

Aus der Klinik und Poliklinik für Urologie
der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. H. Riedmiller

**DIE BEDEUTUNG DER EXPRESSION DES
IL-4 REZEPTORS
FÜR DIE PROGNOSESTELLUNG BEIM
LOKAL BEGRENZTEN
NIERENZELLKARZINOM**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Andrea Krieger
aus Ulm

Würzburg, Juli 2002

Referent: Prof. Dr. med. H. Riedmiller

Koreferent: Prof. Dr. A. Duschl

Dekan: Prof. Dr. med. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Februar 2003

Die Promovendin ist Ärztin im Praktikum.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Nierenzellkarzinom.....	1
1.1.1	Allgemeines.....	1
1.1.2	Therapie.....	1
1.1.3	Prognosestellung.....	3
1.2	IL-4 und IL-4-Rezeptor.....	4
1.3	Fragestellung.....	5
2	Material und Methoden.....	7
2.1	Tumormaterial.....	7
2.1.1	Herkunft.....	7
2.1.2	Stadieneinteilung und Malignitätsgrad.....	7
2.1.3	Datenerhebung.....	7
2.2	Herstellung immunhistochemisch gefärbter Schnitte.....	8
2.2.1	Antikörper.....	8
2.2.2	APAAP-Methode (Alkalische-Phosphatase).....	9
2.2.3	Material und Färbetechnik.....	9
2.3	Auswertung der Schnitte.....	11
2.4	Statistische Analyse.....	11
3	Ergebnisse.....	13

3.1	Expression von IL-4Rα im untersuchten Tumormaterial.....	13
3.2	Statistische Auswertung.....	17
3.2.1	Mittelwert, Median und Streuung.....	17
3.2.2	Univariate Prognoseanalyse	17
3.2.3	Bivariate Analyse	25
4	Diskussion	27
5	Zusammenfassung.....	32
6	Abkürzungsverzeichnis	33
7	Literaturverzeichnis	35

1 Einleitung

1.1 Das Nierenzellkarzinom

1.1.1 Allgemeines

Das Nierenzellkarzinom ist ein maligner Tumor des Erwachsenenalters, der von den Epithelzellen der Tubuli und Sammelrohre ausgeht, verdrängend gegen das umliegende Gewebe wächst und eine starke Tendenz zu lymphogener und hämatogener Metastasierung zeigt. Es wächst solide oder zystisch, aber auch azinär oder tubulopapillär, und neigt zu Einblutungen, Nekrosen und Verkalkungen. Von den verschiedenen Typen des Nierenzellkarzinoms ist mit 80 % der klarzellige Typ der häufigste. Metastasen treten bevorzugt in Lunge, Leber, Knochen und ZNS auf.

Das Nierenzellkarzinom macht etwa 3 % aller malignen Erkrankungen des Erwachsenen aus mit einem Häufigkeitsgipfel zwischen dem 40. und 60. Lebensjahr. Männer sind zweimal häufiger betroffen als Frauen. Als prädisponierende Faktoren gelten starker Zigarettenkonsum und Schmerzmittelabusus. Ein eindeutiges Karzinogen konnte jedoch bisher nicht ermittelt werden. Familiäre Häufungen treten auf und ebenso eine erhöhte Inzidenz bei der seltenen v. Hippel-Lindau-Krankheit und der Polyzystischen Nierenerkrankung (**Beldegrun und deKernion, 1989**). Symptome treten beim Nierenzellkarzinom erst spät auf. Die klassische Trias Hämaturie, Flankenschmerz und palpabler Tumor zeigt sich nur in etwa 5-10 % der Fälle und ist dann Zeichen einer schon fortgeschrittenen Krankheit (**Heidbreder und Hofmockel, 1994**). Häufig macht sich die Erkrankung erst durch symptomatisch gewordene Metastasen oder paraneoplastische Syndrome wie Hyperkalzämie und Bluthochdruck bemerkbar.

1.1.2 Therapie

Therapeutisch hat sich beim nicht-metastasierten Nierenzellkarzinom allein die radikale Tumornephrektomie mit kompletter Entfernung von Niere, Nebenniere, Fettkapsel und Gerota'scher Faszie bewährt. Bei sehr kleinen lokalisierten Karzinomen kann auch der Versuch einer organerhaltenden Tumorsektion unternommen werden. Aufgrund seiner

Strahlenunempfindlichkeit und Resistenz gegen Zytostatika (Multiple Drug Resistance) gibt es bis heute keine effektive Therapie bei bereits metastasiertem Tumorleiden. In einem Teil der Fälle mit geringer Weichteilmetastasierung scheint eine adjuvante Immuntherapie den Krankheitsverlauf günstig zu beeinflussen. Es kommen dabei Interferone und IL-2 sowie Zytostatika (z. B. 5-Fluorouracil) zum Einsatz. Eine Heilung wird dadurch jedoch nicht erreicht. Neueste Therapieansätze basieren ebenfalls auf einer Stimulation des Immunsystems, wobei durch Vaccination mit einer Zellhybride aus Tumorantigenen und dendritischen Zellen eine tumorspezifische Abwehrreaktion durch zytotoxische T-Zellen induziert wird (Kugler et al., 2000).

Stadium	Robson (1969)	TNM (UICC, 1997)
I	Tumor auf das Nierenparenchym beschränkt	Tumor \leq 7 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere
II	Tumorausdehnung in den Perirenalraum	Tumor $>$ 7 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere
III	a) Einbruch in Nierenvene oder Vena cava b) Befall regionärer Lymphknoten c) Einbruch in lokale Gefäße und regionäre Lymphknoten	a) Tumorausdehnung in perirenales Gewebe, nicht über die Gerota-Faszie hinaus b) makroskopischer Tumor in Nierenvene/V.cava unterhalb des Zwerchfells c) makroskopischer Tumor in V.cava oberhalb des Zwerchfells
IV	a) Ausbreitung in Nachbarorgane b) Fernmetastasen	Tumor infiltrierte über die Gerota'sche Faszie hinaus

Tabelle 1: Gegenüberstellung der Stadieneinteilungen des Nierenzellkarzinoms nach Robson und TNM-System.

1.1.3 Prognosestellung

Die Prognose der Patienten mit Nierenzellkarzinom hängt von verschiedenen Faktoren ab wie Tumorstadium (s. Tab.1), Malignitätsgrad und Therapie. Beim lokalisierten Tumor im Stadium I nach Robson beträgt die Fünf-Jahres-Überlebensrate 75 %, wobei sie im Stadium IV auf 11 % absinkt (**Guinan et al, 1995**).

Um jedoch dem individuellen Krankheitsverlauf, der trotz gleichen Tumorstadiums und Malignitätsgrades sehr unterschiedlich sein kann, sowohl bei der Prognosestellung als auch bei der Wahl der Therapie gerecht zu werden, ist man auf der Suche nach neuen Bewertungsfaktoren. Viele verschiedene prognostische Parameter ermöglichen es, den klinischen Verlauf der Erkrankung präziser vorherzusagen zu können und Hochrisikopatienten herauszufiltern, die eventuell von einer intensiven adjuvanten Therapie profitieren würden.

So konnte z.B. für die Infiltration der Nierenvenen (**Usubutun et al., 1998**) keine prognostische Aussagekraft nachgewiesen werden, während der DNS-Gehalt der Tumorzellen (**Rainwater et al., 1991; Ljungberg et al., 1991; Di Silverio et al., 2000**), Mikroangiogenese (**Van Poppel et al., 1997; Yoshino et al., 1998**), Erythrozytensedimentationsrate (**Jakobsen et al., 1994; Hoffmann et al., 1999**), CRP (**Masuda et al., 1998; Hoffmann et al., 1999**) MNV (=Mean Nuclear Volume; **Soda et al., 1999**), IL-6 Serumlevel (**Ljungberg et al., 1997**) und IL-2R Serumlevel (**Matsumoto et al., 1998**) signifikant mit dem Überleben der Patienten korrelieren.

Neuere Studien befassen sich vor allem mit zytogenetischen und molekularbiologischen Veränderungen und deren möglichen Zusammenhang mit dem Tumorgeschehen. CD44 (**Paradis et al., 1999; Gilcrease et al., 1999**), PCNA (=proliferating cell nuclear antigen; **Gotoh et al., 1998**), IL-6R (**Costes et al., 1997**), der Proliferationsmarker Ki-67 (**Hofmockel et al. 1995; Rioux-Leclercq et al., 2000**) und EGF-r (=epidermal growth factor receptor; **Sakamoto et al., 1997; Moch et al., 1997**) sind Oberflächenmoleküle, die als potentielle Prognosefaktoren ermittelt werden konnten. Eine erhöhte Expression von zytoplasmatischem VEGF (=vascular endothelial growth

factor) scheint mit einer schlechten Prognose der Patienten zu korrelieren (**Paradis et al., 2000**). Die Expression von p-53 weist dagegen keinerlei prognostischen Wert auf (**Gelb et al., 1997**). Verschiedene Chromosomenabberationen wurden beschrieben und teilweise konnten Korrelationen mit dem Tumorstadium und dem Malignitätsgrad festgestellt werden (**Schullerus et al., 1997; Beroud et al., 1996**).

1.2 IL-4 und IL-4-Rezeptor

IL-4 ist ein Cytokin, das im Bereich des Immunsystems, speziell in der Parasitenabwehr und Allergieentstehung, vielfältige Funktionen erfüllt (**Chomarat et al., 1998; Nelms et al., 1999**).

Es ist für seine Fähigkeit zur Induktion von allergiespezifischem IgE bekannt. Es fördert die Reifung von eosinophilen Granulozyten und, durch vermehrte Expression von VCAM-1 auf Endothelzellen, deren Adhäsion und Immigration. Durch vermehrte Ausschüttung von Chemokinen werden die Immunzellen an den Ort des Geschehens gelockt. Daneben stimuliert IL-4 in T-Helferzellen seine eigene Synthese sowie die von IL-5, IL-6 und anderen Zytokinen und führt zur Differenzierung von Th2-Zellen. Becherzellen werden durch IL-4 zu vermehrter Schleimbildung angeregt. Der entzündungshemmende Effekt von IL-4 beruht auf einer verminderten Produktion von IL-1, TNF α und NO. Die zelluläre Immunreaktion wird durch eine Hemmung der INF γ -Synthese unterdrückt. Die Aktivierung von Makrophagen wird gezielt abgeschwächt. Unter dem Einfluß von IL-4 wurden auch verschiedenste Veränderungen an Fibroblasten, Epithelzellen und Hepatozyten beobachtet.

IL-4R gehört zur Familie der Cytokin-Rezeptoren. Es gibt zwei Typen von IL-4 Rezeptoren. Sie setzen sich aus jeweils zwei Untereinheiten zusammen, die ein Heterodimer bilden. Beide Rezeptortypen enthalten IL-4R α , ein 140 kDa Protein mit einer hohen Affinität für IL-4. Beim Typ-I Rezeptor bildet γ c (=common gamma), eine Untereinheit des IL-2 Rezeptors, den zweiten Teil von IL-4R, beim Typ-II Rezeptor das IL-13R α Protein, das auch Teil des IL-13 Rezeptors ist. Dieser Umstand erklärt die Kreuzreaktivität von IL-4 und IL-13 am Typ-II Rezeptor. Bemerkenswert ist, daß jedes bisher untersuchte Gewebe des menschlichen Körpers IL-4 Rezeptoren exprimiert,

wobei sich eine unterschiedliche Verteilung der verschiedenen Rezeptortypen erkennen läßt. So findet man auf T-Zellen ausschließlich Typ-I Rezeptoren, wogegen feste Gewebe bevorzugt den Typ-II Rezeptor exprimieren. Nach Bindung des Liganden an seinen Rezeptor assoziieren Protein-Tyrosinkinasen aus der JAK-Familie mit der intrazellulären Domäne des Rezeptors und werden dadurch aktiviert. JAK-Kinasen aktivieren ihrerseits Transkriptionsfaktoren vom STAT-Typ durch Phosphorylierung, die dadurch vom Cytosol in den Kern wandern, an Promotorsequenzen binden und die Transkription aktivieren. Es gibt noch weitere Signalkaskaden zur Übermittlung der IL-4 Funktionen, die bislang jedoch eine eher untergeordnete Rolle spielen.

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten in den letzten Jahren eine starke antiproliferative Wirkung von IL-4 auf Malignomzellen nachweisen. So wurden in vitro Versuche an Lungentumoren (**Topp et al., 1993**), am Kolonkarzinom (**Lahm et al., 1994**), am Magenkarzinom (**Morisaki et al., 1992**), am Nierenzellkarzinom (**Obiri et al., 1993**) und vielen anderen malignen Tumoren durchgeführt. Zum Teil wurde dieser Effekt auf die Aktivierung des Immunsystems durch IL-4 zurückgeführt (**Tepper et al., 1992**). Es wird jedoch angenommen, daß IL-4 auch eine direkte antiproliferative Wirkung besitzt. Diese Erkenntnisse eröffneten neue Perspektiven in der Tumorthherapie. An verschiedenen Tumoren ließen sich funktionstüchtige IL-4 Rezeptoren nachweisen, z.B. am Nierenzellkarzinom (**Obiri et al., 1993**), am nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (**Tungekar et al., 1991**), am Melanom, Ovarial- und Mammakarzinom (**Obiri et al., 1994**). Erste Phase II Studien mit rekombinantem humanen IL-4 wurden bei Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom unternommen (**Stadler et al., 1995**; **Margolin et al., 1994**), erbrachten jedoch keine befriedigenden Ergebnisse. Auch der Versuch, etablierte Immunstimulantien, z.B. IL-2 und Interferone mit IL-4 zu kombinieren, zeigte gegenüber der herkömmlichen Therapie keine Vorteile.

1.3 Fragestellung

In zahlreichen Untersuchungen konnten auf in vitro kultivierten Zellen von Nierenzellkarzinomen funktionelle Interleukin-4 Rezeptoren nachgewiesen werden (**Obiri et al., 1993**). Unklar ist bislang, ob und inwiefern dadurch das biologische Verhalten des Tumors beeinflußt wird.

Könnten Unterschiede in der Expression von IL-4R α auf Zellen des Nierenzellkarzinoms möglicherweise mit einem unterschiedlichen Wachstums- oder Metastasierungsverhalten in Zusammenhang stehen oder ist es ohne Bedeutung für die Entwicklung der Krankheit, ob viel oder wenig IL-4 Rezeptoren auf den Tumorzellen vorhanden sind?

Ziel dieser Arbeit ist es deshalb, die Expression von IL-4R α im nicht-metastasierten Nierenzellkarzinom auf einen möglichen Zusammenhang zum postoperativen Krankheitsverlauf der Patienten zu überprüfen und festzustellen, ob der Rezeptor möglicherweise zur Verbesserung der Prognosestellung beitragen könnte.

Gleichzeitig böte der Nachweis funktionsfähiger IL-4 Rezeptoren auf Zellen des Nierenzellkarzinoms einen Ansatz für weitergehende Forschung hinsichtlich neuer Therapiemöglichkeiten, wobei IL-4 beispielsweise als Transporter für bestimmte Chemotherapeutika dienen könnte.

2 Material und Methoden

2.1 Tumormaterial

2.1.1 Herkunft

Bei dem verwendeten Material handelt es sich um Präparate von ausschließlich klarzelligen Nierenzellkarzinomen, die im Zeitraum von Februar 1985 bis Dezember 1994 an der Urologischen Universitätsklinik Würzburg durch Tumornephrektomie gewonnen wurden.

Es gingen 198 Patienten (119 Männer und 79 Frauen) mit einem Durchschnittsalter von 59,4 Jahren (Minimum=29 Jahre, Maximum=83 Jahre) in die Studie ein. Bei diesen Patienten wurden durch präoperatives Staging Lymphknoten- und Fernmetastasen ausgeschlossen.

2.1.2 Stadieneinteilung und Malignitätsgrad

Die klinische Stadieneinteilung der Tumoren erfolgte nach der internationalen TNM-Klassifikation. Bei 142 Patienten konnte ein auf die Niere beschränkter Tumor festgestellt werden (19 Patienten im Stadium 1, 123 Patienten im Stadium 2), die anderen 56 Patienten wiesen bereits eine Tumordinfiltration des perirenal Gewebes oder einen makroskopisch sichtbaren Veneneinbruch auf (Stadium 3a+b).

Die Bestimmung des Malignitätsgrades erfolgte entsprechend der Richtlinien der WHO, wobei 18 Tumoren als hochdifferenziert (Grad 1), 158 Tumoren als mäßig differenziert (Grad 2) und 22 Tumoren als undifferenziert (Grad 3) eingestuft wurden. Die histopathologische Untersuchung der Tumoren erfolgte am Pathologischen Institut der Universität Würzburg.

2.1.3 Datenerhebung

In dieser Studie wurde nun der postoperative Krankheitsverlauf der Patienten hinsichtlich rezidivfreier Zeit und Überlebenszeit vom Zeitpunkt der Operation an untersucht. Auch Patienten, die zur Tumornachsorge nicht in die Urologische

Universitätsklinik Würzburg kamen, wurden durch Fragebögen an den jeweiligen Hausarzt oder niedergelassenen Urologen erfaßt. Rezidivfreiheit bedeutet, daß weder ein Tumorrezidiv noch Metastasen aufgetreten sind. Der Tod eines Patienten wurde nur dann auf das Nierenzellkarzinom zurückgeführt, wenn vorher entweder ein Rezidiv oder Metastasen aufgetreten waren.

Die mittlere Beobachtungsdauer betrug 5,0 Jahre. Bis April 1997 erlitten 30 Patienten ein Rezidiv, 19 Patienten verstarben daran. Weitere 13 Patienten verstarben im gleichen Zeitraum an einer anderen Ursache.

2.2 Herstellung immunhistochemisch gefärbter Schnitte

2.2.1 Antikörper

Gundlage der immunhistochemischen Färbung histologischer Schnitte ist die Bindung spezifischer Antikörper an ihre antigene Determinante. Es werden polyklonale und monoklonale Antikörper unterschieden. Zur Herstellung polyklonaler Antikörper wird bevorzugt das Kaninchen verwendet. Diese Antikörper entstammen verschiedenen B-Lymphozyten und sind daher gegen verschiedene Epitope des Antigens gerichtet. Sie weisen außerdem eine unterschiedlich hohe Affinität für dieselbe antigene Determinante auf. Monoklonale Antikörper werden von Plasmazellklonen gebildet, zu deren Herstellung fast ausschließlich Mäuse herangezogen werden. Sie reagieren nur mit einem spezifischen Epitop des Antigens, gegen das sie gerichtet sind, und besitzen eine einheitliche Affinität. Monoklonale Antikörper besitzen gegenüber ihren polyklonalen Äquivalenten den Vorteil einer höheren Spezifität, Qualitätskonstanz und geringerer Hintergrundfärbung. Andererseits sind sie in der Anwendung nicht so flexibel wie polyklonale Antikörper. Sie können häufig nur mit den speziellen Färbemethoden angewandt werden, für die sie produziert wurden. Desweiteren kann es vorkommen, daß das spezifische Epitop dem Fixierungsvorgang nicht standhält und dadurch keine Anfärbung mehr möglich ist. Sollte das gesuchte Epitop bei verschiedenen Antigenen zu finden sein, kann es außerdem zu Kreuzreaktionen kommen und der Vorteil der hohen Spezifität dadurch verloren gehen (Naish, 1989).

2.2.2 APAAP-Methode (Alkalische-Phosphatase)

Um den an sein Antigen gebundenen Primärantikörper sichtbar zu machen, wird nun ein geeignetes Enzym-Substrat-System gewählt. In der vorliegenden Studie wurde die APAAP-Methode verwendet. Sie bietet gegenüber anderen Methoden, z.B. der PAP-Methode den Vorteil, daß das Ergebnis aufgrund der geringen intrinsischen Alkalische-Phosphatase-Aktivität der Niere kaum verfälscht wird.

Das APAAP-Reagenz besteht aus gelösten Immunkomplexen aus Alkalischer-Phosphatase und Anti-Alkalische-Phosphatase-Antikörpern.

Nach Bindung des monoklonalen Primärantikörpers an sein Antigen werden die histologischen Schnitte mit einem polyklonalen Brückenantikörper (Link oder Sekundärantikörper) gegen Maus-IgG inkubiert. Dieser Brückenantikörper reagiert sowohl mit dem Primärantikörper als auch mit dem APAAP-Immunkomplex und verbindet sie somit.

Danach wird mit einem Substrat-Chromogen-Reagenz inkubiert. Die Alkalische Phosphatase hydrolysiert das Substrat, ein Naphtholphosphatester, zu Phenolen und Phosphaten. Die Phenole reagieren mit farblosen Diazoniumsalzen (Chromogene) und bilden so unlösliche Azofarbstoffe. Als Chromogen diente in dieser Studie Neufuchsin, welches markiertem Gewebe eine intensive Rotfärbung verleiht (**Naish, 1989**).

2.2.3 Material und Färbetechnik

Monoklonale anti-IL-4R α -Antikörper (Klon A3/10) als freundliche Leihgabe von Herrn Priv. Doz. Dr. Duschl, Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften (Biozentrum), Am Hubland, Universität Würzburg

Link-Antikörper, APAAP-Komplex, Neufuchsin Fertigkit und Glyceringelatine von der Firma DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg

Tris-Puffer:	Trishydroxymethylaminomethan	4,50 g
	Tris-HCl	34,25 g
	NaCl	43,90 g
	Aqua dest. Ad	5.0 l

pH auf 7,5 +/-0,1 einstellen

RPMI-Medium: RPMI (Seromed Biochrom KG, Berlin)	5 ml
Aqua dest.	45 ml
Rinderserum	5 ml

Aus dem formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Tumormaterial wurden zunächst 5µm dicke Schnitte angefertigt, auf Objektträger aufgebracht und durch jeweils 15minütiges Bad in Xylol, Aceton und Aceton/Tris-Puffer-Gemisch (1:2) entparaffiniert. Nach gründlichem Spülen mit Tris-Puffer wurden die Schnitte in 10 mM Citronensäure-Lösung (pH=6) 30 Minuten im Autoklav (P=1 bar, T=121°C) gekocht, um eventuelle Paraffinrückstände restlos von den Antigenstellen zu entfernen. Bevor mit der Färbung begonnen werden konnte, mußten die Schnitte mindestens 25 Minuten im Citronensäurebad abkühlen und danach noch einmal mit Tris-Puffer gespült werden.

Als ersten Färbeschritt wurden die Präparate mit einer Verdünnung aus Primärantikörper und RPMI-Medium von 1:160 für 60 Minuten inkubiert und danach gründlich mit Tris-Puffer gespült. Diese Spülung erfolgte nach jedem einzelnen Färbeschritt und wird im Folgenden nicht mehr erwähnt. Darauf erfolgte eine 30minütige Inkubation mit einer 1:25-Verdünnung aus Brückenantikörper und einem Gemisch aus Humanserum und RPMI-Medium (1:8). Danach wurde ebenfalls für 30 Minuten mit einer 1:50-Verdünnung aus APAAP-Komplex und RPMI-Medium inkubiert. Die beiden zuletzt genannten Färbeschritte wurden mit einer Einwirkzeit von jeweils 15 Minuten wiederholt. Nach mehrmaligem gründlichen Spülen mit Tris-Puffer mußte nun der Neurofuchsin-Kit zügig aufgetragen und nach einer kurzen Inkubationszeit von 5 Minuten wieder mit Tris-Puffer abgespült werden. Danach wurden die Präparate mit Hämalaun gegengefärbt (3 Minuten) und in wasserlöslicher Glyceringelatine eingedeckt. Sämtliche Färbeschritte erfolgten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer.

Bei jeder Färbung liefen zwei Kontrollen mit: bei der Negativ-Kontrolle wurde der erste Färbeschritt mit dem Primärantikörper ausgelassen, wobei es daraufhin zu keiner Rotfärbung des Präparates kommen durfte; bei der Positiv-Kontrolle wurde als Primärantikörper ein monoklonaler Antikörper gegen PCNA (Proliferation Cell Nuklear

Antigen; Klon PC10, Medac Diagnostika GmbH, Hamburg; PCNA:RPMI-Medium=1:20) verwendet, wobei hier nur Zellkerne angefärbt werden sollten.

2.3 Auswertung der Schnitte

Die Auswertung der Schnitte erfolgte am Lichtmikroskop mit 250-facher Vergrößerung (Okular: 10x, Objektiv: 25x). Ein in das Objektiv eingelegtes Raster mit 100 Schnittpunkten erlaubte die Bestimmung des Verhältnisses von gefärbten Tumorzellen zur Gesamtzahl der gezählten Tumorzellen in Prozent. Die Auszählung der Tumorzellen erfolgte je Präparat in zwei zufällig ausgewählten Tumorarealen. Das Objektiv wurde meanderförmig über das jeweilige Tumorareal geführt, wobei 25 Gesichtsfelder pro Tumorareal, d.h. 50 Gesichtsfelder pro Präparat ausgezählt wurden.

2.4 Statistische Analyse

Die Ergebnisse der Auszählung wurden mittels statistischer Tests auf eine mögliche signifikante Korrelation zur Prognose der Patienten untersucht. Als Maß für die Prognose und damit abhängige Variablen dienten die Überlebenszeit und die rezidivfreie Zeit, jeweils gemessen vom Zeitpunkt der Tumornephrektomie. Die statistischen Berechnungen wurden für beide Variablen getrennt durchgeführt.

Als unabhängige Variablen wählten wir neben dem potentiellen Prognosefaktor IL-4R die etablierten Prognostikatoren TNM-Stadium und Malignitätsgrad. Einerseits konnten wir durch die univariate Analyse dieser beiden Faktoren zeigen, daß es sich bei dem untersuchten Tumormaterial um einen repräsentativen Querschnitt handelt. Des Weiteren dienten sie in der bivariaten Analyse der näheren Untersuchung des fraglichen Prognosefaktors IL-4R.

Unter Verwendung der Überlebensraten nach Kaplan-Meier wurde zunächst mit log-rank Tests (paarweiser Gruppenvergleich nach Cox; **Peto und Pike, 1973**) und Tests auf einen Trend in Gruppen nach Tarone (**Tarone, 1975**) jede einzelne Variable hinsichtlich ihrer Bedeutung für Überlebenszeit und rezidivfreie Zeit untersucht. Dann

wurden mittels Kendall's tau-Korrelation und Chi-Quadrat Test die unabhängigen Variablen paarweise auf eine mögliche Abhängigkeit untereinander untersucht.

Aufgrund der dadurch gewonnenen Ergebnisse mußte auf eine multivariate Prognoseanalyse verzichtet werden.

3 Ergebnisse

3.1 Expression von IL-4R α im untersuchten Tumormaterial

186 von den 198 ausgewerteten Tumoren waren IL-4R α positiv, 12 Tumore zeigten keinerlei Anfärbung. Die Werte der IL-4R α positiven Schnitte lagen zwischen 0,1 % und 92,9 %.

95 % der ausgezählten Schnitte ergaben IL-4R α Werte unter 64,58 %. Die Hälfte der Schnitte lag bei Werten unter 6,65 % (=Median).

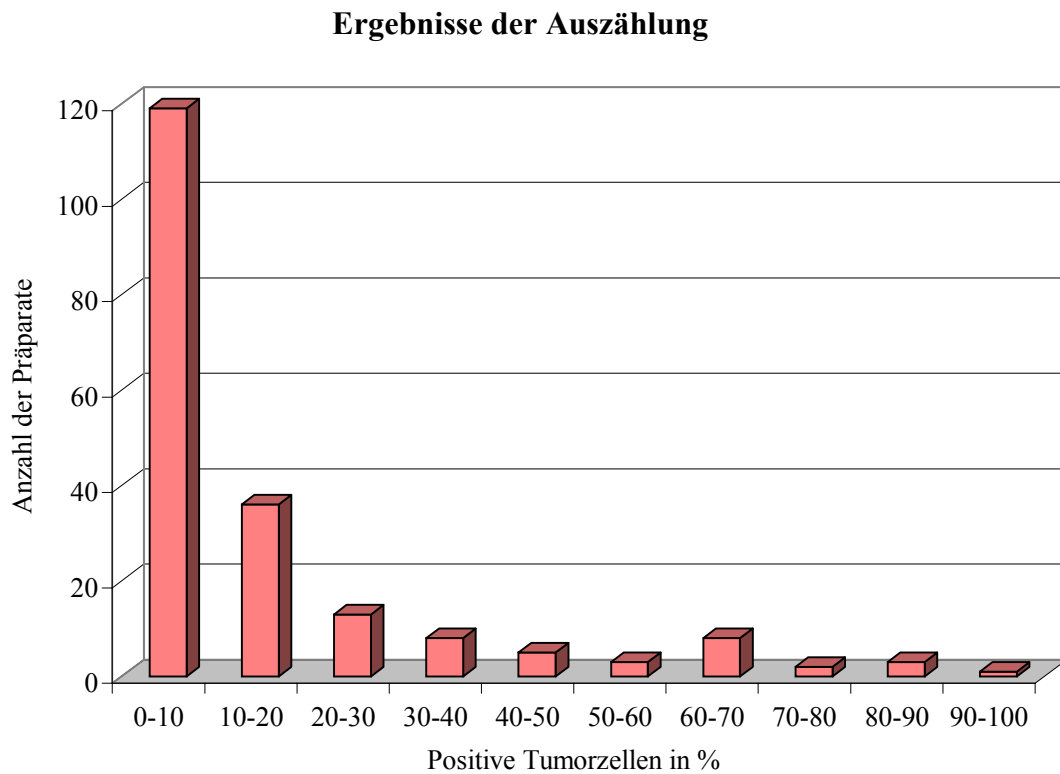


Abb.1): Die Ergebnisse der Auszählung.

Die nun folgenden Abbildungen einiger ausgewählter Schnitte (Abb. 1-5) sollen veranschaulichen, wie das Tumormaterial nach Inkubation mit dem anti-IL-4R α -Antikörper durch die unterschiedliche Anfärbung ausgewertet werden konnte. Die fotografierten Ausschnitte mögen dabei nicht unbedingt repräsentativ für das Gesamtergebnis der jeweiligen Auszählung sein.

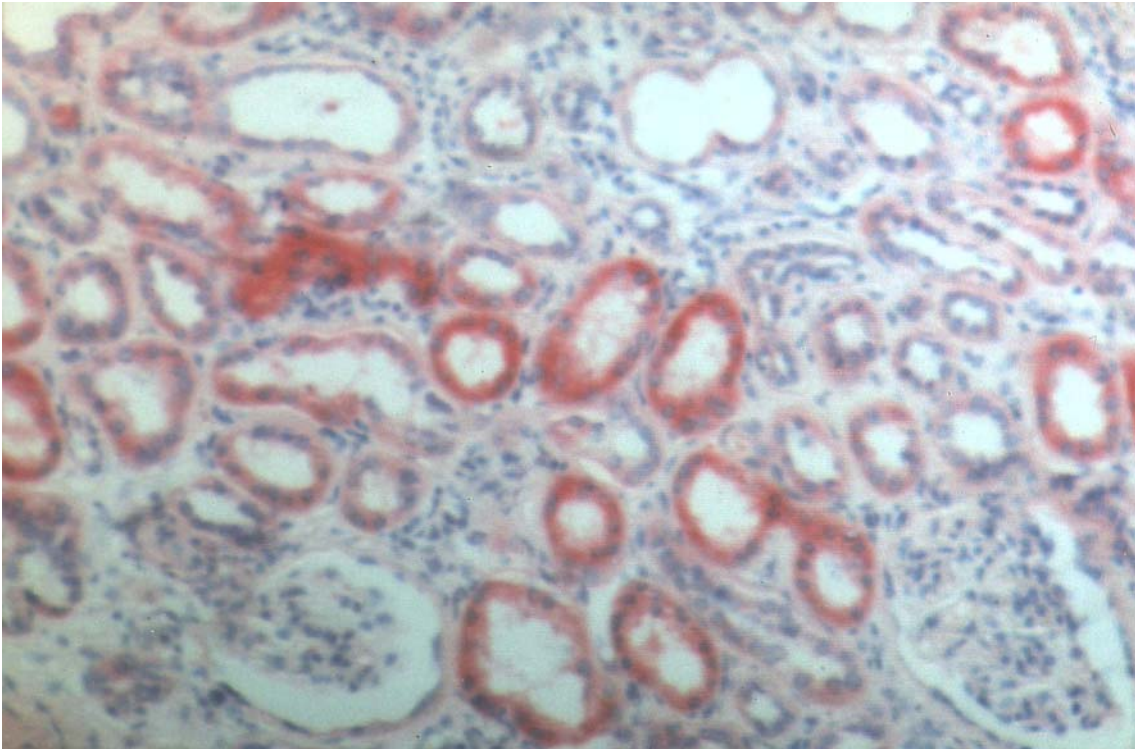


Abb. 2): Dieses Präparat zeigte v.a. eine starke Anfärbung im gesunden Gewebe (Vergrößerung 250-fach).

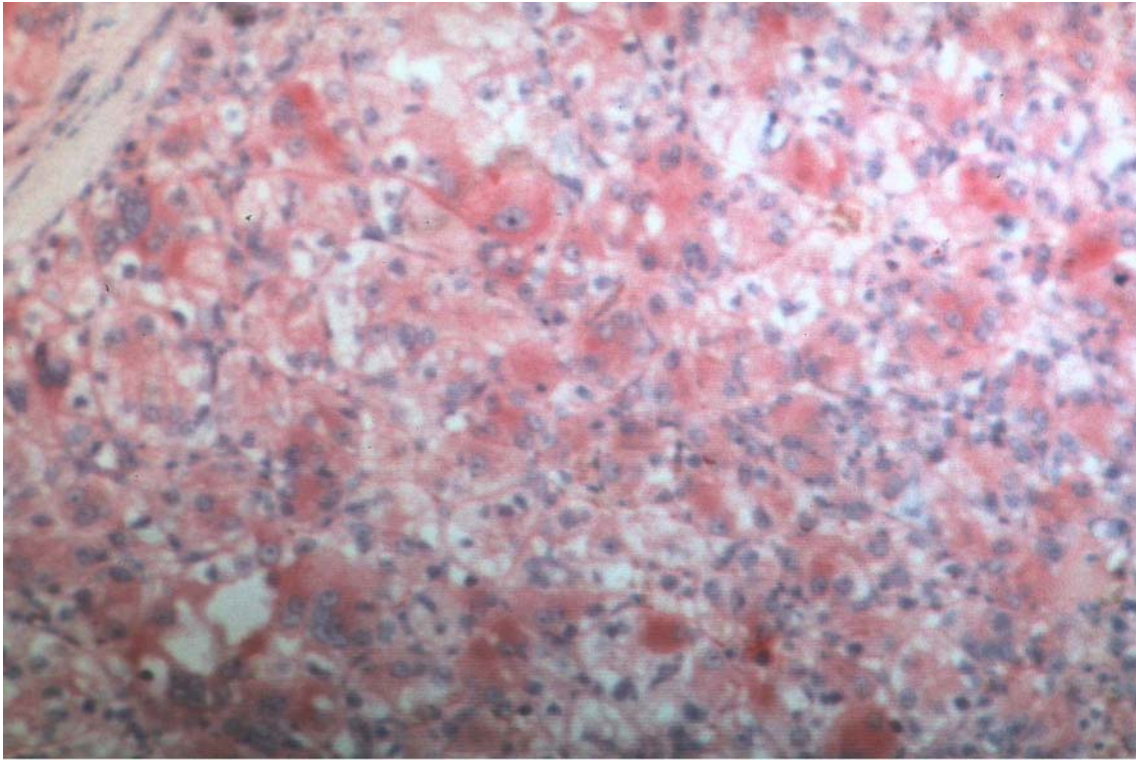


Abb. 3): Bei diesem Präparat wurden nur 4,8 % der Zellen als positiv gewertet
(Vergrößerung 250-fach)

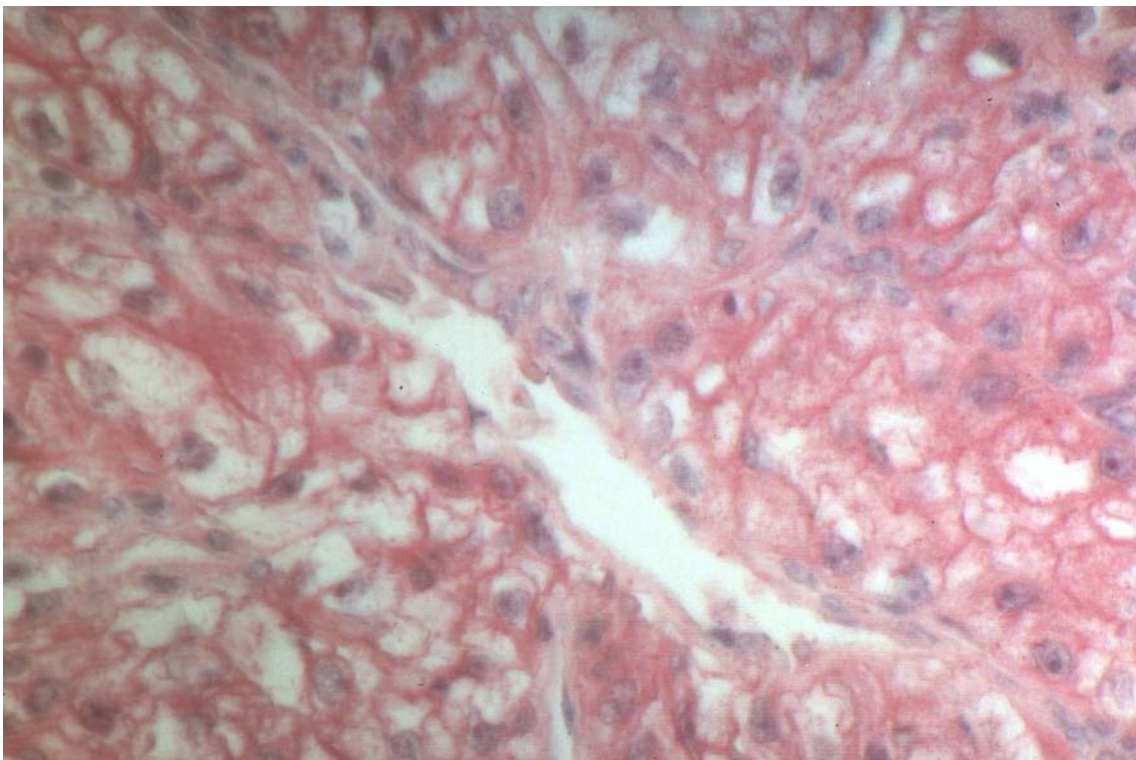


Abb. 4): Dieses Präparat ergab 23,0 % positive Tumorzellen (Vergr. 400-fach).

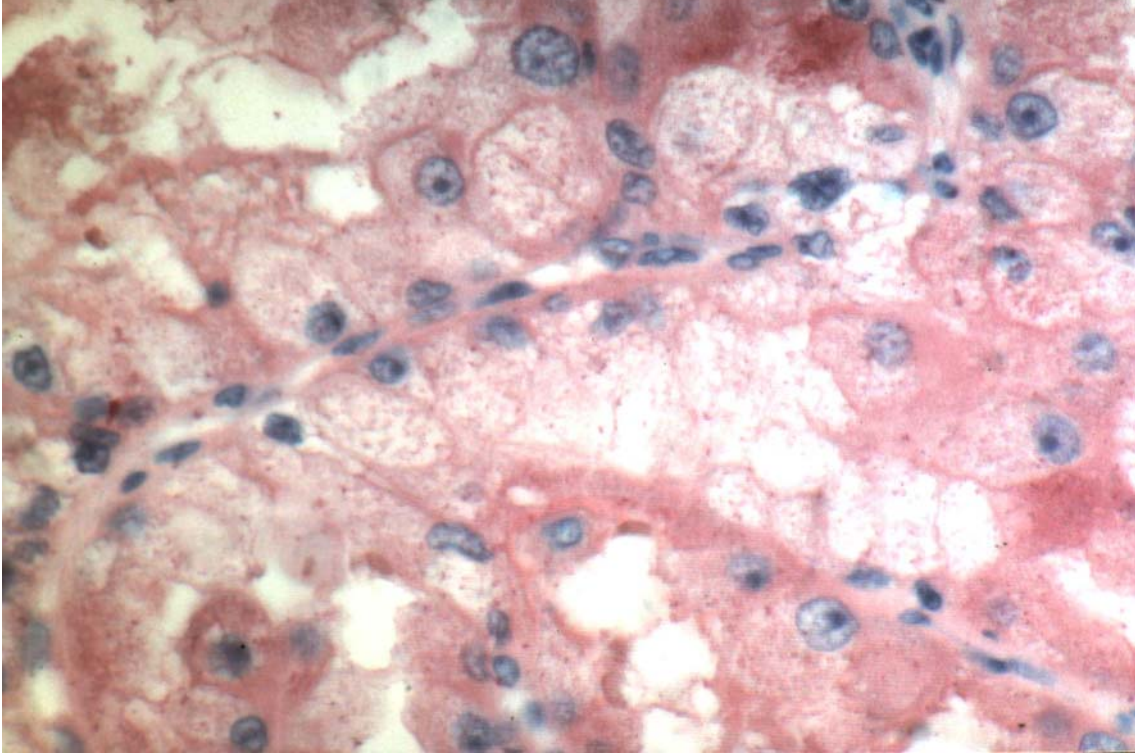


Abb.5): Bei diesem Präparat wurden 28 % der Tumorzellen als positiv gewertet (Vergrößerung 400-fach).

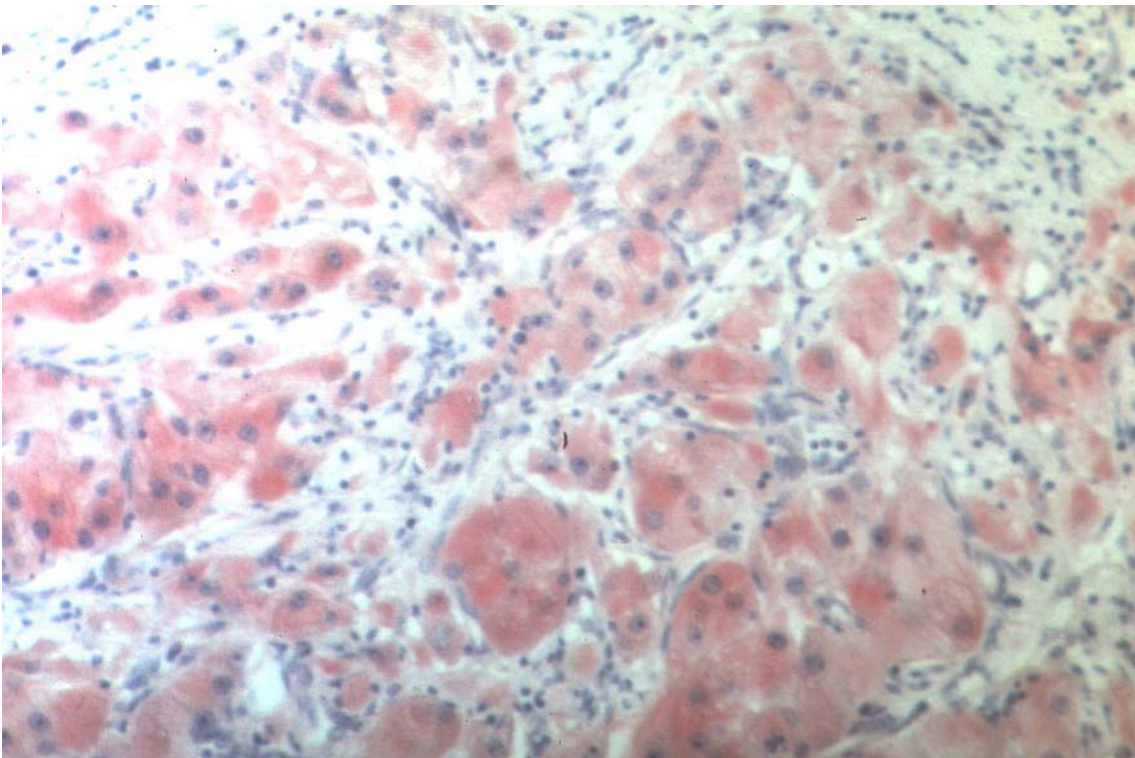


Abb. 6): Dieses Präparat ergab in der Gesamtauszahlung eine positive Anfärbung der Tumorzellen von 78,9 % (Vergrößerung 250-fach).

3.2 Statistische Auswertung

3.2.1 Mittelwert, Median und Streuung

Variable	Mittelwert (%)	Median (%)	Streuung (%)
IL-4R α	14,69	6,65	20,34

Tabelle 2: Für den untersuchten Parameter IL-4R wurden aus den 198 ermittelten Werten der Mittelwert, der Median und die Streuung berechnet.

3.2.2 Univariate Prognoseanalyse

In der univariaten Prognoseanalyse werden mittels statistischer Tests potentielle Prognosefaktoren unabhängig voneinander auf eine mögliche signifikante Korrelation zum postoperativen Krankheitsverlauf untersucht.

Zwei Testverfahren kommen dabei zur Anwendung. Wenn sich das Patientenkollektiv hinsichtlich des zu untersuchenden prognostischen Parameters in zwei Gruppen unterteilen läßt, benutzt man den paarweisen Gruppenvergleich nach Cox oder log-rank Test. Teilt sich das Patientenkollektiv in drei oder mehr Gruppen, wie das beispielsweise bei Tumorstadium und Malignitätsgrad der Fall ist, wird der Test auf einen Trend in den Gruppen nach Tarone angewandt. Beide Tests basieren auf dem Vergleich von Überlebensraten nach Kaplan-Meier, auch bekannt als „product limit method“ oder „life table analysis“. Dabei zeigt sich, ob eine starke bzw. schwache Ausprägung des prognostischen Merkmals mit einem schlechteren bzw. günstigeren Krankheitsverlauf einhergeht.

Um das Patientenkollektiv hinsichtlich der Expression von IL-4R α in zwei vergleichbare Gruppen zu teilen, bedienten wir uns der ROC („receiver operating characteristics“). Als Trennwert oder cutoff-point diente der Wert (9,0 %), bei dem Sensitivität und Spezifität sowohl im Hinblick auf Überleben als auch auf Rezidiv die geringste Differenz zeigten. Alternativ hätte auch der Median als Trennwert verwendet werden können.

Im Folgenden sind die Ergebnisse der univariaten Prognoseanalyse für Tumorstadium, Malignitätsgrad und IL-4R α bezüglich Überleben und Rezidiv zusammengestellt.

Variable	Gruppen-trennung	Anzahl der Fälle pro Gruppe	Überleben	Rezidiv
TNM-Stadium	I	19	p=0.0026	p=0.00001
	II	123		
	III	56		
Malignitätsgrad	I	18	p=0.0039	p=0.000018
	II	158		
	III	22		
IL-4R α	IL-4R α \leq 9,0 %	113	p=0.18	p=0.13
	IL-4R α $>$ 9,0 %	85		

Tabelle 3: Zusammenfassung der Ergebnisse der univariaten Überlebenstatistik. p ist die Irrtumswahrscheinlichkeit, mit der ein Zusammenhang zwischen zwei Variablen nur rein zufällig ist. Ein $p \leq 0.05$ bedeutet, daß der Zusammenhang signifikant ist.

TNM-Stadium

Erwartungsgemäß korreliert das TNM-Stadium in signifikanter Weise mit dem postoperativen Krankheitsverlauf, was sowohl das Überleben ($p=0.0026$) als auch die rezidivfreie Zeit ($p=0.00001$) der Patienten betrifft (siehe Abb. 7a) und 7b)). Nach dem Kaplan-Meier Schema ergab sich für Patienten mit einem Tumorstadium I eine Fünf-Jahres-Überlebensrate von 100 %. Die Überlebensrate von Patienten mit einem Tumorstadium II sank dagegen auf 95 %, die von Patienten mit einem Tumorstadium III auf nur 84 %. Ähnliche Ergebnisse erbrachte die Analyse der rezidivfreien Zeit. Nach fünf Jahren waren 100 % der Patienten mit einem Tumorstadium I, 92 % der Patienten mit einem Tumorstadium II und 70 % der Patienten mit einem Tumorstadium III ohne Rezidiv.

Überlebenszeit

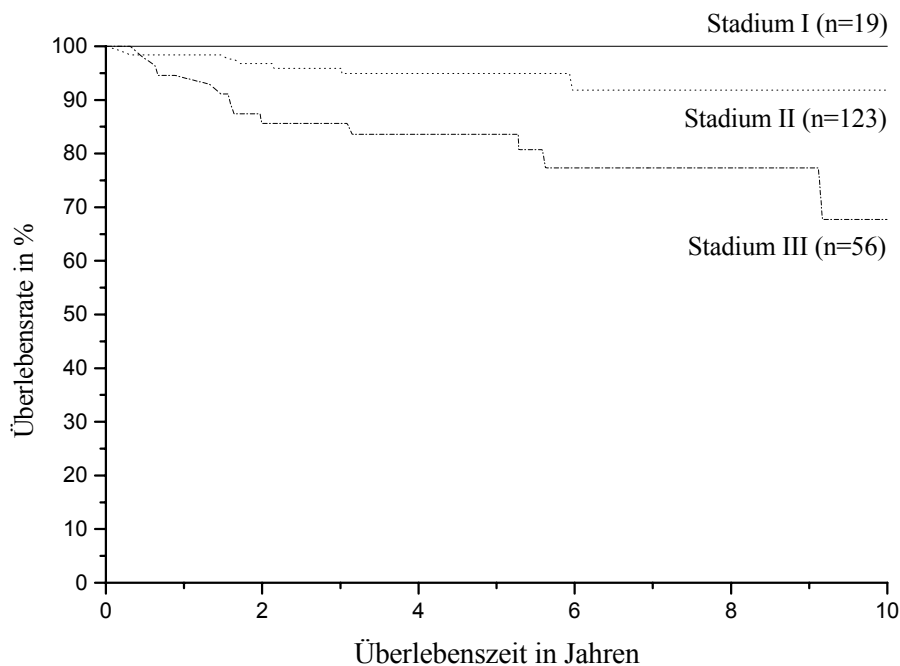


Abb. 7a): Univariate Prognoseanalyse des TNM-Stadiums in Bezug auf die Überlebenszeit.

Test nach Tarone: $p=0.0026$

Rezidivfreie Zeit

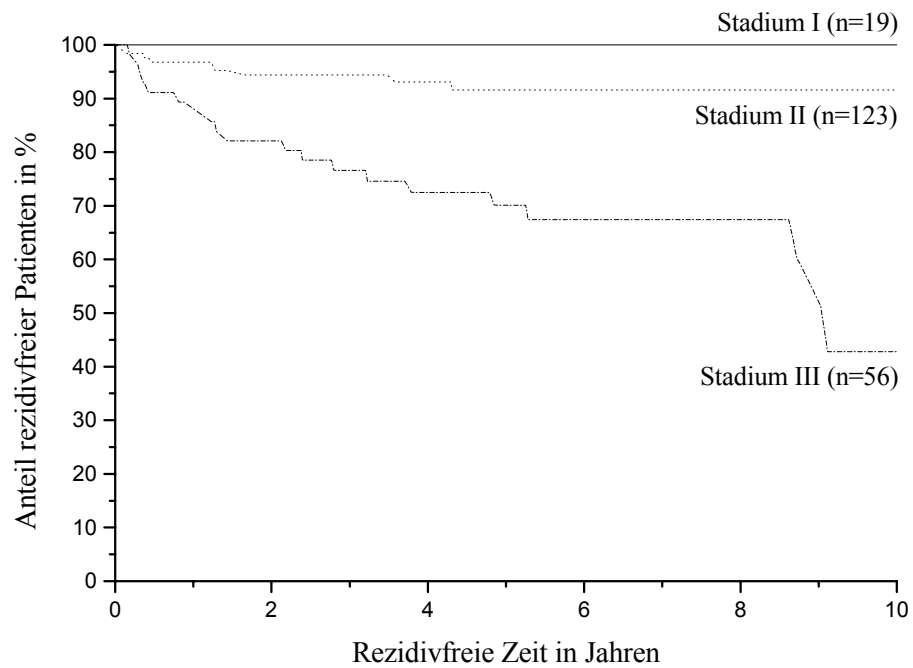


Abb. 7b): Univariate Prognoseanalyse des TNM-Stadiums in Bezug auf die rezidivfreie Zeit.

Test nach Tarone: $p=0.00001$

Malignitätsgrad

Auch der Malignitätsgrad der Karzinome zeigte eine signifikante Korrelation hinsichtlich Überleben ($p=0.0039$) und rezidivfreier Zeit ($p=0.000018$) (siehe Abb. 8a) und 8b)). Für Patienten mit einem Tumor Grad I ergab sich eine Fünf-Jahres-Überlebensrate von 94 %, 95 % für Patienten mit einem Tumor Grad II und 71 % für Patienten mit einem Tumor Grad III. Dieser Widerspruch löst sich auf, wenn man berücksichtigt, daß die Überlebensrate der Patienten mit Grad I Tumoren nach 10 Jahren noch 85 %, bei Patienten mit Grad II Tumoren jedoch nur noch 54 % betrug. 94 % der Patienten mit einem Tumor Grad I waren fünf Jahre nach der Operation rezidivfrei, wogegen diese Rate bei Patienten mit einem Tumor Grad II auf 90 % und bei Patienten mit einem Tumor Grad III auf nur 50 % absank.

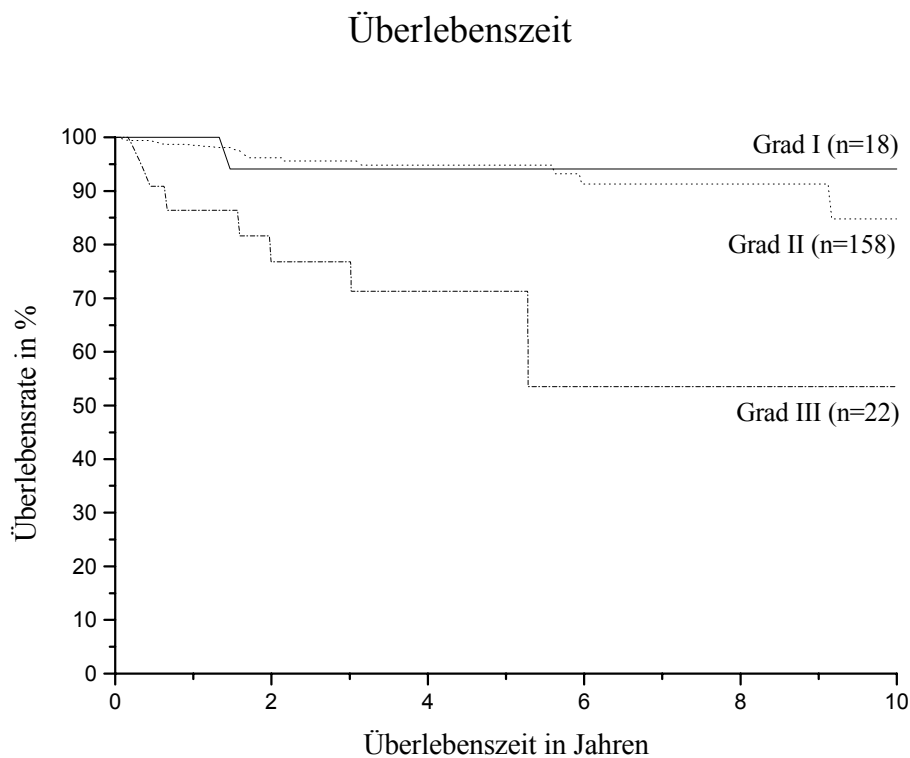


Abb. 8a): Univariate Prognoseanalyse des Malignitätsgrades in Bezug auf die Überlebenszeit.

Test nach Tarone: $p=0.0039$

Rezidivfreie Zeit

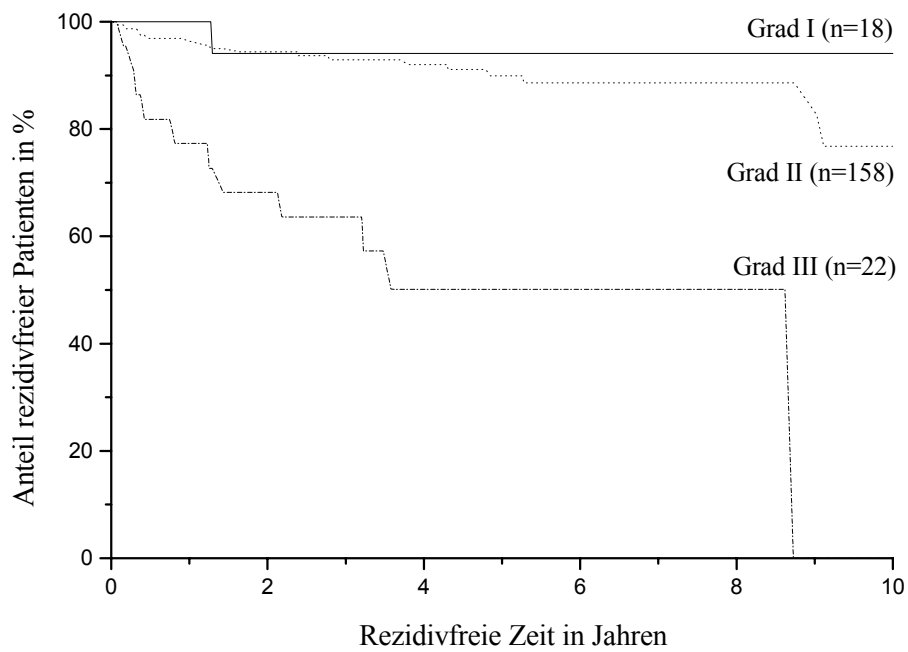


Abb. 8b): Univariate Prognoseanalyse des Malignitätsgrades in Bezug auf die rezidivfreie Zeit.

Test nach Tarone: $p=0.000018$

IL-4R α

Für die Menge der auf Zellen des Nierenzellkarzinoms exprimierten IL-4 Rezeptoren ergab sich kein Zusammenhang zum postoperativen Krankheitsverlauf.

Der Trennwert der beiden verglichenen Gruppen wurde mithilfe der ROC auf 9,0 % festgelegt. Zur statistischen Analyse wurde der log-rank Test verwendet. Sowohl hinsichtlich des Überlebens ($p=0.18$) als auch der rezidivfreien Zeit ($p=0.13$) konnte für IL-4R α statistisch keine signifikante Korrelation zur Prognose der Patienten ermittelt werden (siehe Abb. 9a) und 9b)).

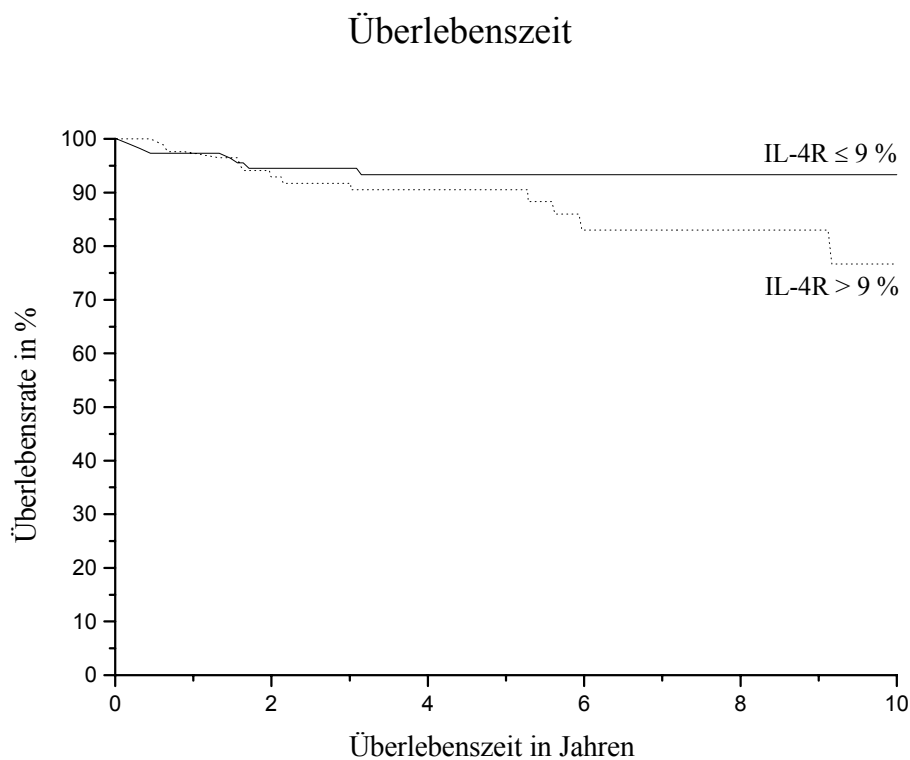


Abb. 9a): Univariate Prognoseanalyse von IL-4R α in Bezug auf die Überlebenszeit.
log-rank Test: $p=0.18$

Rezidivfreie Zeit

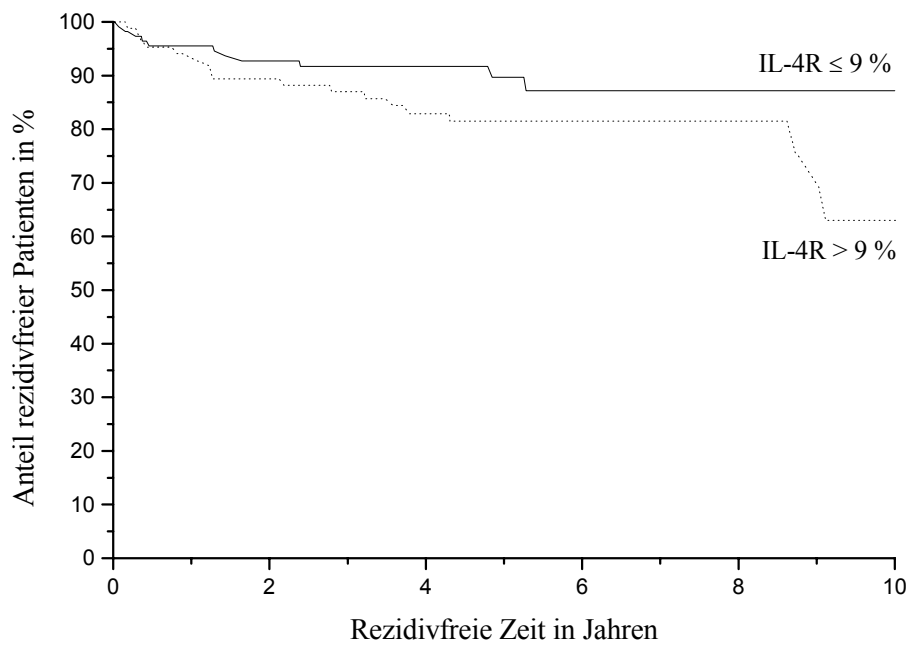


Abb. 9b): Univariate Prognoseanalyse von IL-4R α in Bezug auf die rezidivfreie Zeit.
log-rank Test: p=0.13

3.2.3 Bivariate Analyse

Während in der univariaten Analyse die Variablen einzeln auf ihre prognostische Aussagekraft hinsichtlich des postoperativen Krankheitsverlaufes untersucht werden, soll die bivariate Analyse mögliche Abhängigkeiten der Variablen untereinander aufdecken. Mittels statistischer Tests werden jeweils zwei Variablen zueinander in Beziehung gesetzt. Es wird der Grad der Abhängigkeit und dessen Signifikanz ermittelt, ohne daß dabei eine Aussage über Ursachen oder Auswirkungen dieser Abhängigkeit getroffen wird. Wenn eine statistisch signifikante Abhängigkeit besteht, bedeutet das, daß bei bekannten Werten einer Variablen auf die Werte der anderen Variablen geschlossen werden kann. Konsequenzen für die Prognose des Patienten ergeben sich daraus nicht.

Die vier gängigsten bivariaten Tests sind der Chi-Quadrat-Test (χ^2 -Test), der U-Test, der Wilcoxon-Test und die Korrelation.

Wir verwendeten den Chi-Quadrat-Test und die Tau-Korrelation nach Kendall.

Der Chi-Quadrat-Test eignet sich für die Korrelationsanalyse bei kategorialen Daten, d.h. Daten, die in mehrere Klassen aufgeteilt werden können. Er läßt sich aber auch auf ordinale Daten gut anwenden. Ordinale Daten sind Daten, die sich ordnen bzw. in eine Rangreihenfolge bringen lassen, z.B. Schweregrade.

Um den Grad des Zusammenhanges zwischen zwei Variablen zu ermitteln, wird der Kontingenzkoeffizient C ermittelt. Dieser kann einen Wert zwischen 0 und 1 annehmen, wobei ein von Null verschiedener Wert bedeutet, daß zwischen den Variablen ein Zusammenhang besteht. Ob dieser Zusammenhang signifikant ist oder nur rein zufällig besteht, ist aus dem absoluten Betrag von C aber nicht ersichtlich. Zur Signifikanzprüfung berechnen wir Chi-Quadrat. Wenn Chi-Quadrat größer oder gleich einem kritischen Vergleichswert ist, dann besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen den beiden Variablen. Auf detailliertere Erläuterungen zur Berechnung von χ^2 und Kontingenzkoeffizient C oder der Festlegung des Signifikanzniveaus p möchte ich verzichten, da sie den Rahmen dieser Arbeit sprengen würden.

Der Rangkorrelationskoeffizient Tau nach Kendall wird zur Korrelationsanalyse bei ordinalen Daten verwendet.

Die Berechnung von Tau beruht auf dem paarweisen Vergleich der Ränge. Dabei kann Tau Werte zwischen -1 und +1 annehmen, wobei $\tau=+1$ vollständige Abhängigkeit, $\tau=0$ Unabhängigkeit und $\tau=-1$ vollständige inverse Abhängigkeit bedeutet.

Bei $\tau=\pm 0.3$ kann man von einer „gewissen Abhängigkeit“, bei $\tau=\pm 0.6$ von einer „guten Korrelation“ sprechen.

Je mehr Variablenpaare verglichen werden, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit, daß es sich um rein zufällige Abhängigkeiten handelt. Mit zunehmender Zahl von Variablenpaaren sinkt die Irrtumswahrscheinlichkeit p. Bei $p < 0.05$ ist die Abhängigkeit statistisch signifikant.

Tumorstadium - Malignitätsgrad

Für die Variablen Tumorstadium und Malignitätsgrad konnte mittels Chi-Quadrat Test und Kendall's Tau-Korrelation eine statistisch signifikante Abhängigkeit ermittelt werden.

Aus einem Chi-Quadrat-Wert von 16.6732 kann man schließen, daß Tumorstadium und Malignitätsgrad mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p=0.001$, d.h. auf einem hohen Signifikanzniveau, miteinander korrelieren. Durch die Tau-Korrelation nach Kendall wurde diese Abhängigkeit bestätigt. Es ergab sich ein Korrelationskoeffizient $\tau=0,2633$ ($p < 0,0001$).

Tumorstadium - IL-4R α

Mit einem Chi-Quadrat-Wert von 12.0588 ($p=0.0021$) wurde auch für das Variablenpaar Tumorstadium und IL-4R α eine statistisch signifikante Abhängigkeit festgestellt. Auch der Korrelationskoeffizient $\tau=0,1910$ ($p=0,0001$) nach Kendall spricht für eine gewisse Abhängigkeit der beiden Variablen.

Malignitätsgrad – IL-4R α

Auch für das Variablenpaar Malignitätsgrad und IL-4R α ergab sich mittels Chi-Quadrat-Test ($\chi^2=10.8113$; $p=0.0034$) eine Abhängigkeit der Variablen, die wiederum durch Kendall's Tau-Korrelation mit $\tau=0.2802$ ($p < 0,0001$) bestätigt wurde.

4 Diskussion

Die Operation ist die einzige kurative Therapie beim lokal begrenzten Nierenzellkarzinom. Das Risiko der operierten Patienten, im weiteren Verlauf ein Rezidiv oder Metastasen zu entwickeln, ist jedoch sehr unterschiedlich. Die Prognose orientiert sich bisher ausschließlich an Stadium und Malignitätsgrad des Tumors. Doch auch Patienten mit gleichem Tumorstadium und Malignitätsgrad können derart unterschiedliche Krankheitsverläufe zeigen, daß die Prognosestellung allein anhand dieser zwei Kriterien unzureichend erscheint. Es werden neue Prognosefaktoren benötigt, um die Risikogruppen genauer zu differenzieren und dadurch eine individuellere Anpassung der adjuvanten Therapie und Nachsorge zu ermöglichen.

Beispielhaft zeigen sich derartige Bemühungen beim Prostatakarzinom. Das Serum-PSA (=prostata-spezifisches Antigen) erwies sich als ausgezeichneter Prognostikator und hielt Einzug in die Routinediagnostik (**Bostwick et al., 2000**). Beim Mammakarzinom gibt neben TNM-Stadium und histologischem Grad des Tumors vor allem der Östrogen-Rezeptor-Status Hinweise auf den weiteren Krankheitsverlauf (**Fitzgibbons et al., 2000**).

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, werden auch beim Nierenzellkarzinom verschiedene Gewebeeigenschaften des Primärtumors auf ihre Prognoserelevanz geprüft. Diese Versuche befinden sich noch in der Experimentierphase. Für einige dieser potentiellen Prognosefaktoren konnte jedoch schon mehrfach eine signifikante Korrelation zum Überleben und zur Rezidivfreiheit der Patienten ermittelt werden. Ich möchte an dieser Stelle noch einmal EGF-r (=epidermal growth factor receptor) und den Proliferationsmarker Ki-67 erwähnen. Eine starke Expression dieser beiden Oberflächenmoleküle auf Tumorzellen wurde in verschiedenen Studien mit einer schlechten Prognose in Zusammenhang gebracht (**Sakamoto et al., 1997; Moch et al., 1997; Hofmockel et al., 1995; Rioux-Leclercq et al., 2000**).

IL-4R ist ein membranständiger Cytokinrezeptor und läßt sich auf allen Geweben des menschlichen Organismus nachweisen. Sein Ligand, das Interleukin-4, fördert die Eosinophilenreifung und -aktivierung, die Differenzierung von Th2-Zellen und die Induktion von IgE und ist damit ein wichtiger Faktor im Bereich des Immunsystems.

Seine Schlüsselfunktion bei der Allergieentstehung wird eingehend untersucht und bietet Ansatzpunkte für neue Therapien (**Duschl et al., 1995**). Auch im Rahmen eines Tumorgeschehens kann es zu einer vermehrten intratumoralen Produktion von IL-4 und anderen Cytokinen der Th2-Zellreihe kommen, wie **Onishi et al. (1999)** am Beispiel des Nierenzellkarzinoms demonstrierten. Diese Studie zeigte eine signifikante Korrelation zwischen Tumorstadium bzw. Malignitätsgrad des Tumors und der Cytokinproduktion, welche als Hinweis auf eine intratumorale humorale Abwehrreaktion gewertet werden könnte.

Obiri et al. wiesen **1993** IL-4 Rezeptoren auf Zellen des Nierenzellkarzinoms nach. Auch auf den Zellen verschiedener anderer Malignome konnten IL-4 Rezeptoren nachgewiesen werden, beispielsweise beim Melanom, beim Mammakarzinom und beim Ovariakarzinom (**Obiri et al., 1994**), bei kolorektalen Karzinomen (**Lahm et al., 1994**), beim Magenkarzinom (**Morisaki et al., 1992**) und bei verschiedenen leukämischen Erkrankungen wie der Akuten Myeloischen Leukämie.

Die Arbeitsgruppen stellten fest, daß IL-4 einen antiproliferativen Effekt auf die Zellen der untersuchten Malignome besitzt. In vitro Versuche von **Hoon et al.** zeigten bereits **1991**, daß IL-4 das Zellwachstum von Nierenzellkarzinomen hemmt.

Die genaue Funktion des IL-4 Rezeptors auf Tumorzellen, insbesondere hinsichtlich der antiproliferativen Wirkung seines Liganden IL-4, ist noch unklar. **Obiri et al (1993)**, **Lahm et al. (1994)** und **Morisaki et al. (1992)** nahmen an, daß IL-4 direkt über seinen Rezeptor hemmend auf das Wachstum von Tumoren einwirkt. **Gooch et al. (1998)** führten die Wachstumshemmung durch IL-4 auf eine rezeptorvermittelte Induktion des programmierten Zelltodes zurück.

IL-4 ist in der Lage, über seinen Rezeptor viele unterschiedliche Signalkaskaden in Gang zu setzen, von denen bisher erst wenige eingehend erforscht sind. **Chang et al. (2000)** konnten demonstrieren, daß dem molekularen Mechanismus, der beim Kolonkarzinom zu einer Wachstumshemmung durch IL-4 führt, eine Aktivierung von STAT-1 (=signal transducer and activator of transcription-1) zugrunde liegt. Dies könnte möglicherweise auch bei anderen Tumoren und ebenso beim Nierenzellkarzinom der Fall sein.

Obiri et al. (1993) stellten fest, daß IL-4 durch Internalisierung des Rezeptorkomplexes eine Verminderung der Rezeptordichte auf den Tumorzellen bewirkt, wogegen B- und T-Zellen unter Einfluß von IL-4 vermehrt Rezeptoren exprimieren (**Ohara et al., 1988**). Es wäre denkbar, daß eine rezeptorvermittelte Funktion von IL-4 das Tumorwachstum zwar hemmt, diesem Effekt jedoch durch Internalisierung des Rezeptorkomplexes entgegen gewirkt wird. Damit würde theoretisch eine geringe Rezeptordichte auf den Tumorzellen für eine schlechte Prognose sprechen. Jedoch könnte die Rezeptorverminderung selbst Teil eines Mechanismus sein, der bei bestimmten Tumoren wie auch dem Nierenzellkarzinom zu einer Wachstumshemmung führt. Demnach würde eine geringe Rezeptordichte auf den Tumorzellen für einen günstigen Krankheitsverlauf sprechen.

Bislang wurde jedoch die Frage, ob das Vorhandensein von IL-4 Rezeptoren auf Tumorzellen und die Menge des vorhandenen Rezeptoren sich überhaupt in irgendeiner Weise auf die Prognose der Patienten auswirkt, noch nicht näher untersucht. Wäre eine rezeptorvermittelte Wirkung von IL-4 an der körpereigenen Tumorabwehr beteiligt, so könnte man eine Korrelation mit dem weiteren Krankheitsverlauf erwarten.

In der vorliegenden Studie untersuchten wir 198 Präparate von lokalisierten Nierenzellkarzinomen. Die univariate Analyse ergab jedoch keine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem Ausmaß der IL-4R α Expression auf den Tumorzellen und Überleben oder Rezidivfreiheit der Patienten.

In der bivariaten Analyse konnten wir jedoch eine gewisse Abhängigkeit zwischen der Menge des nachweisbaren IL-4R α und dem Tumorstadium sowie dem Malignitätsgrad feststellen. Dabei korrelierte ein hoher Prozentsatz an rezeptortragenden Zellen mit einem hohen Malignitätsgrad und einem fortgeschrittenen Tumorstadium. Indirekt würden diese Ergebnisse darauf hinweisen, daß eine große Menge an IL-4R α eher für einen schlechten Krankheitsverlauf spricht. Tendentiell ließ sich bei Patienten, deren Tumore nur eine geringe IL-4R α Expression aufwiesen, auch ein günstigerer Krankheitsverlauf beobachten (s. Abb. 9a) und 9b)). Für diesen Zusammenhang ließ sich jedoch wie oben bereits erwähnt keine statistische Signifikanz berechnen. Demnach eignet sich IL-4R α beim Nierenzellkarzinom nicht als Prognosefaktor.

Interessant bleibt jedoch die Frage, weshalb mit zunehmender Entdifferenzierung des Tumors die Menge an IL-4R α nicht sinkt, sondern eher ansteigt. Im Gegensatz dazu konnte nämlich für verschiedene andere Genprodukte nachgewiesen werden, daß ihre Expression mit zunehmender Entdifferenzierung der tumorös entarteten Zelle nachläßt. Das gilt z.B. für das Genprodukt des MDR-1-Gens, das P-Glykoprotein, das für die multiple drug resistance des Nierenzellkarzinoms verantwortlich sein soll (**Rochlitz et al., 1992; van Kalken et al., 1991**).

Bei der Auswertung der Tumorpräparate fiel auf, daß der Rezeptor auf tumorös verändertem Gewebe insgesamt wesentlich schwächer exprimiert war als auf gesundem Nierengewebe. Wir untersuchten von 80 Tumorpräparaten Anteile gesunden Gewebes und fanden hier eine positive Anfärbung der distalen und proximalen Tubuli von 95-100%. Dieses Ergebnis ist leicht nachzuvollziehen, wenn man berücksichtigt, daß die Tumorzellen den Rezeptorkomplex nach Bindung des Liganden internalisieren. Durch die immunhistochemische Färbung der Tumorpräparate konnten nur Bestandteile der Zellmembranen sichtbar gemacht werden. Informationen über im Cytoplasma gelösten Rezeptorkomplex konnten wir dadurch nicht gewinnen. Statistisch konnten diese Ergebnisse leider nicht ausgewertet werden, da gesundes Gewebe nur spärlich und bei den meisten Präparaten überhaupt nicht vorhanden war.

Obwohl sich der IL-4 Rezeptor nicht als Prognosefaktor für Patienten mit Nierenzellkarzinom eignet, so ist er dennoch Gegenstand intensiver Forschung hinsichtlich möglicher zukünftiger Therapien von Tumorerkrankungen.

Die Entdeckung eines funktionellen IL-4 Rezeptors auf Tumorzellen und die Feststellung, daß sein Ligand, das IL-4, möglicherweise direkt über den Rezeptor wachstumshemmend auf diese Tumoren wirkt, eröffnete neue Möglichkeiten in der bislang unbefriedigenden Immuntherapie von Malignomen. Und obwohl eine direkte antiproliferative Wirkung des Cytokins über seinen Rezeptor teilweise in Frage gestellt wurde (**Bosco et al., 1990**), ist man sich einig, daß IL-4 und der IL-4 Rezeptor Ansätze für zukünftige Therapien bieten.

Zum einen zeigt IL-4 eine Anti-Tumor-Aktivität über die Aktivierung und Degranulation von eosinophilen Granulozyten (**Tepper et al., 1992**). Außerdem führt

IL-4 zu einer Zunahme der Expression von MHC-Molekülen auf der Oberfläche von Tumorzellen (**Hoon et al., 1991**). Damit erhöht es die Immunogenität des Tumors und macht ihn für das Immunsystem angreifbarer. Auch die Hemmung der Angiogenese durch IL-4 ist möglicherweise an der Tumorabwehr beteiligt (**Volpert et al., 1998**).

IL-4 unterdrückt die Th1-Differenzierung von T-Zellen und damit die Entwicklung der bisher für die Tumorabwehr verantwortlich gemachten Immunzellen. Eine möglicherweise effektive Tumorabwehr durch das wirtseigene Immunsystem wird demnach durch IL-4 geschwächt (**Terres et al., 1998**). **Rodolfo et al. (1999)** fanden jedoch heraus, daß auch Th2-differenzierte cytotoxische T-Zellen eine antitumoröse Immunantwort auslösen können.

Es wurden in vitro Versuche (**Cheon et al., 1996**) und Versuche am Maus-Modell (**Younes et al., 1995; Hillmann et al., 1995 und 1997**) durchgeführt, wobei IL-4 allein oder in Kombination mit IL-2, $\text{INF}\alpha$, und TNF appliziert wurde. Der Anti-Tumor-Effekt von IL-4 konnte durch diese Versuche bestätigt werden: IL-4 allein als auch in Kombination mit anderen Cytokinen bewirkte dosisabhängig eine signifikante Wachstumshemmung im Zellkultur-Experiment. Bei erkrankten Mäusen bewirkte die systemische Applikation von IL-4 eine signifikante Reduktion der Lungenmetastasen. Dennoch zeigten erste Phase I und Phase II Studien bei Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom nicht den erhofften Erfolg (**Stadler et al., 1995; Margolin et al., 1994**).

Auch bleibt zu bedenken, daß IL-4 sowohl die vermehrte Expression als auch die enzymatische Aktivität von extrazellulären Proteasen, z.B. Aminopeptidase N, induziert (**Riemann et al., 1995**). Diese extrazellulären Proteasen bewirken eine Desintegration des Zellverbandes und fördern dadurch möglicherweise die Tumorprogression und Metastasierung.

Neuere Studien nutzen den IL-4 Rezeptor als Andockstelle für ein an IL-4 gekoppeltes Zellgift. Dabei dient IL-4 als Transporter für das Toxin, beispielsweise Diphtherietoxin oder ein *Pseudomonas* Exotoxin, dessen cytotoxische Eigenschaften zur Tumorabwehr genutzt werden sollen (**Puri, 1999; Kornmann et al., 1999; Husain et al., 1999**).

5 Zusammenfassung

Die Prognose von Patienten mit lokal begrenztem Nierenzellkarzinom nach Tumornephrektomie kann trotz gleichen Tumorstadiums und Malignitätsgrades sehr unterschiedlich sein. Um den postoperativen Krankheitsverlauf besser vorhersagen und Hochrisikopatienten identifizieren zu können, werden neben den etablierten Prognosefaktoren Tumorstadium und Malignitätsgrad neue prognostische Parameter benötigt.

Mit dieser Zielsetzung untersuchten wir in der vorliegenden Studie den IL-4 Rezeptor hinsichtlich seiner prognostischen Aussagekraft. Wir verwendeten eine immunhistochemische Färbemethode, um die Rezeptoren auf den Zellmembranen der Tumorzellen sichtbar zu machen. Es wurden 198 Präparate lokal begrenzter Nierenzellkarzinome ausgewertet. Mittels statistischer Tests unter Verwendung der Überlebensraten nach Kaplan-Meier wurden die dadurch erhaltenen Werte zum Überleben und zur rezidivfreien Zeit der Patienten in Beziehung gesetzt. In dieser univariaten Prognoseanalyse ergab sich jedoch kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Expression von IL-4R α und Krankheitsverlauf. Aufgrund dieses Ergebnisses entfiel die multivariate Prognoseanalyse unter Einbeziehung des IL-4 Rezeptors.

Um zu zeigen, daß es sich bei den untersuchten Tumoren um einen repräsentativen Querschnitt handelt, erfolgte auch eine statistische Auswertung der etablierten Prognosefaktoren TNM-Stadium und Malignitätsgrad. Erwartungsgemäß ließ sich für diese beiden Parameter eine statistisch signifikante Korrelation zum postoperativen Krankheitsverlauf der Patienten ermitteln.

Somit bleibt festzustellen, daß der IL-4 Rezeptor sich beim lokal begrenzten Nierenzellkarzinom nicht zur Verbesserung der Prognosestellung eignet.

6 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APAAP	Komplex aus Alkalischer Phosphatase und Anti-Alkalische-Phosphatase-Antikörper
Aqua dest.	destilliertes Wasser
bzw.	beziehungsweise
CRP	C-reaktives Protein
DNS	Desoxyribonukleinsäure
kDa	Kilodalton
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
IL-4R	IL-4 Rezeptor
IL-4R α	α -Untereinheit des IL-4 Rezeptors
INF	Interferon
JAK	Familie von Protein-Thyrosinkinasen
MDR	Multiple Drug Resistance
MHC	Major Histocompatibility Complex
MNV	Mean Nuclear Volume
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
PAP	Komplex aus Peroxidase und Anti-Peroxidase-Antikörper
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
ROC	Receiver Operating Characteristics
RPMI	Zellkulturmedium
PSA	Prostata Spezifisches Antigen
STAT	DNS Transkriptionsfaktor
Th1-Zellen	T -Helferzellen mit Typ-1-Differenzierung
Th2-Zellen	T -Helferzellen mit Typ-2-Differenzierung
TNF	Tumornekrosefaktor
TNM	Stadieneinteilung von malignen Tumoren
UICC	Union International Contre Le Cancer
VCAM	Adhäsionsmolekül auf Endothelzellen

VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentrales Nervensystem

7 Literaturverzeichnis

Beldegrun A und deKernion JB Renal Tumors. Campbell's Urology 1998, Seventh Edition: 2283-2326.

Beroud C, Fournet JC, Jeanpierre C, Droz D, Bouvier R, Froger D, Chretien Y, Marechal JM, Weissenbach J, Junien C (1996) Correlations of allelic imbalance of chromosome 14 with adverse prognostic parameters in 148 renal cell carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 17(4):215-24.

Bosco M, Giovarelli M, Forni M, Modesti A, Scarpa S, Masuelli L, Forni G (1990) Low doses of IL-4 injected perilymphatically in tumor-bearing mice inhibit the growth of poorly and apparently nonimmunogenic tumors and induce a tumor-specific immune memory. *J Immunol* 145(9):3136-43.

Bostwick DG, Grignon DJ, Hammond ME, Amin MB, Cohen M, Crawford D, Gospodarowicz M, Kaplan RS, Miller DS, Montironi R, Pajak TF, Pollack A, Srigley JR, Yarbrow JW (2000) Prognostic factors in prostate cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 124(7):995-1000.

Chang TL, Peng X, Fu X (2000) Interleukin-4 mediates cell Growth inhibition through activation of STAT-1. *Journal of Biological Chemistry* 275(14):10212-10217.

Cheon J, Chung DJ, Kim JJ, Koh SK, Sohn J (1996) Inhibitory effects of interleukin-4 on human renal cell carcinoma cells in vitro: in combination with interferon-alpha, tumor necrosis factor-alpha or interleukin-2. *Int J Urol* 3(3):196-201.

Chomarat P, Banchereau J (1998) Interleukin-4 and Interleukin-13: Their similarities and discrepancies. *Intern Rev Immunol* 17:1-52.

Clauß G, Finze FR, Partzsch L (1999) Statistik für Soziologen, Pädagogen, Psychologen und Mediziner, Grundlagen.

Costes V, Liautard J, Picot MC, Lequeux N, Brochier J, Baldet P, Rossi JF (1997) Expression of the interleukin 6 receptor in primary renal cell carcinoma. *J Clin Pathol* 50:835-40.

Di Silverio F, Casale P, Colella D, Andrea L, Seccareccia F, Sciarra A (2000) Independent value of tumor size and DNA ploidy for the prediction of disease progression in patients with organ-confined renal cell carcinoma. *Cancer* 88(4):835-43.

Duschl A, Sebald S (1995) Das Interleukin-4-Netzwerk. *Biospektrum* 2:8-14

Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, Ruby SG, O'Malley F, Simpson JF, Connolly JL, Hayes DF, Edge SB, Lichter A, Schnitt SJ (2000) Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 124(7):966-78.

Gelb AB, Sudilovsky D, Wu CD, Weiss LM, Medeiros LJ (1997) Appraisal of intratumoral microvessel density, MIB-1 score, DNA content, and p53 protein expression as prognostic indicators in patients with locally confined renal cell carcinoma. *Cancer* 80(9):1768-75.

Gilcrease MZ, Guzman-Paz M, Niehans G, Cherwitz D, McCarthy JB, Albores-Saavedra J (1999) Correlation of CD44S expression in renal clear cell carcinomas with subsequent tumor progression or recurrence. *Cancer* 86(11):2320-6.

Gooch JL, Lee AV, Yee D (1998) Interleukin 4 inhibits growth and induces apoptosis in human breast cancer cells. *Cancer Res* 58(18):4199-205.

Gotoh A, Hanioka K, Shirakawa T, Wada Y, Gohji K, Okada H, Aradawa S, Kamidono S (1998) Assessment of proliferating cell nuclear antigen expression and prognosis in patients with renal cell carcinoma with pulmonary metastases. *Int J Urol* 5:214-8.

Guinan P, Saffrin R, Stuhldreher D, Frank W, Rubenstein M (1995) Renal cell carcinoma: comparison of the TNM and Robson stage groupings. *J Surg Oncol* 59(3):186-9.

Heidbreder E, Hofmockel G (1994) Parenchymatöse Nierentumoren. In: Classen M, Diehl V, Kochsiek K (Hrsg): Innere Medizin, 4. Auflage, Urban und Schwarzenberg, 1329-34.

Hillmann GG, Younes E, Visscher D, Ali E, Lam JS, Montecillo E, Pontes JE, Haas GP, Puri RK (1995) Systemic treatment with interleukin-4 induces regression of pulmonary metastases in a murine renal cell carcinoma model. *Cell Immunol* 160(2):257-63.

Hillmann GG, Younes E, Visscher D, Hamzavi F, Kim S, Lam JS, Montecillo EJ, Ali E, Pontes JE, Puri RK, Haas GP (1997) Inhibition of murine renal carcinoma pulmonary metastases by systemic administration of interferon gamma: mechanism of action and potential for combination with interleukin 4. *Clin Cancer Res* 3(10):1799-806.

Hoffmann R, Franzke A, Buer J, Sel S, Oevermann K, Duensing A, Probst M, Duensing S, Kirchner H, Ganser A, Atzpodien J (1999) Prognostic impact of in vivo soluble cell adhesion molecules in metastatic renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 79(11-12):1742-5.

Hofmockel G, Tsatalpas P, Müller H, Dämmrich J, Poot M, Maurer-Schultze B, Müller-Hermelink HK, Frohmüller HG, Bassukas ID (1995) Significance of conventional and new prognostic factors for locally confined renal cell carcinoma. *Cancer* 76:296-306.

Hofmockel G, Riess S, Bassukas ID, Dämmrich J (1997) Epidermal growth factor family and renal cell carcinoma: expression and prognostic impact. *Eur Urol* 31:478-84.

Hoon DS, Okun E, Banez M, Irie RF, Morton DL (1991) Interleukin 4 alone and with gamma-interferon or alpha-tumor necrosis factor inhibits cell growth and modulates cell surface antigens on human renal cell carcinomas. *Cancer Res* 51(20):5687-93.

Husain SR, Kreitman RJ, Pastan I, Puri RK (1999) Interleukin-4 receptor-directed cytotoxin therapy of AIDS-associated Kaposi's sarcoma tumors in xenograft model. *Nat Med* 5(7):817-22.

Jakobsen EB, Eickhoff JH, Andersen JP, Ottesen M (1994) Prognosis after nephrectomy for renal cell carcinoma. *Scand J Urol* 28:229-36.

Kalken CK van, Valk P van der, Hadisaputro MMN, Pieters R, Broxterman HF, Kuiper CM, Scheffer GL, Veerman AJP, Meyer CJLM, Scheper RJ, Pinedo HM (1991) Differentiation dependent expression of P-glycoprotein in the normal and neoplastic human kidney. *Ann Oncol* 2:55-62.

Kornmann M, Kleeff J, Debinski W, Korc M (1999) Pancreatic cancer cells express interleukin-13 and -4 receptors, and their growth is inhibited by *Pseudomonas* exotoxin coupled to interleukin-13 and -4. *Anticancer Res* 19(1A):125-31.

Kugler A, Stuhler G, Walden P, Zoller G, Zobywalski A, Brossart P, Trefzer U, Ullrich S, Muller CA, Becker V, Gross AJ, Hemmerlein B, Kanz L, Muller GA, Ringert RH (2000) Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids. *Nat Med* 6(3):332-6.

Lahm H, Schnyder B, Wyniger J, Borbenyi Z, Yilmaz A, Car BD, Fischer JR, Givel JC, Ryffel B (1994) Growth inhibition of human colorectal-carcinoma cells by interleukin-4 and expression of functional interleukin-4 receptors. *Int J Cancer* 59(3):440-7.

Ljungberg B, Larsson P, Stenling R, Roos G (1991) Flow cytometric deoxyribonucleic acid analysis in stage I renal cell carcinoma. *J Urol* 146(3):697-9.

Ljungberg B, Grankvist K, Rasmuson T (1997) Serum interleukin-6 in relation to acute-phase reactants and survival in patients with renal cell carcinoma. *Eur J Cancer* 33(11):1794-8.

Margolin K, Aronson FR, Sznol M, Atkins MB, Gucalp R, Fisher RI, Sunderland M, Doroshow JH, Ernest ML, Mier JW (1994) Phase II studies of recombinant

human interleukin-4 in advanced renal cancer and malignant melanoma. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 15(2):147-53.

Masuda H, Kurita Y, Fukuta K, Mugiya S, Suzuki K, Fujita K (1998) Significant prognostic factors for 5-year survival after curative resection of renal cell carcinoma. *Int J Urol* 5(5):418-22.

Matsumoto T, Furukawa A, Sumiyoshi Y, Akiyama KY, Kanayama HO, Kagawa S (1998) Serum levels of soluble interleukin-2 receptor in renal cell carcinoma. *Urology* 51(1):145-9.

Moch H, Sauter G, Buchholz N, Gasser TC, Bubendorf L, Waldman FM, Mihatsch MJ (1997) Epidermal growth factor receptor expression is associated with rapid tumor cell proliferation in renal cell carcinoma. *Hum Pathol* 28(11):1255-9.

Morisaki T, Yuzuki DH, Lin RT, Foshag LJ, Morton DL, Hoon DS (1992) Interleukin 4 receptor expression and growth inhibition of gastric carcinoma cells by interleukin 4. *Cancer Res* 52(21):6059-65.

Naish SJ (Hrsg.) (1989) Handbuch II immunochemischer Färbemethoden, DAKO-Corporation, 9-29.

Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE (1999) The IL-4 Receptor: Signaling mechanisms and biologic functions. *Annu Rev Immunol* 17:701-38

Obiri NI, Hillman GG, Haas GP, Sud S, Puri RK (1993) Expression of high affinity interleukin-4 receptors on human renal cell carcinoma cells and inhibition of tumor cell growth in vitro by interleukin-4. *J Clin Invest* 91(1):88-93.

Obiri NI, Siegel JP, Varricchio F, Puri RK (1994) Expression of high-affinity IL-4 receptors on human melanoma, ovarian and breast carcinoma cells. *Clin Exp Immunol* 95(1):148-55.

Ohara J, Paul WE (1988) Up-regulation of interleukin 4/B-cell stimulating factor 1 receptor expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(21):8221-5.

Onishi T, Ohishi Y, Imagawa K, Ohmoto Y, Murata K (1999) An assessment of the immunological environment based on intratumoral cytokine production in renal cell carcinoma. *BJU Int* 83(4):488-92

Paradis V, Ferlicot S, Ghannam E, Zeimoura L, Blanchet P, Eschwege P, Jardin A, Benoit G, Bedossa P (1999) CD44 is an independent prognostic factor in conventional renal cell carcinomas. *J Urol* 161:1984-7.

Paradis V, Lagha NB, Zeimoura L, Blanchet P, Eschwege P, Ba N, Benoit G, Jardin A, Bedossa P (2000) Expression of vascular endothelial growth factor in renal cell carcinomas. *Virchows Arch* 436(4):351-6.

Pascale Chomarot and Jacques Banchereau (1998) Interleukin-4 and Interleukin-13: Their Similarities and Discrepancies. *Intern Rev Immunol* 17:1-52.

Peto R, Pike MC (1973) Conservatism of the approximation $(0-E)^2/E$ in the log rank test for survival data or tumor incidence data. *Biometrics* 29:579-84.

Puri RK (1999) Development of a recombinant interleukin-4-Pseudomonas exotoxin for therapy of glioblastoma. *Toxicol Pathol* 27(1):53-7.

Rainwater LM, Zincke H, Farrow GM, Gonchoroff NJ (1991) Renal cell carcinoma in young and old patients. Comparison of prognostic pathologic variables (cell type, tumor grade and stage, and DNA ploidy pattern) and their impact on disease outcome. *Urology* 38(1):1-5.

Riemann D, Kehlen A, Langner J (1995) Stimulation of the expression and the enzyme activity of aminopeptidase N/CD13 and dipeptidylpeptidase IV/CD26 on human renal cell carcinoma cells and renal tubular epithelial cells by T cell-derived cytokines, such as IL-4 and IL-13. *Clin Exp Immunol* 100:277-283.

Rioux-Leclercq N, Turlin B, Bansard J, Patard J, Manunta A, Moulinoux JP, Guille F, Ramee MP, Lobel B (2000) Value of immunohistochemical Ki-67 and p53 determinations as predictive factors of outcome in renal cell carcinoma. *Urology* 55(4):501-5.

Rochlitz CF, Lobeck H, Peter S, Reuter J, Mohr B, de Kant E, Huhn D, Herrmann R (1992) Multiple drug resistance gene expression in human renal cell cancer is associated with the histologic subtype. *Cancer* 69:2993-8.

Rodolfo M, Zilocchi C, Accornero P, Cappetti B, Arioli I, Colombo MP (1999) IL-4-transduced tumor cell vaccine induces immunoregulatory type 2 CD8 T lymphocytes that cure lung metastases upon adoptive transfer. *J Immunol* 163(4):1923-8.

Sakamoto s, Kitahara S, Sumi S, Horiuchi S, Yoshida K (1997) Relationship of epidermal growth factor binding capacity to histopathologic features and prognosis in human renal cell carcinoma. *Invasion Metastasis* 17(2):94-100.

Schullerus D, Herbeers J, Chudek J, Kanamaru H, Kovacs G (1997) Loss of heterozygosity at chromosomes 8p, 9p, and 14q is associated with stage and grade of non-papillary renal cell carcinomas. *J Pathol* 183(2):151-5.

Soda T, Fujikawa K, Ito T, Sasaki M, Nishio Y, Miyakawa M (1999) Volume-weighted mean nuclear volume as a prognostic factor in renal cell carcinoma. *Lab Invest* 79:859-67.

Stadler WM, Rybak ME, Vogelzang NJ (1995) A phase II study of subcutaneous recombinant human interleukin-4 in metastatic renal cell carcinoma. *Cancer* 76(9):1629-33.

Tarone RE (1975) Tests for trend in life table analysis. *Biometrika* 62:679-82.

Tepper RI, Coffman RL, Leder P (1992) An eosinophil-dependent mechanism for the antitumor effect of interleukin-4. *Science* 264:548-51.

Terres G, Coffmann RL (1998) The role of IL-4 and IL-10 cytokines in controlling an anti-tumor response in vivo. *Int Immunol* 10(6):823-32.

Topp MS, Koenigsmann M, Mire-Sluis A, Oberberg D, Eitelbach F, Von Marschall Z, Notter M, Reufi B, Stein H, Thiel E, Berdel WE (1993) Recombinant human interleukin-4 inhibits growth of some human lung tumor cell lines in vitro and in vivo. *Blood* 82:2837-44.

Tungekar MF, Turley H, Dunnill MS, Gatter KC, Ritter MA, Harris AL (1991) Interleukin 4 receptor expression on human lung tumors and normal lung. *Cancer Res* 51(1):261-4.

Usubutun A, Ayhan A, Uygur MC, Ozen H, Toklu C, Ruacan S (1998) Prognostic factors in renal cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 17:77-81.

Van Poppel H, Vandendriessche H, Boel K, Mertens V, Goethuys H, Haustermans K, Van Damme B, Baert L (1997) Microscopic vascular invasion is the most relevant prognosticator after radical nephrectomy for clinically nonmetastatic renal cell carcinoma. *J Urol* 158:45-9.

Volpert OV, Fong T, Koch AE, Peterson JD, Waltenbaugh C, Tepper RI, Bouck NP (1998) Inhibition of angiogenesis by interleukin 4. *J Exp Med* 188(6):1039-46.

Yoshino S, Kato M, Okada K (1998) Evaluation of the prognostic significance of microvessel count and tumor size in renal cell carcinoma. *Int J Urol* 5:119-23.

Younes E, Haas GP, Visscher D, Pontes JE, Puri RK, Hillmann GG (1995) Intralesional treatment of established murine primary renal tumor with interleukin-4: localized effect on primary tumor with no impact on metastases. *J Urol* 153(2):490-3.

Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle Herrn Priv. Doz. Dr. K. Weingärtner dafür danken, daß er mir ermöglicht hat, unter seiner Anleitung an der Urologischen Universitätsklinik Würzburg zu promovieren und durch diese Arbeit einen Einblick in das wissenschaftliche Arbeiten und Denken in der medizinischen Forschung zu gewinnen.

Herrn Prof. Dr. H. Riedmiller danke ich für die Arbeitsmöglichkeit im wissenschaftlichen Labor der Urologischen Universitätsklinik.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. A. Duschl, der sich die Zeit nahm, alle meine Fragen zu beantworten. Er zeigte mir, wie man komplizierte Sachverhalte mit einfachen Worten auf den Punkt bringen kann. Dafür und für seine wertvollen Tips zum Verfassen der Doktorarbeit möchte ich ihm besonders danken.

Herrn Dr. M. Heuschmied möchte ich ganz herzlich dafür danken, daß er mir bei der Statistik so wertvolle Hilfe geleistet hat. Ohne ihn wäre diese Arbeit wohl kaum zustande gekommen.

Ganz herzlich danken möchte ich auch der Medizinisch Technischen Assistentin des wissenschaftlichen Labors der Urologischen Universitätsklinik, Frau Barbara Dexler. Sie führte mich ein in die Grundlagen der Immunhistochemie und trug durch ihren unermüdlichen Einsatz maßgeblich zum Gelingen des praktischen Teils der Arbeit bei.

Ganz besonderer Dank gilt auch Herrn Stefan Schürer und Herrn Dr. Robert Krieger, die mir wertvolle Hilfestellung am Computer gaben und bereitwillig das Korrekturlesen der Arbeit übernahmen.

Lebenslauf

Geburtsdatum: 22. Juli 1972

Geburtsort: Ulm

Eltern: Dr. Roland Krieger, Diplom Chemiker
Waltraud Krieger, geb. Müller, Kindergärtnerin

Geschwister: Dr. Robert Krieger, Diplom Chemiker

Schulbildung: Grundschule Wiblingen: 1979-1983
Gymnasium Wiblingen: 1983-1990
Gastschülerin an der WHHS, Pine Bluff, AR, USA: 1990-1991
Gymnasium Wiblingen: 1991-1993
Allgemeine Hochschulreife: Juni 1993

Studium: Humanmedizin an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität, Würzburg: 1994-2001

Ärztliche Vorprüfung: September 1996

1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: März 1998

2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: April 2000

3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: November 2001

Praktisches Jahr: Chirurgie: Leopoldina Krankenhaus Schweinfurt
Urologie: Dryburn Hospital, Durham, England
Innere Medizin: Juliusspital Würzburg

AIP vom 01.01. bis 31.07.2002 in der Urologischen Klinik des Städtischen Klinikums Karlsruhe und seit dem 01.08.2002 in der Abteilung für Allgemein Chirurgie des Vivantes Klinikum Neukölln, Berlin, als Ärztin im Praktikum beschäftigt