-143

Timpl, R., Brown, J.C. (1994) The laminins. Matrix Biol. 14, 275-281

Tomita, Y., Nishiyama, T., Fujiwara, M and Sato, S. (1990) Immunohistochemical detection of major histocompatibility complex antigens and quantitative analysis of tumour infiltrating mononuclear cells in renal cell cancer. Br. J. Cancer 62, 354-359

Tomita, Y., Saito, T., Saito, K., Oite,T., Shimizu, F. and Sato, S. (1995) Possible significance of VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$) for hematogenous metastasis of renal cell cancer.
Int. J. Cancer 60, 753-758

Tomita, Y., Bilim, V., Kawasaki, T., Takahashi, K., Okan, I., Magnussson, K.P., Wiman, K.G.

(1996) Frequent expression of Bcl-2 in renal cell carcinomas carrying wild-type p53. Int. J. Cancer 66, 322-325

Truong, L.D., Pindur, J., Barrios, R., D'Agati, V., Lechago, J., Suki, W., Majesky, M. (1994) Tenascin is an important component of the glomerular extracellular matrix in normal and pathologic conditions. Kidney Int. 45, 201-210

Truong, L.D., Foster, S.V., Barrios, R., D'Agati, V., Verani, R.R., Gonzalez, J.M., Suki, W. (1996) Tenascin is an ubiquitous extracellular matrix protein of human renal interstitium in normal and pathologic conditions. Nephron 72, 579-586

Van der Flier, A., Sonnenberg, A. (2001) Function and interactions of integrins. Cell Tissue Res. 305, 285-298

Varner, J.A., Cheresh, D.A., (1996) Integrins and cancer. Curr. Opin. Cell Biol. 8, 724-730

Vleminckx, K, Kemler, R. (1999) Cadherins and tissue formation: integrating adhesion and signaling. Bioessays 21, 211-220

Wesseling, J., van der Valk, S., Vos, H.I., Sonnenberg, A., Hilkens, J. (1995) Episialin (MUC1) overexpression inhibits integrin-mediated cell adhesion to extracellular matrix components. J. Cell Biol. 129, 255-265

Wewer, U.M., Wayner, E.A., Hoffstrom, B.G., Lan, F., Meyer-Nielsen, B., Engwall, E., Albrechtsen, R. (1994) Selective assembly of laminin variants by human carcinoma cells. Lab. Invest. 71, 719-730

Wilson, K.E., Langdon, S.P., Lessells, A.M., Miller, W.R. (1996) Expression of the extracellular matrix protein tenascin in malignant and benign ovarian tumours. Br. J. Cancer 74, 999-1004

Wodarz, A. (2000) Tumor suppressors: linking cell polarity and growth control. Curr. Biol. 10, 624-626

Ziegler, A., Milstein, C. (1979) A small polypeptide different from β2-microglobulin associated with a human cell surface antigen. Nature 279, 243-244

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. C. A. Müller für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung meiner Arbeit bedanken, insbesondere für Ihre grosse Geduld bei der schriftlichen Fertigstellung.

Besonderer Dank gilt auch Frau Prof. Dr. J. Markovic-Lipkovski, deren Engagement bei der Auswertung der Präparate unerlässlich war.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. G. Klein für die freundliche Unterstützung sowohl während des praktischen Teils als auch bei der schriftlichen Korrektur.

Für die besonders gute Zusammenarbeit und wunderbare Zeit im Labor während des experimentellen Teils möchte ich meinen herzlichen Dank Frau Friedericke Frank und Frau Ingeborg Steiert aussprechen.

Über die professionelle Hilfe beim Layout danke ich ganz besonders Frau Susanne Wald und Herrn Michael Reichmann, die mit ihrem Fachwissen die vorliegende Arbeit in eine so schöne Form gebracht haben.

Nicht vergessen möchte ich meine Freunde, Bekannte und Arbeitskollegen des Kantonsspitals Münsterlingen, die bei so manchem geselligen Zusammenkommen auf mich verzichten mussten.

Die vielen ermutigenden Worte meiner Eltern und das geduldige Verständnis von Herrn Felix Geser haben während der schriftlichen Zusammenstellung mein Durchaltevermögen immer wieder aufgefrischt und erneuert.

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name:	Susanne Widmann
Geburtstag:	06.10.1970
Geburtsort:	Waiblingen

Schulbildung

1977-1981	Karolinger Grundschule Waiblingen
1981-1990	Staufer-Gymnasium Waiblingen

Die Zeit «dazwischen»

09/1990-08/1991	Freiwilliges Soziales Jahr in den Krankenanstalten Esslingen und im Evangelischen Verein Fellbach
08/1991-12/1991	Ofenbauprojekt in Shighatini, Tansania

Studium

04/1992-03/1998	Medizinstudium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
03/1998	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Tübingen
04/1998-05/1999	Praktisches Jahr im Lorn and Island District General Hospital Oban, Schottland, Kantonsspital Basel und Kreiskrankenhaus Friedrichshafen
04.05.1999	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Friedrichshafen

Berufliche Tätigkeit

09/1999-02/2001	Ärztin im Praktikum in der Abteilung für Anästhesie am Olgahospital Stuttgart
06/2001-01/2004	Assistenzärztin in der Abteilung für Anästhesie, Notfall- und Intensivmedizin am Kantonsspital St. Gallen, Schweiz
seit 03/2004	Assistenzärztin in der Abteilung für Anästhesie, Notfall- und Intensivmedizin am Kantonsspital Münsterlingen, Schweiz

St. Gallen, den 2. Mai 2004