

Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie
(Direktor: Univ. Prof. Dr. med. H. Höfler)
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar

Die Expression von Stromelysin-3 bei invasiven und nicht- invasiven Neoplasien der Harnblase

Christine Steiner

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:	Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier
Prüfer der Dissertation:	1. Univ.-Prof. Dr. H. Höfler 2. Univ.-Prof. Dr. R. Hartung

Die Dissertation wurde am 22.11.2001 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 09.01.2002 angenommen.

Meinen Eltern

Danke!

Herrn Professor Höfler für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit diese Doktorarbeit anzufertigen.

Dr. Jim Mueller für die Betreuung meiner Arbeit, seine stetige Unterstützung und sein persönliches Engagement.

Elke Müller für die Einweisung in die Techniken der Immunhistochemie und In-Situ-Hybridisierung. Sie stand mir stets mit Rat und Tat zur Seite.

Dem gesamten Labor von Herrn Professor Höfler für die interessanten wissenschaftlichen Diskussionen sowie die nette und freundschaftliche Atmosphäre.

Meinen Eltern, ihre stetige Unterstützung hat mir eine sorgenfreie Studienzeit ermöglicht.

Andreas für seine Geduld, seine Computerkenntnisse und vieles mehr.

Inhalt

1. Klinik der Harnblasenkarzinome	6
1.1 Epidemiologie der Harnblasenkarzinome.....	6
1.2 Äthiologie der Harnblasenkarzinome	6
1.2.1 Ursache multipler Harnblasenkarzinome.....	7
1.3 Diagnostik der Harnblasenkarzinome.....	8
2. Histologie der Harnblasenkarzinome	9
2.1 Gesundes Urothel.....	9
2.2 Präinvasive Urothelkarzinome.....	10
2.2.1 Karzinoma in situ.....	11
2.2.2 Nicht-invasive papilläre Urothelneoplasien	12
2.3 Invasive Urothelkarzinome.....	14
2.4 TMN-Klassifikation der Urothelkarzinome.....	15
3. Bedeutung der Histologie für den klinischen Verlauf	17
3.1 Prognose der oberflächlichen Harnblasenkarzinome	18
3.2 Therapie der Harnblasenkarzinome	19
4. Biologie der Harnblasenkarzinome	20
4.1 Prognostische Marker im Versuch.....	20
4.1.1 p53.....	20
4.1.2 Chromosom 9 Defekt.....	22
4.1.3 Retinoblastoma Surpressor Gen.....	22
4.1.4 E-cadherin.....	22
4.1.5 Blutgruppenantigene.....	24
4.1.6 Epidermaler Wachstumsfaktor.....	24
4.2 Invasion als zentrales Problem	25
4.2.1 Basalmembran Antigene.....	25
4.2.2 Proteasen.....	26
5. Stromelysin-3	29
5.1 Aufbau.....	29
5.2 Substratspezifität.....	30
5.3 Vorkommen	31

6. Ziel der Studie	35
7. Material und Methoden.....	37
7.1 Patienten.....	37
7.2 Immunhistochemie.....	41
7.3 In situ Hybridisierung	43
8. Ergebnisse.....	45
8.1 Muster der Stromelysin-3 Expression.....	45
8.2 Stromelysin-3 Expression der verschiedenen Gruppen.....	47
8.3 Stromelysin-3 Expression: Vergleich mit histopathologischen Parametern....	49
9. Diskussion	54
9.1 Zusammenfassung der Ergebnisse	54
9.2 Begründung der Ergebnisse	55
9.2.1 Verhältnis des Proteins Stromelysin-3 zur mRNA	55
9.2.2 Stromelysin-3 bei invasiven Harnblasenkarzinomen	55
9.2.3 Stromelysin-3 bei nicht-invasiven Harnblasenkarzinomen	57
9.3 Stromelysin-3 bei Umbauvorgängen	59
9.3.1 Morphologische Unterschiede der Karzinoma in situ und der nicht- invasiven papillären Harnblasenneoplasien.....	60
9.3.2 Die Bedeutung von Stromelysin-3 für die Extrazelluläre Matrix.....	61
9.3.3 Stromelysin-3 bei Invasion und Metastasierung.....	62
9.3.4 Die Bedeutung des Stromas für die Tumorzellen.....	65
9.4 Ausblick	68
10. Zusammenfassung.....	70
11. Literaturverzeichnis	72

1. Klinik der Harnblasenkarzinome

1.1 Epidemiologie der Harnblasenkarzinome

Jedes Jahr führen bösartige Neubildungen der Harnblase laut "Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland" (1997) zu 18.000 Neuerkrankungen. Mit 12.500 jährlichen Neuerkrankungen sind mehr als doppelt so viele Männer von Blasenkrebs betroffen wie Frauen (5.100). Die Harnblase ist bei den Männern die vierthäufigste Krebslokalisation. Die Inzidenz der Harnblasenkarzinome nimmt nach dem 40. Lebensjahr zu und erreicht im 6. und 7. Dezenium ihren Höhepunkt (Raghavan and Huben, 1995). An diesem Tumorleiden verstarben im Jahr 1996, 6.490 Patienten. Dies entspricht einer Mortalität von 7,9 pro 100.000 Einwohner.

Insgesamt erkranken laut Statistischen Bundesamt jährlich 333.000 Personen neu an Krebs. An diesem Leiden verstarben im Jahr 1996, 212.888 Patienten. Damit sind 3,05% der durch Krebs verursachten Todesfälle auf Harnbasenkarzinome zurückzuführen.

1.2 Äthiologie der Harnblasenkarzinome

Ursache für die höhere Erkrankungsrate bei Männern könnte die längere Urinkarzinogen-Expositionsdauer beim Mann mit obstruktiver Prostatahyperplasie und der höhere Raucheranteil sein. Der Zusammenhang zwischen Rauchen und Harnblasenkrebs ist schon seit vielen Jahren bekannt, etwa 80% der Patienten mit Harnblasenkarzinomen haben in ihrer Vergangenheit geraucht (Morrison et al., 1984). Das Erkrankungsrisiko scheint allerdings nur nach sehr langer Rauchergeschichte (mehr als 20 Jahre) erhöht zu sein (Silverman et al., 1992).

Ein weiterer Risikofaktor ist die Exposition mit Anilinfarbstoffen und einigen aromatischen Aminen, wie z. B. 2-Naphthylamine, Benzidine, 4-Aminobiphenyl, 4,4-

Methylene bis(2-Chloraniline) und O-Toluidine. Personen die mit Leder, Gummi, Farbstoffen oder Aluminium arbeiten haben deshalb ein erhöhtes Risiko an Harnblasenkarzinomen zu erkranken (Silverman et al., 1992).

Weiterhin ist festgestellt worden, daß Patienten mit chronischer Urinstauung eine erhöhte Inzidenz für Harnblasenkrebs haben. Ob hierfür die Stase selbst oder die meist mit einer Urinstauung einhergehende chronische Infektion verantwortlich ist, ist noch nicht geklärt (Raghavan and Huben, 1995). Inwieweit Entzündungen der Harnblase bei der Entstehung von Blasenkrebs eine Rolle spielen, ist ebenfalls noch Ziel weiterer Forschungen (Kroft and Oyasu, 1994).

Eine weitere Form der chronischen Entzündung, verursacht durch die Implantation der Eier von *Schistosoma haematobium* in der Harnblasenwand, geht in Regionen mit endemischem Vorkommen dieser Organismen, mit einer erhöhten Inzidenz für Harnblasentumore einher (El-Bokainy, 1983). Allerdings sind mehr als 70% dieser Tumoren Plattenepithelkarzinome, welche in den USA nur 2% der Harnblasentumore ausmachen (Silverman et al., 1992).

Weitere Faktoren die das Risiko an Harnblasenkrebs zu erkranken erhöhen, sind der Genuß von Kaffee, chloriertem Wasser und künstlichen Süßstoffen (Raghavan and Huben, 1995).

1.2.1 Ursache multipler Harnblasenkarzinome

Fast die Hälfte aller Karzinome in der Harnblase wachsen multifokal. Man vermutet daß multiple Tumore entweder die Nachkommenschaft einer einzigen transformierten Zelle sind oder daß sie voneinander unabhängig aus getrennten Klonen entstanden sind. Letztere Möglichkeit geht von einem Feldeffekt der Harnblasenmukosa aus. Das Phänomen des Feldeffekts könnte mit der Vermutung erklärt werden, daß ein bestimmter karzinogener Stimulus zu einer spezifischen Antwort des gesamten Urothels führt (Kroft and Oyasu, 1994). Die Idee eines Feldeffekts wird durch die Tatsache bekräftigt, daß Karzinoma in situ auch außerhalb der Harnblase zu finden sind und häufig multifokal im Nierenbecken, in den Ureteren, in der Uretra oder in der Prostata auftreten (Crawford, 1996). Weiterhin werden Karzinoma in situ nur in

10% der Fälle isoliert gefunden; 90% der CIS sind sichtbaren papillären Tumoren benachbart (Hudson and Herr, 1995).

Die andere Möglichkeit, daß multiple Tumoren aus demselben neoplastischen Klon entstanden sein könnten, erklärt man durch eine intramuköse Migration der neoplastischen Zellen von ihrem Ursprungsort weg. Bei den Karzinoma in situ konnte eine laterale Ausbreitung entlang der Basalmembran beobachtet werden. Es wurde auch herausgefunden, daß Dysplasien und Karzinoma in situ häufiger in naher Umgebung zum exophytischen Tumor gefunden werden als weiter von ihm entfernt (Kroft and Oyasu, 1994). Das überzeugendste Argument für die Monoklonalität von multiplen Harnblasentumoren kommt von zwei Studien, die molekulargenetische Techniken bei verschiedenen Patienten mit multiplen Tumoren anwandten. Dabei konnten dieselben genetischen Defekte (p53 Mutationen, LOH 9 und 17p) in der Mehrzahl der multiplen Tumoren eines gegebenen Patienten gefunden werden (Kroft and Oyasu, 1994).

1.3 Diagnostik der Harnblasenkarzinome

Als Erstsymptom weisen etwa 80% der Patienten mit Harnblasenkarzinomen eine Mikro- oder Makrohämaturie auf, die anfangs meist schmerzlos und intermittierend auftritt. Die restlichen 20% haben die Symptome einer Blasenentzündung, wie ständiger Harndrang, Pollakisurie, Dysurie, Nykturie oder Inkontinenz (Raghavan and Huben, 1995; Cummings et al., 1992).

Zur diagnostischen Abklärung werden Ureterozystoskopie, Urinzytologie, Urographie, Sonographie, CT, und histopathologische Untersuchung einer Tumorbiopsie verwendet (Soloway, 1992). In ca. 70% der Fälle sind Harnblasenkarzinome an der Hinter- bzw. Seitenwand lokalisiert. Im Trigonum/Blasenhalsbereich kommen 20% und im Blasendach 10% der Karzinome vor (Thomas, 1998). Knapp die Hälfte der Malignome wächst multifokal, daher ist eine komplette endoskopische Beurteilung der gesamten Blase erforderlich.

2. Histologie der Harnblasenkarzinome

Es gibt außer einigen sehr seltenen Neoplasien der Harnblase, drei verschiedene Formen von Karzinomen die in der Harnblase vorkommen. Das Urothelkarzinom, das Adenokarzinom und das Plattenepithelkarzinom.

Nur etwa 5% der Harnblasenkarzinome gehen in den westlichen Industrienationen vom Plattenepithel aus (Sen et al., 1985). Gehäuft findet man diesen Tumortyp in Gebieten mit endemischem Vorkommen von Bilharziose, hier machen Plattenepithelkarzinome bis zu 70% aller Harnblasenkarzinome aus (Silverman et al., 1992).

Auch Adenokarzinome machen nur weniger als 5% der Harnblasenkarzinome aus (Sen et al., 1985). Sie gehen von den Urachusresten des Blasendaches (Urachuskarzinom) oder von den periurethralen und periprostatistischen Drüsen aus (Riede and Schaefer, 1995).

Die häufigsten malignen Tumoren der ableitenden Harnwege sind Urothelkarzinome: über 90% der Harnblasenkarzinome gehen vom Übergangsepithel aus (Riede and Schaefer, 1995; Raghavan and Huben, 1995). Sie können rein papillär oder in solider Form auftreten (Riede and Schaefer, 1995).

In dieser Studie wurde nur das am häufigsten vorkommende Urothelkarzinom untersucht.

2.1 Gesundes Urothel

Das gesunde Urothel ist mehrschichtig und kann bis zu 7 Zellagen dick sein. Da es Flächen mit wechselnder Ausdehnung, wie die Harnblase, überzieht, kann es unterschiedlich stark gedehnt sein. Zum Lumen hin besitzt das Urothel eine abschließende Schicht charakteristischer großer Deckzellen, auch "umbrella cells" genannt. Diese Deckzellen können Kernatypien aufweisen, welche nicht als Dysplasien mißgedeutet werden sollten (Bucher and Wartenberg, 1989; Epstein et al., 1998).

2.2 Präinvasive Urothelkarzinome

Karzinome entstehen aus der heutigen Sicht der Tumorigenese nicht direkt aus gesundem Gewebe, sondern entwickeln sich progressiv über mehrere Stufen zum malignen Tumor. Dem invasiven, zur Metastasierung fähigen Harnblasenkarzinom gehen folglich präneoplastische oder nicht-invasive Läsionen voraus (siehe Abbildung 1) (Riede and Schaefer, 1995).

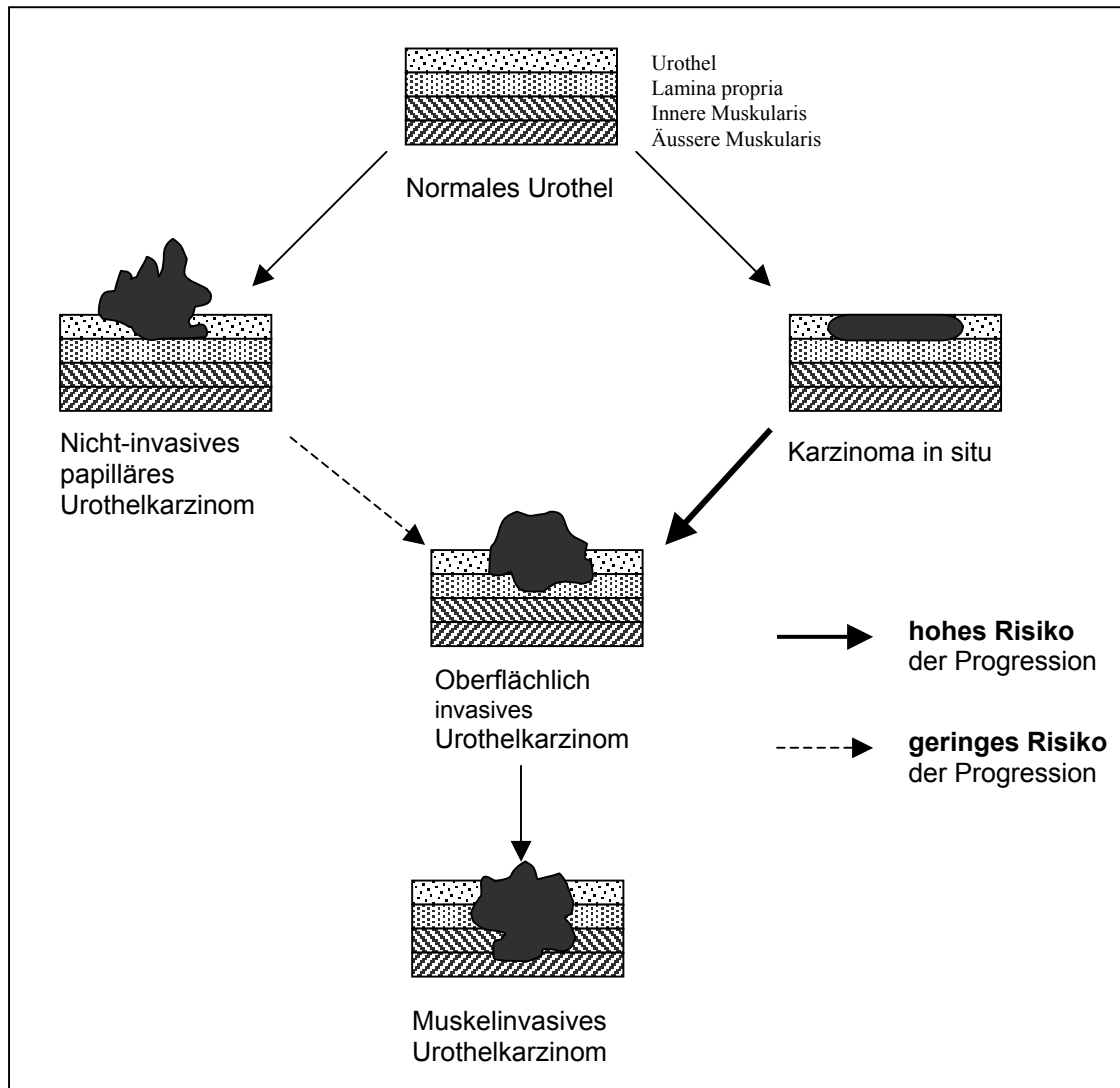


Abbildung 1: Die beiden präneoplastischen Läsionen der Harnblasenkarzinome besitzen ein unterschiedlich hohes Risiko sich in ihrem Verlauf zu einem invasiven Urothelkarzinom zu entwickeln.

Diese präneoplastischen Läsionen kann man grundsätzlich in zwei verschiedene Arten mit sehr unterschiedlicher Morphologie und Prognose unterteilen: die Karzinoma in situ (pTis) und die nicht-invasiven papillären Urothelkarzinome (pTa). Beiden

Läsionen gemeinsam ist jedoch, daß sie ein unvorhersagbares Potential besitzen sich in ihrem Verlauf zu einem invasiven Karzinom zu entwickeln. 70% bis 80% aller Patienten mit Harnblasenkrebs weisen bei ihrer Erstvorstellung einen oberflächlichen Tumor auf und in 10-15% dieser Fälle entwickeln sich diese Tumoren zu einem invasiven Karzinom (Abel et al., 1988; Kroft and Oyasu, 1994). Aus diesem Grund wurden diese beiden präinvasiven Neoplasien in dieser Studie untersucht.

2.2.1 Karzinoma in situ

Karzinoma in situ sind flache, nicht-invasive Läsionen die endoskopisch nur durch diskrete Schleimhautveränderungen wie eine samtartige Verdickung oder eine Entzündung auffallen (Cummings et al., 1992). Sie können sich aus Urotheldysplasien entwickeln, progressieren in zwei Drittel der Fälle zu invasiven Karzinomen und weisen eine hohe Rezidivfrequenz (63-92%) auf (Ozen, 1995).

Histologisch findet man ein mehr als sieben Zellreihen betragendes Urothel, das von Tumorzellen durchsetzt ist und bei dem die reihenartige Anordnung nicht mehr nachweisbar ist (siehe Abbildung 2). Einzelne Zellen zeigen Nukleolenvergrößerung, Zellkernhyperchromasie, eine veränderte Kern-Plasma-Relation zugunsten des Zellkerns und eine erhöhte Mitoserate. Das umgebende Gewebe kann normal aussehen, ödematös verändert sein, oder als Zeichen einer Entzündung Lymphozyten, Plasmazellen und Monozyten aufweisen. Suburothelial kann auch eine ausgeprägte Angioneogenese vorliegen, welche zytoskopisch als Entzündung imponiert (Catalona, 1991; Riede and Schaefer, 1995). Ein weiterer charakteristischer Befund ist die verminderte Zellkohäsion. Durch die verlorengegangene Zytokohäsivität lösen sich die Zellen leichter aus dem Urothelverband. Dies ist ein Grund warum die Spülzytologie in mehr als 90% der Fälle der Carcinoma in situ positiv ist (Cummings et al., 1992).

Da Karzinoma in situ meist keine typischen klinischen Symptome hervorrufen und 25% der Patienten asymptomatisch sind, stellen sich Karzinoma in situ zur Zeit der Diagnose meist schon als Grad 3 Läsionen dar. Sie sind Vorstufen des soliden Grad 3 Karzinoms und weisen somit eine hohe maligne Potenz auf (Crawford, 1996).

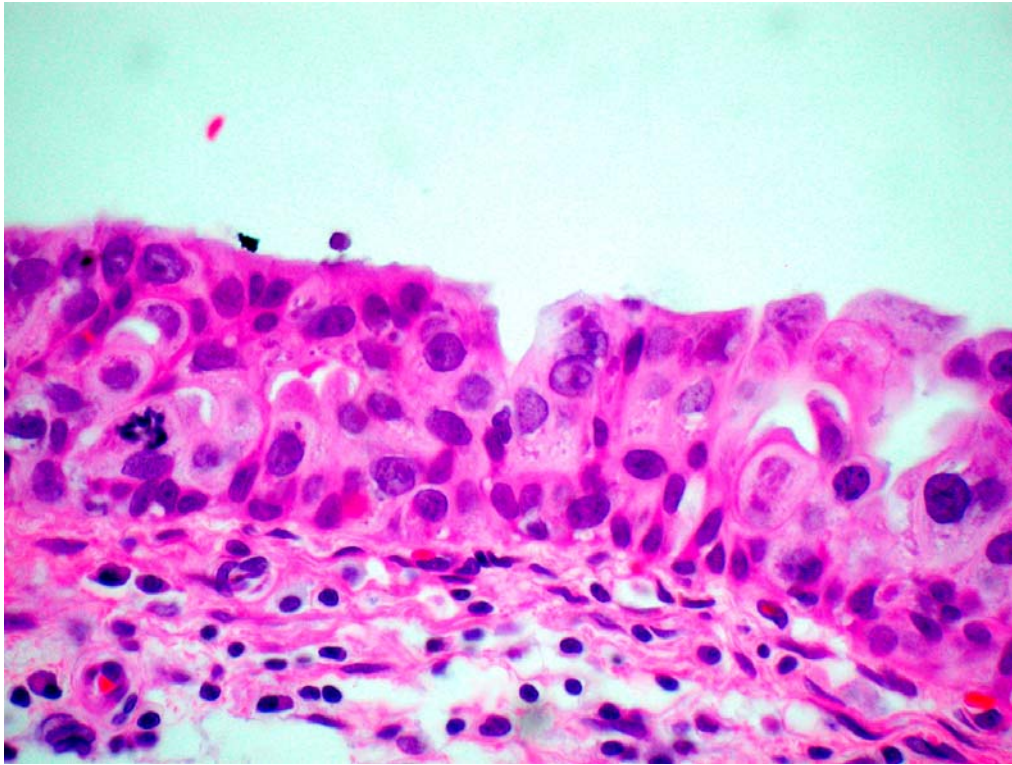


Abbildung 2: HE Schnitt eines Karzinoma in situ, welches ein von Tumorzellen durchsetztes Urothel zeigt. Eine Invasion der Basalmembran und des darunterliegenden Stromas ist nicht zu erkennen.

2.2.2 Nicht-invasive papilläre Urothelneoplasien

Das am häufigsten auftretende Harnblasenneoplasma ist das papilläre Urothelkarzinom. Etwa 80% der Harnblasenkarzinome sind bei ihrer Erstdiagnose nicht-invasive (pTa) oder oberflächlich invasive (pT1) papilläre Karzinome.

Oftmals werden diese Tumoren zusammen als oberflächliche Harnblasenkarzinome bezeichnet, da sie von den Urologen in gleicher Weise therapiert werden. Ein weiterer Grund für die gemeinsame Bezeichnung ist die Schwierigkeit der Diagnose einer Invasion der Lamina propria. Durch beispielsweise tangentielle Schnitte der Tumorfragmente kann eine Stromainvasion nicht immer sicher ausgeschlossen werden. Allerdings gibt es große Unterschiede in der Genetik und der Klinik der beiden Tumoren. Nicht-invasive papilläre Tumoren (pTa) sind benigne und progressieren wesentlich seltener als oberflächlich invasive papilläre Harnblasenkarzinome (pT1). Dies verdeutlicht wie wichtig die korrekte

Diagnosestellung der beiden Tumoren ist, um beispielsweise pT1 Tumoren aggressiver therapieren zu können.

Die Beziehung der beiden Tumoren zueinander ist immer noch nicht eindeutig klar. Einige Autoren bevorzugen die Hypothese, daß pT1 Karzinome aus pTa Tumoren entstehen, während andere Autoren es auch für möglich halten, daß pTa und pT1 Tumoren zu verschiedenen Tumorentitäten gehören (Sauter, 1998).

In dieser Studie wurde versucht nur nicht-invasive papilläre Urothelkarzinome (pTa) zu untersuchen.

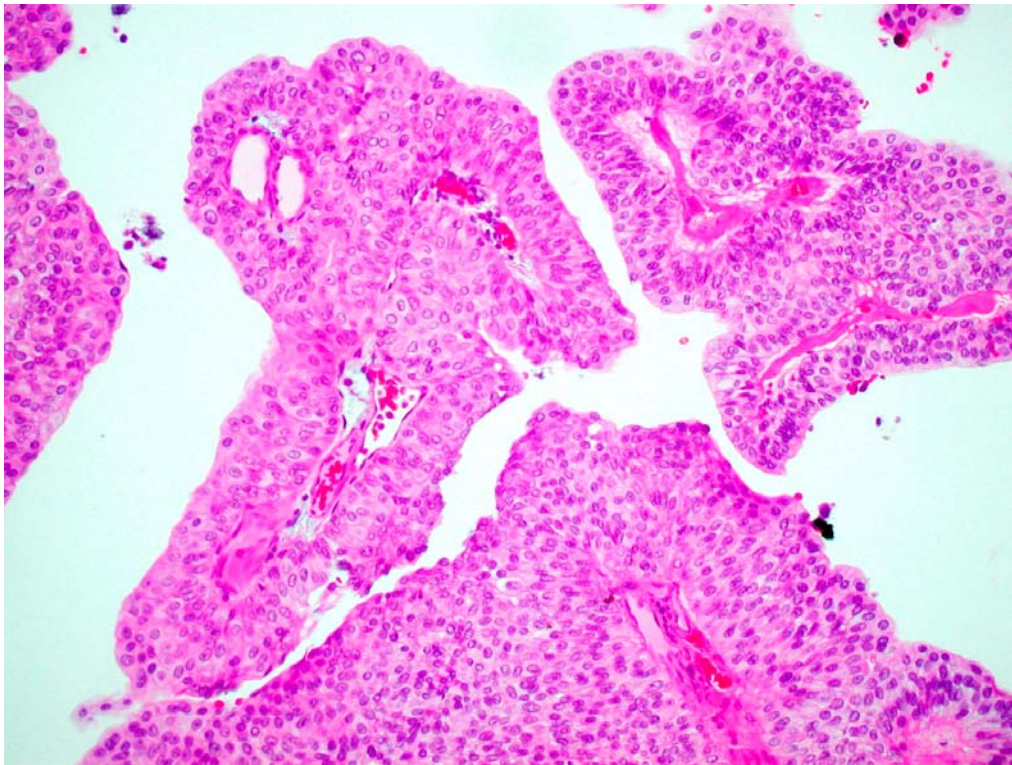


Abbildung 3: HE Schnitt eines oberflächlichen papillären Urothelkarzinoms, in welchem die papilläre Fältelung der Mukosa und das verbreiterte Urothel deutlich zu erkennen sind.

Die Entwicklung der papillären Urothelkarzinome erfolgt meist nicht aus einer Urotheldysplasie, sondern aus einer einfachen Hyperplasie oder aus “gesundem” Urothel (Ozen, 1995; Riede and Schaefer, 1995).

Häufig läßt sich bereits makroskopisch die papilläre Struktur des Tumors erkennen. Histologisch findet man beim papillären Urothelkarzinom vom Grad 1 eine papilläre

Fältelung der Mukosa, deutlich mehr als sieben Zellreihen, Zellkernanomalien, Verlust der Zellpolarität, Riesenzellen, prominente Nukleoli und eine erhöhte Mitoserate (siehe Abbildung 3) (Catalona, 1991).

2.3 Invasive Urothelkarzinome

Histologische Kennzeichen eines malignen Blasentumors sind ein mehr als sieben Zelllagen dickes Epithel, Verlust der Zellpolarität und des typischen Oberflächenepithels (“umbrella cells”), Zellkernanomalien, Riesenzellen, erhöhtes Zellkern-Zytoplasma Verhältnis, prominente Nukleoli, abnormes Chromatin und eine erhöhte Mitoserate (Ro et al., 1992).

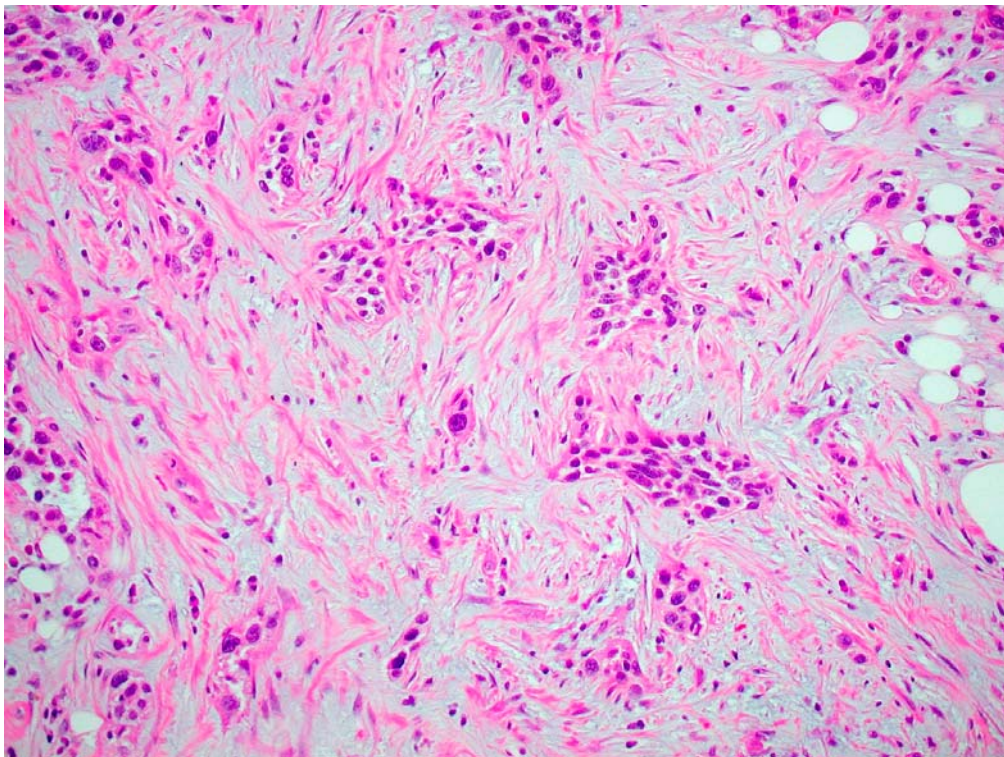


Abbildung 4: HE Schnitt eines invasiven Urothelkarzinoms, welches ein infiltrierendes Muster von Tumorzellnestern zeigt.

Diese histologischen Veränderungen werden bei invasiven jedoch auch bei nicht-invasiven Blasentumoren, wie z.B. nicht-invasiven papillären Urothelkarzinomen und Karzinoma in situ, gefunden und sichern damit nicht die Diagnose eines invasiven Harnblasenkarzinoms. Hauptunterscheidungsmerkmal stellt die Beurteilung der

Basalmembran dar. Gutartige pathologische Neubildungen zeichnen sich durch eine intakte Basalmembran aus, die das Epithel vom Stroma trennt. Invasive Karzinome sind dagegen durch eine defekte Basalmembran und in das Stroma eindringende Tumorzellen charakterisiert (Liotta et al., 1986).

2.4 TMN-Klassifikation der Urothelkarzinome

Um Übersicht über das gesamte Wachstumsspektrum eines Harnblasenkarzinoms zu erhalten, wird dieses nach dem TNM-System klassifiziert. Das TNM System berücksichtigt die Eindringtiefe des Primärtumors (T), den Lymphknotenbefall (N), und die An-oder Abwesenheit von Metastasen (M) und korreliert das Tumorstadium, auch „Staging“ genannt, mit der Prognose (Raghavan and Huben, 1995). So haben z.B. Patienten mit Invasion der Lamina propria eine 5-Jahres-Überlebensrate von über 80%, die bei Invasion der oberflächlichen Muskelschicht auf 30-60% sinkt (siehe Tabelle 1).

Die am Häufigsten verwendeten “Staging” Schemen sind die des American Joint Committee of Cancer und der International Union Against Cancer. Diese TNM Schemen betrachten Ta und T1 Läsionen als oberflächlich und T2-T4 werden als invasiv angesehen. Die meisten oberflächlichen Tumoren haben einen papillären Aufbau, während sich die muskelinvasiven Läsionen meistens nicht-papillär (nodulär) darstellen (Kroft and Oyasu, 1994).

Stadium	Histologie	5-Jahres-Überlebensrate
Tis	Karzinoma in situ	>80%
Ta	Nicht-invasiver papillärer Tumor	>80%
T1	Tumor infiltriert Lamina propria	>80%
T2	Tumor infiltriert innere Muskularis	30-60%
T3a	Tumor infiltriert äußere Muskularis	20-50%
T3b	Tumor infiltriert Perivesikalgewebe	20-40%
T4a	Tumor infiltriert Prostata, Uterus, Cervix, Vagina	<10-40%
T4b	Tumor infiltriert Nachbarorgane	0-25%

Tabelle 1: TNM - Klassifikation der urothelialen Harnblasentumoren (AJCC, 1993)

Ein weiteres histologisches Kriterium ist der pathologische Differenzierungsgrad, auch "Grading" genannt, welcher mit dem Grad der Zellanaplasie und dem Verlust der Differenzierung zunimmt. Der Differenzierungsgrad gibt Aufschluß über die Malignität des Tumors (siehe Tabelle 2). "High-grade" Tumoren sind mit einer erhöhten Mortalität assoziiert (Abel et al., 1988; Cancer, 1988).

Tumor Grad	Differenzierungsgrad
1	gut differenziert
2	mäßig differenziert
3/4	schlecht differenziert oder undifferenziert

Tabelle 2: Differenzierungsgrad der Harnblasenkarzinome (Cancer, 1988)

Eindringtiefe des Primärtumors und Differenzierungsgrad sind eng miteinander verknüpft. In einer Studie wurde herausgefunden, daß nur 6% aller Grad 1 Läsionen invasiv waren, verglichen mit 52% der Grad 2 Läsionen und 82% der Grad 3 Tumoren (Kroft and Oyasu, 1994).

3. Bedeutung der Histologie für den klinischen Verlauf

Die histologische Diagnose ist für die Therapie der Harnblasenkarzinome von entscheidender Bedeutung. Jedoch ist es in einigen Fällen nicht ganz einfach zu einer sicheren Diagnose zu gelangen. Winzige histologische Nuancen können entscheidend sein um z. B. ein Karzinoma in situ von einem sich gerade zum invasiven Karzinom entwickelnden Tumor zu unterscheiden (Huben and Gaeta, 1996). Gerade oberflächlichen Läsionen sollte hohe Aufmerksamkeit gegolten werden, kann es sich doch um Vorstufen eines invasiven Karzinoms handeln. In einer Studie von Abel et al. (1988) wurde 99 Schnitte von Harnblasenkarzinomen von unterschiedlichen Pathologen beurteilt. Dabei wurden 14 Fälle in eine andere pT Kategorie eingeteilt, wovon 6 Fälle von invasiven zu oberflächlichen Karzinomen abgestuft wurden. Bei 13 Fällen wurde der pathologische Differenzierungsgrad anders beurteilt (Abel et al., 1988). Diese Studie macht die Schwierigkeiten der histologischen Klassifizierung und Charakterisierung der Harnblasenkarzinome deutlich. Doch gerade die korrekte Einteilung in Differenzierungsgrad und Stadium gibt Aufschluß über die Aggressivität des Tumors und bestimmt damit die Art der Therapie und der Weiterbehandlung des Patienten. Die optimale, auf den Patienten abgestimmte Therapie, wirkt sich wiederum erheblich auf seine Prognose aus (Huben and Gaeta, 1996).

3.1 Prognose der oberflächlichen Harnblasenkarzinome

Wie bereits schon beschrieben sind oberflächliche papilläre Urothelkarzinome die häufigste Erstdiagnose bei Patienten mit Harnblasenkrebs. Obwohl 80% dieser Patienten erfolgreich mit transurethraler Resektion behandelt werden können, sind Rückfälle häufig. Die Rückfallraten variieren von 30-85%. In 10-30% dieser Fälle kommt es zu einer Verschlechterung des Differenzierungsgrades und in 10-15% zu einer Verschlechterung des Tumorstadiums (Kroft and Oyasu, 1994).

Da nicht-invasive papilläre Urothelkarzinome ein unvorhersagbares Risiko aufweisen zu progressieren, wäre es von großem Vorteil den Anteil der Patienten herauszufinden die in ihrem Krankheitsverlauf ein invasives Karzinom entwickeln werden. Mit diesem Wissen könnte bei solchen Patienten zu einer radikaleren Therapie gegriffen werden und die lebensbedrohliche systemische Krebserkrankung verhindert werden. Leider gibt es bislang jedoch noch keine eindeutigen Marker die das Verhalten dieser Läsionen vorhersagbar machen können.

Die Karzinoma in situ haben mit 63-92% ebenfalls eine sehr hohe Rezidivfrequenz. Die Progressionsrate ist wie auch bei den oberflächlichen Urothelpapillomen nicht vorhersagbar, wobei sie bei den Karzinoma in situ höher ist als bei den oberflächlichen Urothelkarzinomen. Weiterhin ist die Progressionsrate je nach Wachstumsmuster der Karzinoma in situ sehr unterschiedlich. So haben Karzinoma in situ die sichtbaren papillären Tumoren benachbart sind ein Risiko von 42-83% sich zu einem muskelinvasiven Tumor zu entwickeln, verglichen mit einem Risiko von 20-34% bei isoliert auftretenden CIS (Hudson and Herr, 1995). Weiterhin spielt auch das Auftreten von multifokalen Karzinoma in situ für die Progressionsrate eine Rolle. 78% der Patienten mit diffusen, auch außerhalb der Harnblase auftretenden Karzinoma in situ, entwickelten innerhalb von 16 Jahren ein invasives Karzinom, verglichen mit 8% der Patienten mit fokalen Karzinoma in situ (Crawford, 1996).

Trotz der Erkenntnisse über den Zusammenhang des Wachstumsmusters und der Progressionsrate von Karzinoma in situ, ist deren Verhalten immer noch unvorhersagbar und wird von manchen Autoren sogar als "tückisch" bezeichnet (Orozco et al., 1994).

3.2 Therapie der Harnblasenkarzinome

Die Standardtherapie bei oberflächlichen Harnblasenkarzinomen ist die organerhaltende transurethrale Resektion (TUR). Hierbei wird der Tumor endoskopisch durch eine Hochfrequenzstrom führende Schlinge abgetragen (Alken and Walz, 1992). Da bei gut differenzierten pTa-Tumoren die Progressionsrate unter 5% liegt, ist diese Therapie meist ausreichend (Alken and Walz, 1992). Wichtig ist allerdings, die Patienten zu erkennen, die rezidivgefährdeter sind. Alle Patienten könnten mit radikalen chirurgischen Maßnahmen geheilt werden, doch wäre dies eine Überbehandlung von etwa 80% der Patienten, die keine invasiven Tumoren entwickelt hätten und bei denen die Standardtherapie ausreichend gewesen wäre (Kroft and Oyasu, 1994).

Bei Tumoren mit höherem Progressions- oder Rezidivrisiko wird häufig eine Instillationsprophylaxe verwendet. Bei dieser intravesikalen Chemotherapie werden zytotoxische oder biologisch aktive Substanzen mittels Katheter in die Blase instilliert. Der Vorteil der intravesikalen Chemotherapie gegenüber der systemischen Chemotherapie liegt in den geringeren Nebenwirkungen (Crawford, 1996).

Ein Drittel bis die Hälfte der Patienten, die mit Blaseninstillationen behandelt wurden, hatten eine komplette Regression der nach inkompletter Resektion noch vorhandenen papillären Tumoren aufzuweisen. Für die intravesikale Chemotherapie werden unterschiedliche Chemotherapeutika verwendet: der Alkylant Thiotepa und die Antibiotika Doxorubicin und Mitomycin (Crawford, 1996).

Die Immuntherapie mit dem modifizierten Tuberkuloseimpfstoff Bacille Calmette-Gueron (BCG) ist bei Karzinoma in situ und T1, Grad 3 Tumoren das Mittel der Wahl. Der Lebendimpfstoff wird hierbei kurzfristig in die Harnblase instilliert und verursacht dort eine Entzündung der Mukosa. Die Entzündungsreaktion könnte für die Wirkung auf die Tumorzellen verantwortlich sein. Der genaue Wirkmechanismus ist allerdings noch nicht geklärt (Crawford, 1996).

Bei muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen ist die radikale Zystektomie mit pelviner Lymphadenektomie indiziert (Hall and Dinney, 1996). Trotz dieser aggressiven Therapie treten bei 50% der Patienten mit pT3 und pT4 Tumoren innerhalb von zwei

Jahren Fernmetastasen auf. Lange Zeit ging man davon aus, daß lokale Kontrollen nach radikaler Zystektomie ausreichend wären, doch die lokale Rückfallrate ist kleiner als 10% und das weit größere Problem stellen die bereits früh vorhandenen Mikrometastasen dar (Hall and Dinney, 1996).

Da das invasive Harnblasenkarzinom durch die Metastasierung sehr schnell zu einer systemischen Erkrankung wird, ist die alleinige lokal aggressive Therapie nicht ausreichend (Hall and Dinney, 1996). In klinischen Studien konnte jedoch gezeigt werden, daß weder mit neoadjuvanter noch mit adjuvanter Chemotherapie eine Verlängerung der Überlebenszeiten für Patienten mit invasiven Harnblasenkarzinomen erreicht wurde (Hall, 1997).

4. Biologie der Harnblasenkarzinome

Um die Diagnostik der Harnblasenkarzinome zu erleichtern und damit den einzelnen Patienten die für sie optimale Therapie zukommen zu lassen, ist es wichtig ein größeres Verständnis des Tumorverhaltens zu bekommen. Das Aufschlüsseln der einzelnen Schritte der Tumorigenese und der daran beteiligten Faktoren, könnte helfen, das Verhalten von Harnblasenkarzinomen besser vorhersagen zu können und die Patienten mit diesem Wissen frühstmöglich entsprechend zu behandeln.

4.1 Prognostische Marker im Versuch

4.1.1 p53

Den häufigsten Gendefekt beim Harnblasenkarzinom stellt die Mutation des p53 Tumor Suppressor Gens dar. Dieses Gen liegt auf dem Chromosom 17p13.1 und kodiert ein 53 kDa Protein. Das p53 Protein reguliert die Zellteilung um Zeit für DNA Reparaturen zu gewährleisten, bewirkt einerseits bei DNA Schäden die Apoptose der Zelle und verhindert andererseits die Weitergabe von DNA Schäden auf die nächste Tochterzelle. Liegt eine Mutation des p53 Gens vor, so findet sich im Zellkern eine

Anreicherung des abnormen Proteins das immunhistochemisch angefärbt werden kann (Caliskan et al., 1997).

Vor allem Karzinoma in situ weisen häufig p53 Mutationen auf (siehe Abbildung 5), welche für eine schlechte Prognose sprechen. In einer Studie von Sarkis et al. betrug die Progressionsrate der CIS, bei denen mehr als 20% der Zellen diese Mutation aufwiesen, 86,7% im Vergleich zu 16,7% bei CIS mit geringerer Mutationsrate (Sarkis et al., 1994). Dies zeigt, daß p53 bei Karzinoma in situ als prognostischer Marker geeignet wäre.

In pTa Tumoren findet man seltener p53 Mutationen. In einer Studie von Spruck et al. wiesen nur 3% dieser Tumoren p53 Mutationen auf, verglichen mit 65% der Karzinoma in situ und 51% der T2- T4 Tumoren (Spruck et al., 1994). In einer Studie von Pycha et al. wurden rezidivfreie pTa Tumoren auf diese Mutation hin untersucht. In keinem dieser Tumoren wurden p53 Mutationen gefunden (Pycha et al., 1997). Da laut Caliskan et al. (1997) auch nur 3 - 5% aller pTa Tumoren zu muskelinvasiven Karzinomen werden, stellt sich die Frage, ob sich dies mit den p53 Mutationen in Zusammenhang bringen läßt. Wäre dies der Fall, so wäre p53 auch bei pTa Tumoren als prognostischer Faktor geeignet (Kroft and Oyasu, 1994).

Allerdings wird die Zuverlässigkeit und Aussagekräftigkeit der immunhistochemischen Technik zum Nachweis von p53 Mutationen in einigen Studien angezweifelt (Kroft and Oyasu, 1994). So sind beispielsweise falsch negative Ergebnisse ein großes Problem, da "nonsense mutations", "frame shifts" und Verlust des p53 Gens nicht zu einer Produktion eines abnormalen p53 Proteins führen, welches folglich dann auch nicht immunhistochemisch sichtbar gemacht werden kann. Im Vergleich zwischen der immunhistochemischen Technik und der Sequenzierung gehen die Meinungen in den Studien auseinander. So waren in einer Studie von Bodner et al. (1992) bei einer Gruppe von p53 Mutationen in Lungenkrebs nur 48% dieser Mutationen in der Immunhistochemie detektierbar. Dalbagni et al. (1993) fand dagegen eine gute Korrelation zwischen der Immunhistochemie und der PCR-SSCP Analyse bei p53 Mutationen in Harnblasenkrebs.

4.1.2 Chromosom 9 Defekt

Bei pTa Tumoren ist der "Verlust der Heterozygotie" im Chromosom 9 häufiger als p53 Mutationen (siehe Abbildung 5). 34% der pTa Karzinome wiesen in einer Studie von Spruck et al. diesen Defekt auf. Man vermutet daß die Onkogenese der Harnblasenkarzinome auf zwei verschiedenen Schienen verläuft. Veränderungen des Chromosoms 9 scheinen hauptsächlich für das Entstehen von oberflächlichen Harnblasenkarzinomen verantwortlich zu sein. Weiterhin haben pTa Tumoren mit diesem Defekt häufig Rezidive, werden jedoch seltener zu muskelinvasiven Karzinomen. Erst eine zusätzliche p53 Mutation läßt die oberflächlichen Tumoren invasiv werden (Spruck et al., 1994).

4.1.3 Retinoblastoma Supressor Gen

Ein weiterer prognostischer Faktor ist das Retinoblastoma Supressor Gen. Eine Mutation dieses Gens scheint bei der Entstehung des Harnblasenkrebs eine wichtige Rolle zu spielen. Vor allem Blasentumoren höheren Stadiums mit kürzerer Überlebenszeit weisen diese Mutation auf. So hatten in einer Studie von Logothetis et al., Patienten mit fortgeschrittenem Blasenkrebs (T2 - T4) und dieser Mutation eine kürzere 3-Jahres-Überlebenszeit. Dies spricht dafür, daß ein Defekt des Retinoblastoma Supressor Gens ein prognostischer Faktor bei fortgeschrittenen Harnblasenkarzinomen sein könnte (Liebert and Seigne, 1996).

4.1.4 E-cadherin

E-cadherin wird in normalen Urothelzellen an den Zell-zu-Zell Grenzen exprimiert. Dort ist es für den Zusammenhalt der Zellen verantwortlich und verhindert ein Abwandern einzelner Zellen (Liebert and Seigne, 1996). Bei einem Verlust der E-cadherin Expression können sich die Urothelzellen von ihrem Epithelverband lösen,

was eine Voraussetzung für die Bildung von Metastasen ist. In einigen Studien konnte gezeigt werden, daß ein Defekt in der E-cadherin Expression mit einer verkürzten Überlebenszeit bei Patienten mit muskelinvasiven Blasenkarzinomen und mit einer höheren Rezidiv-und Progressionsrate bei Patienten mit oberflächlichen Harnblasenkarzinomen verbunden ist (Griffiths et al., 1996).

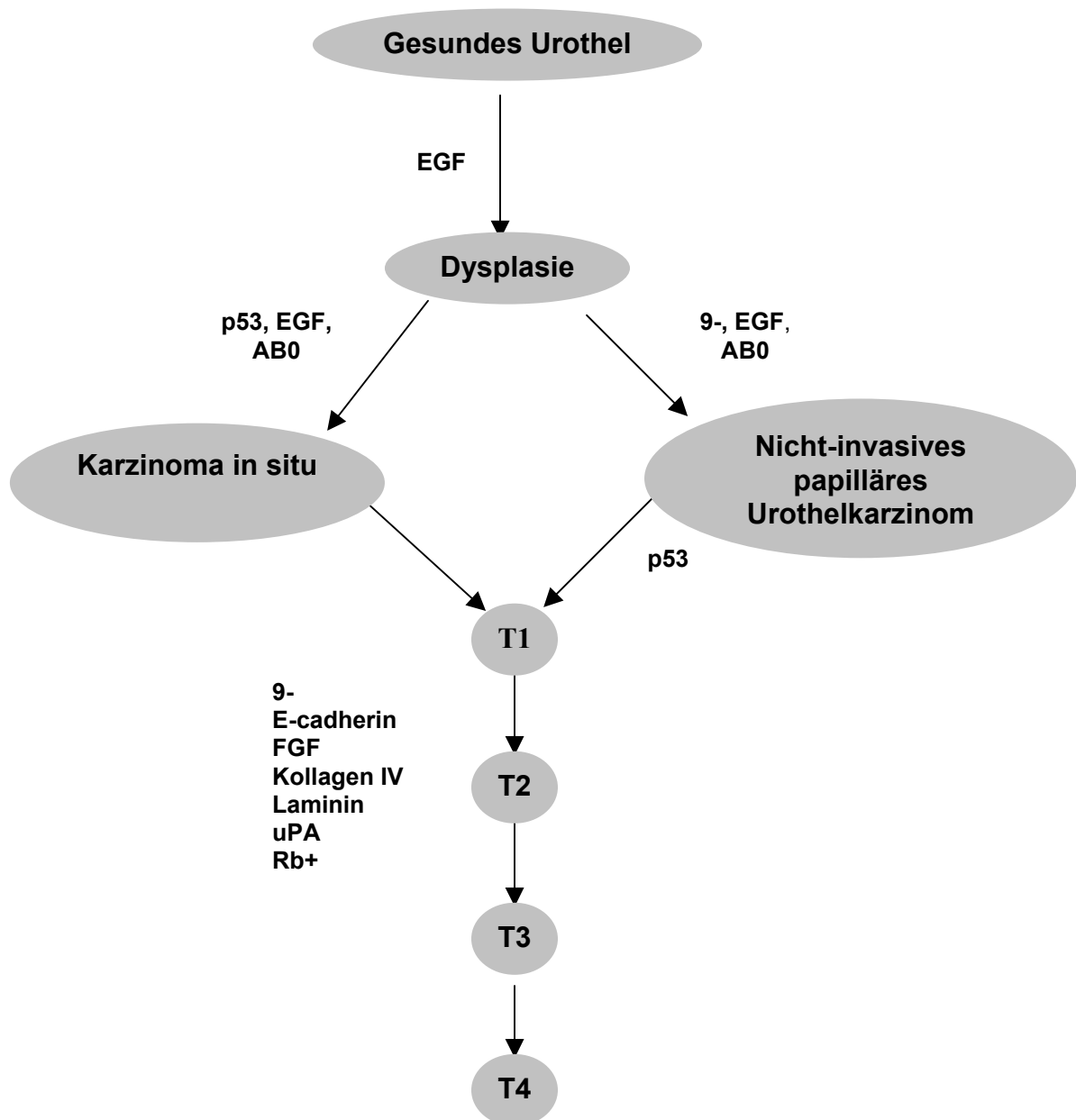


Abbildung 5: Modell der Karziogenese der Harnblasenkarzinome (Kroft and Oyasu, 1994; Liebert and Seigne, 1996).

4.1.5 Blutgruppenantigene

Der Verlust der Blutgruppenantigene ist bei Harnblasenkarzinomen schon seit längerer Zeit bekannt. Dieser Defekt ist hier relativ häufig zu finden und scheint keine relevanten prognostischen Informationen zu geben (Liebert and Seigne, 1996). In einer Studie von Das et al. wiesen 44,4% aller Grad 1 Tumoren diesen Verlust auf, verglichen mit 94,1% bei Grad 3 Tumoren. Außerdem wurde bei 80% der Patienten mit oberflächlichen Karzinomen mit Progression dieser Defekt festgestellt, im Vergleich zu 75% der Patienten mit oberflächlichen Karzinomen ohne Progression (Das et al., 1985). Dies zeigt das der Verlust der Blutgruppenantigene keine prognostische Information in Bezug auf die Progression zu bieten hat.

4.1.6 Epidermaler Wachstumsfaktor

Der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) ist ein 6000-dalton Protein das in vielen Körperflüssigkeiten und Geweben des menschlichen Körpers zu finden ist (Kroft and Oyasu, 1994). Es stimuliert die Proliferation von Epidermiszellen und einer Vielzahl anderer Körperzellen. Weiterhin fungiert es als ein Induktionssignal bei der Embryogenese (Alberts et al., 1989). Sein Rezeptor (EGFr) befindet sich in den meisten Epithelzellen, so auch in der Harnblase, wobei er hier nur auf den Basalzellen gefunden wurde. In karzinomatösen Harnblasen wurde EGFr allerdings in allen Zellagen und in wesentlich höheren Konzentrationen als in gesundem Gewebe gefunden (Liebert and Seigne, 1996). Es wurde herausgefunden, daß die Krebszellen EGF und einen weiteren Wachstumsfaktor (TGF-) produzieren. In gesunden Stromazellen konnten diese Faktoren jedoch nicht gefunden werden (Kroft and Oyasu, 1994). Klinisch korreliert die Überproduktion von EGFr mit dem Tumorstadium und ist v.a. bei Tumoren niedrigeren Stadiums mit einer schlechten Prognose verbunden. Man fand auch außerhalb von Tumoren im normal erscheinenden umliegenden Urothel hohe Konzentrationen von EGFr. Dies läßt die Vermutung zu, daß die EGFr Expression ein frühes Ereignis darstellt, und vielleicht in präkanzerösen Zellen auftritt (Liebert and Seigne, 1996).

4.2 Invasion als zentrales Problem

Das Hauptproblem bei Harnblasenkarzinomen stellt die Invasion dar. Erst die Invasion der Basalmembran ermöglicht es den Tumorzellen in umliegendes, histologisch fremdes Gewebe einzudringen und damit den Zutritt zum Blut- und Lymphgefäßsystem zu erhalten. Durch diesen Zutritt können die Tumorzellen sich im Körper ausbreiten und somit zu einer lebensbedrohlichen systemischen Erkrankung führen (Liotta et al., 1983; Aznavoorian et al., 1993).

Folglich ist es von größter Wichtigkeit Karzinome mit beginnender Invasion so früh wie möglich zu erkennen. Wie bereits im vorigen Kapitel beschrieben, ist dies in der histologischen Diagnostik jedoch nicht immer sicher möglich.

Ein weiterer Punkt ist, daß die histopathologische Untersuchung zwar Aufschluß über die zum Zeitpunkt der Biopsie bestehende Eindringtiefe des Tumors gibt, nicht aber über die Wahrscheinlichkeit oberflächlicher Tumoren in nächster Zukunft zu einem invasiven Karzinom zu werden. Hierfür bräuchte man Marker die am invasiven Geschehen mitbeteiligt sind und die diesem vorausgehen.

4.2.1 Basalmembran Antigene

Die Basalmembran fungiert als physikalische Barriere zwischen Epithel und darunterliegendem mesenchymalen Stroma. Somit ist sie, wie bereits im vorigen Kapitel beschrieben, wichtig für die Verhinderung der Tumorzellinvasion und der Metastasierung. Sie besteht aus einem Kollagen-IV-Netzwerk, das in die Grundsubstanz, bestehend aus Proteoglykanen und Glykoproteinen, eingebettet ist (Liotta et al., 1983). Bei der histologischen Beurteilung von Harnblasentumoren wird auf die Intaktheit der Basalmembran geachtet, doch bei manchen Frühformen sind die ersten Zeichen einer Mikroinvasion noch nicht sichtbar. In einer Studie von Abou Farha et al. (1993) wurde Laminin, ein Glykoprotein der Basalmembran, immunhistochemisch bei verschiedenen Harnblasentumoren untersucht. Dabei wurden fokale Unterbrechungen der Basalmembran bei 2 von 6 Karzinoma in situ, und bei 7 von 25 pTa Tumoren gefunden. Die Tumoren mit

Basalmembranunterbrechungen waren mit einer höheren Rezidivrate und einem kürzeren rezidivfreien Intervall vergesellschaftet (Abou Farha et al., 1993). In einer Studie von Daher et al. wurde Kollagen IV auf seine Intaktheit untersucht. Von einer Gruppe von 13 Patienten, die ein invasives Harnblasenkarzinom hatten und bei denen man Unterbrechungen des Kollagens fand, war nach 3 Jahren keiner mehr am Leben. Im Vergleich dazu lebten noch 11 von 16 Patienten die ebenfalls ein invasives Karzinom hatten, jedoch keinen Defekt des Kollagens aufwiesen. Dies bedeutet, daß sogar bei Tumoren höheren Stadiums die Intaktheit der Basalmembran von prognostischer Bedeutung ist (Liebert and Seigne, 1996).

4.2.2 Proteasen

Proteasen sind Enzyme die für die Zerstörung der Basalmembran verantwortlich sind. Damit spielen sie bei dem Prozeß der Invasion eine entscheidende Rolle. Da sie die Lyse der Basalmembran bewirken, müßten sie bereits vor einer mikroskopisch sichtbaren Basalmembraninvasion in erhöhter Konzentration vorliegen.

Es wurden bereits verschiedene Untergruppen von Proteasen bei Harnblasenkarzinomen entdeckt (Liebert and Seigne, 1996). Proteasen kommen in sehr niedrigen Konzentrationen auch in gesundem Gewebe vor, da das Gewebe kein starres Gebilde ist, sondern einem ständigen Auf-und Abbau unterliegt, welcher sich im Gleichgewicht befindet. Diese Proteolyse ist jedoch zeitlich begrenzt und unterliegt einer genauesten Regulation. Nicht die Proteolyse selbst ist folglich spezifisch für eine maligne Entartung, sondern die unkontrollierte, im Ungleichgewicht stehende Proteolyse (Stetler-Stevenson, 1996; Liotta et al., 1991).

Eine Gruppe der Proteasen sind die Matrixmetalloproteinasen (MMP) die aus 13 verschiedenen Enzymen bestehen, die wiederum in fünf Gruppen eingeordnet werden können (siehe Tabelle 3): intestinale Kollagenasen, Typ IV Kollagenasen (Gelatinasen), Stromelysine, Elastasen und eine Gruppe neuer Mitglieder, wie die Membran Typ Matrixmetalloproteinasen (MT-MMP) und Stromelysin-3 (Stetler-Stevenson, 1996). Die verschiedenen Matrixmetalloproteinasen unterscheiden sich u. a. durch ihre Substratspezifität. Die intestinale Kollagenasen schneiden

hauptsächlich Kollagen I, während Typ IV Kollagenasen v. a. Kollagen IV schneiden. Elastasen schneiden Elastin und die Stromelysine schneiden eine Vielzahl von Matrixbestandteilen, wie Proteoglykane, Laminin, Fibronectin und die nicht-kollagenen Domänen des Kollagen IV (Matrisian and Bowden, 1990).

Gruppe	Name	MMP Nummer	Substrate
Intestinale Kollagenasen	Intestinale Kollagenase	MMP-1	Kollagen III>>I
	PMN Kollagenase	MMP-8	Kollagen I >>III
	Kollagenase-3	MMP-13	Kollagen
Typ IV Kollagenasen	72-kd Typ IV Kollagenase	MMP-2	Kollagen IV, V, Gelatin
	92-kd Typ IV Kollagenase	MMP-9	Kollagen IV, V, Gelatin
Stromelysine	Stromelysin-1	MMP-3	Laminin, Fibronectin
	Stromelysin-2	MMP-10	Laminin, Fibronectin
	Matrilysin	MMP-7	Laminin, Fibronectin
Elastasen	Metalloelastase	MMP-12	Elastin
MMP: Sezernierter Typ	Stromelysin-3	MMP-11	vermutlich Alpha-1-antitrypsin
MMP: Membran Typ	MT-MMP-1	MMP-14	Progelatinase-A
	MT-MMP-2	?	?
	MT-MMP-3	?	Progelatinase-A

Tabelle 3: Die Gruppe der Matrixmetalloproteinasen (Stetler-Stevenson, 1996)

Allerdings weiß man über die genaue Substratspezifität in vivo noch relativ wenig (Stetler-Stevenson, 1996). Während in gesundem Gewebe niedrige Konzentrationen an Typ IV Kollagenase von normalen Zellen produziert wird, findet man in invasiven Karzinomen eine deutlich erhöhte Aktivität der Typ IV Kollagenase (Liotta et al., 1991). Matrixmetalloproteinasen können durch natürliche Inhibitorproteine, die vom Gastgewebe, aber auch von den Tumorzellen selbst produziert werden, inhibiert werden. Diese Proteinase Inhibitor Proteine, "Tissue Inhibitors of

Metalloproteinasen“ (TIMPs), könnten als Metastasensuppressionsproteine wirken und damit die die Tumorzellinvasion inhibieren (Gottesman, 1990).

Neben den Matrixmetalloproteinasen gibt es noch die Serinproteasen. Zu ihnen zählt der Urokinase-Typ-Plasminogenaktivator (uPA), welcher bei Tumoren die Fibrinolyse fördert und somit an der Matrixdegradierung beteiligt ist. Weiterhin ist Urokinase Plasminogen Aktivator an der Aktivierung anderer proteolytischer Enzyme, einschließlich Matrixmetalloproteinasen, beteiligt, was wiederum zur Invasion beiträgt (siehe Abbildung 6).

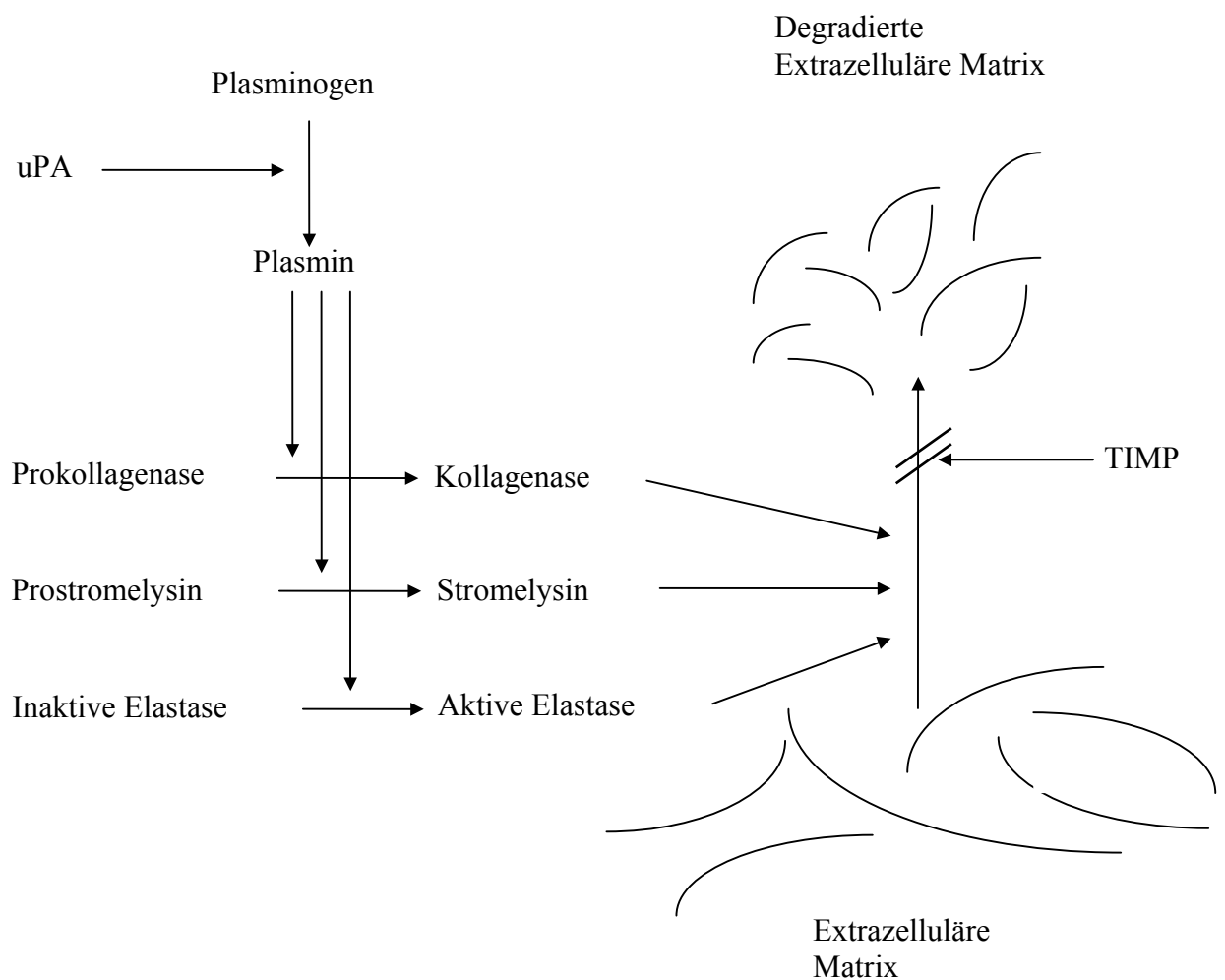


Abbildung 6: Die Degradierung der Extrazellulären Matrix durch Matrixmetalloproteinasen (Mignatti and Rifkin, 1993; Matrisian and Bowden, 1990; Matrisian, 1992).

Die Expression von uPA korrelierte mit dem Stadium bei Harnblasenkarzinomen und niedrige uPA Expressionen waren mit einer längeren Überlebenszeit verbunden (Liebert and Seigne, 1996).

5. Stromelysin-3

Stromelysin-3 gehört zu der Gruppe der Matrix Metalloproteinasen (MMP-11) und wurde 1990 erstmals von Paul Basset beschrieben, der es im Gewebe von Mammakarzinomen entdeckte (Basset et al., 1990). Das Stromelysin-3 Gen wird von den meisten invasiven Karzinomen exprimiert, und konnte auch in einigen nicht-invasiven Karzinomen mit einem hohen Invasionsrisiko gefunden werden. Dagegen kommt es bei Sarkomen oder anderen nicht-epithelialen Tumoren nicht vor (Rouyer et al., 1995). Das Gen für Stromelysin-3 liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 22 nahe dem BCR-Gen, welches mit der chronisch myelotischen Leukämie in Zusammenhang gebracht wird. Das Stromelysin-3 Gen umfaßt 11.5kb und hat 8 Exons und 7 Introns (Basset et al., 1993; von Anglard et al., 1995). Aufgrund Sequenzähnlichkeiten zu Stromelysin-1 (40%) und Stromelysin-2 (38%) und der Unkenntnis der Substratspezifität, wurde diese Protease "Stromelysin-3" (ST3) getauft.

5.1 Aufbau

Stromelysin-3 ist ein Protein bestehend aus 488 Aminosäuren, aufgeteilt in 4 Domänen, dem Preenzym, dem Proenzym, der katalytischen Einheit und der hemopexinartigen Domäne. Weiterhin besitzt Stromelysin-3 als einzige Matrixmetalloprotease noch eine zusätzliche Sequenz von 10 Aminosäuren, an der Schnittstelle zwischen Proenzym und der katalytischen Einheit (siehe Abbildung 7) (Basset et al., 1990; Basset et al., 1993). Stromelysin-3 wird als inaktive Vorstufe, ein 65kDa Zymogen, synthetisiert, aber nicht wie die anderen Matrixmetalloproteinasen in diesem inaktiven Zustand sezerniert, sondern bereits intrazellulär in die enzymatisch aktive Form überführt. Dieser intrazelluläre proteolytischen Schritt, der während der Sekretion stattfindet, wird durch die zusätzliche Sequenz von 10 Aminosäuren die vor der katalytischen Einheit liegen, reguliert. Dieses Inset ist ein Substrat für Furin, eine Golgi-assoziierte Serinprotease, die Stromelysin-3 bereits intrazellulär aktiviert (Pei and Weiss, 1995). Das reife Protein ist ein 45kDa Enzym,

welches bei Phenylalanin 98 beginnt und in seinem katalytischen Zentrum die für die Matrixmetalloproteinasen typische Zinkbindungsstelle aufweist (212-225), für dessen Aktivierung Ca-Ionen notwendig sind (Basset et al., 1990; Matrisian and Bowden, 1990; Pei et al., 1994).

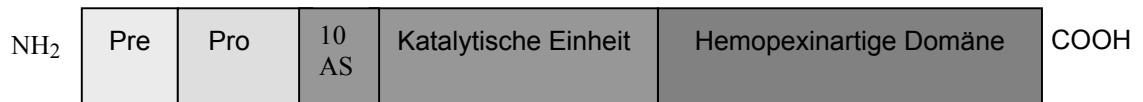


Abbildung 7: Zeichnung des Aufbaus von Stromelysin-3 (Basset et al., 1993).

5.2 Substratspezifität

Im Gegensatz zu allen anderen Matrixmetalloproteinasen zeigt proST3 keine proteolytische Aktivität in Kasein- oder Gelatinezymogrammen und degradiert keine der charakteristischen Komponenten der extrazellulären Matrix. Trotz allem nimmt man, aufgrund der Sequenzhomologien zu den anderen Matrixmetalloproteinasen, an, daß Stromelysin 3 als Protease agiert und das erste Mitglied einer neuen Untergruppe von Matrixmetalloproteinasen ist, welches einzigartige enzymatische Charakteristiken und eine sehr enge Substratspezifität aufweist (Basset et al., 1993; Pei et al., 1994). Die genaue Substratspezifität für Stromelysin 3 in vivo ist noch unbekannt. Pei et al. konnte als ein Substrat für Stromelysin 3, den Serinproteaseninhibitor, Alpha-1-Proteaseinhibitor (Alpha-1-Antitrypsin), identifizieren. (Pei et al., 1994). Stromelysin 3 kann dessen antiproteolytische Aktivität zerstören, indem es die aktive Schleife zwischen Ala-350 und Met-351 schneidet. Dies zeigt daß der Serinproteaseinhibitor als ein mögliches physiologisches Ziel bei der Degradierung der extrazellulären Matrix fungiert. Weiterhin wurden kleine Mengen einer aktiven 30kDa Form des Proteins gefunden, die Fibronectin-, Gelatin- und Vitronectindegradierende Eigenschaften zeigten. Somit könnten verschiedene Prozessierungsschritte die Substratspezifität von Stromelysin 3, von einer hochspezifischen Alpha-1-Proteaseinhibitor schneidenden Protease zu einem Matrix-degradierendem Enzym mit einem weiten Substratspektrum, verändern. Dies zeigt, daß sich Stromelysin 3 von

allen anderen Matrixmetalloproteinasen unterscheidet und ihm möglicherweise eine besondere Rolle bei der Matrixdegradierung zukommt (Pei et al., 1994). Die Proteolyse von Alpha-1-Proteaseinhibitor durch Stromelysin 3 konnte durch die natürlichen Inhibitoren der Matrixmetalloproteinasen, TIMP1 und TIMP2 komplett gehemmt werden (Pei and Weiss, 1995).

5.3 Vorkommen

Stromelysin 3 kommt physiologisch in Geweben vor, in denen ein Gewebeumbau stattfindet. So konnten hohe RNA Level von Stromelysin 3 im Uterus, der Placenta, in Embryonen, und während der Entzündungsphase bei der Wundheilung gefunden werden (Basset et al., 1993). Daneben ist es bei fast allen menschlichen Karzinomen zu finden (Rouyer et al., 1995). Bisher wurde Stromelysin 3 in Mammakarzinomgewebe (Basset et al., 1990; Wolf et al., 1993), in Plattenepithelkarzinomen des Hals- und Kopfbereichs (Muller et al., 1993), in Colonkarzinomen (Johnson et al., 1996), in Plattenepithel- und Adenokarzinomen der Lunge, in Basalzellkarzinomen der Haut, in Karzinomen des Pankreas, des Ovars, des Endometriums, der Cervix und der Blase (Rouyer et al., 1995) (Wolf et al., 1992; Wagner et al., 1992) gefunden.

Interessant ist, daß Stromelysin 3 nicht von den Tumorzellen, sondern von den Fibroblasten die in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Karzinomzellen liegen, sezerniert wird (Basset et al., 1990). Dies ist ungewöhnlich, denn bis vor kurzem ging man davon aus, daß der Großteil der Proteolysefaktoren bei der Tumorinvasion von den Krebszellen selbst produziert wird. Inzwischen hat man herausgefunden, daß auch intestinale Typ I Kollagenase, 72kDa Typ IV Kollagenase und die Urokinase von Fibroblasten sezerniert werden können (Basset et al., 1993).

Die Expression von Stromelysin-3 wird durch Faktoren, die von den Karzinomzellen sezerniert werden, stimuliert. Zu diesen Faktoren gehören Wachstumsfaktoren wie der epidermale Wachstumsfaktor (EGF), der Plättchenwachstumsfaktor (PDGF), der Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF), Cytokine und Tumorpromotoren, wie TPA (tissue plasminogen aktivator). Am stärksten stimuliert der

Fibroblastenwachstumsfaktor (basic FGF) die Stromelysin-3 Expression. Die Faktoren PDGF, TPA und bFGF werden von Karzinomzellen in vitro sezerniert (Basset et al., 1990).

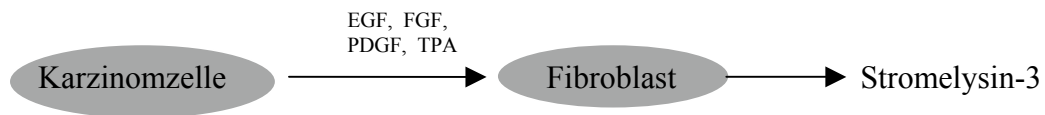


Abbildung 8: Die Karzinomzelle sezerniert Faktoren, welche den Fibroblasten zur Expression von Stromelysin-3 stimulieren.

Die Stromelysin-3 Expression ist charakteristisch für maligne Tumoren. In einer Studie von Basset et al. wurde Stromelysin-3 in 95% der invasiven Mammakarzinome gefunden, aber nur in 5% der benignen Fibroadenome (Basset et al., 1993). Im Vergleich dazu wurden Stromelysin-1 und -2, 72K Typ IV Kollagenase und Pump-1 RNA, auch in Fibroadenomen exprimiert. Typ I Kollagenase und 92K Typ IV Kollagenase wurden wie Stromelysin-3 nur in invasiven Mammakarzinomen gefunden, doch war das Expressionsmuster nicht sehr deutlich zu erkennen und nur Stromelysin-3 RNA konnte in allen Karzinomen klar dargestellt werden (Basset et al., 1990).

Stromelysin-3 wird auch in den Carcinoma in situ der Brust exprimiert, die ein hohes Invasionsrisiko aufweisen. So wurde Stromelysin-3 in einer Studie von Basset et al. bei den duktuellen In-situ-Carcinomen vom Komidotyp, die bekanntlich das größte Progressionsrisiko haben, am häufigsten (61%) gefunden. Im Vergleich dazu, konnte Stromelysin-3 bei den lobulären In-situ-Carcinomen, welche selten zu invasiven Karzinomen werden, nur in 3% der Fälle gefunden werden (Basset et al., 1993).

Weiterhin wurde Stromelysin-3 in Tumormetastasen gefunden. Stromelysin-3 RNA konnte bei Mammakarzinommetastasen in 85% der Lymphknotenmetastasen und in 53% der Metastasen anderer Organe detektiert werden. Dabei scheint die Gewebeart für die Stromelysin-3 Expression nicht determinierend zu sein, da das Stromelysin-3 Gen in allen Typen der Brustkrebsmetastasen, wie Lymphknoten, Knochen, Haut, Pleura und Leber gefunden wurde (Basset et al., 1993).

Die höchsten Stromelysin-3 Konzentrationen werden bei stark invasiven Karzinomen gefunden. So konnten z. B. hohe Stromelysin-3 RNA Level bei den lokal sehr

aggressiven, doch kaum metastasierenden Basalzellkarzinomen gefunden werden (Basset et al., 1993; Wagner et al., 1992; Wolf et al., 1992). Auch bei den höchst invasiven Karzinomen des Hals- und Kopfbereichs konnten hohe Stromelysin-3 Konzentrationen nachgewiesen werden, die mit der lokalen Aggressivität korrelierten (Basset et al., 1993; Muller et al., 1993).

Diese Studien deuten darauf hin, daß Stromelysin-3 als prognostischer Faktor für bestimmte Krebsarten, wie z. B. Brustkrebs geeignet sein könnte, wie auch als Marker für frühinvasive Karzinome.

Allerdings gibt es auch Untersuchungen, die die Wertigkeit von Stromelysin-3 als Marker für Invasion in Frage stellen. So wurden in einer Studie von Mueller et al. Frühkarzinome (pT1) und Pseudoinvasive Karzinome des Colons auf Stromelysin-3 Expression untersucht. Dabei wurden die invasiven Karzinome wiederum nach ihren Wachstumsmustern in zwei Gruppen eingeteilt: in Karzinome mit diffusem, infiltrativen Wachstumsmuster und in Karzinome mit expansivem Wachstumsmuster. Alle Karzinome mit infiltrativem Wachstumsmuster zeigten eine Expression von Stromelysin-3, dagegen wurde bei keinem der Karzinome mit expansivem Wachstumsmuster und bei keinem der Tumoren mit Pseudoinvasion eine Stromelysin-3 Expression gefunden. Dies zeigt, daß Stromelysin-3 zwar ein Indikator für Invasion ist, allerdings schließt die Abwesenheit von Stromelysin-3 eine Invasion nicht aus (Mueller et al., 1997). Ein weiterer interessanter Gesichtspunkt dieser Studie ist, daß die unterschiedliche Stromelysin-3 Expression je nach Wachstumsmuster zeigt, daß es verschiedene Formen der Invasion gibt. So scheinen, bei den infiltrativ wachsenden Karzinomen, Proteasen wie Stromelysin-3 eine wichtige Rolle zu spielen, während sie bei den expansiv wachsenden Karzinomen von untergeordneter Bedeutung zu sein scheinen. Ob das unterschiedliche Wachstumsmuster mit einem unterschiedlich aggressiven Verhalten und damit mit einer unterschiedlichen Prognose korreliert, ist noch Gegenstand weiterer Forschungen. Desweiteren stellt sich die Frage ob Stromelysin-3 für das infiltrative Wachstumsverhalten mitverantwortlich ist und ob somit die Anwesenheit von Stromelysin-3 zu einer stärkeren Zellabsiedelung der Tumorzellen führt. Inwieweit noch andere Faktoren zum infiltrativen Wachstumsmuster beitragen, ist ebenfalls noch nicht geklärt.

Es gibt folglich noch eine Reihe bislang unbeantworteter Fragen auf dem Gebiet der Proteasen und im speziellen der Protease Stromelysin-3. Besonders die Rolle von Stromelysin-3 bei der Invasion von Tumorzellen in umliegendes Gewebe und damit der möglichen Relevanz als prognostische Marker, ist von großem Interesse.

6. Ziel der Studie

Nachdem Stromelysin-3 von den meisten invasiven Karzinomen exprimiert wird, war in dieser Studie von Interesse, ob auch bei invasiven Urothelkarzinomen der Harnblase eine Stromelysin-3 Expression zu finden ist und ob sie bei einer hohen Prozentrate invasiver Harnblasenkarzinome auftritt oder nur bei einem kleinen Teil.

Als nächstes wurde die Frage der Verteilung von Stromelysin-3 im Gewebe gestellt. Findet man auch bei den Harnblasenkarzinomen Stromelysin-3 nur in den Fibroblasten in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Karzinomzellen, oder verhält sich die Stromelysin-3 Verteilung beim Urothelkarzinom anders? Da vermutet wird daß Stromelysin-3 zur Degradierung der extrazellulären Matrix beiträgt, stellt sich weiterhin die Frage ob man an der Invasionsfront invasiver Tumore eine erhöhte Stromelysin-3 Expression findet.

Wie bereits in der Einleitung, Kapitel 5.3 beschrieben, konnte in einigen Studien fast ausschließlich bei invasiven Karzinomen eine Stromelysin-3 Expression nachgewiesen werden (Basset et al., 1993). Da dies für Stromelysin-3 als einen spezifischer Marker für Invasion spräche, ist es sehr interssant herauszufinden, ob es einen Unterschied in der Stromelysin-3 Expression zwischen invasiven und nicht-invasiven Harnblasenkarzinomen gibt.

Weiterhin wäre es für die invasiven Harnblasenkarzinome wissenswert, inwiewiet die Stromelysin-3 Expression mit den histopathologischen Parametern, wie Differenzierungsgrad, Eindringtiefe des Tumors und Lymphgefäßinfiltration, welche eine große prognostische Aussagekraft haben, korreliert. Ebenfalls sollte in dieser Studie die Stromelysin-3 Expression mit infiltrierenden zu expansiven (verdrängendem) Invasionsmustern verglichen werden, nachdem in einer Studie von Mueller et al. signifikante Unterschiede zwischen den beiden Wachstumsmustern gefunden werden konnten (Mueller et al., 1997).

Ein sehr wichtiges Ziel dieser Studie war es herauszufinden, ob es einen Unterschied der Stromelysin-3 Expression bei den Karzinoma in situ der Harnblase und den nicht-invasiven papillomatösen Harnblasenkarzinomen gibt. Nachdem Stromelysin-3 in einer Studie von Basset et al. (1993) am häufigsten in den Karzinoma in situ der Brust mit dem größten Progressionsrisiko gefunden wurde, und nachdem bekannt ist daß oberflächliche papillomatöse Harnblasenkarzinome und Karzinoma in situ der Harnblase eine unterschiedliche Wahrscheinlichkeit, jedoch beide ein unvorhersagbares Potential haben sich in ihrem Verlauf zu einem invasiven Karzinom zu entwickeln, wäre es interessant herauszufinden, ob die

Stromelysin-3 Expression mit der Wahrscheinlichkeit der Progression der präinvasiven Läsionen korreliert. Es wäre von entscheidender Bedeutung prognostische Marker zu finden die das Verhalten dieser Läsionen vorhersagbarer machen könnten. Ein weiterer Punkt ist, daß die eindeutige histologische Diagnose leider nicht immer möglich ist. Die korrekte Diagnose ist jedoch entscheidend für das weitere therapeutische Vorgehen und damit für die Prognose des Patienten. Folglich wäre es von großem Vorteil Marker zu finden welche die Diagnostik erleichtern und exakter werden lassen. Nachdem man vermutet, daß Proteasen invasive Vorgänge mitermöglichen, wäre es ein großer Fortschritt wenn man Proteasen, und in diesem Fall Stromelysin-3, zur Früherkennung beginnender invasiver Vorgänge sichtbar machen könnte, bevor mikroskopisch überhaupt eine Invasion erkennbar ist.

Zusammenfassend sind die beiden Hauptziele dieser Arbeit, folgende Fragen zu beantworten:

1. Eignet sich Stromelysin-3 als Marker zur Früherkennung beginnender invasiver Vorgänge bei histologisch nicht eindeutigen oder noch nicht-invasiven Harnblasenkarzinomen?
2. Korreliert die Stromelysin-3 Expression bei invasiven Harnblasenkarzinomen mit anderen histopathologischen Parametern und besitzt somit eine gewisse Aussagekraft über die Aggressivität und den weiteren Verlauf der Tumorerkrankung?

7. Material und Methoden

7.1 Patienten

In dieser Arbeit wurden insgesamt 106 Patienten mit Harnblasenkarzinomen immunhistochemisch untersucht. In 5 Fällen wurde noch eine In-situ-Hybridisierung durchgeführt. Die Patienten bestanden aus 31 Frauen und 75 Männern (Verhältnis von 1:2,4) mit einem Durchschnittsalter von 70,3 Jahren (von 43 bis 89). Weiterhin setzten diese 106 Patienten sich aus 56 Patienten mit invasiven Harnblasenkarzinomen (siehe Tabelle 5), 27 Patienten mit papillomatösen, nicht-invasiven Harnblasenkarzinomen (pTa) und 27 Patienten mit Karzinoma in situ der Harnblase (pTis) zusammen (siehe Tabelle 6 und 7).

Ein Patient hatte 2 Karzinome und ein Karzinoma in situ, 2 Patienten wiesen 2 Karzinoma in situ auf und 1 Patient ein Karzinoma in situ und ein oberflächliches Papillom.

Die Karzinomgewebe setzten sich zusammen aus 6 Biopsien, 42 Curettagen und 8 Cystektomien.

Die exakte histologische Stadieneinteilung der Karzinome war beschränkt durch die limitierten Gewebeproben bei Biopsien und Curettagen. Dennoch wurden 23 Läsionen als mindestens pT1, 23 als pT2, ein Fall als pT3a, 7 Fälle als pT3b und 2 Fälle als pT4 (beide Cystektomien) beschrieben (siehe Tabelle 4).

Differenziert waren 2 der Fälle gut (G1), 14 mäßig (G2), 4 mäßig bis schlecht (G2-3), 35 schlecht (G3) und ein Fall undifferenziert (G4). In 12 der Fälle war eine Invasion in die Lymphgefäße nachweisbar.

Die Patienten wurden an der Urologischen Klinik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München (TUM) im Zeitraum von 1990 bis 1995 biopsiert, bzw. operiert.

Die pathologische Begutachtung fand im Pathologischen Institut der Technischen Universität München statt.

Die Gewebe wurden in Formalin fixiert und in Paraffinblöcke eingebettet.

Bei der Auswahl der Schnitte war wichtig, daß sie von einer Primärbiopsie (Erstdiagnose) stammten und das Gewebe somit nicht durch Therapiemaßnahmen (systemische oder intravesikale Chemotherapie) verändert war.

Bei der Beurteilung unter dem Mikroskop wurden die Schnitte nach ihrem Wachstumsmuster ausgewählt. Da Stromelysin-3 in bisherigen Studien immer nur in Fibroblasten im direkt an den Tumor grenzenden Gewebe zu finden war, wurden bei dieser Arbeit Schnitte mit möglichst großer Tumor-Stroma-Grenze ausgewählt. Stromaarme, fast nur aus Tumorzellen bestehende Karzinome, waren folglich ungeeignet, geeigneter waren dagegen Karzinome mit Tumorzellen zwischen Stromazellen. Auch bei Papillomen und Karzinoma in situ wurde auf eine deutliche Tumor-Stroma- Grenze geachtet.

Da eine Stromelysin-3 Expression auch bei entzündlichen Prozessen beschrieben wurde, wurden Schnitte mit möglichst geringer Infiltration von Entzündungszellen ausgewählt um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden.

	Nicht-invasive papillomatöse Neoplasien	Karzinoma in situ	Invasive Urothelkarzinome	Total
n	27	27	56	110
Präparat :				
Biopsie	1	18	6	25
Curettag	26	9	42	77
Cystektomie	0	0	8	8
Grade (WHO):				
High (III)	18	27	-	45
Low (I)	9	-	-	9
Differenzierung:				
G3			36	36
G2			18	18
G1			2	2
T-Klassifikation :				
Nicht-invasiv	27	27		54
≥pT1			23	23
≥pT2			23	23
≥pT3			8	8
pT4			2	2

Tabelle 4: Histopathologische Daten der Tumorpräparate.

Nummer	Alter	Geschlecht	Präparat	T	G	L	Muster	Stromelysin-3 Expression
1	79	m	C	1	1	0	E	0
2	71	m	C	1	1	0	E	2
3	84	m	B	1	2	0	E	0
4	71	m	B	1	2	0	E	0
5	76	m	C	1	2	0	E	1
6	75	w	C	1	2	0	E	0
7	59	m	C	1	2	0	E	1
8	82	m	C	1	2	0	E	1
9	80	w	C	1	2	0	I	1
10	66	m	C	1	2	1	E	1
11	76	m	C	1	2	0	I	1
12	73	m	B	1	2	0	E	0
13	73	w	C	1	2.5	0	E	0
14	67	m	B	1	3	0	E	0
15	79	m	C	1	3	0	E	1
16	81	w	C	1	3	0	E	1
17	82	w	C	1	3	0	E	0
18	69	m	C	1	3	1	E	1
19	80	w	C	1	3	0	E	0
20	79	m	C	1	3	0	E	0
21	51	m	C	1	3	0	I	2
22	74	m	C	1	3	0	E	1
23	62	m	C	1	3	0	E	1
24	63	m	C	2	2	1	I	1
25	89	w	C	2	2	0	E	3
26	75	m	C	2	2	0	E	0
27	69	m	C	2	2	0	E	1
28	51	w	C	2	2.5	0	I	3
29	70	m	C	2	2.5	0	E	1
30	65	m	C	2	3	0	E	0
31	84	w	B	2	3	0	I	1
32	70	w	C	2	3	0	I	1
33	67	m	C	2	3	1	E	1
34	66	m	C	2	3	0	I	2
35	84	m	C	2	3	0	I	2
36	79	m	C	2	3	0	I	0
37	70	w	C	2	3	1	I	1
38	56	m	C	2	3	0	I	1
39	64	w	R	2	3	0	E	0
40	73	w	C	2	3	1	I	1
41	85	w	C	2	3	1	I	1
42	78	m	C	2	3	1	I	2
43	75	w	C	2	3	0	I	3
44	74	m	C	2	3	0	E	1
45	61	w	C	2	3	0	I	0
46	69	w	C	2	3	0	I	1
47	76	m	C	3a	3	0	E	1
48	73	w	R	3b	3	0	E	1
49	65	m	C	3b	3	0	I	1
50	66	m	R	3b	3	1	I	1
51	57	m	R	3b	3	0	I	1

52	81	w	R	3b	3	0	I	3
53	80	m	R	3b	3	0	I	1
54	64	m	B	3b	4	1	I	3
55	88	w	R	4a	2.5	0	I	3
56	70	m	R	4a	3	1	I	1

Tabelle 5: Die Stärke (Prozentrate) der Stromelysin-3 Expression an der Tumor-Stroma Grenze bei invasiven Harnblasenkarzinomen verglichen mit anderen histopathologischen Parametern wie der Eindringtiefe des Primärtumors (T), des Differenzierungsgrades (G), der Lymphgefäßinvasion (L) und dem Invasionsmuster (E: expansiv, I: infiltrativ). : Curettage, B: Biopsie, R: Resektion

Nummer	Alter	Geschlecht	Präparat	G	Stromelysin-3 Expression
1	73	w	C	1	0
2	59	m	C	1	0
3	73	m	C	1	0
4	70	m	C	1	0
5	67	w	C	1	1
6	83	m	C	1	0
7	73	m	C	1	1
8	58	w	C	1.5	0
9	45	m	C	1.5	0
10	77	m	B	2	0
11	50	w	C	2	0
12	72	m	C	2	0
13	68	m	C	2	0
14	73	m	C	2	0
15	75	m	C	2	0
16	87	m	C	2	0
17	68	m	C	2	1
18	77	m	C	2	0
19	88	m	C	2	0
20	80	w	C	2	0
21	83	w	C	2	0
22	84	m	C	2	0
23	76	m	C	2	0
24	65	m	C	2	0
25	55	m	C	2	0
26	78	m	C	2.5	1
27	76	m	C	3	0

Tabelle 6 Die Stromelysin-3 Expression im Tumor-Stroma Bereich bei nicht-invasiven papillären Urothelkarzinomen.

Nummer	Alter	Geschlecht	Präparat	G	Stromelysin-3 Expression
1	70	m	B	1	0
2	63	w	Z	1	0
3	70	m	B	1	0
4	79	m	B	1	0
5	81	m	B	1	0

6	54	m	Z	1	0
7	50	m	B	1	0
8	53	m	B	1	0
9	67	m	B	1	0
10	43	m	B	1	0
11	72	m	B	1	0
12	77	m	Z	2	0
13	57	m	B	2	0
14	73	m	B	2	0
15	60	m	Z	2	0
16	57	m	B	2	0
17	57	m	B	2	0
18	47	m	Z	2	0
19	73	w	B	2	0
20	61	w	B	3	0
21	72	m	Z	3	0
22	55	w	B	3	0
23	74	w	Z	3	0
24	80	m	Z	3	0

Tabelle 7: Die Karzinoma in situ der Harnblase zeigten keine Stromelysin-3 Expression.

7.2 Immunhistochemie

Bei der Immunhistochemie läßt man das gesuchte Antigen mit einem spezifisch gegen das Antigen gerichteten Antikörper reagieren. In diesem Fall wurde die Avidin-Biotin-Methode verwendet, welche sich gut für in Paraffin eingebettetes Material eignet. Dabei ist der Primärantikörper gegen Stromelysin-3 gerichtet. Der mit Biotin konjugiertem Sekundärantikörper bindet sich an den Erstantikörper. Das dritte Reagens ist ein Peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex. Die freien Stellen des Avidinmoleküls ermöglichen die Bindung an das Biotin des Sekundärantikörpers. Das Enzym Peroxidase, und damit das gesuchte Enzym Stromelysin-3, wird mit einem Chromogen sichtbar gemacht (Taylor, 1978).

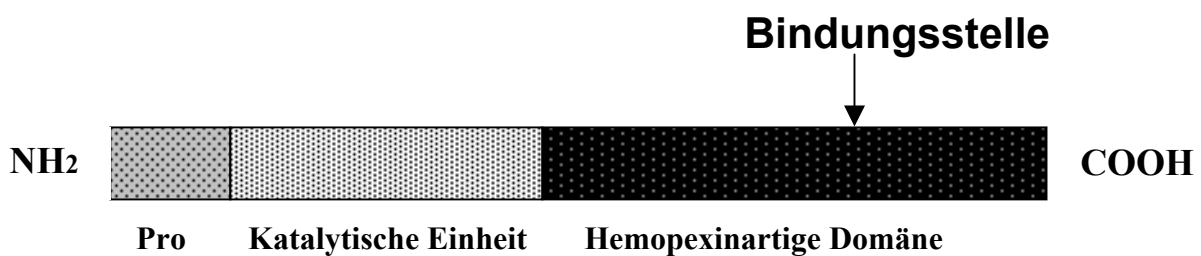


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Bindungsstelle des Antikörpers von Stromelysin-3.

Dazu wurden die einparaffinierten Gewebestücke im Mikrotom in 6µm dünne Scheiben geschnitten und auf silanisierte Objektträger aufgebracht. Bei 50°C wurden die Schnitte über Nacht inkubiert (getrocknet).

Als nächstes wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 95%, 75%, 50% Ethanol) entparaffiniert.

Um unspezifische Färbungen zu vermeiden, wurde die endogene Peroxidase, die vorzugsweise in roten und weißen Blutkörperchen zu finden ist, mit einer Wasserstoffperoxydlösung Lösung (3 ml Wasserstoffperoxid, 7 ml Aqua dest., 40 ml Methanol) blockiert.

Als nächstes wurden die Schnitte 3 x 5 Minuten in einer Citratpufferlösung bei 750W in der Mikrowelle gekocht, um das Gewebe für die Antikörper leichter zugänglich zu machen.

Anschließend wurden die Schnitte in eine feuchte Kammer gelegt und der monoklonale Primärantikörper 5ST-4A9 (Prof.Chambon, Straßburg, Frankreich), der spezifisch gegen Stromelysin-3 gerichtet ist (siehe Abbildung x), wurde in einer Verdünnung von 1:1000 (1% BSA in PBS) aufgetragen. Um unspezifische Hintergrundfärbung zu vermeiden wurde 1% Rinderserumalbumin (BSA) hinzugefügt. Die Schnitte wurden in der feuchten Kammer bei 4°C über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurde der mit Biotin konjugierte Sekundärantikörper auf die Schnitte aufgetragen und diese wurden wieder in einer feuchten Kammer 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (1ml PBS und 5µl 2. Antikörper für 10 Schnitte).

Das dritte Reagenz war ein Peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex. Die freien Stellen des Avidinmoleküls ermöglichen die Bindung an das Biotin des Sekundärantikörpers (Taylor, 1978). Dieser ABC-Komplex wurde auf die Schnitte aufgetragen, welche wiederum 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert wurden.

Als nächstes wurde das Enzym Peroxidase - und damit das gesuchte Antigen Stromelysin-3 - mit dem Chromogen Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB) sichtbar gemacht. Dazu wurde DAB (500µl DAB; 1,5 ml Tris-Puffer 0,05M, pH 7,4; 20µl H₂O₂ {290µl A.d., 10µl 30% H₂O₂}) auf die Schnitte aufgetragen und diese 8 Minuten in einer feuchten Dunkelkammer inkubiert.

Gegengefärbt wurden die Schnitte in Hämalaun.

Als nächstes wurden sie in einer aufsteigende Alkoholreihe dehydriert (50%, 75%, 95%, 100%) und in Xylol geklärt. Zum Schluß wurden die Schnitte mit Eukitt eingedeckelt.

Die Auswertung der Stromelysin-3 Färbung erfolgte semiquantitativ. Es wurden drei Ebenen der Anfärbung unterschieden:

1. die Stärke der Zytoplasmafärbung
2. die Prozentrate der gesamten Stromelysin-3 positiven Zellen
3. die Prozentrate der Stromelysin-3 positiven Tumor-Stroma Bereiche

(0% neg., <30% schwach, 30-70% mittelstark, >70% stark)

Als Kontrollen wurden bei jeder immunhistochemischen Färbung jeweils eine Negativkontrolle, und eine Positivkontrolle, bei der bereits eine positive spezifische Färbung bekannt war, verwendet.

7.3 In situ Hybridisierung

Bei der in situ Hybridisierung kann ein gewünschter Abschnitt der m-RNA oder der DNA direkt im biologischen Präparat sichtbar gemacht werden. Dieser Abschnitt ist in diesem Falle die Nukleinsäuresequenz, die Stromelysin-3 kodiert. Um unspezifische Hintergrundreaktionen zu vermeiden, wurde die mRNA in diesem Fall nicht mit einer RNA hybridisiert, sondern mit einer cDNA. Da nur hochspezifische Bindungen nach den Waschungen bestehen bleiben und DNA:RNA Hybride weniger stabil sind als RNA:RNA Hybride, können nach den Waschungen Hintergrundsignale geringer gehalten werden (Höfler et al., 1998).

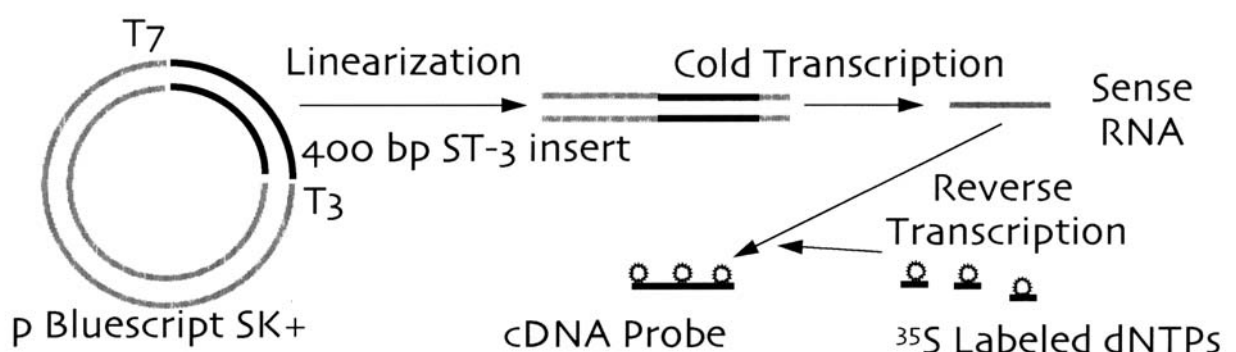


Abbildung 10: Schematische Darstellung der cDNA Sonde für die in situ Hybridisierung.

Dazu wurde eine 400 Basenpaare lange Plasmid DNA, die Stromelysin-3 kodiert (von Prof. Chambon, Straßburg), mit Hilfe einer Restriktionsendonuklease linearisiert und mit einer T3 (sense) und T7 (antisense) RNA Polymerase abgeschrieben (kalte Transkription) (siehe Abbildung 10).

Die RNA wurde nun in einer reversen Transkription mit ³⁵S markierten dNTPs (Desoxynukleosidtriphosphate) zu einer ³⁵S markierten komplementären DNA (cDNA) Sonde transkribiert. Diese Sonde lies man in situ mit der mRNA für Stromelysin-3 hybridisieren. Die Schnitte wurden dazu folgendermaßen präpariert:

die Paraffinblöcke wurden in 9µm dünne Scheiben geschnitten, auf 2% silanisierte Objektträgern aufgebracht und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Als nächstes wurden sie 30 Minuten bei 37°C mit Proteinase K permeabilisiert um das Gewebe für die Sonde zugänglich zu machen (1µg/ml Proteinase K in 100 mM Tris (pH 8,0), 50mM EDTA) (Höfler and Mueller, 1994). Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Schnitte bei Raumtemperatur 30s in 0,2% Glycin in PBS und 10 mM DTT gelegt und anschließend 20 Minuten in 4% Paraformaldehyd in PBS fixiert. Um positiv geladene Moleküle zu neutralisieren wurden die Schnitte nun 10 Minuten acetyliert (0,25 Acetic Anhydrid, 100 mM Triethanolamin, 10 mM DTT).

Die Hybridisierung wurde mit der bereits oben beschriebenen ³⁵S markierten cDNA Sonde in einer Pufferlösung durchgeführt. Die Pufferlösung bestand aus 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM NaPO₄ (pH 6,8), 5 mM EDTA (pH 8,0), 300 mM NaCl, 0,02% Ficoll 400, 0,02% Polyvinylpyrrolidon, 50% deionisiertem Formamid, 10% Dextransulfat, 1µg/ml tRNA und 0,02% BSA. Vor der Hybridisierung wurde die Sonde in 4µl 50% Formamid und 10 mM DTT vorverdünnt und bei 100°C denaturiert. Die Schnitte wurden über Nacht bei 52°C in einer mit Hybridisierungspuffer und Formamid befeuchten Kammer hybridisiert. Der Waschung (3x2 h unter Schütteln bei 52°C in 300 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM NaPO₄ (pH 6,8), 5 mM EDTA, 50% deionisiertes Formamid, 10 mM DTT) folgte die Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 300 mM Ammoniumacetat. Für die Autoradiographie wurden die Objektträger in einer Dunkelkammer mit Kodak NTB-2 Emulsion beschichtet und 10 Tage bei 4°C exponiert. Nach der Entwicklung wurden die Schnitte mit Hämalaun gegengefärbt (Mueller et al., 1997; Leitch et al., 1994).

Die Auswertung unter dem Lichtmikroskop erfolgte nach derselben Methode wie für die Immunhistochemie

8. Ergebnisse

8.1 Muster der Stromelysin-3 Expression

Es konnte eine sehr enge Korrelation zwischen der Expression des Proteins Stromelysin-3 in der Immunhistochemie und der mRNA in der in situ Hybridisierung gesehen werden.

Wie in Abbildung 11 dargestellt, konnte Stromelysin-3 nicht im Tumorgewebe, sondern nur in den Fibroblasten die direkt an das Tumorgewebe grenzen, nachgewiesen werden.

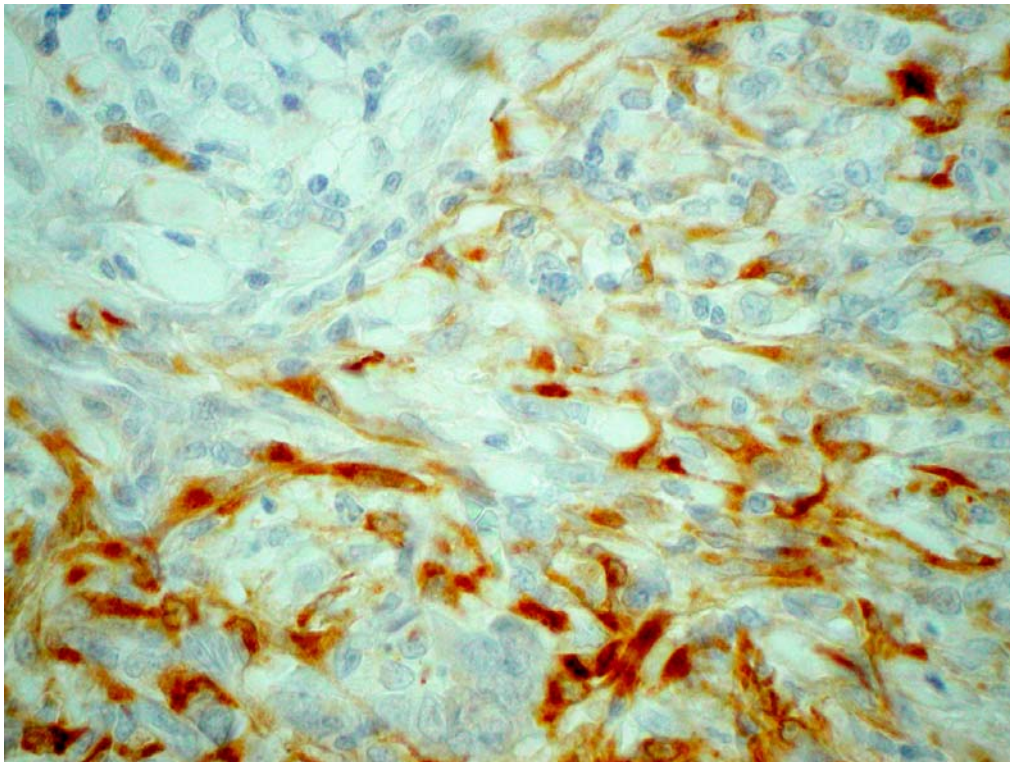
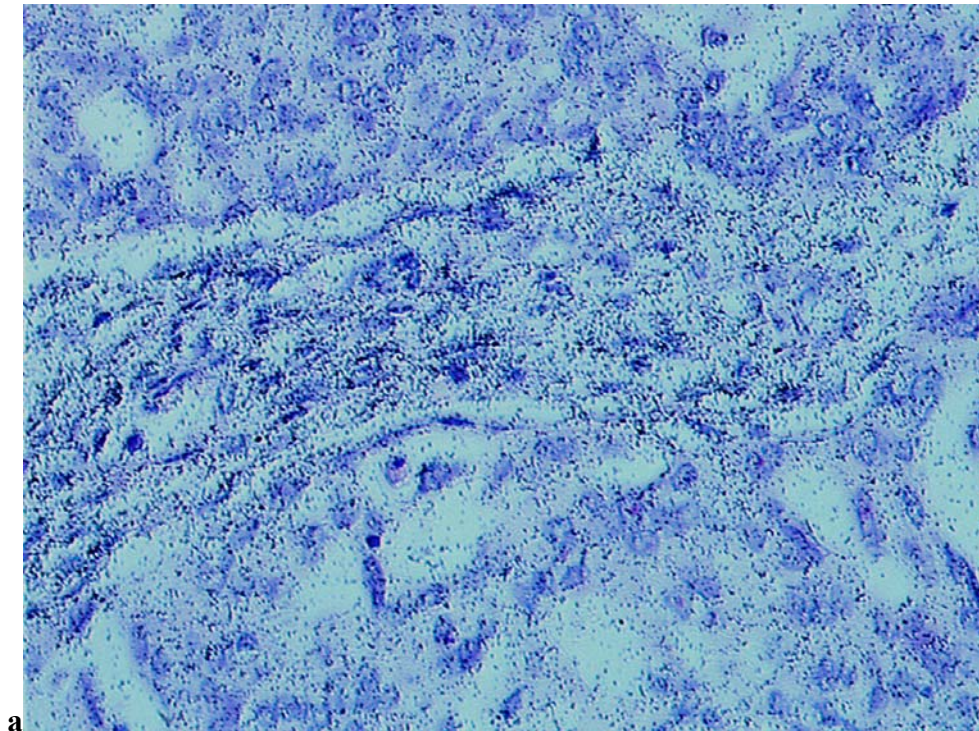
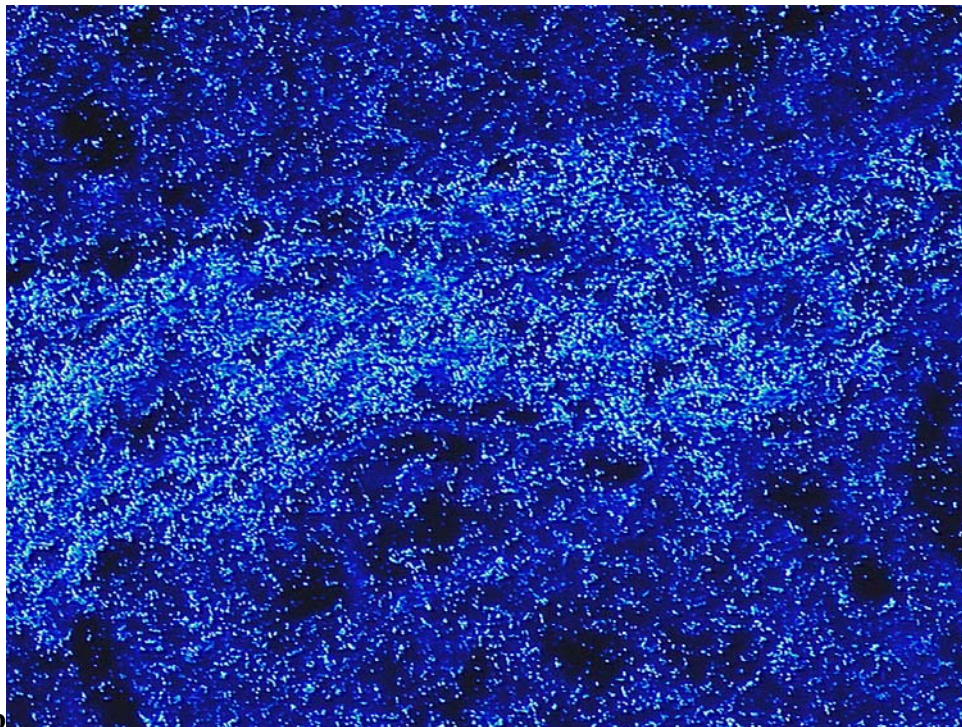


Abbildung 11: Immunhistochemie für Stromelysin-3 bei einem invasiven Karzinom. Man sieht Stromelysin-3 im Zytoplasma von Fibroblasten die an Tumorzellnester grenzen. Die Tumorzellen selbst sind Stromelysin-3 negativ.

Ein ähnliches Expressionsmuster wurde auch in der in situ Hybridisierung gefunden, in welcher Signale (Abbildung 12) im Zytoplasma von an Tumorgewebe grenzenden Fibroblasten gefunden wurden.



a



b

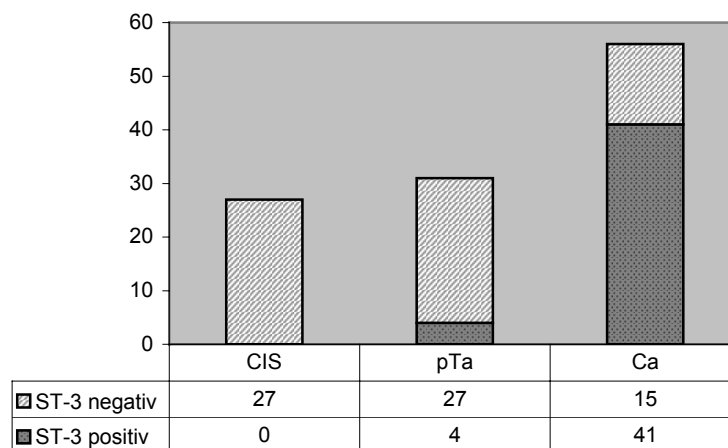
Abbildung 12: a) Die Hellfeldphotographie der in situ Hybridisierung zeigt Signale in Fibroblasten die an Tumorzellen grenzen. Diese Signalverteilung entspricht dem Expressionsmuster von Stromelysin-3 welches in der Immunhistochemie gefunden wurde.
b) Dunkelfeldphotographie des selben Ausschnitts wie in Abbildung a.

Die Auswertung der drei Ebenen der Stromelysin-3 Anfärbung ergab folgendes: die Stärke der Zytoplasmafärbung war mit einer sehr starken Anfärbung bei allen Tumoren gleich intensiv. Dagegen konnten Unterschiede in der Prozentrate der gesamten Stromelysin-3 positiven Zellen festgestellt werden, wobei Stromelysin-3 immer nur punktuell an der Tumor-Stroma Grenze anzutreffen war. Auch die Prozentrate der Stromelysin-3 positiven Tumor-Stroma Bereiche variierte von einer fokalen bis zu einer starken Expression.

Bei den invasiven Karzinomen die Stromelysin-3 exprimierten, konnte Stromelysin-3 gleichmäßig verteilt an den Tumor-Stroma Grenzen gefunden werden, wobei an der Invasionsfront keine stärkeren Konzentrationen zu finden waren.

8.2 Stromelysin-3 Expression der verschiedenen Gruppen

In der Immunhistochemie exprimierten 41 von 56 (73,2%) der invasiven Karzinome Stromelysin-3, verglichen mit nur 4 von 27 pTa Tumoren (14,8%) und keiner der 27 Karzinoma in situ (Graph 1).



Graph 1: Die Verteilung von Stromelysin-3 bei nicht-invasiven und invasiven Harnblasenkarzinomen.

Weiterhin zeigten 30 (53,6%) der invasiven Karzinome und alle 4 der pTa Läsionen nur eine fokale Stromelysin-3 Expression (weniger als 33% der Tumor-Stroma Fläche) (Abbildung 13).

Fünf invasive Karzinome zeigten eine mittelstarke Expression (34-66% der Fläche) und in 6 Fällen konnte eine starke Expression (Abbildung 14) nachgewiesen werden (mehr als 66% der Tumor-Stroma Fläche) (Graph 2).

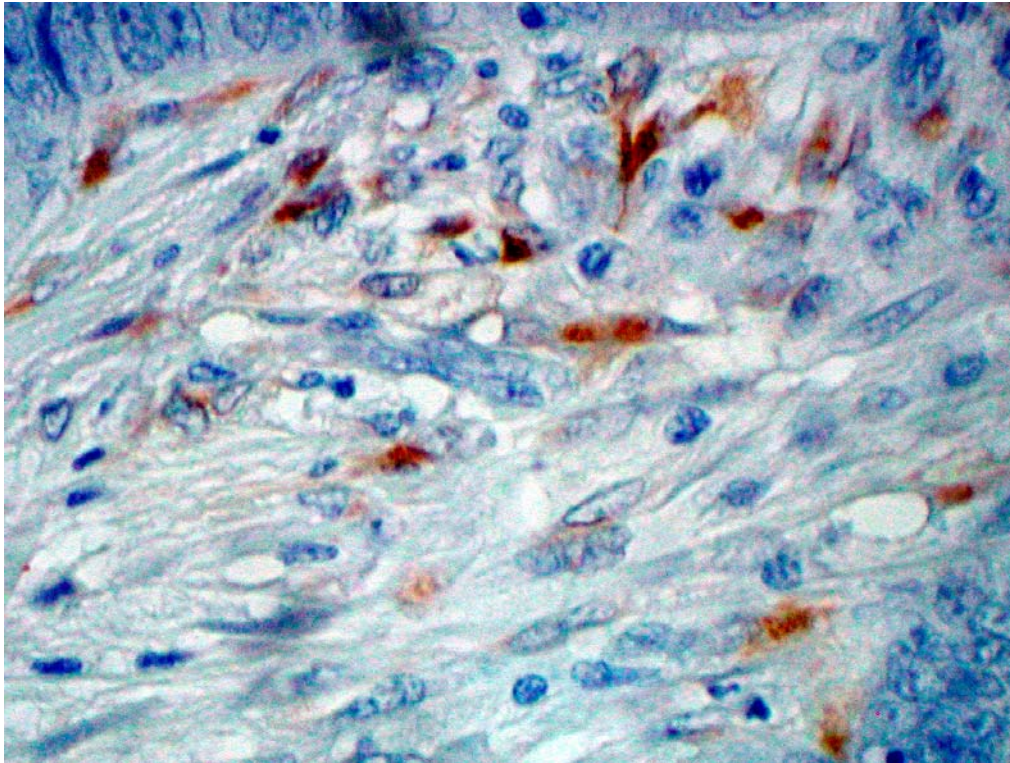
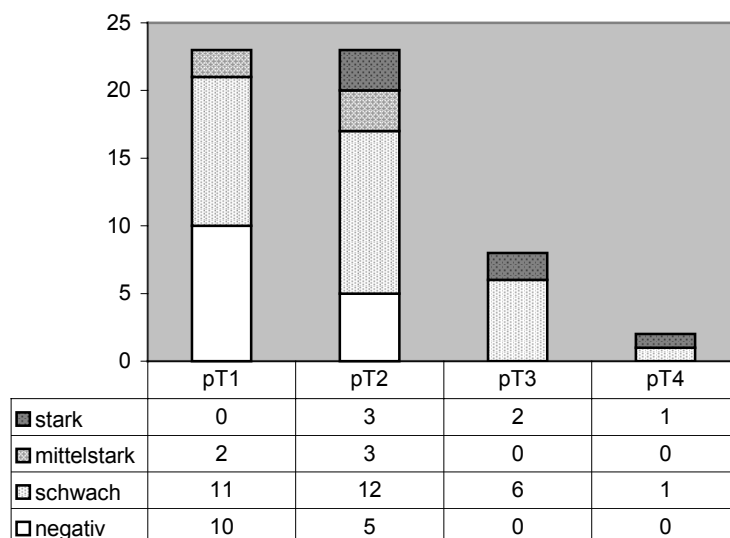


Abbildung 13: Immunhistochemie für Stromelysin-3 bei einem nicht-invasiven papillären Urothelneoplasma. Man sieht Stromelysin-3 positive Fibroblasten im Stroma unterhalb des Tumorepithels.



Graph 2: Die Stärke der Stromelysin-3 Expression verglichen mit der Eindringtiefe des Primärtumors.

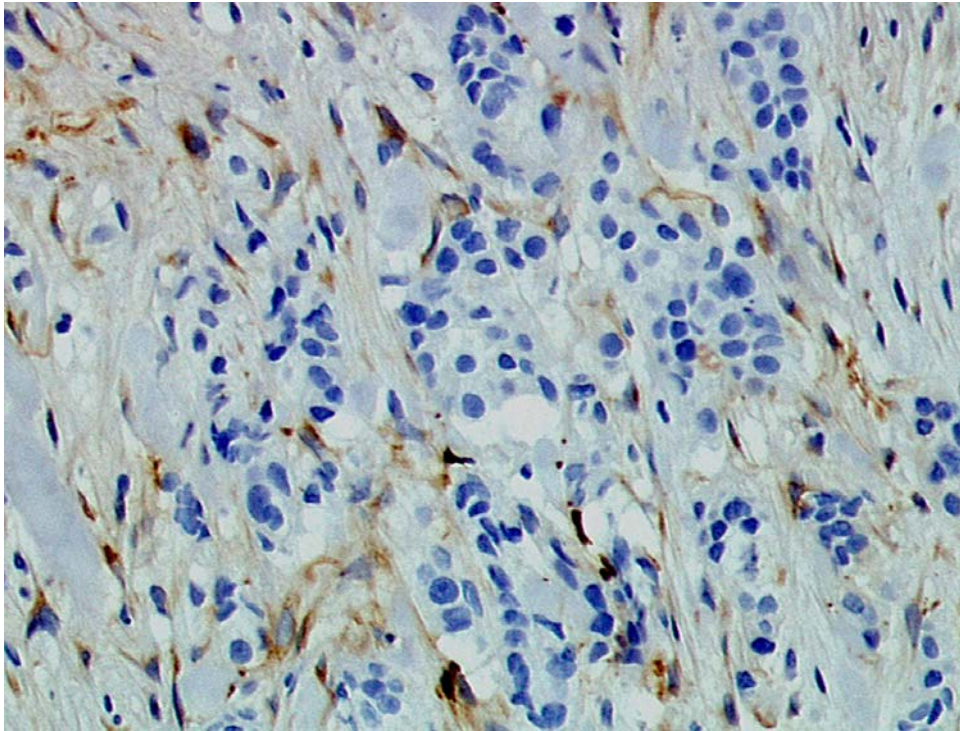
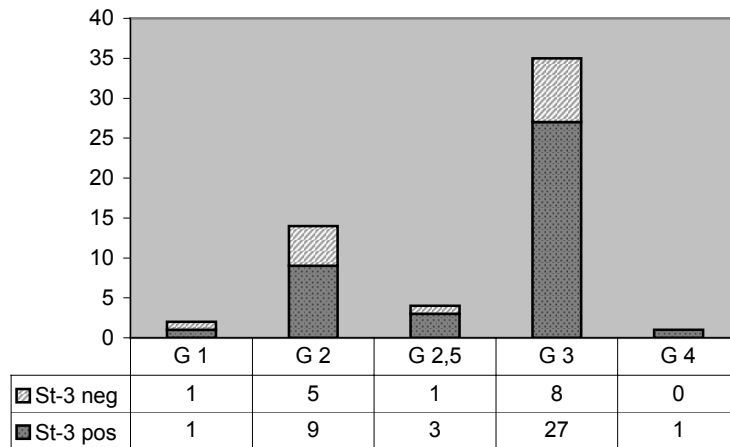


Abbildung 14: Dasselbe invasive Harnblasenkarzinom wie in Abbildung 17, zeigt eine starke Expression von Stromelysin-3 in den an die Tumorzellen grenzenden Fibroblasten.

8.3 Stromelysin-3 Expression: Vergleich mit histopathologischen Parametern

In der Gruppe der invasiven Karzinome, wurde die Expression oder nicht-Expression und die Stärke der Stromelysin-3 Expression in den positiven Fällen mit einer Anzahl histopathologischer Parameter verglichen. Zu diesen Parametern zählten der Differenzierungsgrad, die Eindringtiefe des Tumors, das Vorhandensein oder nicht-Vorhandensein einer Lymphgefäßinvasion und das Wachstumsmuster an der Invasionsfront (infiltrativ oder expansiv).

Zwischen dem Differenzierungsgrad und der Stromelysin-3 Expression konnte keine Korrelation gefunden werden ($p = 0.32$), obwohl 31 der 41 positiven Fälle schlecht differenziert waren und nur 10 gut differenziert (Graph 3).



Graph 3: Die Verteilung von Stromelysin-3 bei verschiedenen Differenzierungsgraden.

Von den 4 Stromelysin-3 positiven pTa Läsionen, waren 2 gut differenziert und 2 schlecht differenziert.

Alle 11 Fälle mit Lymphgefäßinvasion wiesen eine Expression von Stromelysin-3 auf (Abbildung 15), welches eine statistisch signifikante Korrelation darstellt (Chi square, two-tailed Fisher's exact test, $p = 0,026$) (Graph 4).

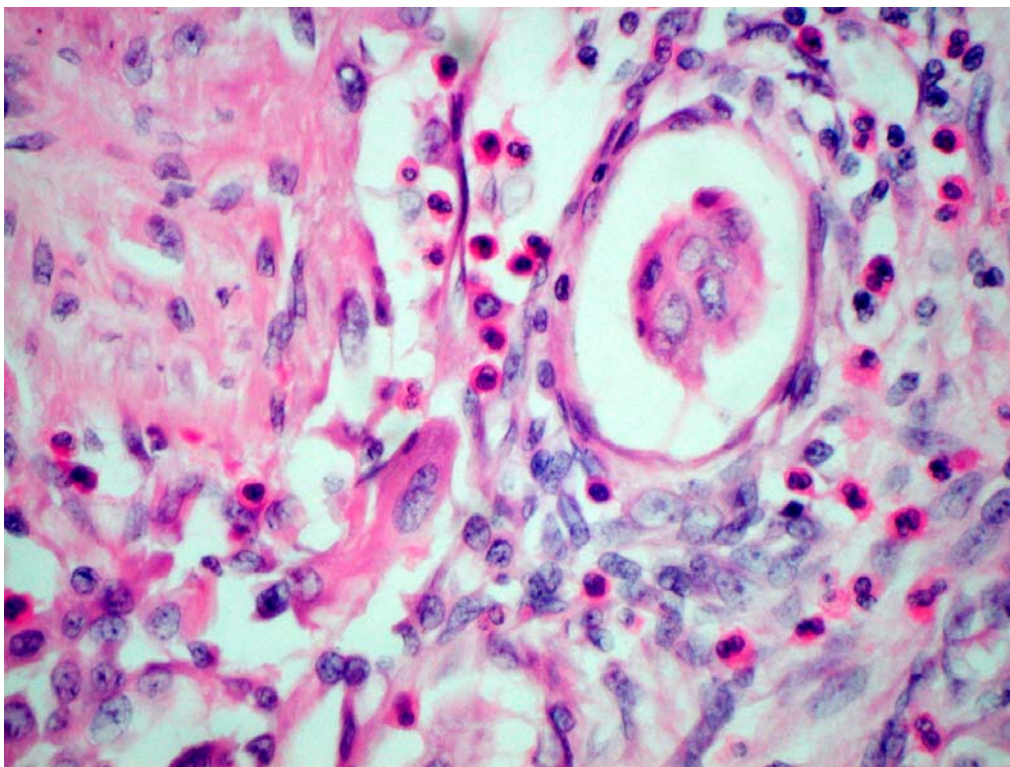
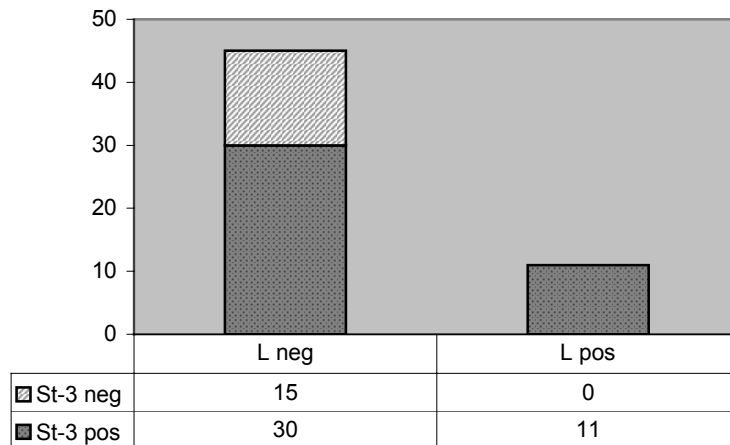


Abbildung 15: HE Schnitt eines invasiven Urothelkarzinoms mit Lymphgefäßinvasion.



Graph 4: Die Stromelysin-3 Expression bei Tumoren mit und ohne Lymphgefäßinvasion.

Eine ähnlich stark signifikante Korrelation konnte zwischen der Stromelysin-3 Expression und den Invasionsmustern gefunden werden (siehe Abbildung 16 und 17). Von den 26 Fällen mit einer signifikanten infiltrativen Komponente an der Invasionsfront, wiesen 24 eine Stromelysin-3 Expression auf, verglichen mit nur 17 von 30 Fällen mit einem expansiven (verdrängenden) Muster ($p = 0,00267$) (Graph 5).

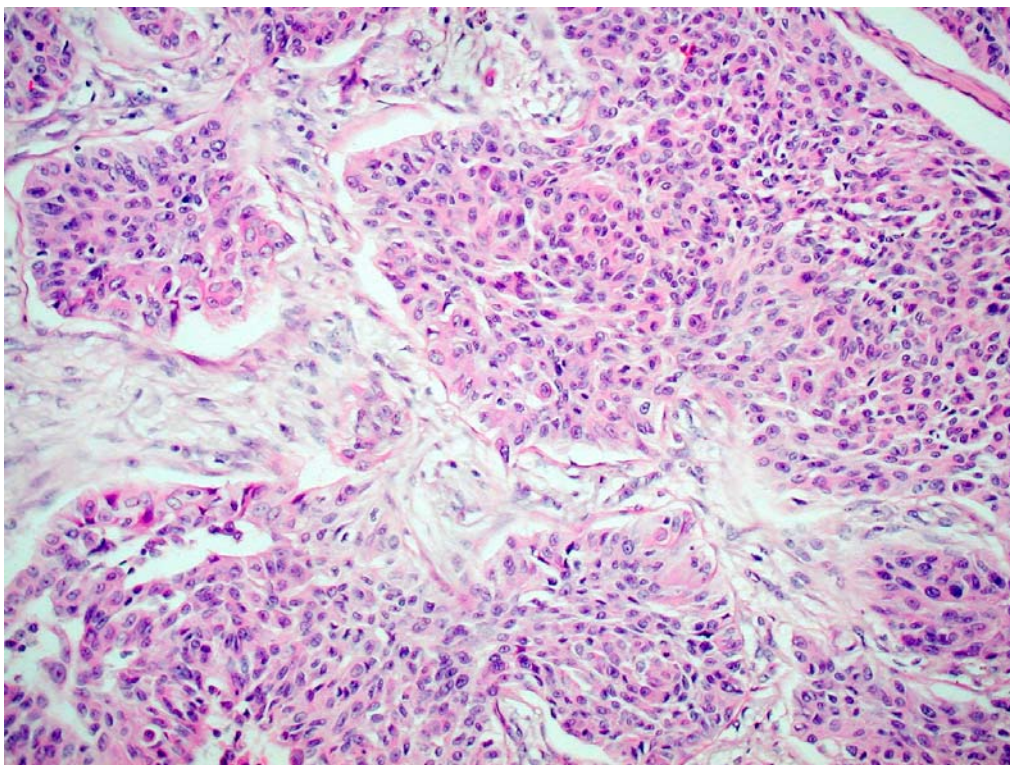


Abbildung 16: HE Schnitt eines invasiven Urothelkarzinoms mit expansivem Invasionsmuster.

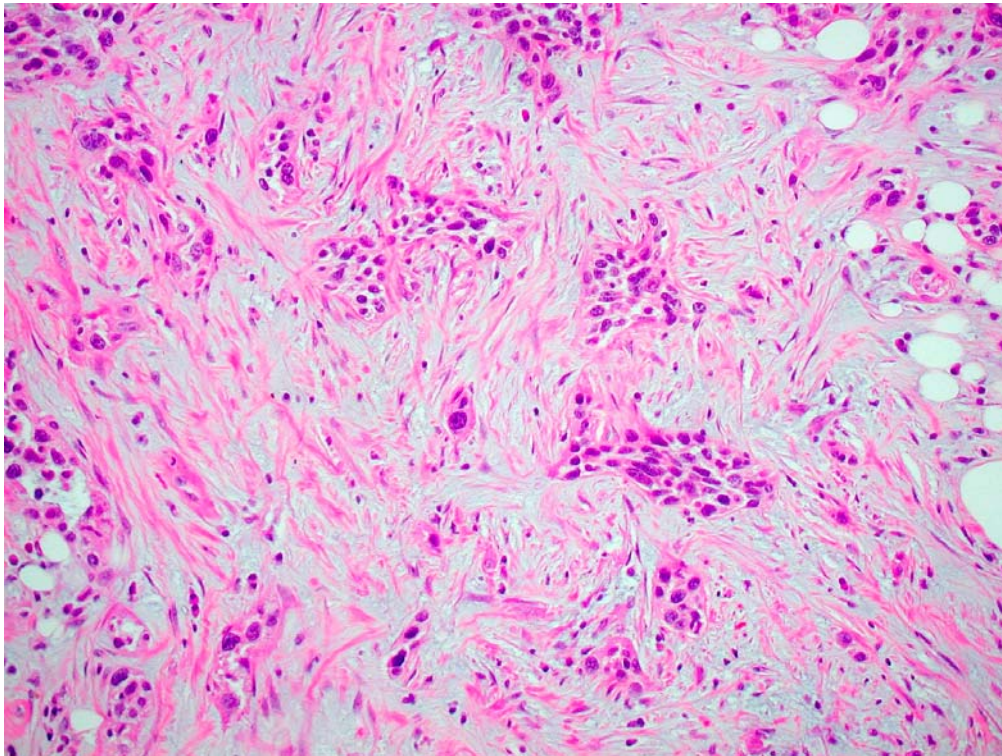
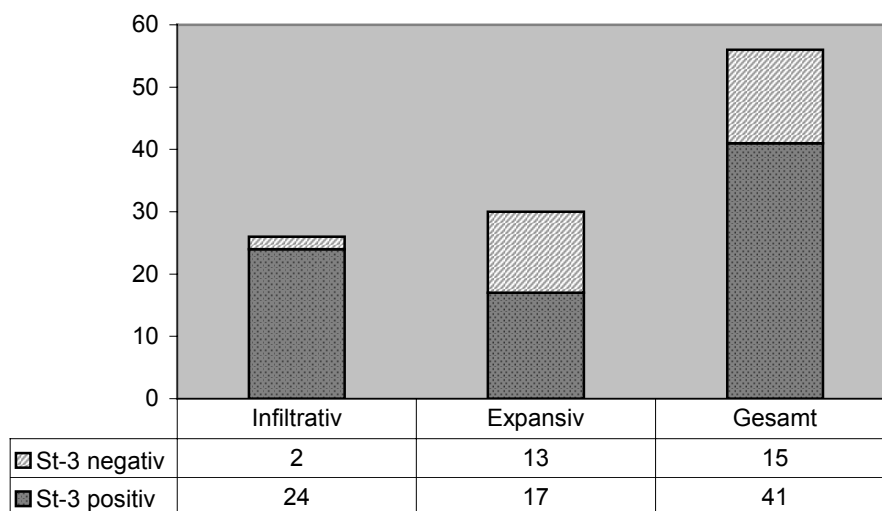


Abbildung 17: HE Schnitt eines invasiven Urothelkarzinoms mit infiltrierendem Invasionsmuster. Man sieht viele kleine zerstreute Tumorzellnester innerhalb der glatten Muskelzellen.



Graph 5: Vergleich der unterschiedlichen Invasionsmuster mit der Stromelysin-3 Expression bei invasiven Urothelkarzinomen.

Keine signifikante Korrelation konnte zwischen der UICC pT Kategorie und der Stromelysin-3 Expression gefunden werden, obwohl alle der 10 pT3, oder pT4 Tumoren eine Stromelysin-3 Expression zeigten, so daß eine deutliche Differenz der

pT1-2 zu den pT3-4 Tumoren auffiel (Chi square, Fisher's exact test, two-tailed, $p = 0,048$).

Die Charakterisierung der Stärke der Stromelysin-3 Expression (fokal, mittelstark, stark), zeigte keine statistisch signifikante Korrelation zu einer der untersuchten histopathologischen Parameter.

9. Diskussion

9.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Das Ziel dieser Untersuchung war, die Expression von Stromelysin-3 in verschiedenen Harnblasentumoren zu untersuchen. Hierbei wurde Stromelysin-3 nicht im Tumorgewebe, sondern ausschließlich in den angrenzenden Fibroblasten nachgewiesen. Dies steht in guter Übereinstimmung zu anderen Studien (Basset et al., 1990; Escot et al., 1996).

Im Rahmen dieser Studie konnte nachgewiesen werden, daß die Exprimierung der mRNA von Stromelysin-3 die Synthese des Proteins Stromelysin-3 zur Folge hatte. Hierbei war die mRNA an denselben Stellen und in ähnlicher Konzentration zu finden wie das Protein Stromelysin-3. Das Protein konnte nur intrazellulär detektiert werden.

Hauptaufgabe dieser Studie war es, die Expression von Stromelysin-3 in drei Typen von Harnblasenkarzinomen, den invasiven Karzinomen, den nicht-invasiven papillomatösen Urothelkarzinomen und den Karzinoma in situ, zu vergleichen.

Als Ergebnis der immunhistochemischen Untersuchung an 56 invasiven Karzinomen, konnte Stromelysin-3 in 73,2% der Fälle nachgewiesen werden.

Erstaunlicherweise waren 14,8% der 27 oberflächlichen papillomatösen Harnblasenkarzinomen Stromelysin-3 positiv. Dagegen konnte Stromelysin-3 bei keinem der 27 Karzinoma in situ der Harnblase dedektiert werden.

Bei den invasiven Harnblasenkarzinomen konnte keine Korrelation zwischen dem Differenzierungsgrad und der Eindringtiefe des Tumors und der Stromelysin-3 Expression gefunden werden. Dagegen konnte aber ein Zusammenhang zwischen der Stromelysin-3 Expression und der Lymphgefäßinvasion und dem Invasionsmuster hergestellt werden.

9.2 Begründung der Ergebnisse

9.2.1 Verhältnis des Proteins Stromelysin-3 zur mRNA

Ein interessantes Ergebnis dieser Untersuchung war, daß bei der In situ-Hybridisierung die mRNA für Stromelysin-3 an denselben Stellen zu finden war, wie das Protein Stromelysin-3 in der Immunhistochemie, nämlich nur intrazellulär. Da das Protein Stromelysin-3 von Fibroblasten synthetisiert und normalerweise, wie in der Einleitung Kapitel 5.1 beschrieben, ins umliegende Stroma sezerniert wird, wäre anzunehmen, daß das Protein Stromelysin-3 nicht in den Fibroblasten, sondern im umliegenden Stroma zu finden ist. Bei dieser Untersuchung konnte das nicht-Vorhandensein des Proteins Stromelysin-3 im freien Stroma, dagegen aber innerhalb der Fibroblasten, noch nicht geklärt werden. Es wäre allerdings vorstellbar, daß Stromelysin-3 in aktiver Form sezerniert wird, innerhalb des Stromas jedoch schnell proteolytisch verändert oder inaktiviert wird. Somit würde es ständig nachgebildet werden, was die gleichzeitig hohe intrazelluläre Konzentration der mRNA und des Proteins Stromelysin-3 erklären könnte.

9.2.2 Stromelysin-3 bei invasiven Harnblasenkarzinomen

Wie bereits in der Einleitung in Kapitel 5.3 beschreiben, konnte Stromelysin-3 in fast allen menschlichen invasiven Karzinomen nachgewiesen werden (Rouyer et al., 1995). Aufgrund dieser Studien wurde auch bei dieser Untersuchung eine positive Reaktion für Stromelysin-3 bei invasiven Harnblasenkarzinomen erwartet, welche mit 73,2% Stromelysin-3 positiver Fälle auch erfüllt wurde. Andererseits wiesen zwar eine Vielzahl, jedoch nicht alle invasiven Harnblasenkarzinome eine Stromelysin-3 Expression auf, was zeigt, daß Stromelysin-3, zumindest in den detektierbaren Leveln nicht immer in den Prozeß der Invasion bei Harnblasenkarzinomen involviert ist.

Weiterhin konnten in früheren Studien, die höchsten Stromelysin-3 Konzentrationen, bei stark invasiv und lokal sehr aggressiv wachsenden Karzinomen gefunden werden (Basset et al., 1993). Somit wurde eine positive Relation zwischen der Invasionstiefe des Tumors und der Stärke der Stromelysin-3 Expression erwartet. In dieser Studie konnte zwar keine signifikante Korrelation gefunden werden, jedoch zeigte sich eine deutliche Differenz der pT1-2 zu den pT3-4 Karzinomen.

Dagegen zeigt die Stromelysin-3 Expression, wie auch schon bei den Kolonkarzinomen beschrieben (Mueller et al., 1995), eine positive Relation mit dem Invasionsmuster. Höchstwahrscheinlich spielt Stromelysin-3 bei der Stromadegradierung einzelner Tumorzellen eine Rolle, welche nötig ist, um einzelnen Zellen oder kleinen Zellgruppen die Verteilung ins Stroma zu ermöglichen. Hingegen bedienen sich große Zellansammlungen invasiver Tumore mit breiten, expansiven Invasionsfronten wohl anderer Invasionsmechanismen, und damit anderer Faktoren und Proteasen als Stromelysin-3. Der Unterschied der Invasionsmuster von Tumoren ist vom histopathologischen Gesichtspunkt aus sehr interessant, es konnte z.B. gezeigt werden, daß Magenkarzinome mit überwiegend infiltrierendem Wachstumsmuster eine signifikant schlechtere Prognose aufwiesen (Gabbert et al., 1992). Trotz allem ist die Molekularbiologie und im speziellen die Rolle der verschiedenen Proteasen und ihrer Inhibitoren bei der Entstehung dieser morphologischer Muster ein sehr komplexes Gebiet welches bisher nur teilweise erforscht ist.

Ein weiterer interessanter Aspekt war die Tatsache, daß die Stromelysin-3 Expression eine deutliche Korrelation mit der Lymphgefäßinvasion aufweist, ein Faktor von dem man weiß, daß er ein Indikator für eine schlechte Prognose beim Harnblasenkarzinomen ist, da die Lymphgefäßinvasion mit Lymphknoten- und Fernmetastasen assoziiert ist.

Nach diesen Ergebnissen kann vermutet werden, daß Stromelysin-3 möglicherweise einen Indikator für aggressivere und damit prognostisch ungünstigere Harnblasenkarzinome darstellt.

9.2.3 Stromelysin-3 bei nicht-invasiven Harnblasenkarzinomen

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, entwickeln sich etwa 10% der oberflächlichen papillomatösen Harnblasenkarzinome im Laufe der Zeit zu invasiven Harnblasenkarzinomen (Kroft and Oyasu, 1994). Nachdem Stromelysin-3 zu der Gruppe der Matrix-metalloproteinasen gehört, welche eine entscheidende Rolle beim Prozeß der Tumordinvasion spielen und eine Stromelysin-3 Expression auch bei frühinvasiven Karzinomen beschrieben wurde (Basset et al., 1990; Basset et al., 1993), könnte man eine positive Stromelysin-3 Expression in etwa 10% dieser Fälle erwarten. Dabei muß allerdings beachtet werden, daß zwar 10% der Patienten mit Papillomen im Laufe ihres Lebens ein invasives Karzinom entwickeln werden, aber nicht 10% aller Papillome zur Zeit der Biopsie im Begriff stehen, invasiv zu werden und somit Proteasen wie Stromelysin-3 exprimieren. Ein nicht-invasives papillomatöses Urothelkarzinom das irgendwann zu einem invasiven Urothelkarzinom wird, exprimiert nicht von Anfang an Proteasen. Stromelysin-3 könnte zwar ein Marker für Invasion sein, bevor morphologische Veränderungen unter dem Mikroskop sichtbar werden, allerdings nur in dem relativ begrenzten Zeitrahmen, in dem Stromelysin-3 sezerniert wird. Nachdem die Tumorentwicklung nicht de novo geschieht, sondern in mehreren Schritten, entwickelt sich aus gesundem Harnblasengewebe aufgrund von Mutationen erst eine präneoplastische Läsion, in diesem Falle ein oberflächliches Papillom, und durch weitere Anhäufung bestimmter genetischer Defekte ein invasives Karzinom (Riede and Schaefer, 1995). Einige Autoren gehen davon aus, daß für oberflächliche papillomatöse Harnblasenkarzinome vor allem Chromosom 9 Mutationen verantwortlich sind, und erst eine weitere Mutation des p53 Tumorsuppressorgens ein nicht-invasives papillomatöses Urothelkarzinom zu einem invasiven Karzinom werden läßt (Ozen, 1995). Es gibt jedoch noch eine Reihe weiterer Faktoren die bei der Entwicklung der Harnblasenkarzinome eine Rolle spielen, wie bereits teilweise in der Einleitung, Kapitel 4.1 beschrieben.

Für die Karzinoma in situ der Harnblase gilt ähnliches wie für die oberflächlichen papillomatösen Harnblasenkarzinome. Auch hier würde Stromelysin-3 nur kurze Zeit

exprimiert werden, was die Wahrscheinlichkeit Stromelysin-3 positive Tumoren zum Zeitpunkt der Biopsie zu erwischen gering werden läßt. Allerdings progressieren die Karzinoma in situ in etwa zwei dritteln der Fälle zu invasiven Karzinomen (Ozen, 1995). Aus diesem Grund erwartet man bei den Karzinoma in situ eine höhere Prozentrate Stromelysin-3 positiver Fälle als bei den oberflächlichen Urothelpapillomen. Weiterhin wurde in einer Studie herausgefunden, daß Stromelysin-3 v.a. in den Karzinoma in situ zu finden ist, die ein besonders hohes Invasionsrisiko aufweisen (Basset et al., 1993). Dies könnte weiter für eine prognostische Bedeutung von Stromelysin-3 bei Karzinoma in situ sprechen.

Aufgrund dieses Hintergrundes war die Stromelysin-3 Expression bei 14,8% (4 von 27) der oberflächlichen papillomatösen Harnblasenkarzinome, dagegen bei keinem der Karzinoma in situ, sehr überraschend.

Allerdings ist es vielleicht doch möglich, daß bei den wenigen oberflächlichen papillomatösen Harnblasenkarzinomen bei denen Stromelysin-3 exprimiert wurde, Stromelysin-3 ein Marker für die ersten Phasen der Invasion ist. Auch die fokale Verteilung von Stromelysin-3 im Gewebe der oberflächlichen papillomatösen Harnblasenkarzinome spricht eher für eine spezifische Reaktion wie sie bei einer beginnenden Invasion zu erwarten wäre.

Nachdem das Urothel von wellenartiger Beschaffenheit ist, ist die Wahrscheinlichkeit, daß das Epithel bei der Histologie tangential geschnitten wird, groß, was zu dem altbekannten Problem, der Unterscheidung zwischen invasiven Tumorinseln und Artefakten von gesundem Epithel führt. In einem Fall einer pTa Läsion die Stromelysin-3 Expression zeigte, bestand aufgrund des HE-Schnittes der Verdacht einer Invasion. Aber auch nach zahlreichen Schnitten konnte dieser Verdacht nicht bewiesen werden. Es ist durchaus möglich daß in Fällen von oberflächlichen papillomatösen Harnblasentumoren bei denen der Verdacht einer Invasion besteht, Stromelysin-3 als ein geeigneter Marker fungieren könnte. Dies ist selbstverständlich von entscheidender Bedeutung, da invasive papillomatöse Harnblasenkarzinome (pT1) ein geringes metastasierendes Potential aufweisen, während nicht-invasive Tumore als nicht metastasierend angesehen werden.

Andererseits spricht die Statistik gegen eine Eignung von Stromelysin-3 als Tumormarker bei nicht-invasiven Harnblasenkarzinomen. Geht man davon aus, daß

Stromelysin-3 als Protease während der Tumorzellinvasion fungiert und Karzinoma in situ in einem wesentlich höheren Prozentsatz zu invasiven Karzinomen werden als oberflächlichen Papillome, müßte sich das Ergebnis für die beiden nicht-invasiven Karzinome eher umgekehrt verhalten.

Die in der vorliegenden Untersuchung gefundenen Ergebnisse werfen nun die Frage auf, warum keines der Karzinoma in situ, deren Wahrscheinlichkeit relativ hoch ist invasiv zu werden, Stromelysin-3 exprimiert, dagegen aber 14,8% der oberflächlichen Papillome.

9.3 Stromelysin-3 bei Umbauvorgängen

Man kann versuchen das Nichtvorhandensein von Stromelysin-3 bei den Karzinoma in situ, dafür aber bei 14,8% der oberflächlichen Papillome anhand der folgenden Hypothese zu erklären.

Das Ergebnis könnte möglicherweise mit den morphologischen Unterschieden der Karzinoma in situ und der oberflächlichen Papillome erklärt werden. Das Stroma welches das Epithel der Karzinoma in situ und der oberflächlichen papillomatösen Harnblasenkarzinome umgibt unterscheidet sich in der Art und Weise, daß das Stroma bei den Karzinoma in situ nicht direkt am Tumoraufbau beteiligt ist, sondern schon vor der Entstehung dieser Läsion vorhanden war; bei den Karzinoma in situ ist vor allem das Urothel pathologisch verändert. Bei den oberflächlichen Papillomen wird das Stroma dagegen als Teil des neoplastischen Prozesses neu gebildet und ist damit direkt am Tumoraufbau mitbeteiligt (Basset et al., 1990; Riede and Schaefer, 1995).

Diese Hypothese geht von einem weiteren Ansatzpunkt aus, dem Auftreten von Stromelysin-3 bei verschiedenen Formen der Degradierung. Wie bereits in der Einleitung, Kapitel 5.3 erwähnt wurde, fungiert Stromelysin-3 nicht nur bei der Tumorprogression als Protease, sondern spielt auch in gesundem Gewebe bei Umbauprozessen eine wichtige Rolle (Basset et al., 1993). Besonderes Interesse gilt hierbei dem Vergleich der Veränderungen der Extrazellulären Matrix bei Invasion und Metastasierung mit Veränderungen während physiologischer Umbauprozesse.

Eine mögliche Begründung des Ergebnisses wäre, für die Stromelysin-3 Expression nicht einen invasiven Prozeß, sondern Umbauvorgänge verantwortlich zu machen.

Im Folgenden soll auf die drei möglichen Erklärungen näher eingegangen werden.

9.3.1 Morphologische Unterschiede der Karzinoma in situ und der nicht-invasiven papillären Harnblasenneoplasien

Wie bereits in Kapitel 2.2.1 beschrieben stellen sich Karzinoma in situ morphologisch als flache Läsionen dar, die makroskopisch oft nur durch diskrete Schleimhautveränderungen auffallen (Cummings et al., 1992). Ihr Wachstumsmuster ist endophytisch. Das umgebende Gewebe kann normal aussehen, allerdings kann suburothelial auch eine ausgeprägte Angiogenese vorliegen (Catalona, 1991; Ro et al., 1992; Riede and Schaefer, 1995). Dies bedeutet, daß vor allem das Urothel pathologisch verändert ist.

Bei den exophytisch wachsenden oberflächlichen Papillomen verhält es sich dagegen anders. Bereits makroskopisch ist die papilläre Struktur des Tumors erkennbar. Histologisch zeigt sich dies durch eine papilläre Fältelung der Mukosa (Catalona, 1991). Dies bedeutet, daß bei den Papillomen nicht nur das Urothel für die Tumormorphologie verantwortlich ist, sondern auch das darunterliegende Stroma direkt am Tumoraufbau mitbeteiligt ist. Im Unterschied dazu ist das Stroma bei den Karzinoma in situ am Tumoraufbau relativ unbeteiligt.

Nachdem Stromelysin-3 nicht im Tumorgewebe selbst, sondern immer nur im umgebenden Stroma gefunden wurde (Basset et al., 1990), könnten diese morphologischen Unterschiede eine Erklärung für das Ergebnis geben. Weiterhin kann man sich überlegen welche Art von Stromaumbau für die Veränderungen des Stromas, wie sie bei den Papillomen zu sehen sind, verantwortlich ist. Hierbei stellt sich die Frage, ob die Stromelysin-3 Expression bei den Papillomen nicht das Resultat von Invasions- sondern von normalen Umbauprozessen des Stromas ist. Die Mechanismen des normalen Gewebeumbaus und der Invasion gleichen sich jedoch, was bei der Betrachtung der Veränderungen der extrazellulären Matrix deutlich zu erkennen ist.

9.3.2 Die Bedeutung von Stromelysin-3 für die Extrazelluläre Matrix

Die Extrazelluläre Matrix ist ein dichtes Netzwerk aus Kollagen- und Elastinfasern die in die Grundsubstanz, bestehend aus Proteoglykanen und Glykoproteinen, eingebettet sind. Sie fungiert als ein Stützgerüst, das Gewebekompartimente separiert, die zelluläre Proliferation, Differenzierung, Migration und Adhäsion beeinflusst und als ein selektiver makromolekularer Filter fungiert (Liotta, 1986; Matrisian, 1992). Es ist normalen Zellen nicht möglich von einem Gewebe durch das Stroma in ein anderes Gewebekompartiment zu gelangen. Die extrazelluläre Matrix wird nur bei Entzündungen, bei der Wundheilung und Neoplasien fokal für Zellen permeabel (Liotta, 1986). Die frühere Ansicht, die extrazelluläre Matrix wäre ein starres Gebilde ist inzwischen überholt. Man weiß heute, daß sie sich in einem Gleichgewicht zwischen Aufbau und Degradierung befindet. Wie bereits schon in der Einleitung, (Kapitel 4.2.2), angesprochen, ist diese kontrollierte physiologische Degradierung Aufgabe der Mitglieder der Matrix-Metalloproteinasen. Man geht davon aus, daß die Matrix-Metalloproteinasen die natürlichen, physiologischen Mediatoren der Matrix Degradierung sind (Stetler-Stevenson, 1996; Matrisian, 1992). Auch Stromelysin-3 konnte in Geweben in denen Umbauprozesse stattfinden in erhöhter Konzentration gefunden werden. So konnten hohe RNA Level von Stromelysin-3 in Embryonen, im Uterus, in der Placenta, und während der Entzündungsphase bei der Wundheilung gefunden werden (Basset et al., 1993). Zwar handelt es sich bei den Papillomen weder um eine Entzündung noch um eine Phase während der Wundheilung oder Embryogenese, aber es wurde von verschiedenen Autoren bereits die Ähnlichkeit dieser physiologischen Prozesse mit der Tumorentstehung und -morphologie beschreiben. Als ein Beispiel sind hier die Trophoblasten zu nennen, die zur Entwicklung der Placenta die Basalmembran und das Stroma des Endometriums penetrieren und in Blutgefäße eindringen um Anschluß an den mütterlichen Blutkreislauf zu bekommen. Zur Überwindung der Gewebeschränken bedienen sie sich der degradierenden Eigenschaften der Proteasen (Stetler-Stevenson et al., 1993; Mignatti and Rifkin, 1993). Fisher et al. (1989) zeigte, daß menschliche Cytotrophoblasten während des ersten Trimesters der Schwangerschaft einen

komplexen Satz an Matrixmetalloproteinasen synthetisieren, wie er von nicht-invasiven Zellen nicht sezerniert wird. Deshalb ähnelt auch das mikroskopische Bild einer Placenta dem eines Tumors.

Dvorak et al. beschreibt, daß Tumoren Veränderungen des Stromas bewirken, wie sie auch bei der Wundheilung auftreten, mit dem Unterschied, daß “Tumoren Wunden sind die nicht heilen” (Dvorak et al., 1986).

Der Unterschied zwischen Umbauvorgängen und den Prozessen während einer Tumorinvasion besteht im Kontrollverlust über die normale Degradierungsprozesse (Stetler-Stevenson et al., 1993). Dies zeigt sich auch dadurch, daß extrem hohe Level von Matrix-Metalloproteinasen, wie sie bei physiologischen Umbauprozessen nicht vorkommen, nur unter pathologischen Bedingungen, z.B. bei der Rheumatoider Arthritis und bei Krebs zu finden sind (Matrisian, 1992). Auch in dieser Untersuchung konnte bei der Mehrzahl der invasiven Karzinome eine sehr hohe Stromelysin-3 Expression festgestellt werden. Bei den oberflächlichen Papillomen waren die Stromelysin-3 Level dagegen allesamt sehr niedrig. In gesundem Gewebe wird die Aktivität der Matrix-Metalloproteinasen durch Aktivatoren wie Wachstumsfaktoren und Cytokine und durch Inhibitoren wie die TIMPs exakt koordiniert (Matrisian, 1992). Erst die unkontrollierte Aktivität der Matrix-Metalloproteinasen die die Balance zwischen Synthese und Degradierung zugunsten der Degradierung aus dem Gleichgewicht wirft, ist für die Invasion der natürlichen Gewebebarrieren verantwortlich und ermöglicht die Metastasierung der Tumorzellen (Stetler-Stevenson et al., 1993). Dieser Prozeß soll im nächsten Kapitel näher erläutert werden.

9.3.3 Stromelysin-3 bei Invasion und Metastasierung

Der Prozeß der Invasion und Metastasierung ist ein komplexer Vorgang der in mehrere Schritte eingeteilt werden kann. Von Bedeutung ist hierbei vor allem die Proteolyse der Gewebeschränken, aber auch angiogenetische und immunologische Vorgänge, unkontrollierte Proliferation durch Verlust der Wachstumsregulation,

Tumorzellbewegung und Neuformation im Zielorgan der Metastasierung spielen eine große Rolle (Liotta et al., 1991).

Zuerst ist für das Wachstum der Tumorzellen eine adäquate Vaskularisierung nötig. Ohne Sauerstoff- und Nährstoffdiffusion bleiben Tumoren dünne asymptomatische Läsionen. Vaskularisierte Tumoren können dagegen wachsen und metastasieren, da sie über die Blutgefäße einen Eintritt zum Rest des Körpers haben. Der hierfür nötige Prozeß der Endothelzellmigration ist auch mit einer Degradierung der endothelialen Basalmembran und der extrazellulären Matrix verbunden. In einigen Studien wurde herausgefunden, daß stimulierte Endothelzellen degradierende Proteinase sezernieren können und auf dieselbe Art und Weise in die extrazellulären Matrix eindringen, wie dies bei der Tumorzellinvasion der Fall ist. Stimuliert wird die Angiogenese durch Wachstumsfaktoren, z. B. basic FGF. Dieser hat drei verschiedene Wirkungen auf die Endothelzellen. Erstens bewirkt er die Motilität der Endothelzellen zu ihrem angiogenetischen Stimulus, zweitens die Proteolyse um in neues Gewebe einzudringen, und drittens die Proliferation um neue Gefäße zu bilden. Die Angiogenese bedient sich folglich der gleichen Methoden wie die Tumorzellinvasion (Liotta et al., 1991). Interessant ist, daß auch die Stromelysin-3 Expression, wie bereits in der Einleitung, Kapitel 4.3.3 beschrieben, am stärksten von basic FGF stimuliert wird und daß basic FGF auch von Karzinomzellen *in vitro* sezerniert wird (Basset et al., 1990). Weiterhin wurde herausgefunden, daß die Inhibitoren der Matrixmetalloproteinase, TIMP1 und TIMP2 antiangiogenetisch wirken und es wird angenommen daß Stromelysin-3 eine wichtige Rolle bei der Angiogenese spielen (Basset et al., 1994).

Weiterhin fällt auf, daß bei den Karzinoma *in situ* zwar eigentlich nur das Urothel pathologisch verändert ist, in einigen Fällen jedoch auch eine ausgeprägte suburotheliale Angiogenese beschrieben wird, die makroskopisch als Entzündung imponiert (Riede and Schaefer, 1995). Ein Ziel weiterer Untersuchungen wäre, herauszufinden ob die suburotheliale Angiogenese bei den Karzinoma *in situ* mit der Stromelysin-3 Expression positiv korreliert. Weiterhin muß überlegt werden, ob eine Angiogenese nicht doch schon für eine Stromamitbeteiligung spricht, jedoch nicht im Sinne von Umbauprozessen wie bei den Papillomen sondern als ersten

Schritt zur Tumorexpansion. In diesem Falle könnte man vielleicht schon allein aus der histopathologischen Untersuchung das Invasionsrisiko erkennen.

Nach der Angiogenese und dem damit verbundenen Wachstum des Tumors, müssen die Tumorzellen als nächsten Schritt zum Blut- und Lymphgefäßsystem gelangen. Da die Basalmembran und die extrazelluläre Matrix, wie bereits in der Einleitung, Kapitel 4.2 beschrieben, normalerweise für Zellen undurchlässig sind, müssen sich die Tumorzellen erst einen Weg durch diese Gewebe verschaffen. Diesen Prozeß hat Liotta (Liotta, 1986) in drei Schritte eingeteilt. Zuerst erfolgt die Bindung der Tumorzelle an die Oberflächenrezeptoren der Zellen, die Matrixbestandteile wie Laminin (Basalmembran) oder Fibronectin (Stroma) spezifisch binden. Als nächstes sezernieren die Tumorzellen hydrolysierende Enzyme oder induzieren die Wirtszellen zu dessen Sezernierung. Diese Enzyme führen zur Lyse der Kontaktstelle und zur Degradierung der Matrix. Meist findet diese Lyse in der unmittelbaren Umgebung der Tumorzellen statt. Auf diese Lyse hin erfolgt dann die Bewegung der Tumorzellen in Richtung der proteolytisch veränderten Matrix (Liotta, 1986). Auch in dieser Studie konnte bei der Mehrzahl der invasiven Karzinome (73%) die Protease Stromelysin-3 dedektiert werden. Stromelysin-3 wurde hier ebenfalls nur in den Fibroblasten, die in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Karzinomzellen lagen, gefunden.

Nach erfolgter Invasion der Basalmembran und der extrazellulären Matrix, müssen die Tumorzellen das Gewebe über das Blut- oder Lymphgefäßsystem verlassen. Hierbei gilt es, das mechanische Trauma des Blutstroms und die Immunabwehr zu überleben. Danach verlassen die Tumorzellen das Blut- oder Lymphgefäßsystem wieder, um dann in einem Gewebe, das sich von ihrem Ursprungsgewebe unterscheidet, einzudringen und in diesem zu wachsen (Liotta et al., 1983; Liotta et al., 1986; Liotta et al., 1991; Aznavoorian et al., 1993). Nur einem sehr kleiner Prozentsatz der zirkulierenden Tumorzellen (<0.01%) gelingt es jedoch zu Metastasen zu werden (Stetler-Stevenson et al., 1990).

Diese Veränderungen des Stromas bei der Tumorinvasion und Metastasierung bewirken zum einen eine ausgeprägte Degradierung des Stromas. Zum anderen konnte aber auch die Synthese eines spezifischen Tumorstromas beobachtet werden. Alle Tumoren benötigen das Stroma um zu wachsen, das Stroma sorgt für die vaskuläre Versorgung welche der Tumor für seine Ernährung, den

Sauerstoffaustausch und den Abtransport von toxischen Metaboliten benötigt (Dvorak et al., 1986; Iozzo, 1995). Darauf soll im Folgenden näher eingegangen werden.

9.3.4 Die Bedeutung des Stromas für die Tumorzellen

Bei vielen Tumoren wird die Synthese eines spezifischen Tumorstromas beobachtet, welches eine Anhäufung bestimmter veränderter Matrixkomponenten aufweist. Dieses Tumorstroma kann das Tumorwachstum entweder behindern oder ihm förderlich sein. Bisher ging man von einer unspezifischen Reaktion der Wirtszellen aus, die mit Hilfe dieses veränderten Stromas den Tumor abzugrenzen versuchen und damit das Tumorwachstum negativ beeinflussen (Stetler-Stevenson, 1996).

Andererseits könnte ein spezifisches Tumorstroma dem Neoplasma von Vorteil sein, wenn es z. B. um die Ernährung und den Abtransport von toxischen Metaboliten geht. Ebenso könnten sich die Tumorzellen über die Veränderung der Stromazusammensetzung ein Milieu schaffen, welches ihr Wachstum fördert und die Invasion erleichtert (Iozzo, 1995).

Im Tumorstroma von Kolonkarzinomen wurde z.B. vor allem eine erhöhte Expression von Proteoglykanen, Fibronectin und Tenascin beobachtet und eine Veränderung von CD44 gefunden. Diese veränderte Synthese von extrazellulären Matrixkomponenten könnte dem Tumor die Metastisierung durch eine veränderte Adhäsion (CD44) oder die Tumorzellproliferation (Tenascin) erleichtern (Stetler-Stevenson, 1996). Basset et al. (1990) fand eine interessante Parallele zwischen der Expression des Gens von Tenascin und Stromelysin-3 bei Brustkrebs. Tenascin konnte regelmäßig im Stroma von Brustkrebsgewebe nachgewiesen werden, und scheint von Fibroblasten sezerniert zu werden. Basset et al. (1990) vermutet, daß Stromelysin-3 und Tenascin während der invasiven Phase bei Brustkrebs zusammen arbeiten.

MacDougall und Matrisian (1995) nehmen sogar an, daß Veränderungen der Gewebsarchitektur für die Induktion der Matrixmetalloproteinasen im Stroma von Tumoren verantwortlich sein könnten. So konnte Werb et al. zeigen, daß Veränderungen der Zellform und der zellulären Interaktionen der Integrine, die Produktion von intestinaler Kollagenase und Stromelysin induzieren können (MacDougall and Matrisian, 1995).

Dvorak beschreibt in seiner Studie die Ähnlichkeiten zwischen der Entstehung des Tumorstromas und der Wundheilung. Bei einigen Karzinomen, wie z.B. denen der Brust, kann das Tumorstroma über 90% der Tumormasse ausmachen. Dieses Tumorstroma ähnelt dem Granulationsgewebe welches bei der Wundheilung vorkommt. Zur Erzeugung dieses Stromas aktiviert der Tumor die Wundheilungsprozesse seines Wirtsgewebes. Zuerst sezernieren die Tumorzellen den "Vascular Permeability Faktor" welcher ein Plasmaleck der Blutgefäße bewirkt. Dabei ergießt sich Plasma in die extrazellulären Räume und löst damit die Gerinnungskaskade aus. Fibrinogen wird zu quervernetztem Fibrin. Als nächstes folgt die Fibrinolyse, das Fibrin-Fibronektin Gel wird in eine vaskularisierte kollagene Matrix umgewandelt. Dazu sezernieren die Tumorzellen die Protease Plasminogen-Aktivator welche Plasminogen zu Plasmin aktiviert und Fibrin spaltet. Es folgt die Tumorangiogenese und die Einwanderung und Vermehrung von Fibroblasten. Das Ergebnis ist ein zellreiches, hoch vaskularisiertes Gewebe, das dem Granulationsgewebe der Wundheilung stark ähnelt. Tumoren bedienen sich folglich der normalen Wundheilungsprozesse des Wirtes, um das Stroma zu erwerben, welches sie für ihr Wachstum benötigen (Dvorak et al., 1986).

Anhand dieses Beispiels wird deutlich, daß der große Unterschied zwischen Tumoren und physiologischen Prozessen des Körpers nicht in den Methoden liegt, derer sich die Tumoren bedienen, sondern im Kontrollverlust. Der "Wundheilungsprozeß" der Tumoren ist nicht selbstlimitiert, sondern findet kontinuierlich statt (Dvorak et al., 1986). Auch das Auftreten von Proteasen spricht noch nicht für ein malignes Geschehen, sondern erst deren unregulierte Aktivität und Zusammenspiel. So kommt bei der Wundheilung die Protease Plasminogen-Aktivator vor, welche selbst wiederum ein Aktivator für die Matrixmetalloproteinasen sein kann. Matrisian et al. (1990) konnte z.B. bei gutartigen Tumoren, wie benignen Papillomen entweder Plasminogen-Aktivator oder eine Matrixmetalloproteinase wie Stromelysin finden. Maligne Plattenepithelkarzinome exprimierten dagegen beides: matrixdegradierende Proteasen und deren Aktivatoren. Matrisian nimmt an, daß nur deren gemeinsames Auftreten eine Invasion der Basalmembran ermöglicht, was zur Mehrschritt-Theorie der Tumorprogression passen würde (Matrisian and Bowden, 1990). Dies verdeutlicht, daß das Auftreten von Stromelysin-3 noch nicht spezifisch für Invasionsvorgänge sein muß. Die Expression von Stromelysin-3 kann zwar einen

invasiven Prozeß oder eine beginnende Invasion aufzeigen, es kann sich jedoch auch um Umbauvorgänge handeln.

Zusammenfassend spricht in dieser Studie das Ergebnis der Stromelysin-3 Expression bei 14,8% der oberflächlichen Papillome und bei keinem der Karzinoma in situ nicht für einen Invasionsprozeß. Natürlich ist es letztendlich vielleicht doch möglich, daß bei den Stromelysin-3 positiven nicht-invasiven papillomatösen Harnblasenkarzinomen, Stromelysin-3 ein Marker für die ersten Phasen der Invasion ist, besonders, da in einem Fall einer solchen Läsion aufgrund des HE Schnittes der Verdacht einer Invasion bestand, welcher nicht sicher bewiesen werden konnte und auch das fokale Expressionsmuster von Stromelysin-3 für Umbauvorgänge untypisch ist. Andererseits spricht gegen die Eignung von Stromelysin-3 als Marker für Frühinvasion, daß die oberflächlichen Papillome wesentlich seltener zu invasiven Karzinomen werden, als die Karzinoma in situ. Dagegen kann das Auftreten von Stromelysin-3 bei den oberflächlichen Papillomen aufgrund ihrer morphologischen Unterschiede zu den Karzinoma in situ erklärt werden. Stromelysin-3 kommt nur im Stroma vor, welches bei den oberflächlichen Papillomen direkt am Tumoraufbau mitbeteiligt ist, bei den Karzinoma in situ jedoch kaum pathologisch verändert ist. Diese Stromamitbeteiligung am Tumoraufbau der Papillome setzt Umbauprozesse voraus, welche wiederum die Anwesenheit von Proteasen wie Stromelysin-3 erklären. Nachdem Stromelysin-3 auch bei normalen Umbauprozessen zu finden ist, und sich die Mechanismen der Tumorinvasion und der physiologischen Veränderungen des Stromas ähneln, kann das Auftreten von Stromelysin-3 bei den oberflächlichen Papillomen auf Stromaumbauvorgänge im Rahmen ihres normalen Tumoraufbaus zurückzuführen sein. Stromelysin-3 kann demnach bei den nicht-invasiven papillomatösen Harnblasenkarzinomen nicht als sicherer prognostischer Marker für Frühinvasion verwendet werden.

9.4 Ausblick

Im Rahmen dieser Studie wurden eine Reihe neuer Fragestellungen aufgezeigt. Um beispielsweise eine wirklich klare Antwort auf die Frage zu erhalten, inwieweit die Stromelysin-3 Expression bei nicht-invasiven papillären Harnblasenkarzinomen tatsächlich nur als Teil von Umbauvorgängen des Stromas zu verstehen ist, oder in einigen Fällen doch ein Marker für Frühinvasion ist, stehen noch weitere Forschungen aus. Es wäre beispielsweise interessant, Stromelysin-3 positive nicht-invasive papillomatöse Urothelkarzinome auf weitere prognostischen Marker, wie z.B. p53 Mutationen oder die Expression der Protease Plasminogen-Aktivator (uPA) (Einleitung, Kapitel, 4.1.1 und 4.2.2) hin zu untersuchen, um eine größere Aussage über die Wahrscheinlichkeit einer Frühinvasion zu erhalten.

Nachdem man bei Karzinoma in situ von einer nicht-Mitbeteiligung des Stromas ausgegangen ist, wäre es weiterhin interessant, Karzinoma in situ auf das Vorhandensein einer suburothelialen Angiogenese hin zu untersuchen. Da angenommen wird daß Matrixmetalloproteinasen bei der Tumorangio-genese eine Rolle spielen, wäre es von Interesse herauszufinden, ob bei den Karzinoma in situ die Stromelysin-3 Expression mit dem Vorhanden-, bzw. Nichtvorhandensein einer suburothelialen Angiogenese korreliert.

Auch auf dem Gebiet der invasiven Harnblasenkarzinome und der Stromelysin-3 Expression ist noch vieles im Unklaren. Zwar wies die Mehrzahl der invasiven Karzinome eine Stromelysin-3 Expression auf, jedoch nicht alle, was bedeutet daß Stromelysin-3 nicht immer an dem Prozeß der Invasion beteiligt sein muß. Es scheint folglich unterschiedliche Abläufe von Tumorzellinvasionen zu geben, die bisher noch nicht erforscht wurden. Auch das Ergebnis der Diskrepanz der Stromelysin-3 Expression zwischen den unterschiedlichen Wachstumsmustern deutet darauf hin. Hierbei wäre weiter zu untersuchen ob Stromelysin-3 für das infiltrative Wachstumsmuster mitverantwortlich ist und somit die Expression von Stromelysin-3 zu einer stärkeren Zellabsiedelung von Tumorzellen und möglicherweise auch zu einer schlechteren Prognose führt.

Viele Entdeckungen auf dem Gebiet der Proteasen und im speziellen der Stromelysin-3 Expression und ihrer Rolle bei der Stromadegradierung bei Umbauvorgängen und der Tumorinvasion stehen noch aus. Ist Stromelysin-3 zusammen mit anderen Faktoren daran beteiligt, ein spezifisches Tumorstroma zu schaffen, welches dem Neoplasma von Vorteil ist, oder ist Stromelysin-3 möglicherweise keine Protease die Matrixbestandteile degradiert, sondern die andere matrixdegradierende Proteasen inaktiviert und somit einen Eindämmungsversuch des Gewebes darstellt, welches sich gegen die Invasion wehrt. Diese Fragen zu klären, wäre noch Ziel weiterer Forschungen.

10. Zusammenfassung

In dieser Studie wurde die Expression von Stromelysin-3 bei invasiven und nicht-invasiven Urothelkarzinomen der Harnblase untersucht.

Stromelysin-3 wurde erstmals 1990 entdeckt und gehört zur Gruppe der Matrixmetalloproteinasen, von welchen man annimmt, daß sie bei der Degradierung der Extrazellulären Matrix eine wichtige Rolle spielen. Die genaue Substratspezifität für Stromelysin-3 ist bisher noch unbekannt. Stromelysin-3 konnte bei physiologischen Prozessen wie der Wundheilung und der Embryogenese gefunden werden. Daneben wurde die Expression von Stromelysin-3 bei einer Vielzahl von Karzinomen beschrieben.

Die Untersuchung der Stromelysin-3 Expression bei nicht-invasiven Urothelkarzinomen war von großem Interesse, da sowohl Karzinoma in situ der Harnblase wie auch nicht-invasive papilläre Urothelkarzinome präinvasive Läsionen sind, welche ein unvorhersagbares Potential haben, sich in ihrem Verlauf zu invasiven Karzinomen zu entwickeln. Hierbei haben die Karzinoma in situ eine höhere Wahrscheinlichkeit zu progressieren als die nicht-invasiven papillären Urothelkarzinome.

Ziel dieser Studie war es herauszufinden, ob Stromelysin-3 sich zur Identifizierung präinvasiver Läsionen mit einem hohen Risiko der späteren Invasion eignet, und als diagnostische Hilfe zur Früherkennung beginnender invasiver Vorgänge bei histologisch nicht eindeutigen oder noch nicht-invasiven Harnblasenkarzinomen fungieren könnte. Ein weiteres Ziel war, die Stromelysin-3 Expression bei bereits invasiven Harnblasenkarzinomen mit anderen histopathologischen Parametern und damit mit der Aggressivität der Tumore zu korrelieren.

In dieser Studie wurde die Stromelysin-3 Expression bei 56 invasiven Harnblasenkarzinomen, 27 Karzinoma in situ der Harnblase und 27 nicht-invasiven papillären Harnblasenkarzinomen immunhistochemisch untersucht. In ausgewählten Fällen wurde eine situ Hybridisierung durchgeführt.

In Übereinstimmung mit anderen Studien konnte Stromelysin-3 auch in dieser Studie nicht im Tumorgewebe, sondern nur in den angrenzenden Fibroblasten nachgewiesen

werden. Weiterhin konnte gezeigt werden daß die Expressierung der mRNA von Stromelysin-3 die Synthese des Proteins Stromelysin-3 zur Folge hatte. Bei den invasiven Harnblasenkarzinomen konnte Stromelysin-3 in 41 von 56 (73,2%) Fällen, bei den nicht-invasiven papillomatösen Harnblasenkarzinomen in 4 von 27 (14,8%) Fällen und bei den Karzinom in situ in keinem Fall nachgewiesen werden. Bei den invasiven Harnblasenkarzinomen zeigte sich eine deutliche Differenz der pT1-2 zu den pT3-4 Karzinomen und der Stromelysin-3 Expression ($p=0,048$). Ebenfalls konnte eine Korrelation zwischen der Stromelysin-3 Expression und der Lymphgefäßinvasion ($p=0,026$) und dem Invasionsmuster ($p=0,0027$) gesehen werden. Stromelysin-3 stellt somit möglicherweise einen Indikator für aggressivere und damit auch prognostisch ungünstigere Harnblasenkarzinome dar.

Bei den präinvasiven Harnblasenkarzinomen spricht das Ergebnis der Stromelysin-3 Expression bei 14,8% der oberflächlichen Papillome und bei keinem der Karzinoma in situ, gegen die Eignung von Stromelysin-3 als Indikator für Frühinvasion.

Letztendlich kann zwar nicht sicher ausgeschlossen werden, daß Stromelysin-3 im Falle der nicht-invasiven papillomatösen Harnblasenkarzinomen, nicht doch ein Marker für die ersten Phasen der Invasion ist. Allerdings spricht hiergegen die Statistik, da sich die nicht-invasiven papillären Urothelkarzinome mit etwa 10% wesentlich seltener zu invasiven Karzinomen entwickeln werden, als die zu etwa zwei dritteln progressierenden Karzinoma in situ. Dagegen kann das Auftreten von Stromelysin-3 bei den nicht-invasiven papillomatösen Harnblasenkarzinomen aufgrund ihrer morphologischen Unterschiede zu den Karzinoma in situ erklärt werden. Stromelysin-3 kommt nur im Stroma vor, welches bei den nicht-invasiven Papillomen direkt am Tumoraufbau mitbeteiligt ist, bei den Karzinoma in situ jedoch kaum pathologisch verändert ist. Diese Stromamitbeteiligung am Tumoraufbau der Papillome setzt Umbauprozesse voraus, welche wiederum die Anwesenheit von Proteasen wie Stromelysin-3 erklären könnte.

Damit könnte das Auftreten von Stromelysin-3 bei den nicht-invasiven papillomatösen Harnblasenkarzinomen auf Stromaumbauvorgänge im Rahmen ihres normalen Tumoraufbaus und nicht eines beginnenden Invasionsprozesses zurückzuführen sein. Dies bedeutet daß sich Stromelysin-3 nicht als sicherer Marker für Frühinvasion bei präneoplastischen Harnblasenkarzinomen eignet.

11. Literaturverzeichnis

Abel, P. D., D. Henderson, M. K. Bennett, R. R. Hall, and G. Williams. 1988. Differing interpretations by pathologists of the pT category and grade of transitional cell cancer of the bladder. *Br. J. Urol.* 62:339-342.

Abou Farha, K. M., R. A. Janknegt, A. D. Kester, and J. W. Arends. 1993. Value of immunohistochemical laminin staining in transitional cell carcinoma of human bladder. *Urol. Int.* 50:133-140.

Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J. D. Watson. 1989. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, Inc., New York.

Alken, P., and P. H. Walz. 1992. *Urologie*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, BRD.

Aznavoorian, S., A. N. Murphy, W. G. Stetler-Stevenson, and L. Liotta. 1993. Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis. *Cancer.* 71:1368-1383.

Basset, P., J. P. Bellocq, C. Wolf, I. Stoll, P. Hutin, J. M. Limacher, O. L. Podhajcer, M. P. Chenard, M. C. Rio, and P. Chambon. 1990. A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature.* 348:699-704.

Basset, P., C. Wolf, and P. Chambon. 1993. Expression of the stromelysin-3 gene in fibroblastic cells of invasive carcinomas of the breast and other human tissues: a review. *Breast Cancer Res. Treat.* 24:185-193.

Basset, P., C. Wolf, N. Rouyer, J.-P. Belloq, P. Chambon, and R. Chambon. 1994. Stromelysin-3 in Stromal Tissue as a Control Factor in Breast Cancer Behaviour. *Cancer.* 74:1045-1049.

Bodner, S.M., J.D. Minna, S.M. Jensen, D. D'Amico, D. Carbone, and T. Mitsudomi et al. 1992. Expression of mutant p53 proteins in lung cancer correlates with the class of p53 mutation. *Oncogene.* 7:743-749.

Bucher, O., and H. Wartenberg. 1989. *Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*. H. Huber Verlag, Goettingen.

Caliskan, M., L. N. Turkeri, B. Mansuroglu, G. Toktas, B. Aksoy, E. Unluer, and A. Akdas. 1997. Nuclear accumulation of mutant p53 protein: a possible predictor of failure of intravesical therapy in bladder cancer. *Br. J. Urol.* 79:373-377.

-
- Cancer, A. J. C. o. 1988. Manual for Staging of Cancer, Philadelphia. 193-195.
- Catalona, W. J. 1991. Bladder cancer. *Adult and pediatric urology*. 1:1135-1183.
- Crawford, E. D. 1996. Diagnosis and treatment of superficial bladder cancer: an update. *Semin. Urol. Oncol.* 14:1-9.
- Cummings, K. B., J. G. Barone, and W. S. Ward. 1992. Diagnosis and staging of bladder cancer. *Urol. Clin. North Am.* 19:455-465.
- Das, G., N. J. Buxton, and R. W. Glashan. 1985. Invasive potential of superficial bladder cancer. A study of the relative merits of predictive parameters. *Br. J. Urol.* 57:32-36.
- Dalbagni, G., G.T. Saez, M.R. Oliva, V.E. Reuter, J. Rosai, and W.R. Fair et al. 1993. P53 mutations in human bladder cancer: genotypic versus phenotypic patterns. *Carcinogenesis*. 34:110.
- Deutschland, A. B. K. i. 1997. Krebs in Deutschland Häufigkeiten und Trends, Saarbrücken.
- Dvorak, H., J. Flier, and L. Underhill. 1986. Tumors: Wounds that do not heal. *N. Engl. J. Med.* 315:1650-1659.
- El-Bokainy, M. N. 1983. The classification of carcinoma of the urinary bladder associated with schistosomiasis and metaplasia. *J. Urol.* 75:680.
- Epstein, J., M. Amin, V. Reuter, and F. Mostofi. 1998. The World Health Organization/International Society of Urological Pathology Consensus Classification of Urothelial (Transitional Cell) Neoplasms of the Urinary Bladder. *Am. J. Surg. Pathol.* 22:1435-1448.
- Escot, C., Y. Zhao, C. Puech, and H. Rochefort. 1996. Cellular localisation by in situ hybridisation of cathepsin D, stromelysin 3, and urokinase plasminogen activator RNAs in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 38:217-226.
- Fisher, S. J., T.-Y. Cui, L. Zhang, L. Hartman, K. Grahl, G.-Y. Zhang, J. Tarpey, and C. H. Damsky. 1989. Adhesive and degradative properties of human placental trophoblast cell in vitro. *J. Cell Biol.* 109.
- Gabbert, H. E., S. Meier, C. D. Gerharz, and G. Hommel. 1992. Tumor-cell dissociation at the invasion front: a new prognostic parameter in gastric cancer patients. *Int. J. Cancer.* 50:202-207.

-
- Gottesman, M. 1990. The role of proteases in cancer. *Semin. Cancer Biol.* 1:97-160.
- Griffiths, T. R., I. Brotherick, R. I. Bishop, M. D. White, D. M. McKenna, C. H. Horne, B. K. Shenton, D. E. Neal, and J. K. Mellon. 1996. Cell adhesion molecules in bladder cancer: soluble serum E-cadherin correlates with predictors of recurrence. *Br. J. Cancer.* 74:579-584.
- Hall, C. M., and C. P. Dinney. 1996. Radical cystectomy for stage T3b bladder cancer. *Semin. Urol. Oncol.* 14:73-80.
- Hall, R. R. 1997. Application of clinical trials to the care of patients with bladder cancer. *Eur. Urol.* 31 Suppl 1:42-46.
- Höfler, H., and J. Mueller. 1994. In Situ Hybridization in Pathology. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 78:124-135.
- Höfler, H., J. Mueller, and M. Werner. 1998. Principles of in situ hybridization. Oxford University Press, Oxford.
- Huben, R. P., and J. Gaeta. 1996. Pathology and its importance in evaluating outcome in patients with superficial bladder cancer. *Semin. Urol. Oncol.* 14:23-29.
- Hudson, M. A., and H. W. Herr. 1995. Carcinoma in situ of the bladder. *J. Urol.* 153:564-572.
- Iozzo, R. 1995. Tumor Stroma as a Regulator of Neoplastic Behavior. *Lab. Invest.* 73:157-160.
- Johnson, L. D., D. M. Hunt, K. Kim, and M. Nachtigal. 1996. Amplification of stromelysin-3 transcripts from carcinomas of the colon. *Hum. Pathol.* 27:964-967.
- Kroft, S., and R. Oyasu. 1994. Biology of Disease, Urinary Bladder Cancer: Mechanisms of Development and Progression. *Lab. Invest.* 71:158-174.
- Leitch, A. R., T. Schwarzacher, D. Jackson, and J. Leitch. 1994. In situ Hybridisierung. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Liebert, M., and J. Seigne. 1996. Characteristics of invasive bladder cancer: histological and molecular markers. *Semin. Urol. Oncol.* 14:62-72.
- Liotta, L. 1986. Tumor Invasion and Metastases-Role of the Extracellular Matrix: Rhoads Memorial Award Lecture. *Cancer Res.* 46:1-7.

-
- Liotta, L. A., R. N. Rao, and S. H. Barsky. 1983. Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab. Invest.* 49:636-649.
- Liotta, L. A., R. N. Rao, and Wewer. 1986. Biochemical interactions of tumor cells with the basement membrane. *Annu. Rev. Biochem.* 55:1037-1057.
- Liotta, L. A., P. S. Steeg, and W. G. Stetler-Stevenson. 1991. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell.* 64:327-336.
- MacDougall, J., and L. Matrisian. 1995. Contributions of tumor and stromal matrix metalloproteinases to tumor progression, invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 14:351-362.
- Matrisian, L. 1992. The Matrix-Degrading Metalloproteinases. *BioEssays.* 14:455-463.
- Matrisian, L., and T. Bowden. 1990. Stromelysin/transin and tumor progression. *Semin. Cancer Biol.* 1:107-115.
- Mignatti, P., and D. Rifkin. 1993. Biology and Biochemistry of Proteinases in Tumor Invasion. *Physiol. Rev.* 73.
- Morrison, A. S., J. E. Buring, and W. G. Verhoek. 1984. An international study of smoking and bladder cancer. *J. Urol.* 131:650-664.
- Mueller, J., E. Mueller, E. Arras, B. Bethke, M. Stolte, and H. Höfler. 1997. Stromelysin-3 expression in early (pT1) carcinomas and pseudoinvasive lesions of the colorectum. *Virchows Arch.* 430:213-219.
- Mueller, J., E. Mueller, B. Bethke, M. Stolte, and H. Höfler. 1995. Stromelysin-3 als Marker bei der Unterscheidung zwischen echter karzinomatöser und pseudotumoröser Invasion im kolorektalen Adenom. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 79:657.
- Muller, D., C. Wolf, J. Abecassis, R. Millon, A. Engelmann, G. Bronner, N. Rouyer, M.-C. Rio, M. Eber, G. Methlin, P. Chambon, and P. Basset. 1993. Increased stromelysin 3 gene expression is associated with increased local invasiveness in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Res.* 53:165-169.
- Orozco, R. E., A. A. Martin, and W. M. Murphy. 1994. Carcinoma in situ of the urinary bladder. Clues to host involvement in human carcinogenesis. *Cancer.* 74:115-122.
- Ozen, H. 1995. Recent studies in bladder cancer. *Curr. Opin. Oncol.* 7:297-302.

-
- Pei, D., G. Majmudar, and S. Weiss. 1994. Hydrolytic Interaction of a Breast Carcinoma Cell-derived Serpin by Human Stromelysin-3. *J. Biol. Chem.* 269:25849-25855.
- Pei, D., and S. Weiss. 1995. Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature.* 375:244-247.
- Pycha, A., C. Mian, A. Haitel, J. Hofbauer, H. Wiener, and M. Marberger. 1997. Fluorescence in situ hybridization identifies more aggressive types of primarily noninvasive (stage pTa) bladder cancer. *J. Urol.* 157:2116-2119.
- Raghavan, D., and R. Huben. 1995. Management of bladder cancer. *Curr. Probl. Cancer.* 19:1-64.
- Riede, U.-N., and H.-E. Schaefer. 1995. Allgemeine und Spezielle Pathologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Ro, J. Y., G. A. Staerckel, and A. G. Ayala. 1992. Cytologic and histologic features of superficial bladder cancer. *Urol. Clin. North Am.* 19:435-453.
- Rouyer, N., C. Wolf, M. P. Chenard, M. C. Rio, P. Chambon, J. P. Bellocq, and P. Basset. 1995. Stromelysin-3 gene expression in human cancer: an overview. *Invasion Metastasis.* 14:269-275.
- Sarkis, A. S., G. Dalbagni, and C. Cordon-Cardo. 1994. Association of p53 nuclear overexpression and tumour progression in carcinoma in situ of the bladder. *J. Urol.* 152:388-392.
- Sen, S. E., R. S. Malek, G. M. Farrow, and M. M. Lieber. 1985. Sarcoma and carcinosarcoma of the bladder in adults. *J. Urol.* 133:29-30.
- Silverman, D. T., P. Hartge, A. S. Morrison, and S. S. Devesa. 1992. Epidemiology of bladder cancer. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 3:421-428.
- Soloway, M. S. 1992. Diagnosis and management of superficial bladder cancer. *Semin. Surg. Oncol.* 5:247-254.
- Spruck, C. H. I., P. F. Ohneseit, M. Gonzales-Zulueta, D. Esrig, N. Miyao, Y. C. Tsai, S. P. Lerner, C. Schmutte, A. S. Yang, R. Cote, L. Dudeau, P. W. Nichols, G. G. Hermann, K. Steven, T. Horn, D. G. Skinner, and P. A. Jones. 1994. Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res.* 54:784-788.

-
- Stetler-Stevenson, W., S. Aznavoorian, and L. Liotta. 1993. Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9:541-573.
- Stetler-Stevenson, W. G. 1996. Dynamics of matrix turnover during pathologic remodeling of the extracellular matrix. *Am. J. Pathol.* 148:1345-1350.
- Stetler-Stevenson, W. G., P. D. Brown, M. Onisto, A. T. Levy, and L. A. Liotta. 1990. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP2) mRNA expression in tumor cell lines and human tumor tissues. *J. Biol. Chem.* 265:13933-13938.
- Taylor, C. R. 1978. Immunoperoxidase Techniques. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 102:113-122.
- Thomas, C. 1998. Histopathologie: Lehrbuch und Atlas zur allgemeinen und speziellen Pathologie. Schattauer, Stuttgart.
- von Anglard, P., T. Melot, E. Guerin, T. Gilles, and P. Basset. 1995. Structure and Promoter Characterisation of the Human Stromelysin-3 Gene. *J. Biol. Chem.* 35:20337-20344.
- Wagner, S. N., C. Ruhri, K. Kunth, B. U. Holecek, M. Goss, H. Höfler, and M. J. Atkinson. 1992. Expression of stromelysin-3 in the stromal elements of human basal cell carcinoma. *Diagn. Mol. Pathol.* 1:200-205.
- Wolf, C., M.-P. Chenard, P. Durand de Grossouvre, J.-P. Bellocq, P. Chambon, and P. Basset. 1992. Breast-cancer-associated stromelysin-3 gene is expressed in basal cell carcinoma and during cutaneous wound healing. *J. Invest. Dermatol.* 99:870-872.
- Wolf, C., N. Rouyer, Y. Lutz, C. Adida, M. Loriot, J.-P. Bellocq, P. Chambon, and P. Basset. 1993. Stromelysin 3 belongs to a subgroup of proteinases expressed in breast carcinoma fibroblastic cells and possibly implicated in tumor progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:1843-1847.