

Aus der Urologischen Klinik
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. Rolf Ackermann

**Untersuchung der Expression des
FAS-Rezeptors im Harnblasenkarzinom**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
Simone Maas
2004

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab
Dekan

Referent: Prof. Dr. Schulz

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Müller

Untersuchung der Expression und Suche nach Mutationen des FAS-Rezeptors im Harnblasenkarzinom

1. Einleitung		
1.1	Biologische und klinische Aspekte des Harnblasenkarzinoms	1
1.2	Molekularpathologie des Harnblasenkarzinoms	7
1.3	Struktur und Funktion des FAS-Rezeptors	11
2. Ziel der Arbeit		19
3. Material und Methoden		
3.1	Verwendete Chemikalien, Lösungen, Geräte und Software	21
3.2	Gewebe für die immunhistochemischen Untersuchungen	24
3.3	Zelllinien und Kultivierung	25
3.4	Präparation von DNA und RNA	25
3.5	Immunhistochemische Untersuchungen	26
3.6	Molekularbiologische Untersuchungen	
	3.6.1 Reverse Transkription	27
	3.6.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)	28
	3.6.3 Single Strand Conformation Polymorphism - Untersuchung (SSCP)	29
	3.6.4 Realtime Reverse Transkriptase – Polymerasekettenreaktion (RT – PCR)	30
3.7	Statistische Methoden	31
4. Ergebnisse		
4.1	Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen	32
4.2	Korrelation der FAS-Expression mit Tumorstadium und Differenzierungsgrad	34
4.3	Korrelation der FAS-Expression mit der <i>p53</i> -Expression	39
4.4	Untersuchung mittels Realtime RT – PCR	41
4.5	Mutationsanalyse von Exon 9 des FAS-Rezeptor-Gens:	
	Auswertung der SSCP - Untersuchungen und Sequenzierungsdaten	44

5. Diskussion	46
6. Zusammenfassung	53
7. Literaturverzeichnis	55
8. Abkürzungsverzeichnis	61
9. Danksagung	63

1. Einleitung

1.1 Biologische und klinische Aspekte des Harnblasenkarzinoms

Drei Prozent aller malignen Tumoren in der Bundesrepublik Deutschland sind Tumore der Harnblase (Leitlinien der deutschen Krebsgesellschaft, 2000). Das Harnblasenkarzinom ist die zweithäufigste Tumorerkrankung im Urogenitaltrakt und in den USA der fünfthäufigste Tumor überhaupt, in der BRD der zehnthäufigste bei Frauen, der vierthäufigste bei Männern (hinter Prostata-, Bronchial- und kolorektalem Karzinom). Diese Diskrepanz besteht erstaunlicherweise auch heute noch, nachdem Frauen auch Männerberufe aufgenommen haben und der Zigarettenkonsum in der weiblichen Bevölkerung zugenommen hat.

Als mögliche Ursache der geschlechtsspezifischen Verteilung wurden genetische, anatomische und hormonelle Gründe angeführt, was jedoch nicht vollständig bewiesen werden konnte (Rübben, 2000). Eine familiäre Häufung ist nicht bekannt.

Die altersunabhängige Inzidenz des Harnblasenkarzinoms in der Bundesrepublik Deutschland beträgt 20 pro 100.000 Einwohner, wobei sie in den industrialisierten Ländern deutlich höher als in ländlichen Gebieten liegt. Pro Jahr treten etwa 20.000 neue Fälle auf, rund 5000 Menschen versterben tumorbedingt. Der Altersdurchschnitt bei der Erstdiagnose liegt bei 67 Jahren, nur 1% der Betroffenen sind jünger als 40 Jahre. Das Altersmaximum der Erkrankung liegt zwischen der 5. und 7. Lebensdekade, auch aufgrund der langen Latenzzeit von durchschnittlich 20-30 Jahren.

Typische Symptome für das Harnblasenkarzinom sind schmerzlose Makrohämaturie, Dysurie, Pollakisurie sowie Schmerzen im Blasen- und Perinealbereich.

Ätiologisch gibt es verschiedene Substanzen, die karzinogen oder ckarzinogen wirken. Als Karzinogene sind Substanzen oder Faktoren zu verstehen, die die Inzidenz maligner Tumoren erhöhen, die Latenzzeit der Karzinogenese verkürzen oder das Tumorspektrum in einem Gewebe verändern können. Ckarzinogene sind hingegen Faktoren, die den Effekt von Karzinogenen verstärken, ohne selbst kanzerogen zu sein.

Zu den karzinogenen Stoffen beim Harnblasenkarzinom zählen mit gesichertem Kausalzusammenhang Naphthylamin, Benzidin und Azofarbstoffe, sowie vermutlich Anilin, Nitrosamine und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe. Die Exposition gegenüber aromatischen Aminen in entsprechenden Betrieben wird nach Nr. 1301 als Berufskrankheit anerkannt.

Vorausgegangene Behandlungen mit Cyclophosphamid und Bestrahlungen sowie chronische Entzündungen, z.B. nach Dauerkatheterbehandlung, Blasensteinen und Nephropathien, stehen als Cokarzinogene mit dem Auftreten eines Harnblasenkarzinoms in Zusammenhang. Auch Zigarettenkonsum, Phenacetin-Abusus und Schistosomiasis (Bilharziose) erhöhen das Risiko für das Entstehen eines Harnblasenkarzinoms. Besonders Schistosomiasis kann dabei, v.a. in Endemiegebieten wie Ägypten, durch chronische Urothelirritationen über Dys- bzw. Metaplasie zu einem Plattenepithelkarzinom führen (Habuchi et al., 1993b). Postuliert wird auch eine infektbedingte Nitrosaminbildung (Rübben, 2000).

Die Auswirkungen von Karzinogenen und Cokarzinogenen werden durch Enzym polymorphismen in ihrem Metabolismus beeinflusst. Speziell für aromatische Amine spielen die Polymorphismen bei N-Acetyltransferasen eine entscheidende Rolle. Die Geschwindigkeit der Inaktivierung von aromatischen Aminen beim Menschen ist individuell stark verschieden. Diese individuelle Differenz kann die unterschiedliche Empfindlichkeit auf eine Exposition gegenüber aromatischen Aminen erklären.

Ebenso gibt es im Hinblick auf polyzyklische Kohlenwasserstoffe eine Korrelation zwischen der Dauer der Exposition und dem Erkrankungsrisiko. Postuliert wird hierbei ein Zusammenhang mit GSTM1 (Glutathion Transferase Isoenzym 1). Dieses Enzym ist unter anderem am Metabolismus von polyzyklischen Aromaten beteiligt. Ein Fehlen dieser Funktion durch Homozygotie eines weit verbreiteten Polymorphismus, bei dem das Gen deletiert ist, scheint ein erhöhtes Risiko für Harnblasenkarzinome nach sich zu ziehen (Steinhoff et al., 2000);(www.medizentrum.de).

Es wird deutlich, dass bei der Entstehung eines Harnblasenkarzinoms von einem multifaktoriellen Geschehen auszugehen ist. Die beteiligten Faktoren können einzeln oder gemeinsam in unterschiedlicher Reihenfolge oder auch zu unabhängigen Zeitpunkten auftreten (im Gegensatz zur Tumorentstehungskaskade beim kolorektalen Karzinom).

Am Beispiel des kolorektalen Karzinoms wurde eine Korrelation zwischen genetischen und morphologischen Veränderungen während der Entwicklung maligner Vorstufen zum metastasierenden Karzinom gezeigt. Schrittweise genetische Alterationen gehen also einher mit dem Erwerb der Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung als Endstufe eines malignen Tumors. Selektion einzelner Tumorzellklone, die zufällig entstanden sind, ist entscheidend bei der Entwicklung zu einem Karzinom. Im Gegensatz zum kolorektalen Karzinom müssen diese Veränderungen beim Harnblasenkarzinom wohl nicht in einer festgesetzten Reihenfolge ablaufen, so dass die Defekte in den genannten Regulationssystemen (Zellzyklus, Apoptose, Adhäsion) zu unterschiedlichen Zeitpunkten betroffen sein können.

Die Einteilung der Harnblasenkarzinome erfolgt histologisch sowie nach Stadium und Differenzierungsgrad.

In 92% der Fälle in westlichen Ländern handelt es sich um ein Übergangszellkarzinom (englisch: Transitional Cell Carcinoma, TCC), in 7% um ein Plattenepithelkarzinom und in 1% um Adeno- oder undifferenzierte Karzinome (Hautmann und Huland, 2001). Jedoch können auch Urothelzellkarzinome herdförmig eine plattenepitheliale oder drüsige Metaplasie oder auch beides aufweisen. Sehr selten sind Blasen Tumoren, die sekundär durch Infiltrationen (z.B. aus Uterus, Prostata) oder Metastasierung eines anderen Primärtumors entstehen.

Makroskopisch finden sich zum Zeitpunkt der Erstdiagnose in 80-90% der Fälle papilläre und in 10-20% solide Tumoren. In über 25% handelt es sich um multifokale Erkrankungen; in bis zu 5% der Fälle sind auch Nierenbecken und Harnleiter betroffen.

Zur Stadieneinteilung gibt es seit 1992 eine mehrfach verfeinerte TNM-Klassifikation für urologische Tumoren nach der Union International Contre le Cancer (UICC), die nach dem Stand von 1997, der in der vorliegenden Arbeit zugrunde lag, wie folgt aussah:

Über das T-Stadium wird durch Hinzufügen der Ziffern 1-4 die Größe und Ausdehnung des Primärtumors definiert (s. Abb. 1.1.):

Tis	Carcinoma in situ
Ta	nicht-invasives papilläres Karzinom
T1	infiltriert subepitheliales Bindegewebe
T2	infiltriert die Muskulatur
T2a	infiltriert die oberflächliche Muskulatur
T2b	infiltriert die tiefe Muskulatur
T3	infiltriert das perivesikale Fettgewebe
T3a	infiltriert mikroskopisch das perivesikale Fettgewebe
T3b	infiltriert makroskopisch das perivesikale Fettgewebe
T4	Befall von extravesikalen Strukturen
T4a	Befall von Prostata, Uterus oder Vagina
T4b	Befall von Becken- oder Bauchwand

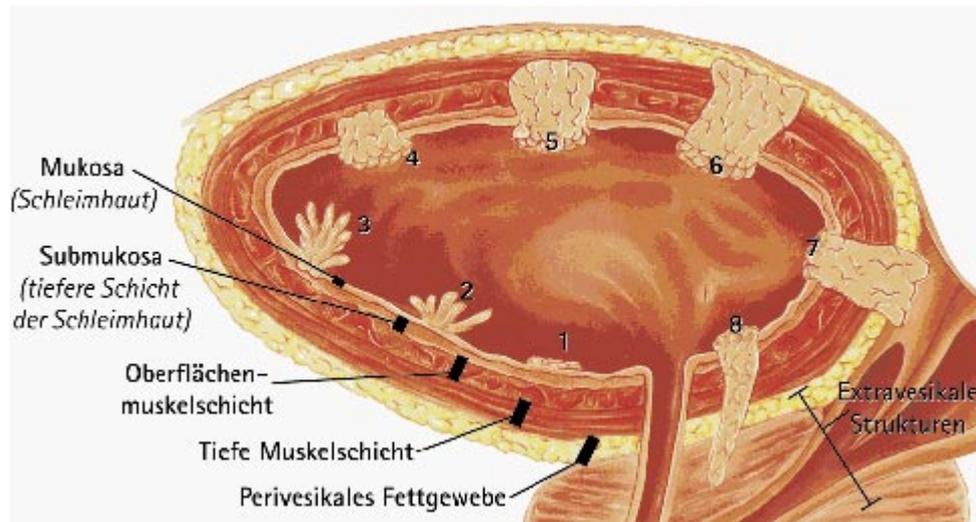


Abbildung 1.1. Schematische Darstellung der Stadieneinteilung des Harnblasenkarzinoms, je nach Ausbreitung im Gewebe: 1=Carcinoma in situ; 2=Ta; 3=T1; 4=T2a; 5=T2b; 6=T3; 7+8=T4; Quelle: www.cytochemia.de

Ein Sonderfall ist das Carcinoma in situ (Tumor in situ = Tis), das nicht die Lamina propria mucosae infiltriert und somit durch die Basalzellmembran begrenzt bleibt. Es hat aber typische Zellveränderungen, die per definitionem auf eine dysplastische Veränderung hinweisen, wie z.B. hoher Chromatingehalt, große Zellkerne, hohe mitotische Aktivität und prominente Nukleoli. Außerdem findet sich eine Erhöhung der Zahl der Zelllagen der Schleimhaut mit unregelmäßiger Zellanordnung. Das Carcinoma in situ kann sowohl einzeln als auch in Kombination mit einem anderen Blasentumor vorkommen. Da sich in 38-83% aller Fälle aus dem Tis innerhalb von 5 Jahren ein invasives Karzinom entwickelt, besitzt es eine hochmaligne Potenz.

Der Lymphknotenbefall wird über den Buchstaben N durch Zusatz der Ziffern 0-2 angegeben:

- | | |
|----|---|
| N0 | keine regionären Lymphknoten befallen |
| N1 | Befall eines solitären Lymphknotens mit einem maximalen Durchmesser von 2 cm |
| N2 | Befall von solitären Lymphknoten mit einem Durchmesser von mehr als 2, aber weniger als 5 cm; oder Befall von multiplen Lymphknoten, aber alle unter 5 cm Durchmesser |
| N3 | Befall von Lymphknoten mit mehr als 5 cm Durchmesser |

Bei der Metastasierung bezeichnet man das Fehlen von Fernmetastasen als M0 und das Vorliegen als M1.

Beim Grading unterscheidet man 4 Gruppen, die mit G und Zusatz der Ziffern 1-4 definiert werden:

G1	gut differenziert (mehr als 7 Zellreihen; leichte Kernatypien; Deckzellenverlust)
G2	mäßig differenziert (mäßige Zellatypien; zunehmender Reihungsverlust der Zellen)
G3	schlecht differenziert (Reihungsverlust; hohe mitotische Aktivität; Riesenzellen)
G4	anaplastisches Karzinom (undifferenziertes Epithel)

Zur Verdeutlichung, dass auch die histopathologische Untersuchung die Einteilung bestätigt hat, benutzt man das Präfix „p“.

Klinisch unterscheidet man nach dem TMN-System oberflächlich wachsende (Tis, Ta, T1 N0 M0), muskelfiltrierende (T2-4 N0 M0), lymphogen (T1-4 N1-3 M0) und hämatogen metastasierende Harnblasenkarzinome (Block, 1994). Wegen des stark unterschiedlichen Verlaufs wird die Zusammenfassung von Tis, Ta und T1 in eine Gruppe zunehmend kritisch gesehen.

Die 5-Jahres-Überlebensrate wird durch lokales Tumorstadium, Lymphknotenbefall und Fernmetastasen bestimmt, wobei sie um so besser ist, je geringer sich die Ausdehnung des Primärtumors darstellt. Es bestehen demzufolge gute Korrelationen zwischen Stadium und Differenzierungsgrad einerseits und Tumorprogression, Rezidivneigung und Überlebensrate andererseits.

Etwa 80% der Patienten kommen initial mit einem lokalisierten Tumorstadium (überwiegend papilläre Tumoren), das unter kurativer Zielsetzung durch eine Transurethrale Elektresektion (TUR) oder radikale Zystektomie behandelt werden kann, während 20% primär bereits einen in die Muskulatur vorgewachsenen Tumor (T2-4) aufweisen.

Entscheidender Schritt der Diagnostik des Harnblasenkarzinoms ist eine Zystoskopie, wobei die Primärdiagnostik auf die Beurteilung des lokalen Tumorstadiums abzielt.

Unbehandelt überleben Patienten mit T2 oder T3 Tumoren nur in 5 bis 10% länger als 5 Jahre (Hautmann und Huland, 2001). Die Rezidivrate ist höher, je entdifferenzierter oder

multifokaler der Tumor ist; sie steigt auch bei Tumoren, die von Dysplasien oder Tis begleitet sind.

Je nach Tumorstadium bzw. – ausdehnung gibt es unterschiedliche Therapien, die von TUR (s. oben) über Zystektomie bis hin zur Polychemotherapie bzw. Strahlentherapie reichen. Auch eine Immuntherapie, wie die Therapie mit BCG (Bacille-Calmette-Guérin: attenuierter Lebendimpfstoff aus *Mycobacterium bovis*), steht als mögliche adjuvante Therapie zur Verfügung. BCG wirkt als unspezifischer Stimulator der zellulären Immunität, wobei der genaue Wirkmechanismus noch nicht hinreichend geklärt ist. Das gängigste Schema ist die wöchentliche Instillation mit 120 mg BCG für 6 Wochen. Es beeinflusst als vesikale Instillation v.a. die Rezidivneigung und die Progressionsrate oberflächlicher Harnblasenkarzinome nach TUR. Die Rezidivrate wird im Vergleich zur alleinigen TUR um 30% gesenkt (Rübben, 2000). Ein Einfluss auf Fernmetastasen besteht jedoch nicht (Bichler et al., 1998). In Einzelfällen ist eine Zystektomie aufgrund der vielen lokalen oder systemischen Nebenwirkungen (z.B. Zystitis), die in 90% der Fälle auftreten, indiziert, obwohl der lokale Harnblasentumor beherrscht erscheint. In 10% ist der Therapieabbruch aufgrund der Nebenwirkungen indiziert, wobei ein positiver Tine-Test (Testung der Hautreaktion nach Applikation von Zellwandproteinen von Tuberkelbakterien mittels eines Multipunkturstempels) mit einer hohen Inzidenz an Nebenwirkungen korreliert.

Außer BCG gibt es auch andere Instillationsmedikamente, wie Mitomycin C (als intravesikale Zytostatikabehandlung) oder KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin). KLH bewirkt dabei ähnlich wie BCG eine Immunmodulation. Diese alternativen Instillationstherapien werden seither vorwiegend bei Patienten mit einem oberflächlichen Karzinom (Ta-1; G1-3) und bei einem Carcinoma in situ als Erstbefund oder Rezidivereignis (adjuvante topische Behandlung) eingesetzt. BCG wird beim Tis und beim T1 G3 Tumor als Erstbefund eingesetzt, bei allen anderen gilt Mitomycin als Mittel der Wahl (Bichler et al., 1998).

Die Nachsorge nach jeder Tumordiagnose und -behandlung ist ebenfalls unterschiedlich. Es ist hierbei fraglich, warum manche Harnblasenkarzinome besser und manche schlechter auf die jeweiligen Therapien ansprechen. Zur Erklärung dieser Unterschiede könnten molekularbiologische Erkenntnisse aus den Untersuchungen von Harnblasenkarzinomen mit unterschiedlichen Reaktionen und klinischen Verläufen beitragen.

1.2 Molekularpathologie des Harnblasenkarzinoms

Trotz der Korrelation zwischen Tumorstadium und Differenzierungsgrad des Harnblasenkarzinoms auf der einen und Überlebenswahrscheinlichkeit auf der anderen Seite kann in vielen Fällen nicht mit ausreichender Sicherheit vorhergesagt werden, welche diagnostizierten Tumoren schnell progredient werden und deshalb frühzeitig einer aggressiveren Therapie zugeführt werden sollten. Einen Ansatzpunkt bietet die Annahme, dass für den uneinheitlichen klinischen Verlauf und Therapieerfolg unterschiedliche genetische Veränderungen verantwortlich sind.

Im Rahmen einer Mehrschrittkanzerogenese finden auch in anderen Tumoren multiple Veränderungen in proliferationsfördernden Protoonkogenen und proliferationshemmenden Tumorsuppressorgenen statt. Verschiedene genetische und epigenetische Veränderungen verschieben das Gleichgewicht in Richtung Zellvermehrung und legen die Grundlagen für die neoplastische Transformation von Zellen: I) Proto-Onkogene werden durch Punktmutation, Amplifikation, Translokation oder Insertion von viralen Sequenzen aktiviert. II) Tumorsuppressorgene, die die Proliferation inhibieren und die terminale Differenzierung fördern (z. B. Rb und *p53*), werden durch Mutation, Deletion und Hypermethylierung inaktiviert.

Die Ausprägung und Art dieser Mehrschrittkanzerogenese werden im Harnblasenkarzinom intensiv mit molekularbiologischen und immunhistochemischen Methoden untersucht. Das Ziel dieser Untersuchungen ist durch Korrelation mit den Patientendaten eine Antwort auf die Frage nach den Ursachen der Heterogenität des Harnblasenkarzinoms zu erhalten.

Besonderes Augenmerk wurde in diesem Zusammenhang auf die Regulation des Zellzyklus und der Apoptose, des programmierten Zelltodes, gerichtet. Im normalen Organismus hat der Zellzyklus als zentrale Integrationsstelle von Proliferation und Differenzierung seine wichtigste Funktion. Er wird in vier Phasen unterteilt: Die G1-Phase als Vorbereitung auf die Replikation in der S-Phase und die G2-Phase als Zwischenschritt zur M-Phase, in der die Mitose stattfindet. Zellen im Organismus, die in der G0-Phase verharren, können durch Wachstumsfaktoren und andere Stimuli den Block zum Eintritt in den Zellzyklus überwinden und sich replizieren und teilen. In Abhängigkeit von extra- und intrazellulären Signalen wird der Zellzyklus durch eine Vielzahl von Proteinen und Enzymen gesteuert (s. Abb.1.2.a). Verschiedene „Checkpoints“ sind als Kontrollpunkte im Zellzyklus integriert. An diesen Stellen wird auf Defekte an den verschiedenen Stellen des Zellzyklus reagiert. Diese „Checkpoints“ sind vor allem nötig, um zu gewährleisten, dass die Mitose erst beginnt, wenn

die DNA vollständig und unbeschädigt repliziert ist. Im Falle einer besonders schweren Schädigung kann es statt zur DNA-Reparatur zur Einleitung der Apoptose und somit zur Elimination der betroffenen Zellen kommen. Hierbei spielt *p53* eine zentrale Rolle (Ganten und Ruckpaul, 2003; Vogelstein, 2000).

Untersuchungen der Zyklin-abhängigen Kinasen (CDK) und deren Inhibitorproteine (p16, p21, p27) sowie die Erforschung anderer in den Zellzyklus eingreifenden Gene und Proteine, wie *p53* und RAS, sind beim Harnblasenkarzinom bereits weit fortgeschritten. Dabei wird ein Hauptaugenmerk auf die Kontrollpunkte gelegt, wobei vor allem der durch das Retinoblastom-Protein (RB) gesteuerte G1→S-Kontrollpunkt zu erwähnen ist (s. Abb. 1.2.b).

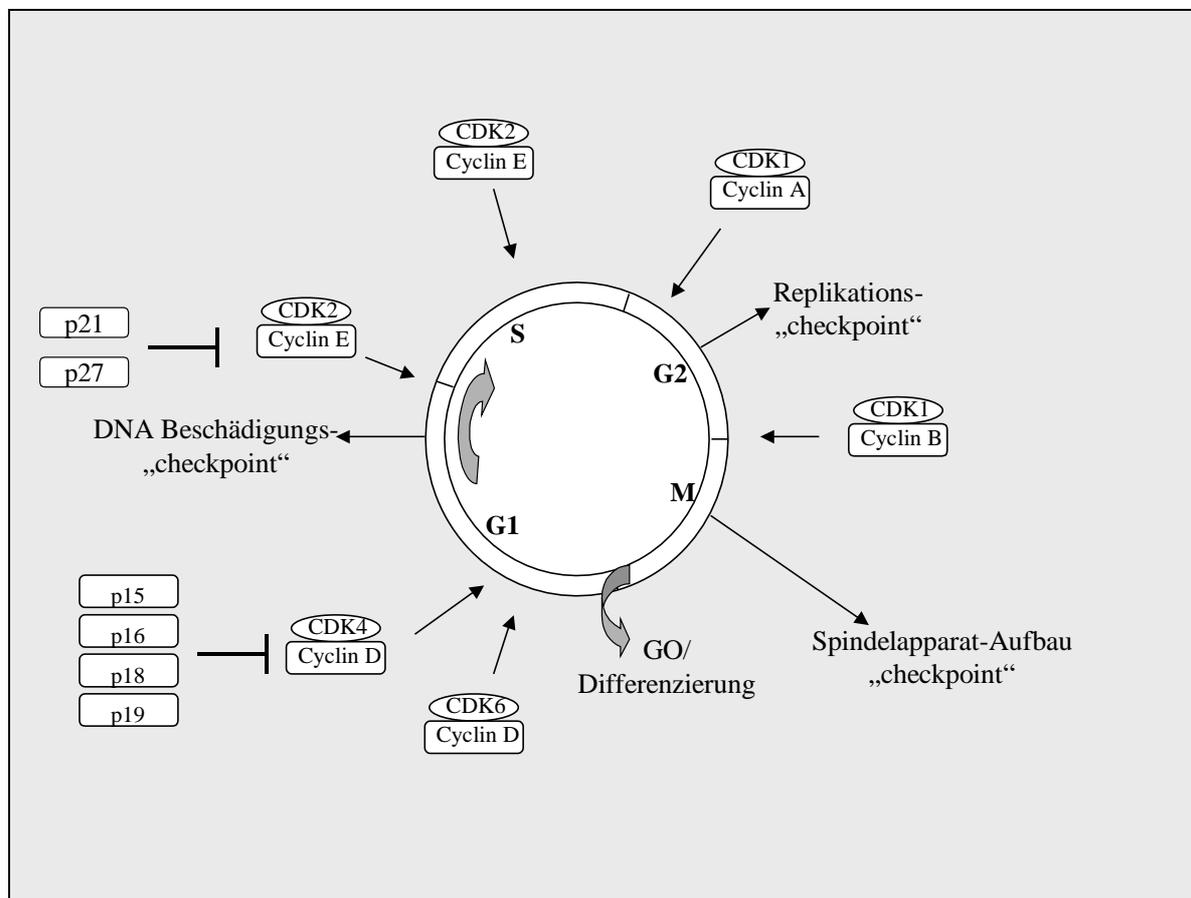


Abbildung 1.2.a Schema des Zellzyklus: Im Kreis sind die jeweiligen Phasen G1, S (DNA-Replikation), G2, M (Mitose) und G0 (Ruhephase) dargestellt, die über Cycline und deren abhängige Kinasen (CDK) reguliert werden. Inhibitorproteine, wie auf der linken Seite dargestellt, können diese inhibieren.

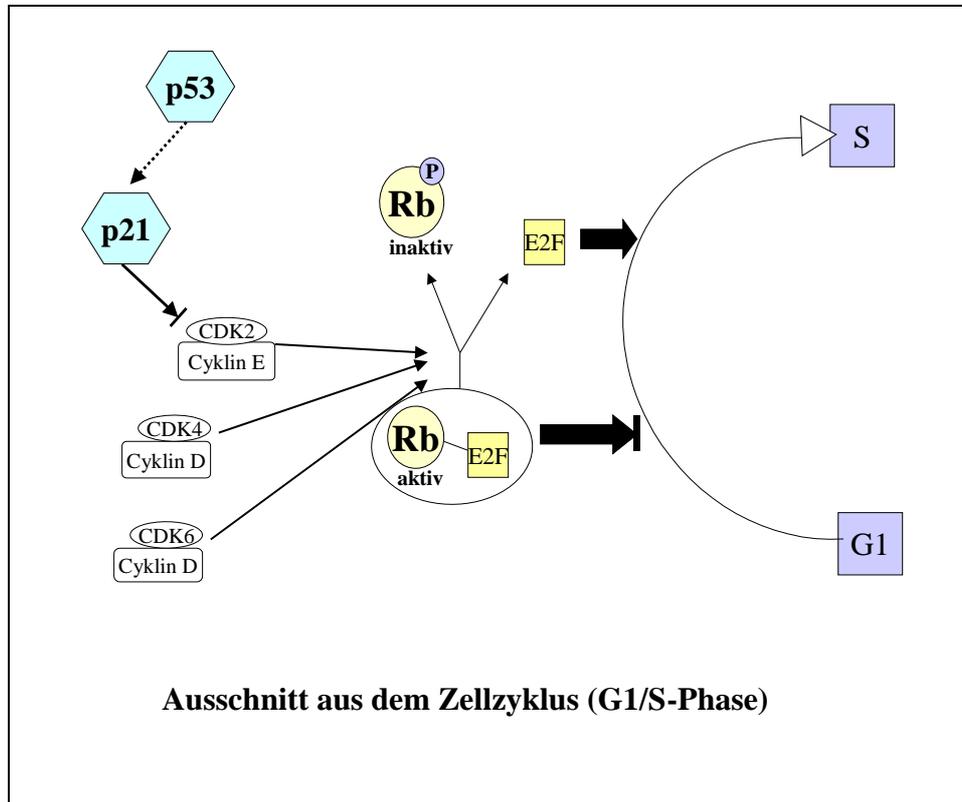


Abbildung 1.2.b Ausschnitt aus dem Zellzyklus (s. Abb. 1.2.a, linke Seite). Darstellung der Beeinflussung der **G1/S-Phase** durch **Rb** und **p53**. Im aktiven Zustand inhibiert Rb die Proliferation. Inaktiviert (=phosphoryliert durch die Zykline und deren abhängigen Kinasen (**CDK**)) wird **E2F** (einen Transkriptionsfaktor) freigesetzt, der wiederum die für die Replikation nötigen Gene aktiviert und den Übergang in die S-Phase ermöglicht; **Rb**=Retinoblastom. **p53** wirkt als „checkpoint“ Mediator durch Zwischenschritte auf die Aktivitätsform von Rb.

Die Apoptose, den sogenannten programmierten Zelltod, könnte man als einen Gegenspieler der Zellproliferation bezeichnen. Sie ist beteiligt bei der Regulation der Gewebemöiostase sowie bei der Elimination geschädigter, insbesondere mutierter Zellen. Die Auslösung der Apoptose ist daher ein wichtiger Mechanismus, um die Entartung von Zellen, deren klonale Expansion und somit das Entstehen maligner Tumoren zu verhindern. Die verminderte Fähigkeit zur Apoptose ist ein wichtiges Merkmal maligner Tumoren.

Von einer Nekrose unterscheidet sich die Apoptose licht- und elektronenmikroskopisch durch Chromatinkondensation, Ausstülpungen der Zellmembran, internukleosomale DNA-Fragmentierung, Zellschwellung und Absonderung des Zellinhaltes in Membranabschnürungen (apoptotic bodies). Letztere werden dann phagozytiert. An der Apoptose beteiligte Gene und Proteine sind auch für die Tumorentwicklung und –therapie beim Harnblasenkarzinom relevant (s. auch 1.3.)

Im Harnblasenkarzinom sind viele genetische Veränderungen als Chromosomenveränderungen erkennbar. Als Chromosomen, die häufig von Verlust oder Mutationen betroffen sind und für die Tumorentwicklung eine entscheidende Rolle spielen, werden die Chromosomen 9 und 13 sowie die Chromosomenarme 11p, 17p und 8p betrachtet. Defekte bei diesen Chromosomen führen vermutlich zum Verlust von Tumorsuppressorgenen, wie *p53* (Chromosom 17), dem *Retinoblastom-Gen* (Chromosom 13), *CDKN2A* (Chromosom 9p) und einem noch nicht eindeutig identifizierten Tumorsuppressorgen auf dem Chromosom 9q. Auch das Adhäsionsmolekül E-Cadherin (von einem Gen auf Chromosom 16q kodiert) scheint bei Verlust mit einer verkürzten Überlebenszeit zu korrelieren und somit ein Faktor für die Prognose der Patienten mit einem Harnblasenkarzinom zu sein (Otto et al., 1997; Bichler et al., 1998; Knowles, 2001).

Es gibt anhand molekularer Alterationen zwei verschiedene Theorien zur endgültigen Ausprägung eines Harnblasenkarzinoms:

I) Eine mutierte Zelle, die viele genetische Alterationen aufweist, wird selektiert und führt durch Vermehrung und Apoptoseverhinderung zum Wachstum an einer Stelle; multiple Tumorherde entstehen durch Migration (Monoklonalität).

II) Mutationen von mehreren Zellen an unterschiedlichen Stellen (Felddefekt) führen zu unabhängiger Transformation von vielen Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten, was zu multiplen Tumoren führt. Für die Monoklonalität spricht z.B. die Inaktivierung desselben X-Chromosoms in allen Tumorzellen und der Verlust des selben Allels von polymorphen Markern (Sidransky, 2002). Demgegenüber sprechen die unterschiedlichen Mutationen in einem Tumor im *p53*-Gen für die multifokale Natur des Harnblasenkarzinoms und somit für den Felddefekt (Habuchi et al., 1993a).

Weiterhin geben Untersuchungen über Mikrosatellitenmarker Hinweise auf genomische Veränderungen. Diese Mikrosatelliten sind repetitive Nukleotidwiederholungen, deren Variationen auf Replikationsfehler und defekte DNA-Reparaturaktivität hinweisen (Bender und Jones, 1999); (Orntoft und Wolf, 1998). Der so zu erfassende Loss of Heterozygosity (LOH) oder eine Mikrosatelliteninstabilität zeigen, dass so entstanden Defekte bei der Replikation und bei dem DNA-Reparaturmechanismus, also Veränderungen auf chromosomaler Ebene, eine Voraussetzung für das Entstehen von karzinomatösen Veränderungen in der Harnblase sein könnten.

1.3 Struktur und Funktion des FAS-Rezeptors

Eine wichtige Rolle bei der Apoptose spielt der FAS-Rezeptor (fibroblast associated) (Düren, 2004), dessen Gen auf dem Chromosom 10 (10q24.1) liegt und sein Ligand, der von einem Gen auf dem Chromosom 1 kodiert wird. Synonyme für den FAS-Rezeptor sind CD95 und APO1. Das Gen wird heutzutage systematisch mit *TNFRSF6* (tumour-necrosis factor receptor superfamily 6) bezeichnet (Locksley et al., 2001).

Vor allem fortgeschrittene Harnblasenkarzinome weisen Verluste von Chromosom 10q auf, wobei auch der Verlust der Funktion von PTEN und anderen Tumorsuppressorgenen neben dem FAS-Rezeptor eine Rolle zu spielen scheint (Fradet und Lacombe, 2000).

Dem FAS-Rezeptor/-Ligand System, das im Mittelpunkt dieser Arbeit stand, kommen im gesunden Organismus zwei wesentliche Aufgaben zu.

Zum einen ist dies die Kontrolle der antigenspezifischen Immunität. Im Falle eines Defektes dieses Systems kann es zu Erkrankungen kommen, wie dem Autoimmun-Lymphoproliferativen Syndrom (ALPS). Hierbei handelt es sich um eine autosomal dominant vererbte Krankheit, bei der defekte FAS-Proteine mit normalen FAS-Proteinen Komplexe bilden und so zu einem unpassenden apoptotischen Signal führen. Es kommt zu Autoimmunität und Lymphadenopathie (Krammer, 2000).

Zum anderen obliegt dem FAS-System die Regulierung der akuten Immunität, so dass eine FAS-vermittelte Zytotoxizität bzw. eine Immunhomöostase entstehen kann (Locksley et al., 2001). Die Immunhomöostase bildet die Voraussetzung für die klonale Expansion der Immunzellen bei Antigenanwesenheit. Unter den ständig produzierten B- und T-Zellen müssen diejenigen herausgefiltert und zum weiteren Wachstum gebracht werden, die spezifisch für das zu eliminierende Antigen sind. Ebenfalls müssen nach Beendigung des Antigenkontaktes die überflüssig entstandenen Immunzellen eliminiert werden. Es muss sich ein Gleichgewicht zwischen Zellwachstum und Zelltod bilden.

Auch bei der Karzinomentstehung spielt das Immunsystem eine wesentliche Rolle und bildet T- und B-Zellen gegen die als fremd erkannten Tumorzellen. Scheinbar können sich manche Tumorzellen genau diesem Angriff widersetzen (siehe „Counterattack“-Hypothese weiter unten).

Der FAS-Rezeptor spielt in der Erhaltung des immunologischen Gleichgewichts als zentrales Regulationssystem also eine entscheidende Rolle. Nicht nur bei der negativen Selektion im Thymus sondern auch bei peripheren T-Lymphozyten determiniert das FAS-System die Immunantwort. Vor allem bei der Interaktion von T-Zellen und Tumorzellen erscheint FAS

wichtig: Normalerweise können die von den T-Lymphozyten produzierten FAS-Liganden in den FAS-Rezeptor exprimierenden Zellen eine Kaskade auslösen, die zur Apoptose führen kann. In fortgeschrittenen Tumoren ist genau dieser Mechanismus außer Kraft gesetzt (Jang et al., 2003). Trotz Anwesenheit von Immunzellen können diese die Tumorzellen in manchen fortgeschrittenen Karzinomen nicht eliminieren oder das Tumorwachstum eindämmen. Dabei sind sicherlich mehrere Faktoren bedeutsam (Krammer, 2000; Krueger et al., 2003; Li-Weber und Krammer, 2003). Zu diesen Faktoren gehören Veränderungen des FAS-Rezeptors und seines Liganden.

Der FAS-Rezeptor ist ein sog. „Todesrezeptor“, der am Vorgang der Apoptose wesentlich beteiligt sein kann. Er ist ein Mitglied der Tumornekrosefaktorrezeptorfamilie (daher die Bezeichnung mit *TNFRSF6*). Alle Todesrezeptoren besitzen die gleiche Grundstruktur und sind sowohl membranständig als auch in löslicher Form zu finden. Typisch für die Familie der Todesrezeptoren sind 2-6 extrazelluläre cysteinreiche Domänen.

Als CD95 oder Apo-1 wurde FAS in mehreren vorangegangenen Studien als wesentlicher Faktor in der Entwicklung von v.a. hämatologischen Tumoren beschrieben. Sein Ligand, FAS-L oder CD95L (Gen auf Chromosom 1), wird normalerweise von zytotoxischen T-Lymphozyten exprimiert, kommt aber auch in Tumorgewebe vor (Lee et al., 1999a). Während der FAS-Rezeptor von normalen epithelialen Zellen exprimiert wird, wird er in vielen fortgeschrittenen Karzinomen herunterreguliert.

Der FAS-Rezeptor enthält extrazelluläre und intrazelluläre Abschnitte, die durch eine einzelne Transmembrandomäne verbunden sind. Aktivierung des FAS-Rezeptors erfolgt durch Interaktion mit seinem Liganden (CD95-L) oder einem agonistischen Antikörper auf der extrazellulären Seite (PLAD). Diese werden an selektiven Bindungsstellen in der extrazellulären Domäne erkannt. Die Bindung des Liganden induziert eine Oligomerisierung, in den meisten Fällen eine Trimerisierung (s. Abb. 1.3.1.).

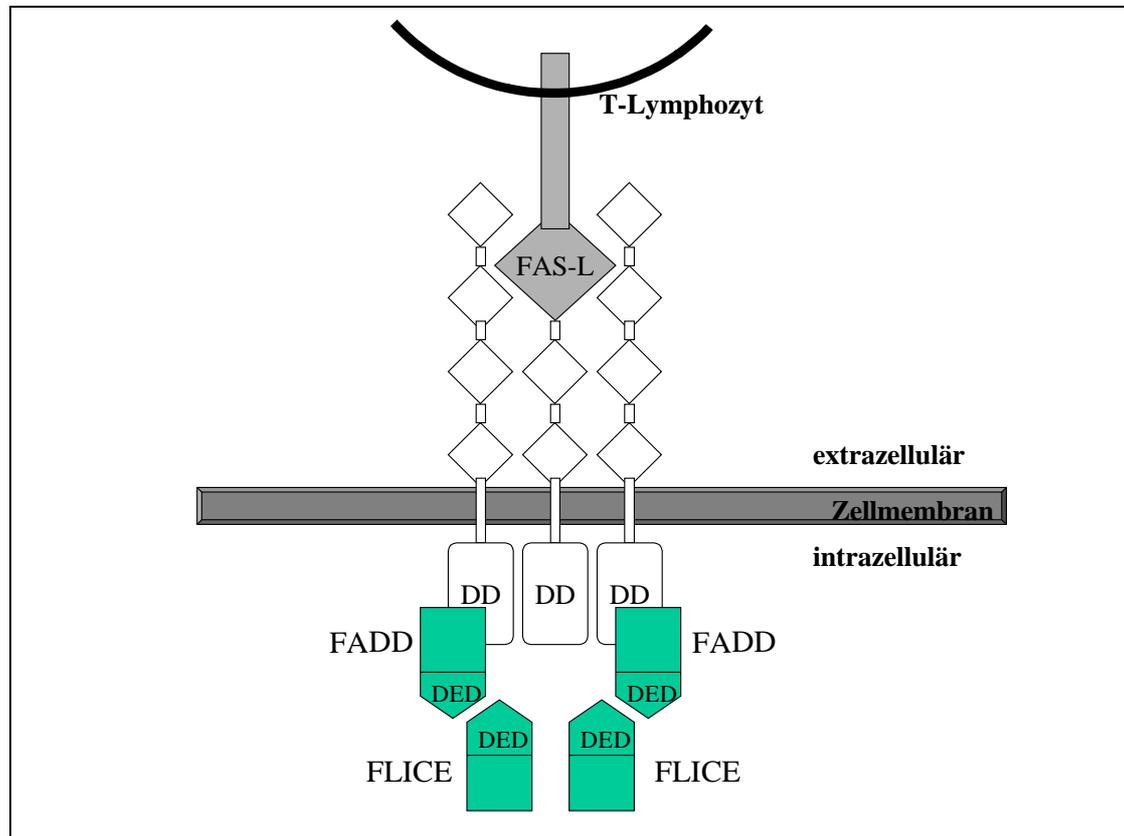


Abbildung 1.3.1. Schematische Darstellungen des FAS-Rezeptors als Mitglied der Tumornekrosefaktor-Rezeptorfamilie mit trimerer Struktur und mit Bindung des Liganden (FAS-L, exprimiert von einem T-Lymphozyten) an der cysteinreichen extrazellulären Seite; **DD**: Death Domain auf der intrazellulären Seite, **DED**: Death effector domain am **FADD** (FAS-Rezeptor Adaptermolekül Death-Domain) und an **FLICE**

Der intrazelluläre Teil verfügt über keine enzymatische Aktivität und muss somit sein Signal - die Vermittlung der extrazellulären Ligandenbindung und die so herbeigeführte Rezeptoraktivierung - über rezeptorassoziierte Moleküle weitergeben. Diese Moleküle sind Proteine und bilden mit den stimulierten und trimerisierten FAS-Rezeptoren einen Komplex. Dieser Komplex wird dann DISC (death-inducing signaling complex) genannt. Hierbei assoziiert das Adapterprotein FADD über seine DED (Death effector domain) an den intrazellulären, cysteinreichen und mit Disulfidbrücken ausgestatteten Teil des FAS-Rezeptors, die „Death Domain“ (DD). Über diese DED wird Procaspase 8 („FLICE“) rekrutiert und in den DISC aufgenommen. Sie enthält ebenfalls eine DED und wird dann proteolytisch gespalten und in die aktivierte heterotetramere Caspase 8 überführt. Da diese die erste Caspase für die nachfolgende Caspasenkaskade ist, wird sie auch Initiatorcaspase genannt. Innerhalb dieser Kaskade werden schnell andere Caspasen gespalten, wie z.B.

Caspase 3, die dann aktiviert ins Zytoplasma freigesetzt werden und die Komplettierung des Zelltodprogrammes durchführen und zur letztendlichen Apoptose führen (s. Abb. 1.3.2.).

Die DISC-Bildung verläuft in Zellen unterschiedlich stark. Deshalb unterscheidet man zwei verschiedene Zelltypen, die mit Hilfe des FAS-Rezeptors den Vorgang der Apoptose einleiten:

In Typ-I-Zellen setzt die Trimerisierung eine Proteinkaskade in Gang, wobei viel DISC gebildet wird. Folgerichtig entsteht auch eine ausreichende Menge an aktivierter Caspase 8, die in der Lage ist, Effektorcaspasen, wie die Caspase 3, direkt zu aktivieren. Ohne Umweg wird die Caspasenkaskade induziert, die zum Zelltod führt.

Im Gegensatz dazu zeigen Typ-II-Zellen nur eine minimale DISC-Bildung. Die somit nur geringe Menge an aktivierter Caspase 8 führt zu einer Spaltung von BID, welches eine Aktivierung der Mitochondrien bewirkt. Die Kaspasenkaskade wird folglich nicht direkt angestoßen. Vielmehr fungieren die Mitochondrien als Signalverstärker. Sie setzen proapoptotische Moleküle, wie z.B. das Cytochrom c, frei, die zusammen mit anderen Faktoren das „Apoptosom“ bilden. Dieses Apoptosom bildet den zweiten initiiierenden Komplex der Apoptose. In der Folge dieser Ereignisse werden die weiteren Caspasen in dem Umfang aktiviert, der zur Apoptose führt.

In beiden Zelltypen sind die Mitochondrien zwar aktiviert, jedoch nur in Typ-II-Zellen für das Apoptoseprogramm notwendig. Ebenso wird deutlich, dass nur die Typ-II-Zellen durch eine Überexpression von BCL2-Familien-Mitgliedern, die die Freisetzung von Molekülen (wie das Cytochrom c) aus den Mitochondrien inhibieren, in ihrer apoptotischen Funktion gehemmt werden können.

Für beide Zelltypen gilt, dass Caspase 8 essentiell ist für Übertragung der Signalkaskade, um die Apoptose auszulösen. Ohne Caspase 8 sind die Zellen resistent gegenüber FAS-vermittelter Apoptose (Ganten und Ruckpaul, 2003).

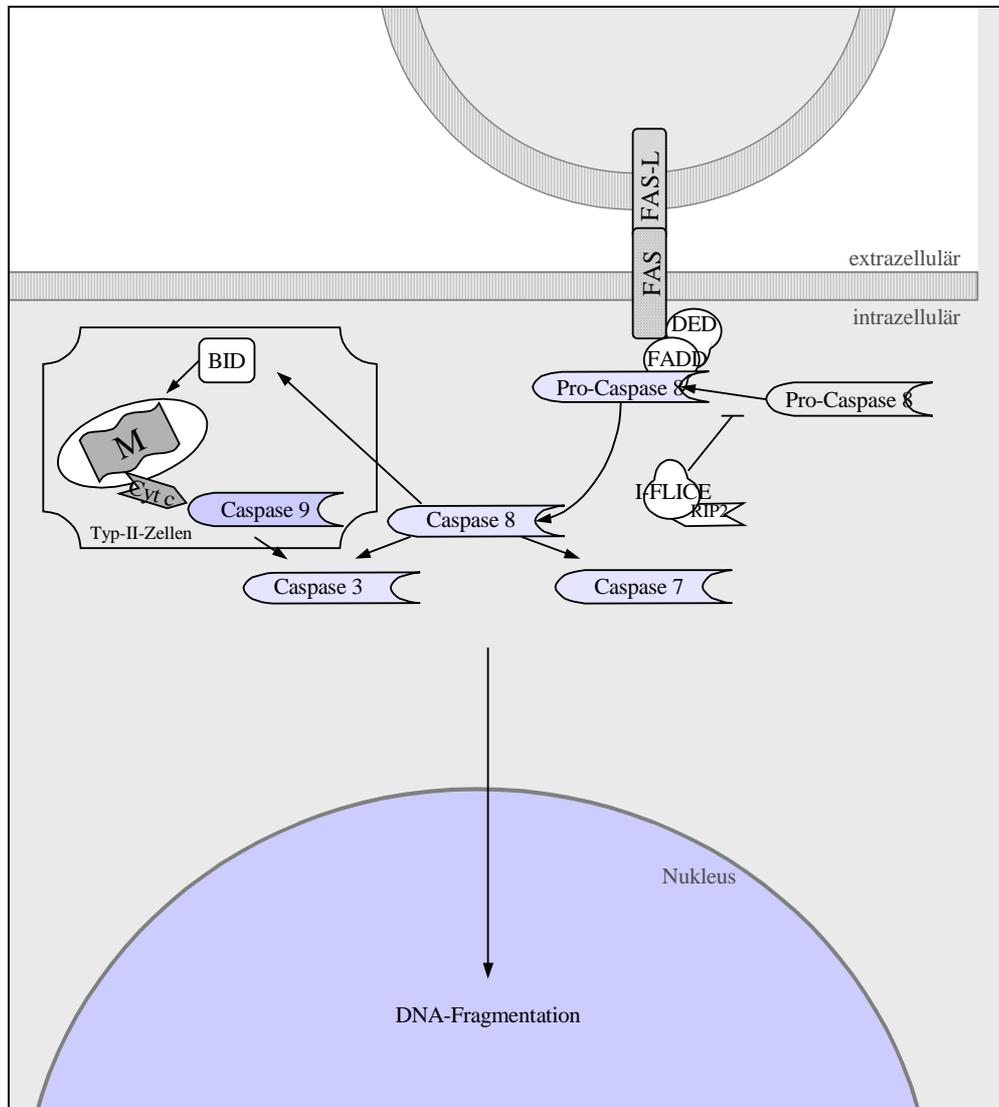


Abbildung 1.3.2. Signalkaskade zur Apoptose über FAS-Rezeptor-Aktivierung: Bildung des DISC, bestehend aus FAS-Rezeptor mit der Death Domain, FADD mit der DED, Pro-Caspase 8, die dann gespalten wird zur aktiven Caspase 8. Dieser Vorgang ist hemmbar durch I-Fllice. Links oben: In Typ-II-Zellen wird wenig DISC gebildet; Signalverstärkung über die Mitochondrien (M), die Cytochrom c (Cyt c) bilden und dann ebenfalls zu einer Aktivierung von Caspase 3 führen. Ausführlich: s. Text

Letztendlich sind auch diese beiden Wege nicht allein ausschlaggebend für das endgültige Auftreten einer Apoptose. Zusätzlich gibt es auch andere Proteine, die diesen Mechanismus regulieren, z.B. FLIP (FLICE inhibiting Proteine, I-Fllice), das die proteolytische Spaltung von Prokaspase 8 inhibiert (Jonsson et al., 2003). Andere Proteine, wie die IAPs (inhibitor of apoptosis) wirken über eine Inhibition der Caspasen. Zu dieser Familie gehört auch das Survivin. IAP-Proteine können an Caspasen (vor allem an die Caspasen 3, 7 und 9) binden und diese inhibieren (Ambrosini et al., 1997).

In normalen Zellen wird die Apoptose sehr präzise reguliert. Eine wichtige Rolle hat dabei das *p53*-Protein. *p53* ist in vielen Karzinomen mutiert, was sich in Defekten von Zellzykluskontrollpunkten (s.1.2.) äußert. Normales *p53* hat darüber hinaus eine proapoptotische Wirkung. Wahrscheinlich greift es auch über die Regulation des FAS-Rezeptor/FAS-Ligand Systems in das Gleichgewicht zwischen pro- und anti-apoptotischen Signalen ein. Es aktiviert die FAS-Expression über *p53*-spezifische Bindungsstellen am Promoter und einem Intron. Dieser Zusammenhang ist auch in soliden Tumoren der Leber (Muller et al., 1998) und des Kolons belegt (Zalcenstein et al., 2003). Weiterhin kann *p53* auch über den mitochondrialen Weg die Aktivierung von Caspasen auslösen (Fukazawa et al., 1999).

Wie sich die Mutationen von *p53* auf die FAS-Rezeptor-Expression im Harnblasenkarzinom auswirken, war bisher nicht untersucht.

Die lösliche Form des FAS-Rezeptors findet sich ebenfalls in vielen epithelialen Zellen. Wenn dieser in großer Zahl exprimiert wird, können die FAS-Liganden oder - im Experiment Antikörper - durch die löslichen FAS-Rezeptoren abgefangen werden, bevor sie auf den membranständigen Rezeptor treffen und die Signalkaskade der Apoptose auslösen könnten.

Veränderungen im FAS-Rezeptor/Ligand-System werden demnach als eine Möglichkeit angesehen, dass Tumorzellen den Vorgang der Apoptose nicht durchlaufen und sich so einen Selektionsvorteil verschaffen könnten. Verschiedene Mechanismen können zu einer Inaktivierung dieses Systems führen: Zum einen könnte das apoptoseinduzierende System durch einen zentralen (z.B. genetischen Defekt), zum anderen durch einen peripheren Mechanismus (z.B. Beeinflussung der Signalkaskade) außer Kraft gesetzt worden sein. Zur Verhinderung der FAS-induzierten Apoptose kommen Gendefekte in Betracht, die die Funktion des FAS-Rezeptor/Ligand-Systems einschränken. Dabei könnten zum einen übergeordnete Gene, die die FAS-Expression beeinflussen, betroffen sein oder zum anderen die Gen-Sequenz, die den FAS-Rezeptor selbst kodiert:

I) Da *p53* FAS induziert, könnte eine Herunterregulation des FAS-Rezeptors in Folge von Mutationen im *p53*-Gen in Tumorzellen auftreten (Zalcenstein et al., 2003).

II) In RAS-transformierten Mauszellen und gelegentlich in Prostatakarzinomen tritt eine Hypermethylierung des FAS-Gens auf und könnte zu einer Unterdrückung der Transkription beitragen. Dieser Mechanismus scheint im Harnblasenkarzinom jedoch nicht in einem relevanten Ausmaß beteiligt zu sein (Santourlidis et al., 2001).

III) Genauso könnte eine fehlende Apoptose der Tumorzellen in Folge einer Mutation in der Death Domain des FAS-Rezeptors auftreten und dessen Aufgabe zur Signaltransduktion

innerhalb der Zelle einschränken. Dies wurde in einer Untersuchung von Harnblasenkarzinomen in Korea beobachtet (Lee et al., 1999b).

Ein peripherer Mechanismus zur Beeinflussung der FAS-induzierten Apoptose wäre ebenso denkbar. In Form einer Blockierung des Apoptosevorgangs durch einen defekten Signalweg innerhalb der Zelle („Postrezeptordefekt“) könnte eine Übertragung des vorhandenen Signals am Rezeptor in die Zelle verhindert werden.

Tumorzellen, die sich auf eine dieser Weisen dem Immunsystem entziehen können, könnten einer positiven Selektion unterliegen. Insbesondere wäre bei diesen Zellen zu erwarten, dass das Eindringen des Tumors ins benachbarte Gewebe und die Metastasierung erleichtert sind. Die FAS-Rezeptor-Expression und die Funktionalität anderer zur Apoptose führender Signalwege könnten daher eng mit der Progression zusammenhängen und über die Prognose des Karzinoms Aufschluss geben.

Wie diese Arbeit zeigen wird, gibt es auch entartete Zellen, die trotz FAS-Ligand/FAS-Rezeptorprotein-Expression nicht einer Apoptose unterliegen. Demnach könnte es in diesen Zellen einen Mechanismus geben, der verhindert, dass trotz eines scheinbar aktiven FASR/FASL-Systems eine apoptotische Wirkung ausbleibt.

Eine weitergehende Hypothese, wie eine Tumorzelle sich gegen die körpereigene Abwehr und die Apoptose, ausgelöst durch Liganden, die von T-Zellen exprimiert werden, schützen kann, ist das „Counterattacking“. Dabei wird der FAS-Rezeptor einer Tumorzelle herunter- und der Ligand hochreguliert, so dass die gesunden Zellen (auch T-Lymphozyten) statt der transformierten Tumorzellen zugrunde gehen und somit Platz für das Wachstum des Tumors geschaffen ist (s. Abb. 1.3.3.). Diese Hypothese ergibt sich aus der offensichtlichen Ausweichung („Escape“) fortgeschrittener Karzinome vor dem Immunsystem (Igney und Krammer, 2002b). Obwohl Karzinome aufgrund ihrer Ausbreitung im Gewebe mit größerer Wahrscheinlichkeit in Kontakt mit dem menschlichen Immunsystem kommen, können manche Tumore diesem entgehen. Die Herunterregulation des FAS-Rezeptors wäre eine logische und effektive Ursache für dieses Phänomen. Im Rahmen der „Counterattack“-Hypothese gäbe es eine Erweiterung dieses Mechanismus, indem auch FAS-Ligand exprimiert wird und pro-apoptotisch auf die Immunzellen im menschlichen Organismus wirken könnte, die selbst FAS-Rezeptor exprimieren.

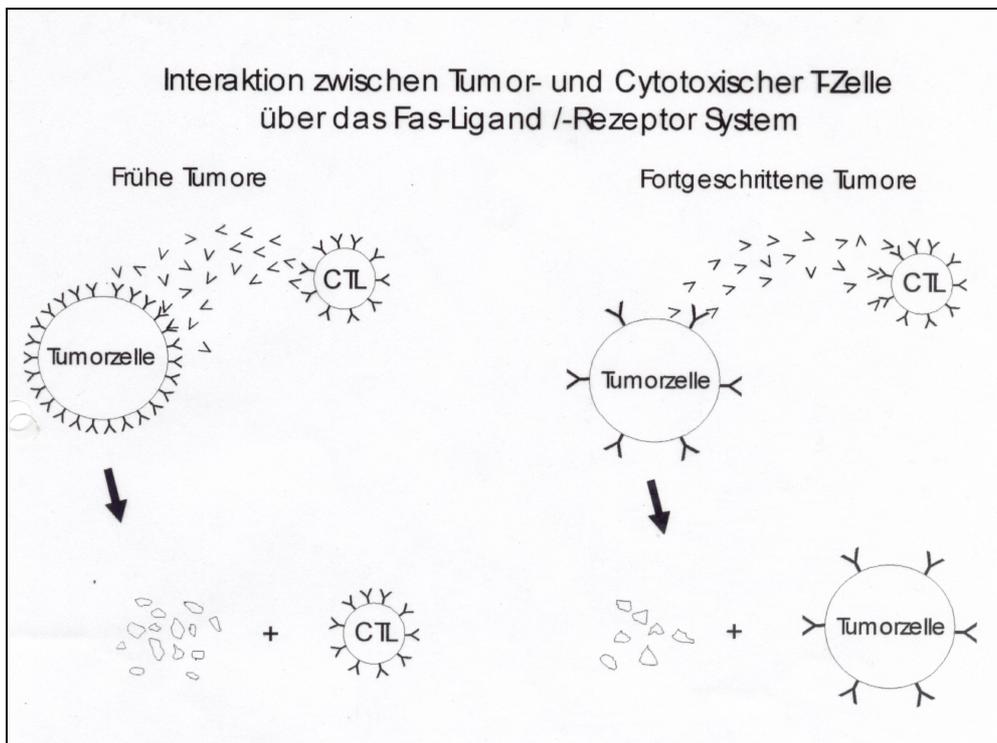


Abbildung 1.3.3. Vereinfachte Darstellung der Counterattack-Hypothese beim FAS-Rezeptor. Linke Seite: CTL (Cytotoxische T-Lymphozyten) produzieren den FAS-Liganden, der an den Rezeptor der Tumorzelle bindet und diese durch Apoptose zerstört. Rechte Seite: Die Tumorzelle reguliert den Rezeptor hoch, die Liganden binden an den Rezeptoren der CTL und zerstören diese. Die Tumorzelle hat sich geschützt und überlebt.

2. Ziel der Arbeit

Das Harnblasenkarzinom ist eine häufige Erkrankung mit sehr unterschiedlichem Verlauf, für die heute eine Vielfalt von therapeutischen Optionen zur Verfügung stehen. Jedoch sind sowohl die Entwicklung zu einem invasiven Karzinom als auch die Reaktion auf die verschiedenen Therapieoptionen in vielen Fällen nicht vorhersehbar. Erkenntnisse über die molekularen Mechanismen bei seiner Entstehung haben grundlegende Einsichten erbracht, jedoch noch keine eindeutigen Marker, die Aussagen über die Ausdehnung des Tumors - besonders den Metastasenbefall - und seine Malignität über etablierte histopathologische Parameter hinaus erlauben.

Für den natürlichen Verlauf eines Tumors und seine Reaktion auf Therapien spielen Veränderungen der Apoptose eine entscheidende Rolle. In vielen anderen Tumoren sind daher Gene, Rezeptoren und intrazelluläre Proteine, die an der Apoptose beteiligt sind, schon gründlich untersucht worden. Diese weisen dem FAS-Rezeptor als einem Faktor bei den apoptotischen Vorgängen in Zellen eine zentrale Rolle zu. Zum einen fungiert er als Vermittler apoptotischer Signale von anderen Zellen und zum anderen als Ziel verschiedener Proteine, die intern die Sensitivität gegenüber einer Apoptoseinduktion regulieren. Auf diese Weise wirkt FAS an der Kontrolle der Gewebshomöostase und der Reaktion auf therapeutische Interventionen mit.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Expression des FAS-Rezeptors im Harnblasenkarzinom. Diese wurde sowohl auf der Protein- als auch mRNA-Ebene analysiert. Mittels Immunhistochemie wurde die FAS-Expression in Harnblasenkarzinomgeweben untersucht und mit dem Tumorstadium, dem Differenzierungsgrad und der Metastasierung korreliert. Durch Untersuchung der mRNA des FAS-Rezeptors galt es herauszufinden, auf welcher Ebene diese Veränderungen stattfinden. Dabei wurde die mRNA-Expressionsanalyse des membranären und löslichen FAS-Rezeptors separat verfolgt. Ziel dieser Untersuchungen war, die Eignung von FAS als prognostischen Marker zu prüfen und die Rolle von FAS, v.a. bei Invasion und Ausbreitung von Harnblasenkarzinomen, besser verstehen zu können.

Einige Anhaltspunkte deuten auf eine wichtige Bedeutung von *p53* nicht nur für „Checkpoints“ des Zellzyklus, sondern auch für die FAS-Rezeptor-Expression. Viele Untersuchungen haben den Verlust von *p53* bei Harnblasenkarzinomen belegt. Daher erschien eine Untersuchung der möglichen Korrelation zwischen *p53*-Veränderungen,

ermittelt durch immunhistochemischen Nachweis des akkumulierten mutierten Proteins, und dem FAS-Rezeptor, auf den es regulierend wirken soll, aussichtsreich.

Schließlich wurden auch Mutationsanalysen der „Death Domain“ des FAS-Rezeptors mittels SSCP und Sequenzierung durchgeführt, da berichtet worden war, dass diese in Harnblasenkarzinomen mutiert sein soll.

3. Material und Methoden

3.1 Verwendete Chemikalien, Lösungen, Geräte und Software

Chemikalien

ABC Kit	Vector Lab. Inc.
Accu-Gel (29:1), 40%	National Diagnostics, Atlanta (USA) über Biozym, Oldendorf
Agarose	Biozym, Oldendorf
AMV Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim
Anti-FAS C-20-Primärantikörper - aus Kaninchen -	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz (USA)
Anti-rabbit Sekundärantikörper - aus Ziege biotinyliert -	Vector Lab. Inc.
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen
Blood & Cell Culture DNA Midi Kit	Qiagen, Hilden
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Desoxyribonukleosidtriphosphatmischung (dNTP)	Peq-Lab, Erlangen
Diaminobenzidin (DAB)	Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen
Ethanol	Merck, Darmstadt
Fötale Kälberserum	Seromed Biochrom, Deisenhofen
H ₂ O ₂	Merck, Darmstadt
Hämalaun Färbelösung nach Mayer	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen
Methanol	Merck, Darmstadt
Mineralöl	Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen
Normal Goat Serum	Vector Lab. Inc.
Oligo p(dT) ₁₅ Primer für cDNA Synthese	Roche, Mannheim
Oligonukleotid-Primer	MWG Oligo Synthesis Biotech, Ebersberg unter Verwendung des Programms Oligo 4.1, Primer Analysis Software, National Biosciences, Inc.
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin

PUC-Mix DNA-Längenmarker	Peq-Lab, Erlangen/ MBI Fermentas
Qiagen Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Reverse Transkriptase (AMV)	Promega, Mannheim
RNeasy [®] Kit (Mini/Midi)	Qiagen, Hilden
Stop Loading Buffer	Amersham Pharmacia, Freiburg
Taq-Polymerase	Finnzyme OY, Espoo (Fin) über Biometra, Göttingen
TEMED	Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen
Triton-X 100	Fluka Chemie, Buchs, CH
Xylol	Merck, Darmstadt
Zellkulturmedien	Life Technologies, Karlsruhe

Soweit nicht gesondert vermerkt, wurden alle weiteren Chemikalien von den Firmen Merck, Darmstadt bzw. Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen bezogen.

Lösungen und Gele

Entwickler:	0,5% Formaldehyd 6 g NaOH
Ethidiumbromidlösung	50 µg/ml Ethidiumbromid
Fixierer:	1% Eisessig 10% Ethanol auf H ₂ O
Gelfixierer:	7,5 g Natriumcarbonat in 1000 ml A.dest.
6 × Ladepuffer für Agarosegele	30% Glycerin 0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol FF in H ₂ O 0,2% EDTA pH = 8,0
Ladepuffer für Polyacrylamidgele	95% Formamid 20 mM EDTA 0,05% Bromphenolblau 0,05% Xylencyanol

PBS	Biochrom, Berlin 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ pH = 7,2
PBSA-Lösung	2% Rinderserumalbumin in PBS, Lagerung bei - 20°C
10 × PCR-Puffer	20 mM Tris HCl 16 mM Ammoniumsulfat 1 mM Magnesiumchlorid pH = 8,55
Silbernitrat:	0,15% AgNO ₃ , in dunkler Flasche aufbewahrt
SSCP-Polyacrylamidgel:	3,5 g Harnstoff 8 ml Accu-Gel (29:1), 40% 3 ml TBE (10 ×) ad 30 ml H ₂ O 50 µl TEMED 500 µl APS (5%)
TAE (50 ×)	242 g Tris Base 57,1 ml Eisessig 100 ml 0,5 M EDTA ad 1000 ml H ₂ O; pH = 8,0
TBE (10 ×)	108 g Tris Base 55 g Borsäure 20 ml 1 M EDTA ad 1000 ml H ₂ O; pH = 8,0

Geräte

Fotodokumentationssystem (Gel Print 2000i)	MWG-Biotech, Ebersberg
Lichtmikroskop DIALUX 22EB	Leitz, Wetzlar
pH-Meter	WTW, Weilheim
Sequenziergerät	ABI Prism Gene Analyser 310

TaqMan-Ansatz in

GeneAmp 5700 Sequenz-Detektionssystem

Applied Biosystems, Foster City

Tris-Thermo-Block Inkubationsgerät

Biometra, Göttingen

Software

Oligodesign: Oligo 4.1, Primer Analysis Software, National Biosciences Inc., 1992

3.2 Gewebe für die immunhistochemischen Untersuchungen

Es wurden Gewebeschnitte von insgesamt 83 Patienten mit Harnblasenkarzinomen immunhistochemisch untersucht.

Dafür wurden die intraoperativ gewonnenen, in Paraffin eingebetteten Gewebepräparate, zum größten Teil aus Zystektomien, zum Teil aus transurethralen Resektionen (TUR-BTs), zum Teil aus Nephrektomien oder Nephroureterektomien verwendet. Alle Gewebe wurden durch den Pathologen begutachtet und histologisch klassifiziert (UICC-Vereinbarung, 1997). Alle Präparate wurden zwischen 1995-1999 in der Heinrich-Heine-Universität gewonnen. Von den Blöcken wurden mit einem Mikrotom jeweils 5 µm dicke Präparate gewonnen, die auf einen Objektträger aufgetragen wurden.

Insgesamt ergab sich bei 83 Patienten folgende Verteilung:

Tabelle 3.2. Verteilung der 83 Präparate, je nach Tumorstadium, Differenzierungsgrad und Lymphknoten-/Metastasenbefall. Die Präparate der Gruppen NOM0 und NxMx wurden zur Vereinfachung in den folgenden Auswertungen zusammengefasst.

Tumorstadium		Differenzierungsgrad		Lymphknoten/Metastasen	
pTa	5	G1	1	N+/M+	21
pT1	7	G2	22	NOM0	45
pT2	19	G3	55	NxMx	17
pT3	39	G4	5		
pT4	13				
Gesamt	83	Gesamt	83	Gesamt	83

3.3 Zelllinien und Kultivierung

Es standen Zelllinien von Prostata-, Harnblase- und Nierenzellkarzinomen zur Verfügung. Die Zelllinien VMCub1, VMCub2 und HT1376 stammten ursprünglich von Dr. J. Fogh, Sloan-Kettering Institute aus den USA (Rye, NY). Ihre Identität wurde von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GMBH) überprüft. Alle Zelllinien wurden regelmäßig auf Kontamination durch Mykoplasmen hin getestet. Die Zelllinien LN-Cap, DU145 (Prostata) und SK-RC-47 (Niere) wurden von der Urologischen Klinik der HHU bereitgestellt. Weiterhin zur Verfügung standen die Zelllinien BFTC-905, BFTC-909, 647v, 639, TCC-Sup, J82, T24 und RT4. RT4 stammte wie auch TCC-Sup und BFTC-905 aus oberflächlichen Harnblasenkarzinomen, wobei die restlichen Zelllinien aus hochgradigen oberflächlichen Karzinomen stammten.

Kultiviert wurden die Zelllinien in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DNEM, Life Technologies) mit 15% bzw. 0,5% hitzeaktiviertem fötalen Kälberserum (Life Technologies) und 100 µg/ml Dihydrostreptomycinsulfat und 100 U/ml Penicillin (Harnblasenkarzinome) oder in RPMI 1640 Medium unter Zusatz von 10% hitzeinaktiviertem fötalen Kälberserum und 100 µg/ml Dihydrostreptomycinsulfat und 100 U/ml Penicillin (Prostata). Die Nierenzellkarzinomzelllinie SK-RC47 wurde in DMEM mit 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum, nicht-essentielle Aminosäuren und 100 mg/ml Dihydrostreptomycinsulfat sowie 100 U/ml Penicillin kultiviert.

Normalurothelzellen wurden aus Ureteren bei Nephrektomie-Operationen von Patienten gewonnen (nach der Methode, beschrieben in Southgate et al.,1994). Alle Untersuchungen an Normalurothelzellen wurden nach Beseitigung von nicht-epithelialen Zellen durch eine erste Passagierung vorgenommen.

3.4 Präparation von DNA und RNA

Es wurde hochmolekulare DNA mit Hilfe des Qiagen Blood & Cell Culture DNA Kits aus Zelllinien von 2 Prostata-, 16 Harnblasenkarzinomen, sowie aus 3 Blutproben isoliert. Zur Isolierung der DNA aus Zelllinien wurden die Zellen einer konfluent bewachsenen 175 cm²-Kulturflasche nach Absaugen des Mediums zunächst trypsiniert und unter Zugabe von 2 ml frischem Medium / FCS mit 1500 × g für 10 Min. bei 4°C pelletiert. Das Zellpellet wurde

zweimal mit kaltem PBS gewaschen und zentrifugiert bevor es mit einem Volumenteil Zell-Lysispuffer und 3 Volumenteilen A. dest. für 10 Min. auf Eis inkubiert wurde. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Zellen unter Zugabe des Nukleus-Lysispuffers und QIAGEN Protease (20 mg/ml) bei 50°C für 2 Stunden inkubiert.

Für die Aufarbeitung genomischer DNA aus Blutproben wurde EDTA-Blut von Patienten der Urologischen Klinik genutzt. Es wurden jeweils 5 ml EDTA-Blut mit 5 ml Zell-Lysispuffer und 15 ml A. dest. für 10 Min. auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation mit $1500 \times g$ für 10 Min. bei 4°C wurden die Nuklei pelletiert und unter Zugabe des Nukleus-Lysispuffers und QIAGEN Protease (20 mg/ml) ebenfalls bei 50°C für 2 Stunden inkubiert.

Nach elektrophoretischer Auftrennung auf einem Agarose-Gel wurde die DNA mit Hilfe des Gel-Extraction Kits (Qiagen) wie folgt eluiert: Nach Zugabe von 3 Volumen QG Puffer/1 Volumen Isopropanol wurden die Proben für 10 Min bei 50°C aufbereitet, zentrifugiert und noch mal mit 750 μ l PE Puffer versetzt. Nach dem Spülen mit H₂O wurde die Eluierung vervollständigt und die Proben so zum Messen der FAS-mRNA-Expression mit FRET vorbereitet.

Die RNA-Isolierung unter Verwendung des RNeasy-Kits entsprach den Angaben des Herstellers.

3.5 Immunhistochemische Untersuchungen

Bei den immunhistochemischen Untersuchungen wurden die Paraffinschnitte jeweils 12 Min. in einem Xylol- und 2 Min. in einem 99,5% Ethanolbad entparaffiniert. Durch 30 Min. Behandlung in 1%iger H₂O₂ in Methanol wurden die endogenen Peroxidasen inaktiviert. Nach der Rehydrierung, Eintauchen der Gewebeproben in Alkoholbäder mit absteigender Alkoholkonzentration für je 5-10 Sek. und abschließendem Spülen in PBS (2×2 Min.) wurden die Schnitte mit 0,5% Triton X-100 in PBS 45 Min. vorbehandelt.

Um unspezifische Reaktionen zu vermeiden, wurden die Schnitte mit jeweils 300 μ l normalem Ziegenerum (1:200 verdünnt in 2% PBSA) bei RT behandelt. Danach wurde der Primärantikörper C-20 FAS Antikörper (Santa Cruz) in einer Verdünnung von 1:250 in 2% PBSA über Nacht auf die Präparate gegeben (18-20 Stunden).

Nach einer Spülung in PBS (2×2 Min.) wurden am darauffolgenden Tag der biotinylierte Sekundärantikörper (Ziegen-anti-Kaninchen-IgG Antikörper; 1:200 verdünnt in 2% PBSA) aufgetragen, 2×2 Min. in PBS gespült und ein Avidin-Biotin-Komplex (1:100 verdünnt in 2%

PBSA) für jeweils 60 Min. aufgetragen, um die Antikörperbindung sichtbar zu machen. Nach einer weiteren Spülung in PBS (2×2 Min.) wurden die Proben 3 Min. mit konzentrierter Diaminobenzidinlösung (DAB) inkubiert. Die gebundene Peroxidase wandelt das Diaminobenzidin in einen braunen Farbstoff um. Die Gegenfärbung erfolgte nach einer Spülung in Aqua dest. (2×2 Min.) durch kurzes Eintauchen in Mayers Hämalaun-Fertiglösung. Danach folgte eine Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe, Überführung für 2 Min. in Xylol und Eindeckelung.

Bei jeder Färbereihe wurde je eine Negativkontrolle mitgeführt, bei der die Behandlung mit dem Primärantikörper unterlassen und statt dessen erneut normales Ziegen Serum auf die jeweiligen Präparate gegeben wurde.

Von einigen Patienten wurden auch mehrere Paraffinschnitte von unterschiedlichen Teilen des Tumorgewebes (über die Histopathologische Abteilung der HHU Düsseldorf befundet) untersucht.

Die Evaluierung erfolgte durch 3 unabhängige Personen (Dr. Müller, Prof. Dr. W.A. Schulz, cand. med. Simone Maas). Bei Nichtübereinstimmung wurden die Präparate erneut begutachtet und erst bei Eindeutigkeit in die endgültigen Ergebnisse miteinbezogen. Die unterschiedlichen Ergebnisse der Anfärbbarkeit wurden in vier Quartale, je nach den prozentual positiv gefärbten Teilen, unterteilt (0-25%, 26-50%, 51-75%, 76-100%).

Der immunhistochemische Nachweis von *p53* Akkumulation wurde von Dr. Christine Steinhoff durchgeführt und ist in ihrer Dissertation (Steinhoff, 2001) beschrieben. Die Anfärbbarkeit für *p53*-Antikörper wurde hier in fünf Kategorien unterteilt (0%, <5%, 5-10%, 10-20%, >20% – in dieser Arbeit wurden die Gruppen 5-10% und 10-20% zur Verdeutlichung zusammengefasst).

3.6 Molekularbiologische Untersuchungen

3.6.1. Reverse Transkription

Um die Expression des FAS-Rezeptors nicht nur auf Proteinebene weiter zu verfolgen, wurde auch die mRNA-Expression des FAS-Rezeptors (in der transmembranären und löslichen Form) untersucht. Dafür wurden 18 mRNAs von 2 Prostatakarzinom-, 1 Nieren-, und 11 Harnblasenkarzinom- und 4 Primärkulturen von normalen Urothelzellen verwendet (teilweise

aus unterschiedlichem Ansatz zur Kontrolle der Variation). Diese wurden dann mit Hilfe einer *Reversen Transkriptase Reaktion* in cDNAs umgewandelt.

Dabei wurden je 2 µg der bei -70°C aufbewahrten RNA-Proben, teilweise vorher durch Vakuumextraktion konzentriert, mit 160 pmol oligo p(dT)₁₅ Primer versetzt und zum Denaturieren für 10 Min. bei 70°C inkubiert. Nach Zugabe eines 10 µl Ansatzes, bestehend aus 2 µl MgCl₂ (50mM), 2 µl Reverse Transkriptase Puffer (10 ×), 2 µl dNTP-Mix (je 10mM), 2 U Rnase-Inhibitor und 8,5 U AMV-RT wurde das Gemisch zentrifugiert und für 45 Min. bei 42°C inkubiert. Nach Hinzufügen von weiteren 5 Units RT / Probe wurde nochmals 30 Min. bei 42°C inkubiert. Zur Denaturierung der Reversen Transkriptase wurde das Gemisch dann 5 Min. auf 95°C erhitzt, danach auf 4°C abgekühlt und bei -20°C gelagert.

3.6.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Aufgrund eines Artikels über eine Mutation in einem bestimmten Teil des Exon 9 des FAS-Rezeptors (Lee et al., 1999b) wurde eine Amplifikation dieses Teils („9A“) durch Polymerasekettenreaktion (PCR) wie folgt durchgeführt:

Als Primer wurde das Primerpaar FASEx9AF/FASEx9AR (MWG Oligo Synthesis) benutzt:

FASEx9A/F: 5`-TGC TGG AGT CAT GAC ACT AAG T-3`

FASEx9A/R: 5`-CAA TGT GTC ATA CGC TTC TTT C-3`

Zu erwarten war ein Produkt aus 131 Basenpaaren mit der zwischen den Primern liegenden Sequenz:

CAA GTT AAA GGC TTT GTT CGA AAG AAT GGT GTC AAT GAA GCC
AAA ATA GAT GAG ATC AAG AAT GAC AAT GTC CAA GAC ACA
GCA GAA CAG AAA GTT CAA CTG CTT CGT AAT TGG CAT CAA CTT
CAT GGA AA

Folgende 50 µl Ansätze wurden durchgeführt:

1,0 µl	2,5 mM dNTP
5 µl	10 × PCR-Puffer
0,3 µl	je Primer [100 pmol/µl], sind also 0,6 µl
0,5 µl	Taq-Polymerase [2 U/µl]

2 µl DNA [50µg/ml]

ad 40,9 µl Aqua dest.

Zur Amplifizierung wurden die Reaktionsansätze bei folgenden Bedingungen amplifiziert:

4.6 Min. bei 95°C zur Start-Denaturierung

40 Schleifen mit folgender Sequenz:

1. 30 Sek. Bei 95°C zum Denaturieren
2. 40 Sek. Bei 50°C zum Annealing
3. 40 Sek. Bei 72°C zur Extension

abschließend folgte eine letztmalige Extension bei 72°C für 5 Min.

Die Proben wurden, wenn nicht sofort weiterverarbeitet, bei 4°C gelagert.

Von der amplifizierten DNA wurden jeweils 20 µl und ein Längenmarker (1 µg von pUC-Mix; 6 × Loading dye solution) auf ein 2% Agarosegel aufgetragen und bei 120 V elektrophoretisch aufgetrennt. Abschließend wurde das Gel 20 Min. in 0,5 µg/ml Ethidiumbromidlösung gelegt, die Banden unter einer UV-Lampe sichtbar gemacht und mit einem Fotodokumentationssystem dokumentiert.

3.6.3 Single Strand Conformation Polymorphism – Untersuchung (SSCP)

Um die Gensequenz des FAS-Rezeptors mittels SSCP auf Mutationen zu untersuchen, wurden die mittels eines UV-Lichts sichtbar gemachten mit Ethidiumbromid gefärbten Banden mit einem Skalpell aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten. Nach dem Wiegen des Gelstücks wurde die DNA mit Hilfe des Qiagen Gel Extraction Kits aufbereitet.

Nach Zugabe eines Puffers QG und Inkubation bei 50°C für 10 Min. wurde 1 Volumen Isopropanol zugegeben und anschließend zentrifugiert, um die DNA zu binden. Danach wurde QG Puffer und PE Puffer zugegeben und erneut zentrifugiert. Mit 30 µl H₂O wurde die so aus dem Gel aufbereitete DNA gewaschen und nach abschließender Zentrifugation weiterverwendet.

Es wurden insgesamt 2 Prostatakarzinomzelllinien, 10 Harnblasenkarzinomzelllinien und 3 Normalblutproben untersucht, wobei immer eine Probe ohne DNA als Negativkontrolle mitgeführt wurde.

Für die eigentliche Untersuchung auf SSCP, die auf einer Konformationsänderung von mutierten DNA-Strängen beruht und sich so in einer veränderten Migration in einem nicht

oder schwach denaturierenden Gel zeigt, wurden jeweils 10 µl der aufbereiteten DNA aus den PCR-Proben verwendet, die nach Zugabe von 5 µl Blaumarker (Stop Loading Buffer) und Denaturierung bei 94°C, auf ein Polyacrylamidgel (8%) aufgetragen wurden. Als Längenstandard wurde 200 ng vom pUC-Mix Marker 8 benutzt. Die elektrophoretische Auftrennung fand – nach fünfminütigem Einlaufen bei 300 V und Raumtemperatur – bei einer Spannung von 300 V über 16 Stunden (bzw. 250 V über 20 Stunden) bei 4°C statt.

Für dieses Polyacrylamid-Gel wurden 8% Polyacrylamid (29:1), 1 × TBE mit Zusatz von 3,5 g Harnstoff, sowie 50 µl TEMED und 500 µl APS in einem 30 ml-Ansatz verwendet.

Nach dem Lauf wurde das Gel mit einer Fixierlösung fixiert, in Aqua dest. gespült und in 0,15% Silberlösung zum Anfärben geschwenkt. Nach erneutem Spülen in Aqua dest. wurde das Gel entwickelt. Dadurch wurden die Banden der Einzelstränge nach ca. 5-10 Min. sichtbar und konnten in 0,75% Natriumcarbonat fixiert, begutachtet, abgelichtet und in Plastikfolie eingeschweißt werden.

Die PCR-Produkte, die im Vergleich auf dem PAA-Gel ein verändertes Bandenmuster – somit eine vermutete Mutation oder ein Polymorphismus – aufwiesen, wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten, gewogen und in 100 µl A. dest. 10 Min. aufgeköcht. Nach der Eluierung wurden sie am Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität sequenziert.

Dafür wurden sie einem automatischen Cycle Sequencing mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotidtriphosphaten unterzogen und über ein automatisches Sequenziergerät (ABI Prism Gene Analyser 310) aufgetrennt und ausgewertet.

Als Kontrolle dienten die eindeutig übereinstimmenden Banden aus den PCR-Produkten. Zur Sequenzierung wurden die gleichen Primer wie für die Amplifikation mittels PCR benutzt.

3.6.4 Realtime Reverse Transkriptase – Polymerasekettenreaktion (RT – PCR)

Um die Expression des FAS-Rezeptors auch auf RNA-Ebene zu verfolgen wurde mit Hilfe der Taqman Realtime RT – PCR in dem GenAmp 5700 Sequenz-detektionssystem die mRNA Expression des FAS-Rezeptors in der transmembranären und löslichen Form in Zusammenarbeit mit Priv. Doz. Dr. Ulrich Warskulat untersucht (Santourlidis et al., 2001). Dabei wurden aus 11 Harnblasenkarzinom-, 2 Prostatakarzinom-, 1 Nierenzellkarzinom- und 5 Normalurothelzelllinien-RNAs mit Hilfe der Reversen Transkriptase (s.o.) cDNAs hergestellt. Der betreffende Genabschnitt der cDNAs wurde dann mit PCR amplifiziert und

an zwei verschiedenen Stellen fluoreszenzmarkiert. Das Signal, das nur in einem bestimmtem Abstand der beiden fluoreszenzmarkierten Orte gemessen wird, kann dann quantitativ über die Zeit hinweg bestimmt werden. Als Kontrolltranskript stand HPRT (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase) zur Verfügung, welches theoretisch in allen Zellen in gleicher Weise und in gleicher Höhe exprimiert wird. Es handelt sich hierbei um ein sog. „Haushaltsgen“. Man kann mit dieser Form der PCR die Bildung des PCR-Produktes kontinuierlich verfolgen. Durch die Verwendung zweier fluoreszenzmarkierter Sonden ist die Methode hochspezifisch. Das gemessene Signal entspricht somit der Menge des gebildeten PCR-Produktes in einem bestimmten Zeitabschnitt, welches wiederum der cDNA-Expression in dem untersuchten Zelllinienmaterial und somit auch der mRNA-Expression entspricht.

3.7 Statistische Methoden

Sämtliche statistische Rechnungen (Mantel-Haenszel Test und Kaplan-Meier Analysen) wurden unter Verwendung von SAS, 6.12, Landeslizenz NRW und SPSS, 10.0, Landeslizenz NRW durchgeführt. Betriebssystem: Windows NT.

4. Ergebnisse

4.1 Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen

Um die Expression des FAS-Rezeptors in Harnblasenkarzinomen zunächst auf Proteinebene zu untersuchen, wurden Gewebeschnitte von insgesamt 83 Harnblasenkarzinomen mit einem polyklonalen Antikörper (C-20 Santa Cruz) behandelt. Im Vergleich dazu wurden auch 5 Gewebeschnitte von Normalurothel mit der gleichen Methode untersucht.

Von den 83 Gewebeschnitten stammten 81 aus der Harnblase (davon 55 aus Zystektomiepräparaten und 26 aus TUR-BTs), die beiden verbleibenden Schnitte stammten von Nephrektomiepräparaten mit histologisch gesicherten Urothelkarzinomanteilen (s. Tab. 4.1.1.)

Tabelle 4.1.1. Herkunft der insgesamt 83 untersuchten und ausgewerteten Gewebepreparate; **Zeilen:** durchgeführte Eingriffe; **Spalten:** Art des untersuchten Gewebes; **ZE**=Zystektomie; **TUR**=Transurethrale Resektion; **BT**=Blasentumor; **NE**=Nephrektomie

	<i>ZE- Präp.</i>	<i>TUR- Präp.</i>	<i>NE- Präp.</i>	<i>Gesamt</i>
<i>Zystektomie</i>	55	18	-	73
<i>TUR-BT</i>	-	7	-	7
<i>Nephrektomie</i>	-	1	2	3
<i>Gesamt</i>	55	26	2	83

Die gefärbten Schnitte wurden unter dem Mikroskop in einer Vergrößerung von 1:400 ausgewertet, indem der Anteil der positiv gefärbten Zellen an allen Tumorzellen an mehreren Stellen bestimmt wurde. Es ergab sich eine logische Einteilung der Präparate in 4 Gruppen, die sich wie folgt definierten:

Gruppe I:	0-25% pos.	---	18 Präparate
Gruppe II:	26-50% pos.	---	14 Präparate
Gruppe III:	51-75% pos.	---	28 Präparate (inkl. 1 aus Niere)
Gruppe IV:	76-100% pos.	---	23 Präparate (inkl. 1 aus Niere)

Insgesamt war eine heterogene Färbung sichtbar, wobei in eher entdifferenzierten Tumoranteilen die Anzahl der positiv gefärbten Zellen deutlich geringer war als in höher differenzierten Tumoranteilen (s. Abb. 4.1.1.).

In allen Präparaten wurde vor allem die positive Zellmembran und das positive Zytoplasma der Tumorzellen berücksichtigt, um sie den positiven Teilen des gesamten Tumorzellverbandes zuzuordnen. Die Nuklei waren in der Mehrzahl aller Tumorzellen positiv und wurden nicht als ausschlaggebender Faktor hinzugezogen.

In den Präparaten mit lymphozytärer Infiltration waren diese zwar auch angefärbt, aber nicht in die Beurteilung miteinbezogen. Diese Färbung von Lymphozyten in Präparaten mit schwacher Anfärbung epithelialer Zellen belegte, dass die Methodik als solche funktioniert hatte.

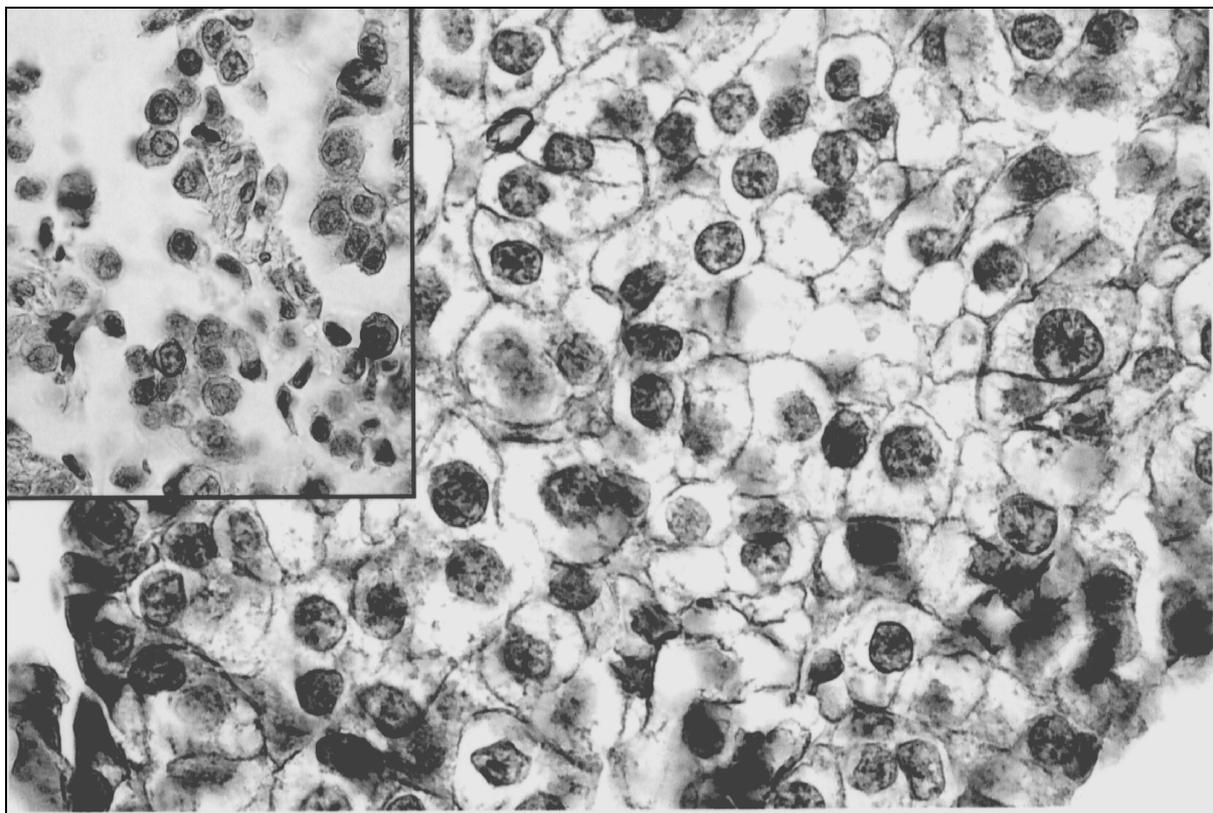


Abbildung 4.1.1. Heterogene positive Färbung in differenzierten Anteilen (grosses Bild – vor allem membranär), heterogen negativ in entdifferenzierten Anteilen (kleiner Einschub)

Im Vergleich zu den Präparaten aus den Harnblasenkarzinomen war in Normalurothelzellen vor allem die Basalmembran positiv gefärbt, wobei der Geweberest, v.a. Entzündungszellen (Lymphozyten), ebenfalls positiv gefärbt war.

Eine positive Färbung der vorhandenen Immunzellen wurde auch in Tumorpräparaten beobachtet. Alle Präparate wurden durch 3 unabhängige Personen begutachtet und erst bei Eindeutigkeit in die Studie aufgenommen. Korreliert wurden dann die in Gruppierungen eingeteilten Ergebnisse der FAS-Färbung mit Tumorstadium, Differenzierungsgrad, Lymphknotenbefall und Metastasierungsstatus sowie mit dem *p53*-Status (untersucht von Dr. Christine Steinhoff).

Für alle Patienten waren ein komplettes klinisches „Follow-up“ erhältlich. Eine Korrelation zwischen den „Follow-up“-Daten der Patienten und dem FAS-Rezeptor-Status ergab keinen Einfluss auf die Überlebensraten nach Zystektomie ($p=0,536$).

4.2 Korrelation der FAS-Expression mit Tumorstadium und Differenzierungsgrad

Die Korrelation von FAS-Färbung mit Stadium, Differenzierungsgrad und Lymphknotenbefall bzw. Metastasierungszustand sind in den Tabellen 4.2.1.a-d sowie in der Tabelle 4.2.2. zusammengefasst.

Tabelle 4.2.1.a FAS-Status (I-IV, Erklärung s. Text) und Tumorstadium. Sichtbare Abnahme der FAS-Expression (Gruppen I und II) bei höherem Stadium (5/19 = 26% bei T2, 17/39 = 44% bei T3, 8/13 = 62%), v.a. im Vergleich der Zeilen **pT2** und **pT3** zu erkennen.

	I	II	III	IV	Gesamt
pTa	-	-	1	4	5
pT1	-	2	3	2	7
pT2	2	3	7	7	19
pT3	10	7	13	9	39
pT4	6	2	4	1	13
Gesamt	18	14	28	23	83

Tabelle 4.2.1.b FAS-Status (I-IV, Erklärung s. Text) und Tumorstadium (zusammengefasst zu oberflächlichen und muskelinvasiven Tumoren). FAS-Expression nimmt bei Muskelinvasion ab (42% in den Gruppen I und II), jedoch ist ein weniger deutlicher Unterschied erkennbar als in der detaillierten Auflistung aus Tab. 4.2.1.a.

	I	II	III	IV	<i>Gesamt</i>
oberflächlich (pTa+pT1)	-	2	4	6	12
muskelinvasiv (pT2-4)	18	12	24	17	71
<i>Gesamt</i>	18	14	28	23	83

Tabelle 4.2.1.c FAS-Status (I-IV, Erklärung s. Text) und Differenzierungsgrad. Keine sichtbare Ab- oder Zunahme der Expression bei höherem Differenzierungsgrad (zwischen 35% und 45% in den Gruppen I und II bei G2-4).

	I	II	III	IV	<i>Gesamt</i>
G1	-	-	-	1	1
G2	4	6	6	6	22
G3	13	7	19	16	55
G4	1	1	3	-	5
<i>Gesamt</i>	18	14	28	23	83

Tabelle 4.2.1.d FAS-Status (I-IV, Erklärung s. Text) und Lymphknotenbefall bzw. Metastasierungszustand; **N0M0** = weder Lymphknotenbefall noch Metastasen, sowie alle, deren Status nicht bekannt ist (d.h. in der Regel metastasenfrei); **N+M+** = entweder befallene Lymphknoten oder Metastasen oder beides. Höhere FAS-Expression bei N0M0 (41/62 = 66%), aber gleichmäßige Verteilung bei N+M+.

	I	II	III	IV	<i>Gesamt</i>
N0M0	10	11	21	20	62
N+M+	8	3	7	3	21
<i>Gesamt</i>	18	14	28	23	83

Im Hinblick auf das Tumorstadium lässt sich keine eindeutige Tendenz erkennen, wenn man „oberflächlich wachsende“ gegenüber „invasiven“ Tumoren zusammenfasst. Wenn stattdessen die Tumorstadien pT2, pT3 und pT4 einzeln betrachtet werden, sieht man eine deutliche Tendenz zu niedrigerer Gruppeneinteilung (= niedriger Expression von FAS) bei höherem Tumorstadium. In Zahlen heißt das: Bei T2-Tumoren lag die Zahl der Fälle in den Gruppen mit niedriger FAS-Rezeptor-Expression zu solchen mit hoher FAS-Rezeptor-Expression bei 5:14; bei T3-Tumoren bei 17:22 und bei T4-Tumoren bei 8:5 (s. Tab. 4.2.1.a). Es fiel also eine geringere FAS-Rezeptor-Expression in fortgeschrittenen Karzinomen auf. Die oberflächlich wachsenden Tumoren waren vorwiegend in den Gruppen III und IV vertreten (10 von 12), wogegen bei den muskelinvasiveren Tumoren (pT3 und pT4) eine Verschiebung in die Gruppen I und II zu finden war. Nur 2 von 12 (17%) oberflächlichen Tumoren (pTa-pT1) und 5 von 19 (26%) der pT2-Tumoren, aber 25 von 52 (48%) der invasiveren Tumoren (pT3-pT4) wiesen eine niedrige FAS-Expression von unter 50% auf. Diese Ergebnisse waren im Mantel-Haenszel-Test hochsignifikant ($p=0,001$), jedoch nicht im χ^2 -Test, im Einklang mit einer graduellen, gerichteten Veränderung.

Die genaue Verteilung der Präparate auf die Gruppeneinteilung der FAS-Expression geht aus Tab. 4.2.2. hervor. Hier wurden die Präparate in 5 Gruppen unterteilt (pTa-pT4) und in diesen wiederum geordnet nach Differenzierungsgrad und Lymphknoten- bzw. Metastasenstatus. Es ergibt sich somit die genaue Auflistung der Verteilung der untersuchten Gewebeproben – und deren Einordnung in die Stadien – in den Gruppen I-IV der FAS-Expression. Ganz grob ist natürlich auch in dieser Detail-Abbildung eine Abnahme der FAS-Rezeptor-Expression in höherem Tumorstadium zu erkennen: Die Zahlen verteilen sich nach unten verfolgend immer weiter auf die linke Hälfte der Spalten (Gruppen I und II).

Bei der Korrelation mit dem Differenzierungsgrad waren die Harnblasen-Karzinom-Präparate unabhängig vom Differenzierungsgrad auf alle Gruppen gleichmäßig verteilt. Wie in Tab. 4.2.1.c zu erkennen, waren 38 (63%) der 60 entdifferenzierten Karzinome (G3 und G4) in den Gruppen III und IV mit viel FAS-Expression, gegenüber 22 (37%) der 60 untersuchten entdifferenzierten Tumore in den Gruppen I und II zu finden. Die Verteilung der noch gut differenzierten Tumore (G1 und G2) war ebenfalls annähernd gleichmäßig (13 von 23 (57%) in den Gruppen III und IV; 10 von 23 (43%) in den Gruppen I und II). Demnach besteht kein Zusammenhang zwischen Differenzierungsgrad und FAS-Rezeptor-Expression (MH-Test: $p=0,577$).

Beim Lymphknoten- und Metastasierungsstatus verhielt es sich ähnlich (s. Tab. 4.2.1.d). Obwohl Tumorpräparate mit N0M0-Status zu 2/3 stärker FAS-Rezeptor exprimierten (41 von 62 Präparaten (66%) in den Gruppen III und IV), gab es bei Tumoren mit Lymphknotenbefall und/oder Metastasennachweis keine Verschiebung zu niedriger Gruppeneinteilung, also geringerer FAS-Rezeptor-Expression (11 von 21 (52%) in den Gruppen III und IV, sowie 10 von 21 (48%) in den Gruppen I und II). Es ließ sich nur eine Tendenz erkennen, die im MH-Test nicht signifikant war ($p=0,036$).

Somit konnte weder bei Entdifferenzierung noch bei Metastasierung des Tumors in Lymphknoten oder entfernte Gewebe eine Tendenz zu niedrigerer oder höherer FAS-Rezeptor-Expression gezeigt werden.

Tabelle 4.2.2.: Detaillierte Verteilung der FAS-Rezeptor-Expressionsgruppen (I-IV, Erklärung s. Text) auf die jeweils angegebenen Tumorstadien; Zeilen-unterteilung in 5 Gruppen; je nach Stadien (pTa-4) und darunter wieder nach Differenzierungsgrad (G1-4) und Lymphknotenbefall bzw. Metastasierungszustand; **x** hinter N oder M = Status nicht bekannt; **0** hinter N oder M = keine Lymphknoten oder Metastasen positiv; **+** hinter N oder M = positiver Befall.

	I	II	III	IV	Gesamt
pTa, G1, NxMx	-	-	-	1	1
pTa, G2, NxMx	-	-	1	2	3
pTa, G2, N0Mx	-	-	-	1	1
pT1, G2, NxMx	-	1	-	1	2
pT1, G2, N0M0	-	1	1	-	2
pT1, G3, N0M0	-	1	1	1	3
pT2, G2, NxMx	1	-	-	-	1
pT2, G2, N0Mx	-	1	1	1	3
pT2, G2, N0M0	-	1	1	-	2
pT2, G2, N+M0	1	-	1	-	2
pT2, G3, NxMx	-	-	1	-	1
pT2, G3, N0M0	-	1	3	6	10
pT3, G2, NxMx	-	2	-	-	2
pT3, G2, N0M0	2	-	-	1	3
pT3, G3, NxMx	-	-	1	-	1
pT3, G3, N0Mx	1	-	-	-	1
pT3, G3, N0M0	5	1	6	5	17
pT3, G3, N+Mx	-	-	1	-	1
pT3, G3, N+M0	2	2	3	2	9
pT3, G3, N+M+	-	-	1	1	2
pT3, G4, N0Mx	-	1	-	-	1
pT3, G4, N0M0	-	-	1	-	1
pT3, G4, N+M0	-	-	1	-	1
pT4, G2, N0M0	-	1	-	-	1
pT4, G3, N0M0	1	1	2	1	5
pT4, G3, N+Mx	-	-	1	-	1
pT4, G3, N+M0	4	-	-	-	4
pT4, G4, N0M0	-	-	1	-	1
pT4, G4, N+M0	1	-	-	-	1
Gesamt	18	14	28	23	83

4.3 Korrelation der FAS-Expression mit der *p53*-Expression

Der *p53*-Status wurde von Dr. Christine Steinhoff untersucht. Eine *p53*-Mutation führt überwiegend zu einer Akkumulation von *p53*-Protein. Diese Akkumulation lässt sich immunhistochemisch darstellen, da der Spiegel an normalem *p53*-Protein gewöhnlich nicht immunhistochemisch erfasst werden kann. Die Einteilung in Gruppen mit mehr positiv gefärbten Anteilen (z.B. >10%) bedeutet somit eine höhere Wahrscheinlichkeit für mutiertes *p53* (Steinhoff, 2001). Die *p53*-Akkumulation war signifikant korrelierbar mit dem Differenzierungsgrad ($p=0,015$), sowie mit detektierten genetischen Mutationen ($p=0,00385$), aber nicht mit dem Tumorstadium ($p=0,176$).

Wenn in Harnblasenkarzinomen *p53* für die FAS-Rezeptor-Expression entscheidend wäre, würde man bei Tumoren mit mutiertem *p53* eine geringe FAS-Expression (Gruppe I und II) erwarten, bei nicht mutiertem *p53* (0% positiv gefärbt) dagegen eine hohe FAS-Expression (Gruppen III und IV). Dies hat sich jedoch nicht bestätigt. Erste Eindrücke, ausgedrückt in Zahlen, erhält man schon in der Tab. 4.3.1. Zur Verdeutlichung kann man das dargestellte Säulendiagramm hinzuziehen. Unter der Annahme einer Beeinflussung von FAS durch *p53* müssten sich nämlich die dunklen Säulen zum größten Teil auf die Gruppen I oder II verteilen sowie die hellen Säulen auf die Gruppen III oder IV. Das ist jedoch, wie in Abb. 4.3.1. zu sehen, nicht der Fall.

Bei weniger wahrscheinlich mutiertem *p53*-Status (0%– 5%) gab es ein Verhältnis zwischen viel FAS-Rezeptor-Expression (Gruppen III und IV) und wenig FAS-Rezeptor-Expression (Gruppen I und II) von 20:13. 60% der Präparate zeigten eine höhere FAS Expression (in den Gruppen III und IV). Bei wahrscheinlicher mutiertem *p53*-Status (5% - 20%) gab es ebenfalls eine Tendenz zu höherer FAS-Rezeptor-Expression (8 von 14 Präparaten (57%) in den Gruppen III und IV; 6 von 14 Präparaten (43%) in den Gruppen I und II). Bei sehr wahrscheinlich mutiertem *p53*-Status (>20%) zeigten dann 64% der Präparate (21 von 33) eine hohe FAS-Expression. Dieses Ergebnis war jedoch nicht signifikant ($p=0,483$).

Eine signifikant messbare Korrelation zwischen mutiertem *p53* und erniedrigter FAS-Expression ließ sich nicht zeigen. Grundsätzlich waren alle Präparate der Harnblasenkarzinome mit wahrscheinlicher *p53*-Mutation in den unterschiedlichen Gruppen der FAS-Expression gleichmäßig verteilt.

Tabelle 4.3.1. FAS-Status (Gruppeneinteilung wie oben beschrieben) und *p53*-Status (0% = negativ; bis über 20% positive *p53*-Färbung, die auf ein mutiertes *p53* hinweist). Auffallend ist eine weitgehend ähnliche Verteilung auf alle Gruppen, unabhängig vom *p53*-Mutationsstatus.

	I	II	III	IV	Gesamt
0%	1	3	3	7	14
0-5%	6	3	7	3	19
5-20%	3	3	2	6	14
>20%	8	4	15	6	33
Gesamt	18	13	27	22	80

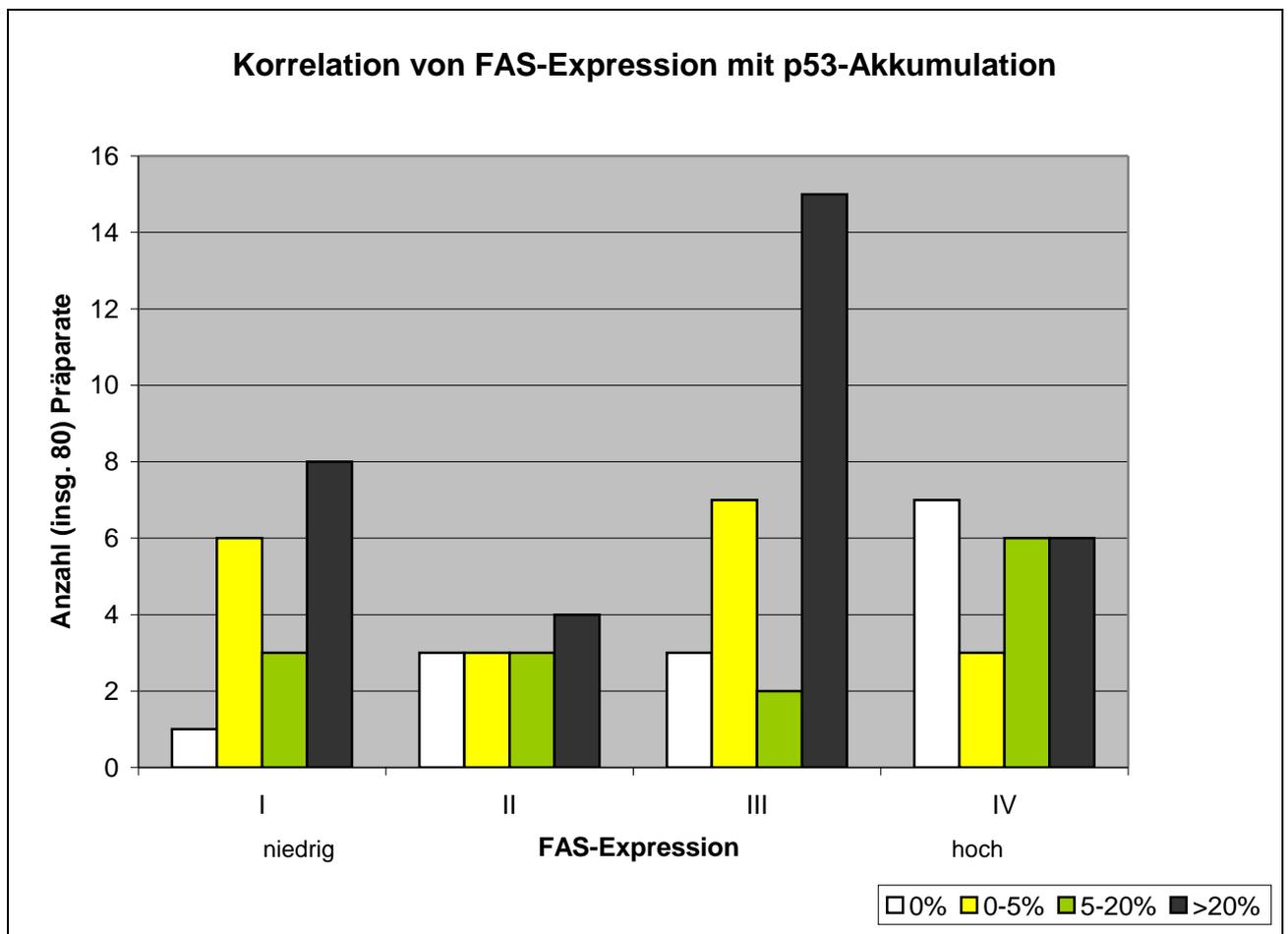


Abbildung 4.3.1. FAS-Status und *p53*-Status; **x-Achse:** Unterteilung in 4 Abschnitte, stellvertretend für die 4 verschiedenen Gruppen der FAS-Rezeptor-Expression (Gruppen I-IV, Erläuterung s. Text); **y-Achse:** Anzahl der Tumorgewebepräparate; **Farben der Säulen** je nach *p53*-Status (s. Legende rechts unten in der Abbildung); gleichmäßige Verteilung der Säulen, unabhängig vom *p53*-Status und somit der Mutationswahrscheinlichkeit. Ist diese hoch (dunkle Säulen) erkennt man trotzdem keine Verschiebung dieser zu den Gruppen mit wenig FAS-Rezeptor-Expression (I und II), sondern eher eine Beibehaltung der Gleichmäßigkeit.

4.4 Untersuchung mittels Realtime RT – PCR

Um der Ursache der verminderten FAS-Expression näher zu kommen, wurde die FAS-Rezeptor-Expression (membranständig = tm und löslich = sol) auch auf der Ebene der mRNA-Expression untersucht. Da im Gewebe die Expression nicht auf Tumorzellen beschränkt ist und das Gesamtniveau wesentlich vom Anteil stark exprimierender Immunzellen abhing, die jedoch nicht in die Bewertung mit eingehen sollten, wurden für diese Experimente Harnblasentumorzelllinien im Vergleich zu kultiviertem Normalurothel verwendet. Dafür wurden mit Hilfe von Reverser Transkriptase aus elf Harnblasenkarzinom-Zelllinien und im Falle des löslichen FAS-Rezeptors auch eine Nierenzellkarzinom- und zwei Prostatakarzinomzelllinien, teilweise aus unterschiedlichen Passagen, cDNAs hergestellt. Zum Vergleich wurden außerdem fünf Normalurothelkulturen untersucht.

Zur Bestimmung der mRNA-Konzentration wurde die Realtime RT-PCR-Methode angewendet, wobei als Kontrolle HPRT-mRNA benutzt wurde. Bei HPRT geht man davon aus, dass es in allen Zellen ähnlich stark exprimiert wird und somit den Nenner für die Expression des FAS-Rezeptors in den jeweils verwendeten Zelllinien bildet. Es liegt auf dem X-Chromosom und gilt als „Haushaltsgen“ durch seine annähernd gleichmäßige Expression.

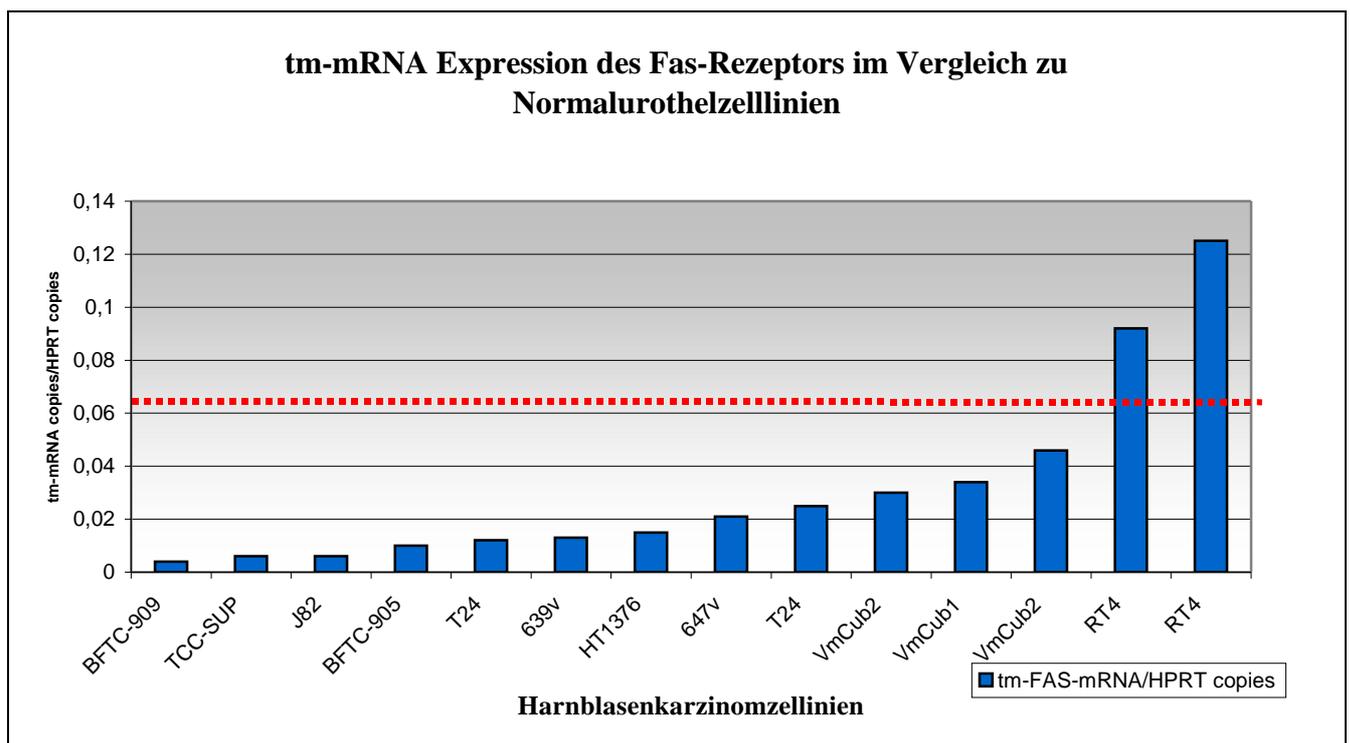


Abbildung 4.4.a mRNA Expression des membranständigen (tm) FAS-Rezeptors; **x-Achse:** Tumor-Zelllinien-Auflistung; **y-Achse:** tm-mRNA-Kopien in Relation zu den HPRT-Kopien; **gestrichelte Linie:** unterster Wert für die Normalurothelzelllinien (lagen zwischen 0,062 und 0,353); der Durchschnittswert lag bei 0,152.

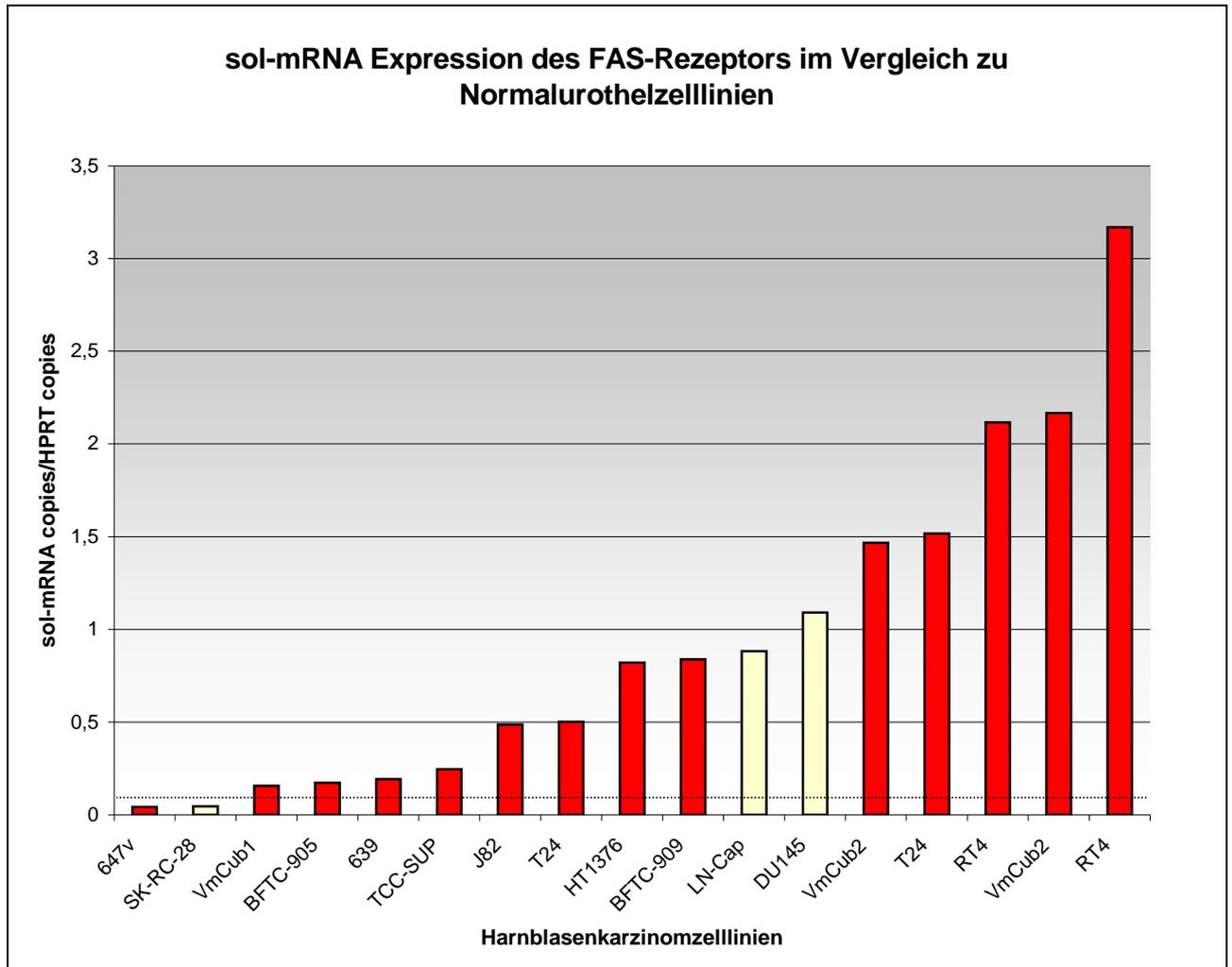


Abbildung 4.4.b mRNA Expression des löslichen FAS-Rezeptors aus 11 verschiedenen Harnblasenkarzinom-Zelllinien und 1 aus der Niere und 2 aus der Prostata (alle 3 hell eingefärbt); **x-Achse:** Tumor-Zelllinien-Auflistung; **y-Achse:** sol-mRNA-Kopien in Relation zu HPRT-Kopien. **Extra-Linie bei 0,057:** Höchstwert der sol-mRNA Expression der Normalurothelzellen, diese lagen zwischen 0,008 und 0,057; nicht darstellbar war der Durchschnittswert, da zu gering (0,021).

Der durchschnittliche Wert für die mRNA-Expression des membranständigen FAS-Rezeptors lag in Normalurothelzellen bei 0,151, wobei die zweimal passagierten Kulturen einen durchschnittlich höheren Wert aufwiesen als die einmal passagierten Kulturen. Alle Werte aus den Harnblasenkarzinomzelllinien lagen unterhalb dieses Mittelwertes. Abb. 4.4.a zeigt als gestrichelte Linie den niedrigsten gemessenen Wert der Normalurothelkulturen (0,062 bei U46). Deutlich zu erkennen ist, dass – bis auf RT4 – die mRNA-Spiegel aller Harnblasenkarzinomzelllinien darunter lagen. Hierbei ist bemerkenswert, dass RT4 die einzige Zelllinie aus einem gut differenzierten papillären Tumor darstellt (pTa). Unterschiedliche Werte für eine Zelllinie ergeben sich bei Bestimmung der Expression verschiedener Passagen. Sie waren jedoch nicht signifikant. Bis auf eine gut differenzierte

Tumorzelllinie zeigt sich daher eine deutliche Abnahme der mRNA-Expression des membranständigen FAS-Rezeptors in Harnblasenkarzinomen im Vergleich zu Normalurothel. In Abb. 4.4.b sind die gemessenen Werte für die mRNA des löslichen FAS-Rezeptors in einem Diagramm dargestellt. Dargestellt sind neben 11 Harnblasenkarzinom-Zelllinien noch 1 Zelllinie aus einem Nierenkarzinom (SK-RC-28) und 2 aus Prostatakarzinomen (LN-Cap, DU145). Der Mittelwert für die Normalurothelzelllinien war mit 0,021 sehr gering und nicht als Linie in der Abb. 4.4.b darstellbar. Der höchste Wert für die mRNA des löslichen FAS-Rezeptors in Normalurothelkulturen lag bei 0,057 (dargestellt also gestrichelte Linie in Abb.4.4.b). Nur die in der Abb. 4.4.b gezeigten ersten beiden Zelllinien (647v und SK-RC-28) lagen unter diesem Höchstwert der Normalurothelien (als Extra-Linie eingezeichnet). Deutlich wird, dass nur in 1 der 11 untersuchten Harnblasenkarzinomzelllinien (647v) die Werte für die mRNA-Expression des löslichen FAS-Rezeptors unterhalb des Höchstwertes der Normalurothelzelllinien liegen. In den restlichen 10 Zelllinien lag der Wert jedoch darüber und in allen sogar über dem Normalurothelzelllinien-Mittelwert. Interessanterweise liegen auch die Werte der Zelllinie RT4 sowohl über dem Mittelwert, als auch über dem höchstgemessenen Wert für die mRNA des löslichen FAS-Rezeptors.

Die in der Literatur beschriebene Theorie des löslichen FAS-Rezeptors als vorzeitige Abschirmung eines FAS-Liganden ließe sich mit diesen Ergebnissen vereinbaren. Besonderes Augenmerk ist hierbei auf die Zelllinie RT4 zu richten. Der membranständige FAS-Rezeptor ist noch (als einzige der untersuchten Zelllinien) stark exprimiert, wobei auch der Wert für den löslichen FAS-Rezeptor höher als der Durchschnitt liegt und eine durch das FAS-Rezeptor/Ligand-System auf herkömmliche Weise ausgelöste Apoptose verhindern könnte.

Die Tabelle 4.4. zeigt, dass in allen Zelllinien die Expression des membranständigen FAS-Rezeptors im Vergleich zu den Normalurothel-Zelllinien deutlich unter 75% (72% bei RT4 bis zu 3% bei BFTC-909) lag. Die lösliche Form des FAS-Rezeptors wurde im Vergleich zu den Durchschnittswerten des Normalurothels in Harnblasenkarzinomen in bis zu 26-fach erhöhter Expression vorgefunden.

Verglichen mit der mRNA-FAS-Rezeptor Expression in Normalurothel-Zelllinien war das Verhältnis von sol- zu tm-FAS in allen Tumoren deutlich über 1 (bis zu 210 in der Zelllinie BFTC-909). In Normalurothel-Zelllinien lag die mRNA-Expression des löslichen FAS-Rezeptors gerade bei 14% der Menge an mRNA des membranständigen FAS-Rezeptors (s. Tab. 4.4.). In der letzten Spalte wurde der Wert für das sol/tm-FAS Verhältnis des Normalurothels gleich 1 gesetzt. Dann ergeben sich Steigerungen dieses Verhältnisses in Harnblasenkarzinomen auf das hundertfache (bis zu 1500-fach bei BFTC-909).

Tabelle 4.4. Auflistung der 11 Zelllinien und deren mRNA Expression von membranärem (**tm**) und löslichem (**sol**) FAS-Rezeptor in Relation zu **HPRT**, dem „Haushaltsgen“. Deutliche Abnahme der tm-FAS-mRNA-Expression (Angaben in Prozent) und Zunahme der sol-FAS-mRNA (Angaben in X-fach) in den Tumorzelllinien im Vergleich zum Normalurothel. Die letzten beiden Spalten zeigen das Verhältnis der mRNA-Expression von sol- zu tm FAS (ausser beim Normalurothel deutlich über 1). Die letzte Spalte ergibt sich aus der vorletzten, wenn das Verhältnis in Normalurothelzellen gleich 1 gesetzt wird. **NU**=Normalurothel

Zelllinie	Tm-FAS mRNA		sol-FAS mRNA		Verhältnis von Sol/tm-FAS	sol/tm-FAS im Verhältnis zu NU
	tm-FAS/HPRT copies	tm-FAS zu NU (Prozent)	sol-FAS/HPRT copies	sol-FAS zu NU (X-fach)		
<i>BFTC-909</i>	0,004	3	0,838	40	210	1500
<i>J82</i>	0,006	4	0,487	23	81	579
<i>TCC-Sup</i>	0,006	4	0,246	12	41	293
<i>639</i>	0,013	9	0,192	9	15	107
<i>HT 1376</i>	0,015	10	0,821	39	55	393
<i>T24</i>	0,019	13	1,01	48	53	379
<i>647v</i>	0,021	14	0,042	2	2	14
<i>BFTC-905</i>	0,01	7	0,173	8	17	121
<i>VmCub1</i>	0,034	23	0,156	7	5	36
<i>VmCub2</i>	0,038	25	1,817	87	48	343
<i>RT4</i>	0,109	72	2,643	126	24	171
Normalurothel	0,151	100	0,021	1	0,14	1

4.5 Mutationsanalyse von Exon 9 des FAS-Rezeptor-Gens:

Auswertung der SSCP-Untersuchungen und Sequenzierungsdaten

In der Literatur wird beschrieben, dass in einigen Harnblasenkarzinomen eine Mutation in der Death Domain des FAS-Rezeptors zu finden sei (Lee et al., 1999b). Daher wurden die in der Urologischen Klinik der Heinrich-Heine-Universität vorhandenen Zelllinien auf diese Mutationen untersucht; außerdem auch einige Prostatakarzinomzelllinien.

Mit Hilfe von PCR-Produkten und SSCP-Untersuchungen wurde der betroffene Gen-Abschnitt, der für die Death Domain des FAS-Rezeptors kodiert, amplifiziert. Dieser Teil des Gens (Exon 9, Teil A) wurde auf ein Gel aufgetragen, ausgeschnitten und anschliessend sequenziert. Im Vergleich zu der bekannten Gen-Sequenz von Exon 9A (131 Basenpaare), welche für die Death Domain des FAS-Rezeptors kodiert, konnte in keinem Fall ein Hinweis auf eine Mutation gefunden werden. Der sequenzierte Genabschnitt (Exon 9A; s. Abb. 4.5.1.) entsprach in allen Fällen der Basenpaarfolge des normalen Exons (Accession number:

X81342; Exon 9; Abschnitt: 148-278). In keinem der 10 untersuchten Fälle trat eine Mutation auf (s. Abb. 4.5.2 als stellvertretendes Sequenzierungsergebnis). Auch die in der Literatur als häufig beschriebene Mutation von G zu A (an der Stelle, die in der Abb. 4.5.2. unterstrichen ist) war nicht zu eruieren.

Zu erwartendes Produkt aus 131 Basenpaaren

```

001 CAA GTT AAA GGC TTT GTT CGA AAG
025 AAT GGT GTC AAT GAA GCC AAA ATA
049 GAT GAG ATC AAG AAT GAC AAT GTC
073 CAA GAC ACA GCA GAA CAG AAA GTT
097 CAA CTG CTT CGT AAT TGG CAT CAA
121 CTT CAT GGA AA

```

Abbildung 4.5.1. Genprodukt des Exon 9A des FAS-Rezeptor-Gens, das für die Death-Domain kodiert. **Unterstrichen:** Die Stelle, an der in 8 von 9 Deletions-Mutations-Fällen in der Studie von Lee et al. eine Mutation von der Base G zu A gefunden wurde, ist unterstrichen.

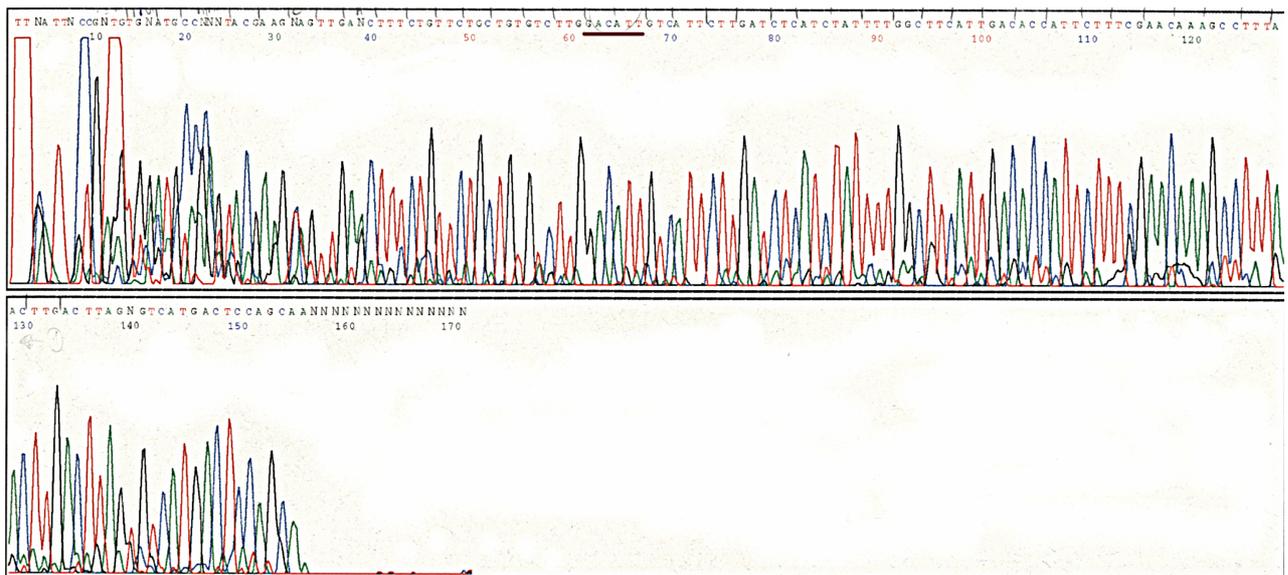


Abbildung 4.5.2. Beispielhaftes Sequenzierungsergebnis einer Zelllinie. In der oberen Zeile stehen die jeweils analysierten Basen in ihrer Reihenfolge; hier – durch Benutzung eines Primers für den Gegenstrang – auch rückwärts und komplementär zu lesen (Anfang bei 133 abwärts); **Unterstrichen:** Lokalisation der häufig gefundenen Mutationen; in [Abb. 4.5.1.](#) befindet sich diese Abfolge in einem Abschnitt AAT GTC, da in [Abb. 4.5.2.](#) der Komplementärstrang sequenziert ist, entspricht dies der unterstrichenen Stelle: GAC ATT. Hier ist keine Mutation zu erkennen.

5.Diskussion

Harnblasenkarzinome zeichnen sich durch erhebliche Heterogenität aus. Histologisch lassen sich verschiedene Gruppen unterscheiden, die unterschiedlich auf verschiedene Therapieoptionen ansprechen. Unterschiede im klinischen Verlauf und Ansprechen auf Therapien sind jedoch auch innerhalb histologisch einheitlichen Gruppen zu erkennen.

Das Tumorstadium basiert sowohl auf erhöhter Zellproliferation als auch auf inadäquat ausgeführter Apoptose (Green und Evan, 2002). In vielen anderen Tumoren wurde schon eine Verringerung der Apoptose nachgewiesen. Diese trägt unmittelbar dazu bei, dass Tumoren wachsen und sich ausbreiten und sich einer Therapie entziehen. Auch das körpereigene Immunsystem, das im Falle eines Tumorleidens aktiviert wird, könnte so umgangen werden. An all diesen Phänomenen ist auch FAS in einem gewissen Maße beteiligt.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, in welchem Umfang diese generelle Erkenntnis auch für das Harnblasenkarzinom zutrifft. Daher ist die FAS-Expression bei 83 Gewebeschnitten von Harnblasenkarzinomen mit dem Tumorstadium und dem Differenzierungsgrad korreliert worden. Hierbei ergibt sich, dass der FAS-Rezeptor unabhängig vom Differenzierungsgrad, aber abhängig vom Tumorstadium exprimiert wird. In höheren Stadien des Harnblasenkarzinoms findet zunehmend eine Herunterregulation des FAS-Rezeptors statt, unabhängig von der Differenzierung des Karzinoms. Signifikant ist speziell die Korrelation von gradueller Herunterregulation des FAS-Rezeptors mit höherem Tumorstadium, wobei zwischen den Stadien T2 und T3 eine klare Stufe abzugrenzen ist: In nur 1/3 der T2-Tumoren, aber in knapp 50% aller T3-Tumoren fand sich eine FAS-Expression von unter 50% der Tumorzellen. Bei den T4-Tumoren sind es schon 2/3 mit geringer FAS-Expression. Die in den letzten Jahren übliche Einteilung der Harnblasenkarzinome in oberflächliche (Ta und T1) und invasiv (T2-4) wachsende Tumore spiegelt sich in diesen Ergebnissen nicht wieder. Vielmehr ist ein Unterschied zwischen T2- und T3- Tumoren auszumachen, also eine Stufe beim Übergang von muskel- zu fettgewebsinvasiv wachsenden Tumoren. Dies ist eine für das Harnblasenkarzinom ungewöhnliche Abgrenzung.

Auch im Hinblick auf die Metastasierung lässt sich eine ähnliche Aussage treffen. Das Ergebnis ist zwar hierbei nicht so deutlich, aber eine Tendenz lässt sich erkennen. Es zeigt sich, dass die Tumoren mit Metastasen oder Lymphknotenbeteiligung in weniger als der Hälfte der untersuchten Gewebe eine hohe FAS-Expression zeigen, Tumoren ohne

Metastasen jedoch in 67% FAS stark produzieren. Tendenziell bestätigt dieses Ergebnis die These, dass Tumoren primär mit zunehmender Ausbreitung dazu neigen, die FAS-Produktion herunterzuregulieren.

Dieses Ergebnis passt zu der Theorie, dass vor allem bei höheren Stadien, wenn Karzinomzellen das umliegende Gewebe und Gefäße infiltrieren, eine Herunterregulation des FAS-Rezeptors es dem Tumor erleichtert, sich auszubreiten. Auch eine Metastasierung auf hämatogenem und lymphogenem Wege scheint bei erniedrigter FAS-Expression erleichtert, möglicherweise durch Umgehung des körpereigenen Immunsystems. (Igney und Krammer, 2002a; Johnstone et al., 2002; Owen-Schaub, 2002).

Ähnliche Ergebnisse wie in dieser Arbeit wurden auch in einer Untersuchung von Lee et al. (Lee et al., 1999a), aber nicht bei Giannopoulos et al. (Giannopoulou et al., 2002) gefunden, obwohl alle denselben Antikörper benutzten. Da diese Autoren weder eine membrangebundene FAS-Expression noch eine Expression in Normalurothelzellen beobachteten, könnte die Ursache für diese Abweichung in einer niedrigeren Sensitivität bestehen.

In anderen Veröffentlichungen wurde das FAS-Rezeptor/Ligand-System in Harnblasenkarzinomen im Hinblick auf den löslichen FAS-Rezeptor und -Liganden untersucht (Mizutani et al., 1998; Perabo et al., 2001b). Mizutani et al. (Mizutani et al., 1998) fanden eine inverse Korrelation zwischen der Höhe des löslichen FAS im Serum und der krankheitsspezifischen Überlebensrate. Wenig lösliches FAS bei Patienten mit niedrigem Tumorstadium ging einher mit einem geringeren Risiko an Tumorrezidiven. Hierbei wurde jedoch keine allgemeine Korrelation zwischen FAS-Ligand und Tumorstadium und Differenzierungsgrad ermittelt. In einer anderen Studie derselben Autoren (Mizutani et al., 2001) wurde dann eine signifikante Korrelation zwischen FAS-Ligand-Expression und Tumorstadium und Differenzierungsgrad gezeigt. Im Gegensatz dazu fand Perabo et al. (Perabo et al., 2001b) keine Korrelation zwischen löslichem FAS und FAS-Liganden und klinisch-pathologischen Parametern. Fraglich ist also immer noch, ob der FAS-Ligand bei fortgeschrittenen Harnblasenkarzinomen erhöht exprimiert wird und inwieweit dem löslichen FAS-Rezeptor eine Bedeutung zukommt.

Zusammenfassend weisen aber alle Untersuchungen auf eine Beteiligung des FASR/FASL-Systems am Umgehen der körpereigenen Immunabwehr und der veränderten Apoptose in Harnblasenkarzinomen hin. Einschränkend muss allerdings festgestellt werden, dass in der vorliegenden Arbeit der prognostische Wert der FAS-spezifischen Expression begrenzt war. Eine Korrelation zu dem Überleben der Patienten erbrachte kein signifikantes Ergebnis. Auch

in anderen Studien waren die Ergebnisse für andere Parameter des FAS-Systems in dieser Hinsicht nicht überzeugend (Giannopoulou et al., 2002; Perabo et al., 2001a). Dies könnte bedeuten, dass die Herunterregulation des FAS-Rezeptors und Hochregulation eines veränderten FAS sowie veränderte Expression des Liganden zwar eine Rolle bei der Tumorprogression spielen, jedoch in der Regel nicht den entscheidenden Faktor für den klinischen Verlauf und das Überleben von Patienten mit Harnblasenkarzinomen darstellen.

Die vorliegende Arbeit hat sich mit einigen der vielfältigen Mechanismen beschäftigt, die bei der Entwicklung von Tumoren zu einer Störung des FAS-Systems führen können. Es gibt darüber hinaus noch weitere. Beispielsweise wird die Wirkung des FAS-Liganden noch auf andere Weise moduliert. Der Ligand ist nicht nur in der Lage, an den FAS-Rezeptor sondern auch an den DcR3-Rezeptor zu binden. Wenn dieser verstärkt exprimiert wird, bindet der FAS-Ligand an ihn. Statt mit Hilfe eines löslichen FAS-Rezeptors könnten die Liganden mit dem DcR3-Rezeptor abgefangen und dadurch die Apoptose in den Tumorzellen vermieden werden (Ashkenazi, 2002). Die in manchen Studien beim Harnblasenkarzinom erhöht vorgefundene Konzentration des FAS-Liganden (Mizutani et al., 1998) muss also nicht unbedingt zu einer erhöhten Apoptoseauslösung führen.

Die vorliegende Arbeit belegt zwei Veränderungen in Harnblasenkarzinomen und Zelllinien, die eine verminderte FAS-Antwort nach sich ziehen könnten. Zum Einen war die Expression von FAS vermindert; zum Anderen wurde eine Verschiebung vom membranständigen (tm-FAS) zum löslichen (s-FAS) Rezeptor beobachtet.

Durch eine Untersuchung der mRNA aus verschiedenen Zelllinien im Vergleich mit normalen Urothelzellen konnte gezeigt werden, dass eine Herunterregulation von FAS mit großer Wahrscheinlichkeit auf der Ebene der Transkription stattfindet. Wie die verminderte Transkription zustande kommt, konnte nicht endgültig geklärt werden. Eine Möglichkeit besteht in einer Hypermethylierung des TNFRSF6-Promoters. Eine verstärkte Methylierung von CpG-reichen Promotoren ist insgesamt ein häufiger Mechanismus der Geninaktivierung in malignen Tumoren (Jones und Baylin, 2002) und auch beim Harnblasen- und Prostatakarzinom häufig (Fukuhara et al., 2002). Eine verstärkte Methylierung an einzelnen Stellen des Promotors, an denen spezifische Transkriptionsfaktoren binden, wurde tatsächlich als mögliche Ursache für eine verminderte FAS-Expression in Betracht gezogen (Santourlidis et al., 2001). Jedoch scheint dieser Mechanismus nur in wenigen der untersuchten Fälle eine Erklärung für die Herunterregulation zu sein.

Eine weitere Ursache für Veränderungen der Transkription, die die FAS-Expression modulieren können, stellen Veränderungen im *p53*-System dar. Dieses ist ebenfalls an der

Regulation der Apoptose, auch mittels einer FAS-Regulation beteiligt. In früheren Untersuchungen wurde ein Mechanismus gezeigt, bei dem *p53* durch Hochregulation der FAS-Expression und der membranären Lokalisation des FAS-Rezeptors apoptoseinduzierend wirkt (Maecker et al., 2002; Vogelstein et al., 2000; Zalcenstein et al., 2003). Manche Autoren postulieren jedoch, dass genau dieser Mechanismus nicht ubiquitär zu finden und aus diesem Grunde möglicherweise gewebeabhängig sei (Lin et al., 2002). Wieweit dieser Zusammenhang im Harnblasengewebe bzw. – karzinom besteht, war bisher nicht untersucht. Da *p53* in Harnblasenkarzinomen oft in mutierter Form vorgefunden wurde (Orntoft et al., 1998; Esrig et al., 1994), bestand prinzipiell die Möglichkeit einer Beziehung zwischen mutiertem *p53* und einer Herunterregulation von FAS in fortgeschrittenen Harnblasenkarzinomen.

Obwohl sowohl eine FAS-Herunterregulation (wie in dieser Arbeit gezeigt) als auch eine *p53*-Mutation (Steinhoff et al., 2002) durchgängig beobachtet wurden, scheinen diese beiden Veränderungen in keiner Beziehung zueinander zu stehen. Eine Korrelation zwischen mutiertem *p53* und verminderter FAS-Expression in 80 Gewebeproben blieb aus; zwischen FAS-Herunterregulation in den Tumoren und der Akkumulation von somit wahrscheinlich mutiertem *p53* wurde kein Zusammenhang beobachtet.

Eine Erklärung für eine fehlende Korrelation dieser beiden Ergebnisse könnte in der Tatsache zu finden sein, dass die FAS-Expressions-Veränderung eher mit dem Tumorstadium und eine *p53*-Akkumulation, als Ausdruck der Mutation, stärker mit dem Differenzierungsgrad korreliert. Der vermutete Zusammenhang, nach dem *p53* den FAS-Rezeptor in seiner Expression beeinflussen könnte, scheint also in Harnblasenkarzinomen nicht stattzufinden. Vielmehr agieren beide Faktoren offenbar unabhängig voneinander in den Tumorzellen. Die FAS-Expression wird möglicherweise von anderen Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen entscheidend beeinflusst.

In der Vergangenheit wurden Untersuchungen durchgeführt, die den Einfluss von Zellzyklusregulationsproteinen auf die Prognose bzw. die Entscheidung zu einer jeweiligen Therapie aufzeigen sollten. Steiner et al. konnte mit Hilfe des *p53*-Status keine wertvollen Informationen im Hinblick auf die Entscheidung für oder gegen eine Zystektomie bei T1G3-Tumoren geben (Steiner et al., 2000). Bei Santos et al. erschien jedoch ein anderes Protein (Ki67) als prognostisch günstiger Faktor, um Aussagen zu remissionsfreiem Überleben zu machen und so die Entscheidung zu einer adjuvanten Therapie zu fällen (Santos et al., 2003).

In jedem Fall war eine Untersuchung der Zusammenhänge zwischen Zellzyklusregulationsproteinen und der FAS-Expression im Hinblick auf synergistische Apoptosefunktionen nötig.

Während der membranständige FAS-Rezeptor vermindert exprimiert war, konnte anhand von Analysen der mRNA eine erhöhte Expression von löslichem FAS in Tumorzelllinien gezeigt werden. Darauf deuteten bereits Ergebnisse einer anderen Arbeitsgruppe (Perabo et al., 2001a und 2001b). Aussagekräftiger werden diese Ergebnisse jedoch durch die parallel durchgeführte Untersuchung der mRNA von membrangebundenem FAS, im Vergleich zur mRNA von löslichem und membrangebundenem FAS aus Normalurothelzelllinien mit der gut quantitativen Taqman Realtime-PCR. Mit diesem quantitativen Vergleich ist es möglich zu erkennen, ob es in Tumorzellen im Vergleich zu Normalzellen tatsächlich zu einer Verminderung des membranständigen FAS-Rezeptors bei gleichzeitiger Erhöhung des löslichen Rezeptors kommt und die Apoptoseinduktion durch den Membranrezeptor durch diesen Mechanismus umgangen wird. Dies war bisher in den anderen Studien nicht erfolgt.

Es zeigte sich, dass die mRNA von membrangebundenem FAS in fortgeschrittenen Tumorzelllinien bis maximal um den Faktor 33 (bis zu 3%) im Vergleich zu dem Mittelwert der Normalurothelzelllinien vermindert ist. Die mRNA von löslichem FAS wurde bei Zelllinien aus fortgeschrittenen Tumoren im Vergleich zu Normalurothel sogar bis maximal 126fach erhöht vorgefunden. An der Zelllinie RT4, die als Einzige aus einem gut differenzierten papillären Karzinom angelegt wurde, ist zu erkennen, dass diese dem Normalurothel im Hinblick auf membrangebundenes FAS noch am nächsten ist. In allen anderen Fällen war eine enorme Herunterregulation zu sehen. Auch in der RT4-Zelllinie trat eine hohe Expression des löslichen FAS auf. Deutlich wird bei einem Vergleich zu Normalurothel, dass eine Verschiebung des Verhältnisses der beiden Formen des FAS-Rezeptors in Richtung des löslichen FAS-Rezeptors stattfindet.

Ein weiterer möglicher Mechanismus, der eine verminderte FAS-Antwort bedingen könnte, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Überraschend hat die Arbeitsgruppe Lee et al. (Lee et al., 1999b) eine hohe Rate an Mutationen in der *TNFRSF6* bei Urothelzellkarzinomen gefunden. Auch Mutationen könnten Veränderungen der Proteinexpression bewirken. Darüberhinaus wurden diese Mutationen alle im Exon 9 des Gens gefunden. Da das Exon 9 auch die „Death Domain“ des FAS-Rezeptors enthält (Exon 9A), die für die Übertragung des apoptotischen Signals essentiell zu sein scheint (Rieux-Laucat et al., 1995), würden solche Mutationen zu einer verringerten FAS-Antwort führen. Es war daher überaus wichtig, diese Möglichkeit zu verifizieren.

In der beschriebenen Studie von Lee et al. fanden sich 11 Missense-Mutationen und eine Leseraster-Mutation in 42 Tumorgeweben. Acht dieser Mutationen waren G993A Transitionen im Exon 9A. Bei dem Versuch, dieses Ergebnis zu verifizieren, ergab sich jedoch kein Hinweis auf eine Mutation, auch nicht an dieser Stelle. In keinem der 10 aus unterschiedlichen Urothelzellkarzinomen (meist aus fortgeschrittenen Karzinomen) stammenden sequenzierten Abschnitte des Exon 9 war - im Vergleich zum physiologischen Genabschnitt - eine abweichende Sequenz zu eruieren. Ein Grund für diese abweichenden Ergebnisse könnte in den unterschiedlichen Proben, die benutzt wurden, bestehen. Andererseits könnte diese Abweichung auch ein Hinweis darauf sein, dass Mutationen im FAS-Rezeptor-Gen spezifisch in Ostasien auftreten.

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass eine Herunterregulation von FAS sowohl bei der immunhistochemischen Analyse von Tumorgeweben als auch bei der molekularbiologischen Analyse der mRNA in Zelllinien aus fortgeschrittenen Harnblasenkarzinomen zu erkennen war. Die verminderte Expression des Proteins FAS und seiner mRNA der membranären Form gibt einen Hinweis darauf, dass die durch FAS normalerweise ausgelöste Apoptose auf diesem Wege zumindest negativ beeinflusst, wenn nicht sogar aufgehoben und umgangen werden kann. Ein verhinderter Zelltod würde dann in jedem Fall einen Selektionsvorteil darstellen und ein Wachstum bzw. ein Ausbreiten des Tumors erleichtern.

Die gefundenen Veränderungen der FAS-Expression müssen auch im Zusammenhang der von anderen Arbeitsgruppen beschriebenen Veränderungen des FAS-Liganden (Mizutani et al., 2001; Perabo et al., 2001a und 2001b; Strand et al., 1996) gesehen werden. Die vom körpereigenen Immunsystem produzierten Liganden könnten durch die vermehrte Expression eines löslichen FAS-Rezeptors abgefangen werden, ohne überhaupt in die Nähe der Zielzelle und des membranständigen Rezeptors zu gelangen. Die Ergebnisse der mRNA-Untersuchung des löslichen FAS-Rezeptors machen deutlich, dass dieser Mechanismus der Immunevasion in Harnblasenkarzinomen wahrscheinlich ist. Zudem wird eine Herunterregulation der mRNA von membrangebundenem FAS sowie auch auf Proteinebene eine verminderte FAS-Expression in fortgeschrittenen Tumoren beobachtet, so dass nicht unbedingt Postrezeptordefekte für eine veränderte FAS-Antwort in Urothelzellkarzinomen gegenüber Normalurothel angenommen werden müssen.

Vor allem lassen diese Ergebnisse darauf schließen, dass die „Counterattack“-Hypothese im Harnblasenkarzinom weiter verfolgt werden kann. Zusammen genommen deuten die Ergebnisse der verschiedenen Studien darauf hin, dass in Tumorzellen die FAS-Rezeptor-

Expression herunter reguliert wird und gleichzeitig der lösliche FAS-Rezeptor und der FAS-Ligand vermehrt exprimiert werden. Die Ergebnisse von Chopin et al. weisen darauf hin, dass Tumorzellen auf diese Weise das körpereigene Immunsystem umgehen könnten (Chopin et al., 2003).

Generell ist die Counterattack-Hypothese in einer Untersuchung von Igney und Krammer (Igney und Krammer, 2002b) beschrieben. In anderen Studien (Strand et al., 1996) konnte dieser Mechanismus der Immunevasion gezeigt werden. Vor allem in Harnblasentumoren höheren Stadiums mit stärkerer Ausbreitung (deutlich ab pT3) ist er aufgrund der Ergebnisse denkbar. Wenn die Vermeidung des körpereigenen Immunsystems auf diese Weise wichtig für die Ausbreitung von Harnblasenkarzinomen ist, lässt sich diskutieren, ob hier Ansatzpunkte für eine Immuntherapie zu erwägen sind. Eine Ausschaltung der löslichen „Abfang“-Rezeptoren oder eine positive Beeinflussung der tumoreigenen membranständigen Rezeptoren könnte dem Immunsystem zur Bekämpfung von Karzinomen wieder einen Angriffspunkt bieten.

In der Tat gibt es Hinweise darauf, dass Veränderungen des FASR/FASL-Systems durch Chemotherapie erfolgen können. Beispielsweise steht die Apoptose-induzierende Wirkung des FASR/FASL-Systems im Zusammenhang mit prognostischen Faktoren bei der Anwendung von Chemotherapeutika, speziell von Adriamycin. Yu et al. (Yu et al., 2003) fanden hierbei zwar einen Synergismus zwischen Adriamycin und den Tumornekrosefaktoren; obgleich dieser deutlicher bei TNF α als bei FAS ausgeprägt war. Es würde sich also wohl lohnen, die Expression der Komponenten des FAS-Systems im Zusammenhang mit der Chemotherapie des Harnblasenkarzinoms weiter zu untersuchen.

6. Zusammenfassung

Das Harnblasenkarzinom ist ein weltweit verbreitet und häufig auftretender Tumor mit sehr unterschiedlichen klinischen Verläufen und Ansprechraten auf verschiedene Therapieoptionen, deren Ursachen noch weitgehend unergründet sind. Eine wesentliche Ursache der Tumorentwicklung sind Störungen der Apoptose. Speziell ist die Expression des FAS-Rezeptor (Synonym: CD95, APO-1) häufig gestört, der als Übermittler von Apoptosesignalen fungiert. Durch den spezifischen FAS-Liganden, z.B. auf zytotoxischen T-Zellen, wird eine Signalkaskade innerhalb der Zelle in Gang gesetzt, die zur Apoptose führt. Viele Zellen gesunder Gewebe, auch Lymphozyten, exprimieren diesen Rezeptor. Eine verminderte FAS-Expression in Karzinomzellen könnte diesen ermöglichen, Angriffen durch das körpereigene Immunsystem zu entgehen. Karzinomzellen exprimieren auch oftmals eine lösliche Form des FAS-Protein, die FAS-Liganden bindet und ablenkt. Diese Veränderungen könnten einen Selektionsvorteil für Tumorzellen erbringen und damit im Harnblasenkarzinom eine Ursache für die unterschiedlichen Progressionsraten darstellen.

Daher wurde in dieser Arbeit die Expression des FAS-Proteins in 83 Harnblasenkarzinomen, überwiegend aus Zystektomien, immunhistochemisch untersucht. Die Expression der FAS mRNA-Formen (membranständig und löslich) wurde zwischen Harnblasenkarzinom-Zelllinien und kultivierten normalen Urothelzellen mittels quantitativer RT-PCR verglichen. In den Tumorgeweben wurde beobachtet, dass in höheren Tumorstadien eine statistisch signifikante Verminderung der FAS-Rezeptor-Expression stattfindet, v.a. ab dem Stadium pT3. Bei Lymphknotenbefall bzw. Metastasierung liess sich eine Tendenz zu einer niedrigeren FAS-Expression erkennen, die jedoch nicht signifikant war. Ein Zusammenhang mit dem Differenzierungsgrad wurde nicht beobachtet. Ebenso bestand kein Zusammenhang mit dem weiteren klinischen Verlauf, dem Auftreten von Rezidiven oder dem Überleben.

Ein Regulator der FAS-Expression ist das Tumorsuppressorgen *p53*, das in vielen Harnblasenkarzinomen mutiert ist. Es induziert FAS durch Bindung an einen Abschnitt der Promoterregion des FAS-Gens. Mutiertes *p53* akkumuliert gewöhnlich, so dass es immunhistochemisch nachgewiesen werden kann. Ein Vergleich zwischen der Expression von FAS und der Akkumulation von *p53* zeigte jedoch keine Korrelation. Vielmehr korrelierte die *p53*-Akkumulation mit dem Differenzierungsgrad statt – wie die FAS-Expression - mit dem Tumorstadium.

Die Untersuchungen der mRNA des löslichen (sol-FAS) und membranständigen FAS-Rezeptors (tm-FAS) an 11 Harnblasenkarzinomzelllinien zeigten, dass die tm-FAS mRNA in fast allen Tumor-Zelllinien im Vergleich zu normalen Urothelzellen deutlich vermindert war. Umgekehrt fand sich eine starke Erhöhung der sol-FAS mRNA.

Zusätzlich wurde in den Zelllinien mittels SSCP und Sequenzierung nach Mutationen in der „Death Domain“ des FAS-Rezeptors gesucht, die in manchen Tumoren vorkommen. In Harnblasenkarzinom-Zelllinien wurden keine entdeckt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind mit einer Hypothese kompatibel, nach der es im Verlauf der Progression von Tumoren zu einer Verminderung der FAS-Antwort kommt und in manchen Fällen sogar zu einer vermehrten Ausschüttung des FAS-Liganden durch Tumorzellen („Counterattack“-Hypothese). Beim Harnblasenkarzinom scheint eine verminderte Expression v.a. während der Ausbreitung des Tumors über die Organmuskulatur hinaus aufzutreten. Sie wird wahrscheinlich nicht entscheidend durch die Mutationen in *p53* ausgelöst. Die Ergebnisse aus den Zelllinien legen nahe, dass eine verminderte Expression des FAS-Rezeptors auf der Ebene der Transkription durch eine verminderte Expression der tm-FAS mRNA entsteht. Ebenso zeigte sich eine verstärkte Expression der sol-FAS mRNA. Mutationen in der „Death Domain“ sind im Harnblasenkarzinom offenbar nicht weit verbreitet. Es ist anzunehmen, dass die veränderte Expression von FAS zur Progression von Harnblasenkarzinomen beiträgt; jedoch stellt sie offenbar nicht den entscheidenden Faktor beim klinischen Verlauf nach Zystektomie dar. Eine Induktion des FAS-Rezeptors bei Verminderung der löslichen Form könnte einen sinnvollen Ansatz in der Tumorthherapie darstellen.

7. Literaturverzeichnis

Ambrosini,G., Adida,C., Altieri,D.C., 1997. "A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma." *Nat Med* 3: 917-921.

Ashkenazi,A., 2002. "Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily (REVIEW)." *Nature* 2: 420-430.

Bender,C.M., Jones,P.A., 1999. Molecular genetics in carcinoma of the bladder. In: Carcinoma of the bladder. Innovations in Management. Petrovich Z, Baert L, Brady LW (Eds.). Springer-Verlag, Heidelberg; New York, pp. 37-51.

Bichler,K.H., Wilbert,D., Wechsel,H.W., Strohmeier,W.I., 1998. Diagnostik und Therapie des Harnblasenkarzinoms. Einhorn Presse Verlag.

Block,T., 1994. "Chemotherapie des Harnblasenkarzinoms. Aktueller Stand und Trend." *Urologe A*, 33: 557-567.

Chopin,D., Barei-Moniri,R., Maille,P., Frere-Belda,M.A., Muscatelli-Groux,B., Merendino,N., Lecerf,L., Stoppacciaro,A., Velotti,F., 2003. "Human urinary bladder transitional cell carcinomas acquire the functional Fas ligand during tumor progression." *Am J Pathol* 162: 1139-1149.

Düren,C., 2004. "Expression von Fas, Fas-Ligand und CD97 im Schilddrüsenadenom und Struma nodosa." Dissertation, Halle-Wittenberg

Esrig,D., Elmajian,D., Groshen,S., Freeman,J.A., Stein,J.P., Chen,S.C., Nichols,P.W., Skinner,D.G., Jones,P.A., Cote,R.J., 1994. "Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer." *N Eng J Med* 331: 1259-1264.

Fradet,Y., Lacombe,L., 2000. "Can biological markers predict recurrence and progression of superficial bladder cancer?" *Curr Opin Urol* 10: 441-445.

Fukazawa,T., Fujiwara,T., Morimoto,Y., Shao,J., Nishizaki,M., Kadowaki,Y., Hizuta,A., Owen-Schaub,L.B., Roth,J.A., Tanaka,N., 1999. "Differential involvement of the CD95 (Fas/APO-1) receptor/ligand system on apoptosis induced by the wild-type p53 gene transfer in human cancer cells." *Oncogene* 18: 2189-2199.

Fukuhara,H., Kuramochi,M., Fukami,T., Kasahara,K., Furuhashi,M., Nobukuni,T., Maruyama,T., Isogai,K., Sekiya,T., Shuin,T., Kitamura,T., Reeves,R.H., Murakami,Y., 2002. "Promoter methylation of TSLC1 and tumor suppression by its gene product in human prostate cancer." *Jpn J Cancer Res* 93: 605-609.

Ganten,D., Ruckpaul,K., 2003. Grundlagen der Molekularen Medizin, 2. Auflage Ed. Springer-Verlag.

Giannopoulou,I., Nakopoulou,L., Zervas,A., Lazaris,A.C., Stravodimos,C., Giannopoulos,A., Davaris,P.S., 2002. "Immunohistochemical study of pro-apoptotic factors Bax, Fas and CPP32 in urinary bladder cancer: prognostic implications." *Urol Res* 30: 342-345.

Green,D.R., Evan,G.I., 2002. "A matter of life and death." *Cancer Cell* 1: 19-30.

Habuchi,T., Takahashi,R., Yamada,H., Kakehi,Y., Sugiyama,T., Yoshida,O., 1993a. "Metachronous multifocal development of urothelial cancers by intraluminal seeding." *Lancet* 342: 1087-1088.

Habuchi,T., Takahashi,R., Yamada,H., Ogawa,O., Kakehi,Y., Ogura,K., Hamazaki,S., Toguchida,J., Ishizaki,K., Fujita,J., 1993b. "Influence of cigarette smoking and schistosomiasis on p53 gene mutation in urothelial cancer." *Cancer Res* 53: 3795-3799.

Hautmann und Huland, 2001. Urologie, 2. Ed. Springer Verlag.

Igney,F.H., Krammer,P.H., 2002a. "Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis." *Nat Rev Cancer* 2: 277-288.

Igney,F.H., Krammer,P.H., 2002b. "Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack." *J Leukoc Biol* 71: 907-920.

Jang,S., Krammer,P.H., Salgame,P., 2003. "Lack of proapoptotic activity of soluble CD95 ligand is due to its failure to induce CD95 oligomers." *J Interferon Cytokine Res* 23: 441-447.

Johnstone,R.W., Ruefli,A.A., Lowe,S.W., 2002. "Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy." *Cell* 108: 153-164.

Jones,P.A., Baylin,S.B., 2002. "The fundamental role of epigenetic events in cancer." *Nat Rev Genet* 3: 415-428.

Jonsson,G., Paulie,S., Grandien,A., 2003. "High level of cFLIP correlates with resistance to death receptor-induced apoptosis in bladder carcinoma cells." *Anticancer Res* 23: 1213-1218.

Knowles,M.A., 2001. "What we could do now: molecular pathology of bladder cancer." *Mol Pathol* 54: 215-221

Krammer,P.H., 2000. "CD95`s deadly mission in the immune system." *Nature* 407: 789-795.

Krueger,A., Fas,S.C., Baumann,S., Krammer,P.H., 2003. "The role of CD95 in the regulation of peripheral T-cell apoptosis." *Immunol Rev* 193: 58-69.

Lee,S.H., Lee,J.Y., Park,W.S., Kim,S.Y., Jang,J.J., Yoo,N.J., 1999a. "Transitional cell carcinoma expresses high levels of Fas ligand in vivo." *BJU Int* 83: 698-702.

Lee,S.H., Shin,M.S., Park,W.S., Kim,S.Y., Dong,S.M., Pi,J.H., Lee,H.K., Kim,H.S., Jang,J.J., Kim,C.S., Kim,S.H., Lee,J.Y., Yoo,N.J., 1999b. "Alterations of Fas (APO-1/CD95) gene in transitional cell carcinomas of urinary bladder." *Cancer Res* 59: 3068-3072.

Li-Weber,M., Krammer,P.H., 2003. "Function and regulation of the CD95 (APO-1/Fas) ligand in the immune system." *Semin Immunol* 15: 145-157.

Lin,P., Bush,J.A., Cheung,K.J., Jr., Li,G., 2002. "Tissue-specific regulation of Fas/APO-1/CD95 expression by p53." *Int J Oncol* 21: 261-264.

Locksley,R.M., Killeen,N., Lenardo,M.J., 2001. "The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology." *Cell* 104: 487-501.

Maecker,H.L., Yun,Z., Maecker,H.T., Giaccia,A.J., 2002. "Epigenetic changes in tumor Fas levels determine immune escape and response to therapy." *Cancer Cell* 2: 139-148.

Mizutani,Y., Hongo,F., Sato,N., Ogawa,O., Yoshida,O., Miki,T., 2001. "Significance of serum soluble Fas ligand in patients with bladder carcinoma." *Cancer* 92: 287-293.

Mizutani,Y., Yoshida,O., Bonavida,B., 1998. "Prognostic significance of soluble Fas in the serum of patients with bladder cancer." *J Urol* 160: 571-576.

Muller,M., Wilder,S., Bannasch,D., Israeli,D., Lehlbach,K., Li-Weber,M., Friedman,S.L., Galle,P.R., Stremmel,W., Oren,M., Krammer,P.H., 1998. "p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs." *J Exp Med* 188: 2033-2045.

Orntoft,T.F., Wolf,H., 1998. "Molecular alterations in bladder cancer." *Urol Res* 26: 223-233.

Otto T, Krege S, Goepel M, and Rübben H. Markersysteme beim Harnblasenkarzinom. Der Urologe 37, 209-215. 1997. Springer-Verlag.

Ref Type: Magazine Article

Owen-Schaub,L.B., 2002. "Fas function and tumor progression: use it and lose it." *Cancer Cell* 2: 95-96.

Perabo,F.G., Kamp,S., Schmidt,D., Lindner,H., Steiner,G., Mattes,R.H., Wirger,A., Pegelow,K., Albers,P., Kohn,E.C., von Ruecker,A., Mueller,S.C., 2001a. "Bladder cancer cells acquire competent mechanisms to escape Fas-mediated apoptosis and immune surveillance in the course of malignant transformation." *Br J Cancer* 84: 1330-1338.

Perabo,F.G., Mattes,R.H., Wirger,A., Steiner,G., Kamp,S., Schmidt,D., Pegelow,K., von Ruecker,A., Muller,S.C., 2001b. "Soluble Fas and Fas-ligand in bladder cancer in vitro and in vivo." 6: 163-169.

Rieux-Laucat,F., Le Deist,F., Hivroz,C., Roberts,I.A., Debatin,K.M., Fischer,A., De Villartay,J.P., 1995. "Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity." *Science* 268: 1347-1349.

Rübben,H., 2000. Uroonkologie, 3. Ed. Springer Verlag, Berlin Heidelberg.

Santos,L.L., Amaro,T., Pereira,S.A., Lameiras,C.R., Lopes,P., Bento,M.J., Oliveira,J., Criado,B., Lopes,C.S., 2003. "Expression of cell-cycle regulatory proteins and their prognostic value in superficial low-grade urothelial cell carcinoma of the bladder." *Eur J Surg Oncol* 29: 74-80.

Santourlidis,S., Warskulat,U., Florl,A.R., Maas,S., Pulte,T., Fischer,J., Muller,W., Schulz,W.A., 2001. "Hypermethylation of the tumor necrosis factor receptor superfamily 6 (APT1, Fas, CD95/Apo-1) gene promoter at rel/nuclear factor kappaB sites in prostatic carcinoma." *Mol Carcinog* 32: 36-43.

Sidransky,D., 2002. "Emerging molecular markers of cancer." *Nat Rev Cancer* 2: 210-219.

Southgate,J., Hutton,K.A., Thomas,D.F., Trejdosiewicz,L.K., 1994. "Normal human urothelial cells in vitro: proliferation and induction of stratification." *Lab Invest* 71: 583-594

Steiner,G., Bierhoff,E., Schmidt,D., Leissner,J., Wolf,H.K., Albers,P., 2000. "p53 immunoreactivity in biopsy specimens of T1G3 transitional cell carcinoma of the bladder--a helpful parameter in guiding the decision for or against cystectomy?" *Eur J Cancer* 36: 610-614.

Steinhoff,C., 2001. "Nutzung tumorspezifischer Veränderungen für die selektive Reexpression des Tumorsuppressorgens p53 in Harnblasenkarzinomen." Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Steinhoff,C., Franke,K.H., Golka,K., Thier,R., Romer,H.C., Rotzel,C., Ackermann,R., Schulz,W.A., 2000. "Glutathione transferase isozyme genotypes in patients with prostate and bladder carcinoma." *Arch Toxicol* 74: 521-526.

Steinhoff,C., Prior,A., Reichmann,G., Seifert,H.H., Schulz,W.A., 2002. "Activity of E2F-dependent promoters in bladder carcinoma cells and their use for tumour-specific targeting of p53-induced apoptosis." *Int J Oncol* 21: 1033-1040.

Strand,S., Hofmann,W.J., Hug,H., Müller,M., Otto,G., Strand,D., Mariani,S.M., Stremmel,W., Krammer,P.H., Galle,P.R., 1996. "Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expression tumor cells - A mechanism of immune evasion?" *Nature Medicine* 2: 1361-1366.

Vogelstein,B., Lane,D., Levine,A.J., 2000. "Surfing the p53 network." *Nature* 408: 307-310.

Yu,D.S., Hsieh,D.S., Chen,H.I., Chang,S.Y., 2003. "Synergism of Fas-mediated apoptosis and tumor necrosis factor on adriamycin cytotoxicity to transitional cell carcinoma." *Urol Int* 70: 161-166.

Zalcenstein,A., Stambolsky,P., Weisz,L., Muller,M., Wallach,D., Goncharov,T.M., Krammer,P.H., Rotter,V., Oren,M., 2003. "Mutant p53 gain of function: repression of CD95(Fas/APO-1) gene expression by tumor-associated p53 mutants." *Oncogene* 22: 5667-5676.

Internetseiten:

www.medizentrum.de

www.cytochemia.de

8. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
A.	Aqua
Abb.	Abbildung
ALPS	Autoimmunes lymphoproliferatives Syndrom
Apo	Apoptose
APS	Ammoniumpersulfatlösung
BCG	Bacille-Calmette-Guérin
BMFZ	Biologisch-medizinisches Forschungszentrum
BT	Blasentumor
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
C	Cytosin
CDK	Zyclinabhängige Kinasen
DD	Death Domain
DED	Death effector Domain
DISC	Death-inducing signaling complex
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FADD	Fibroblast Associated Death-Domain
FAS	fibroblast associated
FASL	FAS-Ligand
FASR	FAS-Rezeptor
FLIP	Flice inhibiting protein
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
G	Guanidin
GSTM1	Glutathion Transferase Isoenzym 1
HPRT	Hypoxanthin-Phosporibosyl-Transferase
IAP	Inhibitor of apoptosis
IHC	Immunhistochemie
LOH	Loss of Heterozygosity

Abkürzungsverzeichnis

M	Metastasierung
MH-Test	Mantel-Haenszel-Test
Min.	Minute
N	Lymphknotenbefall
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PLAD	pre-ligand-binding assembly domain
PTEN	Phosphatase and tensin homologue
Rb	Retinoblastom
RNA	Ribonukleinsäure
s.	siehe
Sek.	Sekunde
sol	soluble = löslich
SAS	Statistical Analysis System
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
Syn.	Synonym
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris Acetat EDTA - Puffer
TBE	Tris Borat EDTA - Puffer
TCC	Transitional Cell Carcinoma
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
Tis	Tumor in situ = Carcinoma in situ
Tm	Transmembranär ; membranständig
TNFRSF	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamily
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)aminomethan
TUR	Transurethrale Resektion
TUR-BT	Transurethrale Resektion des Blasen Tumors
U	Unit
u.a.	unter anderem
UICC	Union International Contre le Cancer
UV	Ultraviolett

9. Danksagung

Danken möchte ich im Besonderen meinem Betreuer, Prof. Dr. Wolfgang Schulz, der immer Zeit und Lust hatte, Hilfestellungen zu leisten und für die nötige Motivation zu sorgen. Außerdem geht mein Dank an das Forschungslabor der Urologischen Klinik mitsamt seinen Mitarbeitern für die Unterstützung während meiner Arbeit im Labor. Danken möchte ich auch Prof. Rolf Ackermann und den Mitarbeitern der Urologischen Klinik für die Bereitstellung aller notwendigen Materialien und Patientendaten.

Namentlich geht mein Dank an Dr. Andrea Linnemann-Florl für ihre Hilfe und guten Tipps beim Verfassen der Arbeit, an Dr. Oliver Grimm, an Christiane Hader, an PD Dr. Wolfram Müller für die Hilfe beim Auswerten der Präparate und die Übernahme des Ko-Referats, an Andrea Prior, an Dr. Helge Seifert für die Mühen beim Verfassen unserer gemeinsamen Publikationen, an Dr. Christine Steinhoff für die Bereitstellung der p53-Daten, an PD Dr. Ulrich Warskulat und seiner Arbeitsgruppe für die Hilfe bei der RT-PCR-Untersuchungen. Allen namentlich erwähnten danke ich dafür, dass sie mit ihrer Unermüdlichkeit dafür sorgten, mich in die Welten des Labors aufzunehmen und mich in meiner Arbeit zu unterstützen. Viel zu wichtig, um sie nicht zu erwähnen: Vielen Dank an Monika und Walter Schimpe. Ohne die beiden wäre das alles nicht möglich gewesen.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Simone Maas
Geburtsdatum/-ort	29.03.1978 in Krefeld
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Wohnort	Fabriciusstr. 1 40225 Düsseldorf
Telefon	0211 - 1752700 oder 0177 - 7165450
e-mail	maassimone@web.de

Schulische Ausbildung

1984 – 1988	Grundschule Eichendorffstraße in Krefeld
1988 – 1997	Ricarda-Huch-Gymnasium in Krefeld

Hochschulausbildung

10/1997 – 11/2003	Medizinstudium an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
09/1999	Ablegen der Ärztlichen Vorprüfung
09/2000	Ablegen des Ersten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung
08/2002	Ablegen des Zweiten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung
11/2003	Ablegen des Dritten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung (mit der Gesamtnote: -gut-)

Famulaturen

03/2000	Famulatur in der Pädiatrie des Klinikum Krefeld
03/2001	Famulatur in der Urologie der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
08/2001	Famulatur in der Anästhesie im Allgemeinen Krankenhaus (AKH) in Wien
03/2002	Famulatur in der Chirurgischen Praxis von Dr. Bernd Simon in Moers

PJ-Tätigkeiten (10/2002 – 09/2003)

Erstes Tertial	Innere Medizin im Lukaskrankenhaus, Neuss
Zweites Tertial	Wahlfach Urologie im Universitätskrankenhaus (AZU) in Utrecht, NL
Drittes Tertial	Chirurgie im Texas Heart Institute in Houston, USA

ÄiP/Assistenzart-Tätigkeit

Seit 02/2004	Ärztin im Praktikum / Assistenzärztin im Klinikum Krefeld - Abteilung Allgemein- und Viszeralchirurgie -
--------------	---

Promotionsthema

- Beginn der Promotionsarbeit in der Urologischen Klinik im WS 1999/2000 -

„Untersuchung der Expression des FAS-Rezeptors im Harnblasenkarzinom“

Publikationen

Kimura F, Florl AR, Seifert HH, Louthelainen J, Maas S, Knowles MA, Schulz WA

Destabilisation of chromosome 9 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. Br. J. Cancer 85, 1887-1893; 2001

Santourlidis S, Warskulat U, Florl AR, Maas S, Pulte T, Fischer J, Muller W, Schulz WA
Hypermethylation of the tumor necrosis factor receptor superfamily 6 (ATP1, Fas, CD95/Apo-1) gene promoter at rel/nuclear factor kappaB sites in prostatic carcinoma. Mol. Carcinog., 32:36-43; 2001

Maas S, Warskulat U, Steinhoff C, Mueller W, Grimm M-O, Schulz WA, Seifert HH
Decreased FAS Expression in advanced-stage bladder cancer is not related to p53 status. Urology 63, 392-397; 2004

Nebentätigkeiten

1997 – 2002	Tätigkeit als Aushilfsmitarbeiterin im Cäcilien-Hospital in Krefeld (Abteilung: Chirurgie) und im Marienhospital in Düsseldorf (Abteilung: Chirurgische Intensivstation)
-------------	--

Zusatzkurse

10/1998 – 03/1999	Absolvieren eines Ultraschall-Kursus
04/2000 – 06/2000	Absolvieren von „Kolloquium und Praktische Übungen Akute Notfälle und Erste Ärztliche Hilfe“
02/2004-09-20	Absolvieren des Strahlenschutz-Einführungskurses

Düsseldorf, 11.12.2004

Zusammenfassung (Abstract)

Das Harnblasenkarzinom ist ein weltweit verbreiteter und häufig auftretender Tumor mit unterschiedlichen klinischen Verläufen. Eine wesentliche Ursache der Tumorentwicklung sind Störungen der Apoptose, die häufig mit veränderter Expression des FAS-Rezeptors (Synonym: CD95, APO1) einhergehen. Karzinomzellen exprimieren oft auch eine lösliche Form des FAS-Protein, die FAS-Liganden bindet und ablenkt. Diese Veränderungen könnten durch Umgehung des Immunsystems einen Selektionsvorteil für Tumorzellen erbringen.

Daher wurde die Expression des FAS-Proteins in 83 Harnblasenkarzinomen immunhistochemisch untersucht. Die Expression der FAS mRNA-Formen wurde zwischen Harnblasenkarzinom-Zelllinien und normalen Urothelzellen verglichen. In den Tumorgeweben wurde beobachtet, dass in höheren Tumorstadien eine signifikante Verminderung der FAS-Rezeptor-Expression stattfindet. Bei Lymphknotenbefall bzw. Metastasierung ließ sich eine Tendenz zu einer niedrigeren FAS-Expression erkennen. Ein Zusammenhang mit dem Differenzierungsgrad, dem weiteren klinischen Verlauf oder Überleben wurde nicht beobachtet. Ein Regulator der FAS-Expression ist das Tumorsuppressorgen *p53*, das in vielen Harnblasenkarzinomen mutiert und dann akkumuliert nachzuweisen ist. Ein Vergleich zwischen der FAS-Expression und der Akkumulation von *p53* zeigte jedoch keine Korrelation.

Die Untersuchungen der mRNA des löslichen (sol-FAS) und membranständigen FAS-Rezeptors (tm-FAS) an 11 Harnblasenkarzinomzelllinien zeigten, dass die tm-FAS mRNA in fast allen Tumor-Zelllinien im Vergleich zu normalen Urothelzellen deutlich vermindert war. Umgekehrt fand sich eine starke Erhöhung der sol-FAS mRNA.

Zusätzlich wurde in den Zelllinien mittels SSCP und Sequenzierung nach Mutationen in der „Death Domain“ des FAS-Rezeptors gesucht. Es wurde jedoch keine entdeckt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind mit einer Hypothese kompatibel, nach der es im Verlauf der Tumorprogression zu einer Verminderung der FAS-Antwort kommt und in manchen Fällen sogar zu einer vermehrten Ausschüttung des FAS-Liganden durch Tumorzellen („Counterattack“-Hypothese). Dies schien v.a. während der Ausbreitung des Tumors über die Organmuskulatur hinaus (pT3) aufzutreten. Die Ergebnisse aus den Zelllinien legen nahe, dass eine verminderte Expression des FAS-Rezeptors auf der Ebene der Transkription entsteht. Mutationen in der „Death Domain“ sind offenbar nicht weit verbreitet.

Es ist anzunehmen, dass die veränderte Expression von FAS zur Progression von Harnblasenkarzinomen beiträgt; jedoch stellt sie offenbar nicht den entscheidenden Faktor beim klinischen Verlauf nach Zystektomie dar. Eine Induktion des FAS-Rezeptors bei Verminderung der löslichen Form könnte einen sinnvollen Ansatz in der Tumorthherapie darstellen.