

Faktor VII aktivierende Protease (FSAP) in Normalgeweben und Tumoren des Urogenitalsystems

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Keil, Judith, geb. Kellert
aus Bielefeld
Gießen 2007

Aus dem Institut für Pathologie
des Medizinischen Zentrums für Pathologie
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Direktor: Prof. Dr. A. Schulz

Gutachter: Prof. Dr. A. Schulz

Gutachter: Prof. Dr. K.T. Preissner

Tag der Disputation: 14.01.2008

Meinen Eltern
Bärbel und Joachim Kellert

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	6
1.1 Vaskuläre Proteasen und ihre Rezeptoren	6
1.2 Faktor VII aktivierende Protease (FSAP)	8
1.3 Urologische Tumoren.....	13
1.3.1. Störungen der Hämostase bei Patienten mit malignen Tumoren.....	13
1.3.2. Epidemiologie, Immunhistochemie und Prognose der Nierenzell- karzinome	14
1.3.3. Klassifikation, Epidemiologie und Prognose der Hodentumoren	15
1.3.4. Epidemiologie, Ätiologie, Therapie und Prognose der Adeno- karzinome der Prostata.....	17
2. Fragestellung.....	19
3. Material und Methoden.....	20
3.1 Untersuchungsgut.....	20
3.1.1. Normalgewebe.....	20
3.1.2. Nierenzellkarzinome	20
3.1.3. Hodentumoren	22
3.1.4. Prostatakarzinome	24
3.2 Die primären Antikörper	25
3.3 Methoden.....	26
3.3.1. Vorbereitete Verfahren	26
3.3.2. Immunhistochemische Methode	26
3.3.3. Arbeitsanleitung	27
3.3.4. Auswertung der Präparate	28
4. Ergebnisse	29
4.1 Auswertungskriterien und Darstellung	29
4.2 Normalgewebe.....	30
4.3 Nierenzellkarzinome	37
4.4 Hodentumoren	40
4.5 Adenokarzinome der Prostata	44
5. Diskussion	47

5.1	Nachweis der Immunreaktivität von FSAP	47
5.2	Lokalisation, Funktion und Aktivierung von FSAP	47
5.3	Expression von FSAP im Tumorgewebe	50
6.	Zusammenfassung	52
6.1	Zusammenfassung	52
6.2	Abstract.....	53
7.	Literaturverzeichnis	55
8.	Anhang	65
8.1	Reagentien und Lösungsansätze	65
8.2	Abkürzungsverzeichnis	67
8.3	Erklärung	68
8.4	Lebenslauf	69
8.5	Danksagung.....	71

1. Einleitung

1.1 Vaskuläre Proteasen und ihre Rezeptoren

Das vaskuläre Endothel kleidet sämtliche Gefäße aller Organsysteme des menschlichen Körpers aus und spielt eine wesentliche Rolle als Grenzfläche zwischen Blut und dem umgebenden Gewebe. Die Schrankenfunktion des Endothels ist gegeben durch die Anwesenheit von membrangebundenen Rezeptoren für verschiedene Moleküle wie Proteine, fetttransportierende Moleküle, Metabolite und Hormone und auch durch spezifische junktionale Proteine und Rezeptoren, die Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen beherrschen. Es hat dynamisch regulierende Funktionen mit einem Repertoire an vasoregulatorischen Molekülen, verschiedenen Adhäsionsrezeptoren und Komponenten der Hämostase. Damit nimmt das Endothel teil an der Kontrolle der Vasomotorik von Entzündungsreaktionen und der Immunantwort und ist eingebunden in die Vorgänge der Angiogenese, Atherogenese und Thrombose. Das Endothel hat eine zentrale Bedeutung in der Regulierung des Blutflusses, u.a. durch die Produktion sowohl gerinnungsfördernder als auch gerinnungshemmender Substanzen und durch Sekretion und Aufnahme von vasoaktiven Substanzen, die zur Konstriktion und Dilatation der Gefäße führen (Cines et al.,1998; Böcker et al., 1997; Preissner et al., 2000).

Die luminale Seite der Endothelzellen ist fortwährend den unterschiedlichen mechanischen Belastungen des Blutstroms und den zirkulierenden Blutzellen ausgesetzt. Intaktes Endothel hat unter unveränderten physiologischen Bedingungen eine nichtthrombogene Wirkung. Diese wird aufrechterhalten durch spezifische endotheliale Rezeptoren, die die verschiedenen Proteasen binden, welche an Gerinnung und Fibrinolyse beteiligt sind wie Faktor VIIa und Faktor Xa, Thrombin und aktiviertes Protein C. Solche Rezeptoren sind z.B. Tissue factor (TF), Protease aktivierbare Rezeptoren, Thrombomodulin und Protein-C-Rezeptor. Sie sind z.T. auch auf Thrombozyten und Leukozyten exprimiert und an zellulären Hämostase- und Entzündungsreaktionen beteiligt. Des weiteren sind Rezeptoren für Plasminogen und Plasminogenaktivatoren vorhanden, die dazu dienen, fibrinolytische und proteolytische Ereignisse zu lokalisieren (Coughlin, 1999; Ruf et al.,1999; Esmon et al.1999; Preissner et al., 2000).

Ausser ihrer Funktion in der Hämostase haben einige an der Gerinnung beteiligte Proteasen, wie z.B. Faktor VIIa, Faktor Xa, Thrombin und Protein C, noch weitere Aufgaben, die die Zellen der Gefäßwand und anderer Organe und Gewebe, oder auch Tumorzellen betreffen. Diese Funktionen wurden entdeckt durch Versuche an Mäusen, denen der jeweilige Faktor fehlte (Knock-out-Mäuse), was zu pathologischen Symptomen oder zum Tod führte. Ähnliche Beobachtungen machte man bei der Deletion der entsprechenden Rezeptoren (Preissner et al., 2000).

Eine wichtige Rolle spielen Proteasen auch in der Gefäßwand bei pulmonalen und vaskulären Erkrankungen wie z.B. Arteriosklerose. Dort führen Reizungen des Gefäßendothels zu Veränderungen des Zellphänotyps, worauf eine gesteigerte Adhäsion und Infiltration von Leukozyten oder Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten folgt (Ross, 1993).

Durch Proteasesysteme, Adhäsionsmoleküle und Integrine wird der vaskuläre Gewebeumbau gefördert; insbesondere gehören dazu das **Plasminogenaktivator/Plasmin-System**, die Matrix-Metalloproteinasen (MMP) und Cysteinproteasen. Bei chronischer Gefäßwandbelastung und Schädigung (Hypertonus, Hypoxie, Hyperlipidämie) wird die Expression dieser Proteasen in den Zellen der Gefäßwand deutlich gesteigert (Clowes et al., 1990).

Urokinase scheint eine Schlüsselrolle zu spielen bei vaskulärer Wundheilung und arterieller Neointima Bildung. Man fand durch tierexperimentelle Untersuchungen heraus, dass bei uPA-knock-out-Tieren eine neointimale Hyperplasie verhindert wird. Man führt das auf die fehlende Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen und auf die reduzierte Zahl residenter Makrophagen zurück.

Das **Plasminogen-System** wird gebildet durch ein inaktives Proenzym, Plasminogen, das umgewandelt wird zu Plasmin durch zwei physiologische Plasminogenaktivatoren (PA), tissue-type PA (t-PA) und urokinase-type PA (u-PA). Sie werden kontrolliert durch Plasminogenaktivator-Inhibitoren (PAI), von denen PAI-1 physiologisch wahrscheinlich der bedeutendste ist. Während t-PA vor allem an der Gerinnselauflösung beteiligt und entscheidend für die Thrombolyse ist, ist u-PA, welcher an einen membran-gebundenen Rezeptor bindet, eingebunden in perizelluläre Proteolyse während Zellmigration und Gewebeumbau. Es wurde beobachtet, dass auch bei einem Mangel an Plasminogen die arterielle Neointima Bildung herabgesetzt ist, was darauf hin deutet, dass u-PA durch Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin wirkt (Carmeliet et al., 1999). Das im zirkulierenden Blut

vorhandene scu-PA oder Pro-Urokinase wird durch Plasmin oder Kallikrein in die aktive two-chain(tc)-Form umgewandelt. t-PA ist im Plasma nur in sehr geringen Konzentrationen vorhanden, ein hoher Anteil ist an Endothelzellen gebunden (Lee et al., 1999; Carmeliet et al., 1999; Greiling et al., 1995). Aktive Urokinase als herausragender extravaskulärer Plasminogenaktivator ist außerdem eingebunden in verschiedene Gewebeumbauprozesse und in die Pathologie von Gefäßerkrankungen (Pepper, 2001; Vassalli et al., 1991).

Es wurde an verschiedenen Beispielen belegt, dass eine Störung der proteolytischen Balance in der Gefäßwand ein entscheidender Faktor bei der Pathogenese arterieller Gefäßerkrankungen ist (Shi et al., 1999).

1.2 Faktor VII aktivierende Protease (FSAP)

Eine große Anzahl von proteolytischen Enzymen zirkuliert im Blut als Zymogene, die spezifisch aktiviert werden durch limitierte Proteolyse aufgrund einer Vielzahl von physiologischen Ereignissen. Am bekanntesten sind Proteasen, die in Gerinnung, Fibrinolyse und Komplementaktivierung eingebunden sind (Hunfeld et al., 1999). Obwohl die Mehrheit dieser und anderer Plasmaproteine in der Leber gebildet und metabolisiert werden, sind auch einige andere extrahepatische Zelltypen bekannt, die Gerinnungs- und Fibrinolysefaktoren exprimieren oder Zielgewebe für deren Aktivitäten darstellen (Knoblauch et al., 2002). 1996 wurde durch Adsorption an immobilisierte Hyaluronsäure eine neuartige Serin-Protease isoliert, die signifikante Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz mit „hepatocyte growth factor activator“ zeigte (Choi-Miura et al., 1996; Sumija et al., 1997).

Die Serin Protease HGF-Aktivator wurde aus menschlichem Serum isoliert. Sie besitzt strukturelle Ähnlichkeit zum Gerinnungsfaktor XII. HGF wird als inaktive single-chain-Form synthetisiert und abgesondert und dann durch endoproteolytische Prozesse zu einer heterodimeren Form aktiviert (Miyazawa et al., 1993). Aufgrund ihrer Eigenschaft an Hyaluronsäure zu binden, wurde jene Protease „Plasma Hyaluronan-Binding Protein (PHBP)“ genannt. Die Ergebnisse einer Northern blot Analyse deuten darauf hin, dass zumindest Leber, Niere, Skelettmuskulatur und Pankreas PHBP mRNA exprimieren (Choi-Miura et al., 1996). In der Maus wird PHBP nur in Leber und Niere produziert (Choi-Miura et al., 2001b; Hashimoto et al., 1997). Die Proteinstruktur von PHBP besteht im amino-terminalen Bereich aus drei

„Epidermal growth factor-like“-Domänen, gefolgt von einer Kringle-Domäne und der typischen Serin-Protease-Domäne. Obwohl diese Struktur mit in Gerinnung und Fibrinolyse eingebundenen Proteasen Gemeinsamkeiten hat, ist die genannte Abfolge der Gesamtstruktur der Protease bisher einzigartig. **Ein struktureller Vergleich des menschlichen PHBP-Gens mit den Genen von Gerinnungsfaktor XII, tPA und Urokinase zeigt, dass diese Gene viele signifikante Ähnlichkeiten haben (Römisch et al., 1999a; Römisch et al., 1999b; Choi-Miura et al., 1996; Sumiya et al., 1997).**

1998 wurde von einem Prothrombinkomplexkonzentrat aus humanem Plasma eine Protease präpariert, wobei ihre Eigenschaft an immobilisiertes Aprotinin zu binden, genutzt wurde. Sie reagierte besonders gut mit Thrombinspezifischen chromogenen Substraten, war aber nicht durch rekombinantes Hirudin hemmbar. Von dieser Gruppe wurde die Protease „plasma hyaluronan binding serine protease (PHBSP)“ genannt. Nach Isolierung und Sequenzierung der beiden erwähnten Proteasen wurde festgestellt, dass sie das gleiche Proenzym haben, bzw. identisch sind (Hunfeld et al., 1997; Hunfeld et al., 1999; Kannemeier et al., 2001). Desweiteren aktiviert diese Protease konzentrations- und zeitabhängig den Gerinnungsfaktor VII und zwar unabhängig von TF. Aufgrund dieser Eigenschaft wurde sie „**Faktor VII activating protease**“ (**FSAP**) genannt. Das Proenzym hat ein Molekulargewicht von 64 kDa und besteht aus 537 Aminosäuren. Eine Disulfidbrücke verbindet die aminoternale 45 kDa schwere Kette und 30 kDa leichte Kette, die die Protease-Domäne enthält. Bisher ist nur die aktive tc(two-chain)-Form aus dem Plasma isoliert worden, im Blut zirkuliert sie aber vorwiegend als sc(single-chain)-Zymogen (Kannemeier et al., 2001; Römisch et al., 1999, Römisch, 2002a). Der größte Anteil von FSAP zirkuliert im Blut als inaktives sc-Zymogen und nur eine Spur als aktive tc-Form (van't Veer et al., 2000).

Es wurde davon ausgegangen, dass Faktor VII keine Gerinnungsaktivität in Abwesenheit von TF hat (Bajaj et al., 1981). Der TF-Faktor-VII-Komplex bildet in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen an Phospholipiden einen Komplex, an dem die Faktor X-Aktivierung erfolgt (Greiling et al., 1995). Außerdem kann Faktor VII auch durch verschiedene andere Enzyme, wie Faktor XIIa, Faktor Xa, Faktor IXa und über eine Autoaktivierung durch Faktor VIIa in vitro aktiviert werden, letztere sehr abhängig von TF. Auch Hepsin kann Faktor VII aktivieren (Lee et al., 1999).

Autoaktivierung ist beschrieben worden für einige Plasma Serin Proteasen, gewöhnlich induziert durch geladene Oberflächen oder Co-Faktoren (Etscheid et al., 2000). Neben seiner Funktion als Hauptaktivator der Gerinnung in vivo kann der Faktor VII/TF Komplex noch andere biologische Abläufe beeinflussen, wie z.B. Angiogenese und Tumormetastasierung (Siegbahn, 2000).

Im Vergleich zu Kallikrein, Plasmin und FXIIa ist **FSAP der stärkste FVII-Aktivator im Plasma**. In Gegenwart von Ca^{2+} und Heparin wird die amidolytische Aktivität signifikant verstärkt. Aprotinin dagegen verhindert die Aktivität. Daneben sind C1-Inhibitor und Antiplasmin sehr effiziente Inhibitoren. Die gereinigten Faktoren VIII und V der Blutgerinnung werden von der Protease inaktiviert. In Gerinnungstests verkürzt FSAP die Rekalzifizierungs- und Thrombinzeit schon bei niedrigen Konzentrationen, die APTT jedoch kaum, was auf eine Beteiligung am extrinsischen Gerinnungsweg hindeutet (Römisch et al., 1999a; Römisch et al., 1999b).

Die Vollblut-Thrombelastographie in Gegenwart von Pro-Urokinase-Konzentrationen zeigte bei Gabe von FSAP eine vollständige Auflösung der entstandenen Fibringerinnsel. **Daher spielt FSAP möglicherweise auch in der Fibrinolyse eine Rolle**. Inkubation von scPAs mit FSAP zeigte eine potente Aktivierung von scuPA, wesentlich schwächere von sctPA. Es ist berichtet worden, dass sctPA und tctPA ähnliche Aktivitäten haben, während scuPA wenig Aktivität zeigte und tcuPA voll aktiv war. Für Prourokinase war FSAP ein stärkerer Aktivator als Kallikrein, jedoch schwächer als Plasmin. Für tPA lag es von den genannten Aktivatoren an letzter Stelle. Die Erzeugung von tcPAs wurde beschleunigt durch Zugabe von Ca und Heparin. **Dass FSAP sowohl prokoagulatorisch durch die FVII-Aktivierung als auch fibrinolytisch über scuPA Aktivierung wirkt, deutet auf eine duale Rolle im Gerinnungs- und Fibrinolyssystem hin.**

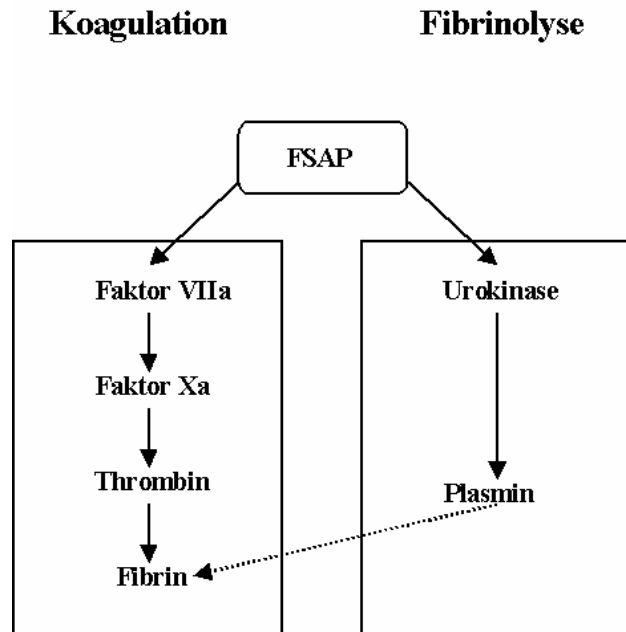


Abb.1: Duale Rolle der „Faktor VII-aktivierenden Protease (FSAP)“ in der Hämostase

Eine direkte Aktivierung von Plasminogenen durch FSAP wurde nicht beobachtet und auch Prothrombin wurde nicht gespalten, aber bindende Eigenschaften von FSAP an Fibrin wurden nachgewiesen. Fibrinogen und Fibronectin sind weitere Substrate von PHBP. Wegen seiner hohen Affinität zu Heparin wird angenommen, dass es eine Funktion an der Zelloberfläche oder der ECM hat; seine Eigenschaft, scuPA zu spalten, weist vielleicht darauf hin, dass es in zellassoziierte Ereignisse eingebunden ist, wie für gebundene Urokinase beobachtet wurde. Ob der Protease eine physiologische Rolle bei der Initiierung der Fibrinolyse zukommt, ist noch spekulativ, allerdings gibt es Studien, deren Ergebnisse die Hypothese unterstützen, dass FSAP zum fibrinolytischen Potential des Plasmas beiträgt (Choi-Miura et al., 2001a; Römisch et al., 1999b; Römisch et al., 1999c; Römisch et al., 2002b; Vassalli et al., 1991). **Die Plasmakonzentration von FSAP beträgt 12 µg/ml in gesunden Probanden, wobei unbekannt ist, wie die Verteilung im Körper aussieht.** Frauen haben leicht höhere Protease-Antigen-Level und deutlich höhere Aktivitätslevel als Männer. Das Alter hat keinen Effekt auf die Aktivität, während 10% der getesteten Plasmaproben von gesunden Blutspender eine signifikant reduzierte FSAP-Aktivität zeigten. Die DNA-Analyse offenbarte einen bestimmten „single nucleotide

polymorphism (SNP)“ von FSAP, was zu einem Austausch von Aminosäuren führte, der mit einer reduzierten Aktivität korrelierte. Diese Mutation wurde FSAP Marburg I genannt. Es wird angenommen, dass die veränderte Aminosäuresequenz die Interaktion von FSAP mit Prourokinase beeinflusst. Die FVII-Aktivierung war nicht betroffen. FSAP-Mangel-Plasma zeigte signifikant verlängerte Lyse-Zeiten von Gerinnseln, aber durch Zugabe von gereinigtem FSAP plus scuPA wurde der Effekt aufgehoben (Römisch et al., 2001; Römisch et al., 2002b).

Die Aktivatoren des Proenzym konnten bisher nicht identifiziert werden. Unter sonst identischen Bedingungen während des Reinigungsprozesses konnte der sc-Vorläufer dargestellt werden, wenn Harnstoff mit enthalten war. Die Zymogen-Form wandelte sich schnell in die aktive Form um, wobei die spontane Aktivierung abhängig ist von der Proenzymkonzentration.

Die Ergebnisse von Vorinkubationsexperimenten des FSAP lassen darauf schließen, dass die sc-Form ein Vorläufer ist, die zwei-Untereinheiten Struktur eine aktive Form ist, und die drei- oder vier-Ketten Struktur eine inaktive Form ist (Kannemeier et al., 2001; Choi-Miura et al., 2001d; Etscheid et al., 2000).

Die Reinigung des Proenzym vom Plasma offenbarte, dass die Protease einer autokatalytischen Aktivierung unterliegt (Kannemeier et al., 2001; Etscheid et al., 2002). Die Daten lassen vermuten, dass die Autoaktivierung von FSAP während der Plasmafraktionierung induziert wird durch die Abnahme der Inhibitoren und beschleunigt durch geladene Oberflächen des chromatographischen Harzes erfolgt. Außerdem wird die Autoaktivierung in vitro verstärkt durch geladene Moleküle, wie Heparin, Dextran, Sulfat oder Poly-L-Lysin, während Ca^{2+} die sc-Form stabilisiert und die Autoaktivierung verlangsamt (Kannemeier et al., 2001; Etscheid et al., 2000). Von verschiedenen getesteten Proteasen war nur Urokinase in der Lage t-FSAP zu generieren. Möglicherweise wird die katalytische Aktivität von Pro-Urokinase/uPA gebraucht, um sc-FSAP zu aktivieren. Der Mechanismus der Autoaktivierung/ Erniedrigung von FSAP steht eventuell in Beziehung zu einer positiven Verstärkung im Hinblick auf scuPA Aktivierung und Aktion. Über Autoaktivierung von anderen Proteinen, wie z.B. Trypsinogen, Komplement C1 und Gerinnungsfaktor XI in vitro, wurde berichtet (Kannemeier et al., 2001).

Es ist kaum bekannt, ob und wie die Aktivität von FSAP in vivo kontrolliert wird. Eine Gruppe berichtete, dass Hemmungs- und Aktivierungsmechanismen denen von Faktor XII ähnlich sind. Andere neuere Studien ließen vermuten, dass das

menschliche vaskuläre Endothel FSAP aktivieren kann, was zu nachfolgenden Ereignissen in Gerinnung und Fibrinolyse führt (Choi-Miura et al., 2001c; Nakazawa et al., 2002). Weiterhin zeigten andere Versuche, dass FSAP die platelet-derived growth factor BB-vermittelte Proliferation und Migration von vaskulären glatten Muskelzellen hemmt (Kannemeier et al., 2004).

1.3 Urologische Tumoren

1.3.1. Störungen der Hämostase bei Patienten mit malignen Tumoren

Patienten mit malignen Tumoren haben eine wesentlich höhere Inzidenz thrombembolischer Störungen, bekannt als Trousseau Syndrom (Callander et al., 1992). Die genaue Ätiologie des Trousseau Syndroms ist noch nicht geklärt. Über Assoziationen von Patienten mit einem Nierenzellkarzinom (NZK) oder einem Prostatakarzinom und einem prothrombotischen Status wurde selten berichtet (Sánchez-Ortiz et al., 1998; Rodriguez et al., 2000; Fischer et al., 1996). Das NZK und das Prostatakarzinom werden assoziiert mit Störungen der Hämostase. Eine abnormale Produktion von TF wurde vermutet (Callander et al., 1992; Rao, 1992; Rodriguez et al., 2000). Eine neuere Untersuchung brachte die schlechtere Oxygenierung von soliden Tumoren mit der erhöhten Expression von Gerinnungsfaktoren in Zusammenhang (Denko et al., 2001). Aber auch für viele andere Malignome wie z.B. das Endometriumkarzinom (Taponeco et al., 2001), Tumoren des Gastrointestinaltraktes (Sier et al., 1993; Marutsuka et al., 1991) und das maligne Melanom (Wojtukiewicz et al., 1990), wurden in einer Vielzahl von Studien ein Zusammenhang mit Komponenten der Plasminogen-Aktivierungskaskade und der Hämostase aufgezeigt. Von allen malignen urologischen Tumoren treten beim NZK am häufigsten paraneoplastische Syndrome auf (Sánchez-Ortiz et al., 1998). Verschiedene Untersuchungen zeigten erhöhte Werte von Faktor VII, z.T. auch Faktor X im Tumorgewebe bei NZK. Die Faktoren VII und X wurden nachgewiesen in den interzellulären Räumen im Tumorgewebe, angrenzend an die Oberfläche der Tumorzellen (Callander et al., 1992; Zacharski et al., 1986).

Auch beim Prostatakarzinom wurde von Gerinnungsstörungen im Zusammenhang mit Faktor VII berichtet (Adamson et al., 1994; van Deijk et al., 1983). Studien haben

gezeigt, dass die Plasmaspiegel von TF und uPA bei Patienten mit malignen Tumoren signifikant höher liegen als bei Patienten mit benignen Tumoren oder Kontrollgruppen (Zhao et al., 2002).

1.3.2. Epidemiologie, Immunhistochemie und Prognose der Nierenzellkarzinome

Das Nierenzellkarzinom ist der häufigste maligne Tumor der Niere und macht 3% aller maligner Tumorerkrankungen des Erwachsenen aus. Der Tumor wird in allen ethnischen Volksgruppen und allen geographischen Regionen gefunden. Es gibt keine Prädisposition einer Rasse. Männer sind häufiger betroffen als Frauen (1.6:1). Meistens tritt das NZK bei Erwachsenen auf, aber es wurde auch schon bei Kindern beobachtet. Die Inzidenz steigt mit fortschreitendem Alter, der Höhepunkt liegt im sechsten Lebensjahrzehnt. Ätiologie und Histogenese des NZK sind unklar. Zytogenetische Studien haben gezeigt, dass die meisten Tumoren übereinstimmende chromosomale Abnormalitäten aufweisen. NZK sind gelegentlich assoziiert mit anderen renalen Erkrankungen. Sowohl bei erworbenen als auch bei hereditären polyzystischen Erkrankungen kommt es vor und bei 38 bis 55 Prozent der Patienten mit Hippel-Landau Syndrom tritt es auf. Familiäre Fälle sind selten und Erbllichkeit scheint kein wesentlicher Faktor zu sein.

Die häufigste Variante ist mit 70% aller NZK der klarzellige Typ, 10-15% der Fälle sind vom chromophilen Typ und 5% vom chromophoben. Das NZK vom sarkomatoiden Typ ist eine besonders wenig differenzierte, anaplastische Variante und macht 1.5 % der Fälle aus.

Das immunhistologisch vorherrschende Charakteristikum der klarzelligen und chromophilen NZK ist die Koexpression von zylinderepitheltypischen Keratinen und Vimentin, wobei mit zunehmender Entdifferenzierung Vimentin verstärkt exprimiert wird. Der positive Nachweis der Lektine DBA und SBA kann differentialdiagnostisch genutzt werden, der Antikörper RCC 38 färbt selektiv chromophile Tumorzellen an. Das weitgehend gleichartige Verhalten des klarzelligen und chromophilen NZK ist auf ihre gemeinsame antigene Verwandtschaft zum proximalen Tubulus zurück zu führen.

Dem gegenüber hat der chromophobe Typ eine histogenetische Beziehung zum Sammelrohr. Differentialdiagnostisch nutzbar ist bei diesen die Positivität für das Lektin SBA und das Schaltenzym Carboanhydrase C.

Die Dedifferenzierung und Heterogenität der sarkomatoiden NZK führt zu einer Koexpression von Keratin und Vimentin mit unterschiedlicher Ausprägung in den einzelnen Tumorabschnitten. Auch kann eine Immunreaktivität für Desmin und glattmuskuläres Aktin, selten für Antigene fibrohistiozytärer Differenzierung, beobachtet werden.

Die Prognose kann durch viele Faktoren beeinflusst werden, wie Tumorgröße, marginale Infiltration, histologischer Typ, aber der wichtigste ist das Tumorstadium. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt 98% im TNM-Stadium 1, im Stadium 4 nur noch 33%. Die Überlebensrate des klarzelligen NZK nach Nephrektomie insgesamt liegt bei 50%, die Prognose des papillären ist besser und die des chromophoben über 80%. Das sarkomatoide NZK hat eine infauste Prognose; nur wenige Patienten überleben ein Jahr nach Stellung der Diagnose (Remmele, 1997; Murphy et al., 1994).

1.3.3. Klassifikation, Epidemiologie und Prognose der Hodentumoren

Die Klassifikation der Hodentumoren ist nicht einheitlich, da es zwei Schemata gibt, die weitverbreitet in Gebrauch sind, eines formuliert von der WHO, das andere aufgestellt von der British Testicular Tumour Panel (BTTP).

Hodentumore sind relativ selten, sie machen etwa 1% der malignen Neoplasien des Mannes aus, aber sie sind die häufigsten Tumorerkrankungen junger Männer im Alter von 15 bis 44 Jahren. Der Altersgipfel liegt zwischen 25 und 35 Jahren, ein zweiter im achten und neunten Jahrzehnt.

Seminome werden bei Patienten beobachtet, die ungefähr 10 Jahre älter sind als die mit nicht seminomatösen Keimzelltumoren. Der Anteil der Seminome liegt bei etwa 40% aller Neoplasien der männlichen Gonaden, 25% entfallen auf die Kombinationstumore und 35% auf die teratoiden Geschwülste; 2% der testikulären Neoplasien sind Leydigzelltumore. Es bestehen große Unterschiede hinsichtlich der Inzidenzen von Hodentumoren in verschiedenen Ländern.

Die Anzahl der Neuerkrankungen der Keimzelltumoren hat in den vergangenen Jahren zugenommen. Kryptorchismus hat eine der stärksten positiven Assoziationen

zu Hodentumoren, insbesondere zu Seminomen. Männliche erstgradig Verwandte von Patienten mit malignen Hodentumoren hatten ein sechsfach höheres Risiko zu erkranken als Kontrollgruppen, Brüder haben ein höheres Risiko als Väter von Betroffenen.

Bis heute ist nicht bekannt, welche Ursachen dafür verantwortlich sind, dass sich aus normalen Gonozyten bzw. Keimzellen atypische Keimzellen und schließlich Keimzelltumoren entwickeln. Verschiedene Theorien und Modelle zur Erklärung sind aufgestellt worden.

Ca. 95% der primären Hodentumoren sind Keimzelltumore und damit von Natur aus maligne, mittlerweile aber sind fast alle heilbar. Samenstrangtumore sind wesentlich seltener und kommen über eine größere Altersspanne hinweg vor.

Die meisten Seminome sind extrem sensibel für Bestrahlung und Chemotherapie. Bei klinisch auf den Hoden beschränkten Tumoren besteht die übliche der Orchiektomie folgende Behandlung aus der Bestrahlung bestimmter Lymphknoten. Damit ist eine Heilungsrate von 95% zu erwarten. Bei der Behandlungsstrategie der verschiedenen nichtseminomatösen Keimzelltumoren wird gegenwärtig normalerweise nicht unterschieden zwischen den einzelnen Formen. Durch die stadienorientierte Therapie werden Vollremissionsraten von 80-90% erreicht. Prinzipiell sprechen alle Tumorzellen auf die Therapie an, der Anteil der kompletten Remissionen ist jedoch unterschiedlich. Vor allem das reine Chorionkarzinom und auch choriokarzinomatöse Komponenten haben eine schlechtere Prognose. Prognostisch ungünstige Befunde sind außerdem: Teratokarzinome, Dottersacktumorenteile, sarkomatöse und rhabdomyosarkomatöse Areale, Einbrüche in Lymphspalten und Venen. Von Bedeutung sind ferner das Tumorstadium, der Durchmesser des größten Tumorknotens und die Höhe der serologischen Tumormarker.

Die Therapie der Leydigzelltumoren besteht aus inguinaler Orchiektomie, bei Malignität sollte über eine retroperitoneale Lymphadenektomie nachgedacht werden. Sie sind bei Kindern immer benigne, bei Erwachsenen muss bei 10% mit einem malignen Verlauf gerechnet werden, wobei die meisten innerhalb von fünf Jahren sterben.

Der Adematoidtumor ist mit 60% die häufigste benigne Neoplasie der testikulären Adnexe. Er kommt in jedem Alter vor, selten aber bei Kindern. Obwohl er meist im Nebenhoden lokalisiert ist, kann er sich bis in das Hodengewebe ausdehnen. Trotz

möglicher Infiltrationen ist der klinische Verlauf konstant benigne (Remmele, 1997; Ulbright et al., 1999).

1.3.4. Epidemiologie, Ätiologie, Therapie und Prognose der Adenokarzinome der Prostata

Das Adenokarzinom der Prostata ist die häufigste nicht-kutane maligne Neoplasie des Menschen in den USA, mit einem geschätzten Vorkommen von über 30% bei Männern älter als 50 Jahre. Betreffend die Mortalität folgt es an zweiter Stelle dem Lungenkrebs. In Deutschland steht das Prostatakarzinom nach dem Bronchialkarzinom an 2. Stelle der Häufigkeit. Nach dem Krebsatlas in der Bundesrepublik Deutschland schwankt die Letalität des Prostatakarzinoms zwischen 12,9 und 19,4%. Inzidenz und Mortalität haben in den letzten Jahrzehnten zugenommen. Zwischen 1991 und 1995 hat die Sterberate abgenommen, was wahrscheinlich auf eine bessere Diagnostik und höheres Bewusstsein für die Erkrankung in der Bevölkerung zurückzuführen ist. Das klinisch manifeste Prostatakarzinom tritt normalerweise zwischen dem sechsten und achten Lebensjahrzehnt auf. Nur 1% der Patienten sind jünger als fünfzig Jahre alt. Der Häufigkeitsgipfel liegt zwischen dem 70. und 75. Lebensjahr. Es bestehen beträchtliche geographische Unterschiede hinsichtlich der Inzidenz und Mortalität. Kleine Karzinome sind meistens uniform aufgebaut und hochdifferenziert, große dagegen pluriform mit niedrigdifferenzierten Abschnitten. Wie das normale Prostataepithel sezernieren die Karzinomzellen große Mengen von prostata-spezifischer saurer Phosphatase (PSAP) und exprimieren ein prostataspezifisches Antigen (PSA). Beide können sowohl immunhistologisch als auch im Serum nachgewiesen werden. Über die Ätiologie und Pathogenese des Prostatakarzinoms ist wenig bekannt. Genetische und epigenetische Faktoren sind beteiligt. Die größten Risikofaktoren für die Entwicklung von Prostatakrebs sind Alter, Rasse, Erblichkeit und hormonelle Aktivität. Bei kastrierten Männern ist es unbekannt. Bei Patienten mit Leberzirrhose, die einen erhöhten Östrogenspiegel und erniedrigten Testosteronspiegel haben, besteht ein reduziertes Risiko. Sowohl das primäre, als auch das metastasierte Prostatakarzinom reagieren auf chirurgische Kastration, exogene Östrogen- und Antiandrogen-therapie. Die wesentlichen Behandlungsmöglichkeiten sind die radikale Prostatektomie, externe Bestrahlung,

radioaktive Implantate, Androgenentzugstherapie und, in ausgewählten Situationen, nur wachsame Beobachtung. Die Prognose für Patienten mit einem Prostatakarzinom ist sehr variabel und abhängig von einer Vielfalt von Parametern des Wirtes, des Tumors und der Behandlung.

Patienten mit einer Erkrankung im Stadium T1a haben eine 10-Jahre-Überlebensrate von 95%, Fälle mit Lymphknotenmetastasen eine von 40%, sind aber selten heilbar und von Patienten mit Fernmetastasen überleben nur 10% die 10 Jahre (Remmele, 1997; Young et al., 2000; Böker et al., 1997).

2. Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Verteilungsmuster der Faktor VII-aktivierenden Protease (FSAP) in verschiedenen adulten humanen Geweben und in malignen Tumoren des urogenitalen Systems untersucht. Die immunhistochemische Reaktivität zweier hochspezifischer monoklonaler Antikörper gegen FSAP wurde eingesetzt zur detaillierten Lokalisierung der Protease in Organen und Zellen, wobei insbesondere folgende Fragen berücksichtigt wurden:

1. In welchen humanen Normalgeweben lässt sich mit immunhistochemischen Methoden FSAP nachweisen?
2. Stellt die Immunreaktivität mit AK gegen FSAP ein Differenzierungsmerkmal normaler humaner Zelltypen oder Gewebstypen dar?
3. Wird FSAP auch in malignen Tumoren der ableitenden Harnwege, der Prostata und des Hodens exprimiert und stellt die Antigen-Expression ein Differenzierungsmerkmal dieser Malignome dar?
4. Können monoklonale Antikörper gegen FSAP in der immunhistologischen Diagnostik maligner urologischer Tumoren sinnvoll eingesetzt werden und lassen sich aus dem Muster der Immunreaktivität prognostische Schlüsse ziehen?

3. Material und Methoden

3.1 Untersuchungsgut

3.1.1. Normalgewebe

48 verschiedene adulte humane Gewebe aus den Jahren 1999-2000 wurden untersucht. Die Gewebeproben stammten von Normalgeweben als Bestandteil von diversen Operationspräparaten aus dem Untersuchungsgut des pathologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität Gießen. Sie waren entweder während Operationen oder weniger als 24 h post mortem entnommen worden. Sie waren formalinfixiert und in Paraffin eingebettet.

3.1.2. Nierenzellkarzinome

Bei den Nierenzellkarzinomen wurden anhand der Befunde des pathologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität Gießen vorhandene Schnitte aus den Jahren 1995-2000 herausgesucht und von den als geeignet ausgewählten Schnitten dann anhand der Paraffinblöcke neue Schnitte für die vorliegende Untersuchung hergestellt. Von diesen wurden dann 42 Fälle ausgewertet. Fälle mit unzureichendem Material wurden ausgeschlossen. Das verwertete Gewebe entstammte in 39 Fällen von Nephrektomiepräparaten, 1 Fall war eine Metastase und 2 Zysten lagen vor. Das Durchschnittsalter betrug 63,2 Jahre (von 40 bis 85 Jahre), der prozentuale Anteil des weiblichen Geschlechts betrug 33,3 %, des männlichen 66,7 %.(Tab.1).

20 der untersuchten Nierenzellkarzinome waren vom klarzelligen Typ, 13 vom chromophilen, 5 vom chromophoben und 4 waren niedrigdifferenzierte, sarkomatoide Tumoren.

Tab.1:Untersuchungsmaterial der Nierenzellkarzinome

Journal-Nr.	Alter	Geschlecht	Material			Differenzierung
			Ne	Zy	M	
9506734	61	W	+			Chromophob
9517361	85	W	+			Chromophil
9601250	40	M	+			Klarzellig
9602235	62	W	+			Klarzellig
9608663	75	W	+			Klarzellig
9610989	53	M	+			Klarzellig
9618516	59	W	+			Klarzellig
9619454	66	M	+			Chromophil
9620024	74	M	+			Chromophil
9621548	60	M	+			Chromophob
9622421	63	M	+			Klarzellig
9705211	54	W	+			Sarkomatoid
9706677	74	M	+			Chromophil
9715770	62	M	+			Klarzellig
9721811	65	W	+			Chromophil
9800270	42	M	+			Sarkomatoid
9804434	62	M	+			Chromophob
9809882	68	M	+			Chromophil
9812079	57	M	+			Chromophil
9815556	73	M	+			Klarzellig
9816587	68	M	+			Klarzellig
9816994	78	M	+			Klarzellig
9820482	41	W	+			Klarzellig
9823798	45	M			+	Sarkomatoid
9825643	64	M	+			Klarzellig
9901812	78	M	+			Klarzellig
9903496	58	M	+			Chromophob
9904127	79	M	+			Chromophil
9907092	63	M	+			Klarzellig
9910880	48	M	+			Klarzellig
9914138	72	M		+		Chromophil
9914351	60	M				Chromophil
9914607	57	W	+			Klarzellig
9925537	58	M		+		Chromophil
9925774	79	M	+			Klarzellig
9926306	65	W	+			Klarzellig
9929491	63	W	+			Klarzellig
0004730	76	W	+			Klarzellig
0018307	73	M	+			Chromophil
0030288	69	W	+			Chromophil
0033482	68	M	+			Chromophob
0034351	59	W	+			Sarkomatoid

Ne = Nephrektomie ; Zy = Zyste ; Me = Metastase

3.1.3. Hodentumoren

56 Hodentumoren aus den Jahren 1995-2000 wurden nach obigem Verfahren herausgesucht. Das untersuchte Material entstammte auch hier formalinfixiertem in Paraffin eingebettetem Gewebe, das entweder aus Orchiektomien oder Tumorenukleationen herrührte. In 3 Fällen lagen Metastasen vor. Das Durchschnittsalter lag bei 34,7 Jahren.

Unter den Karzinomen waren 19 klassische Seminome und 1 anaplastisches Seminom. Von den nichtseminomatösen Keimzelltumoren waren 14 embryonale Karzinome, 2 Chorioncarzinome, 5 Dottersacktumore, 3 reife Teratom, 1 unreifes Teratom und 4 maligne Teratome auf den Schnitten zu erkennen, die gefärbt und beurteilt wurden. Außerdem wurden 3 Leydig-Zelltumoren und 4 Adenomatoidtumoren untersucht.

Tab.2: Untersuchungsmaterial der Hodentumoren

Journal-Nr.	Alter	Differenzierung
9508014	22	Embryonales Karzinom
9508682	23	Embryonales Karzinom
9509537	27	Anaplastisches Seminom
9518343	26	Adenomatoidtumor
9614324	35	Leydigzelltumor
9616390	39	Dottersacktumor
9703779	37	Adenomatoidtumor
9708300	27	Embr. Ca/ Dottersack-Tu./Reifes Teratom
9708341	33	Dottersacktumor
9708902	37	Leydigzelltumor
9713569	27	Reifes Teratom
9715197	46	Embryonales Karzinom/Malignes Teratom
9715880	44	Embryonales Karzinom
9716939	36	Embryonales Karzinom
9718990	38	Adenomatoidtumor
9719244	49	Embryonales Karzinom

Tab.2 (Fortsetzung):Untersuchungsmaterial der Hodentumoren

9724610	26	Dottersacktumor/Malignes Teratom
9800733	30	Embr. Ca/ Dottersack-Tu./Reifes Teratom/Chorionkarzinom
9808954	36	Klassisches Seminom
9814656	34	Klassisches Seminom
9818490	34	Klassisches Seminom
9819474	45	Klassisches Seminom
9825983	42	Klassisches Seminom
9900630	28	Embryonales Karzinom
9904782	37	Klassisches Seminom
9913729	34	Klassisches Seminom
9914883	43	Klassisches Seminom
9917889	31	Chorionkarzinom
9918679	46	Klassisches Seminom
9919605	46	Klassisches Seminom
9922660	44	Adenomatoidtumor
9923618	19	Embryonales Karzinom
9927704	26	Klassisches Seminom
0000672	29	Unreifes Teratom
0000992	28	Klassisches Seminom
0007409	37	Klassisches Seminom
0008036	34	Klassisches Seminom
0012053	52	Klassisches Seminom
0012705	30	Embryonales Karzinom
0012711	25	Embryonales Karzinom
0012816	24	Leydigzelltumor
0012937	25	Embryonales Karzinom/Malignes Teratom
0012941	31	Klassisches Seminom
0013920	42	Klassisches Seminom
0017900	53	Klassisches Seminom
0033377	29	Embryonales Karzinom/Malignes Teratom
0035805	45	Klassisches Seminom

3.1.4. Prostatakarzinome

Die 41 ausgewerteten Prostatakarzinome von 1996-2000 wurden ausgewählt aus dem Untersuchungsgut des pathologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität Gießen. Es wurden formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Gewebeblöcke verwendet. In allen 41 Fällen hatte eine Prostatektomie vorgelegen. Das durchschnittliche Alter betrug 63,7 Jahre.

Auf den ausgewählten Schnitten zeigten 10 der Prostatakarzinome ein (überwiegend) cribriformes Wachstumsmuster, in 6 Fällen waren hochdifferenzierte, in 6 Fällen wenig differenzierte glanduläre Adenokarzinome zu erkennen. Weitere 15 waren pluriform.

Tab.3: Untersuchungsmaterial der Prostatakarzinome

Journal-Nr.	Alter	Differenzierung
9601206	65	Cribriform
9609218	81	hochdifferenziert
9610389	64	cribriform
9617284	53	cribriform
9622041	64	hochdifferenziert
9700206	74	wenig differenziert
9703422	71	hochdifferenziert
9704807	76	puriform
9710641	71	wenig differenziert, cribriform
9713514	63	hochdifferenziert
9714028	58	wenig differenziert
9715405	64	hochdifferenziert
97189691	67	hochdifferenziert
9723612	67	cibriform
9801233	62	cibriform
9801574	58	pluriform
9807538	75	pluriform, cribriform
9812782	47	cribriform
9821215	61	pluriform
9823121	63	wenig differenziert
9824953	55	cribriform

Tab.3 (fortgesetzt): Untersuchungsmaterial der Prostatakarzinome

9825077	69	Hochdifferenziert
9903786	72	pluriform
9904129	55	pluriform
9904222	62	pluriform
9910744	72	pluriform
9910955	66	pluriform
9913004	48	cribriform
9913313	63	pluriform
9916317	49	cribriform
9919633	61	cribriform
9928944	66	pluriform
0001133	57	pluriform
0006489	67	pluriform
0015528	65	pluriform
0016245	63	pluriform
0024501	70	pluriform
0031613	69	pluriform
0034167	61	pluriform
0035114	60	pluriform
0038299	56	pluriform

3.2 Die primären Antikörper

Zwei monoklonale gegen FSAP gerichtete Antikörper wurden in allen immunhistologischen Untersuchungen dieser Arbeit eingesetzt. Diese Antikörper wurden durch Immunisierung von Mäusen mit aus Humanplasma gewonnenem tc-FSAP erzeugt (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Preissner, Institut für Biochemie der JLU Gießen und Dr. Römisch von der Fa. Aventis). Sowohl Immunglobulin G Fraktionen vom Kaninchenserum als auch Kulturüberstand von den Hybridom Zell-Linien DSM ACC2453 (mAK 677) und DSM ACC2454 (mAK 1189) wurden durch Protein G Chromatographie aufbereitet. Während mAK 677 gegen das C-terminale Ende, welches der Leichtkette entspricht, von FSAP gerichtet ist, erkennt mAK 1189

das aminoternale Ende von FSAP, entsprechend den schweren Ketten (Römisch et al, 2001, Kannemeier et al., 2001).

Mit beiden Antikörpern wurden Verdünnungsreihen angefertigt. Beide Antikörper wurden 1:40 mit Antibody Diluent (Fa DAKO) verdünnt.

3.3 Methoden

3.3.1. Vorbereitete Verfahren

Aus einigen der normalgroßen Gewebeblöcke und aus allen Großblöcken der Prostata wurden mit Hilfe der alten mikroskopischen Schnitte ca. 1 x 1 cm große Stückchen mit verwertbarem Tumorgewebe herausgetrennt und erneut in Paraffin eingebettet, um Antikörper zu sparen und die Bearbeitung zu vereinfachen. Die übrigen Schnitte konnte man so, wie sie vorhanden waren, verwenden. Die Schnitte mit einer Dicke von ca. 3-5µm wurden mit einem Mikrotom (Modell Histoslides 2000, Fa. Reichert-Jung) angefertigt, im Wasserbad gestreckt (Aqua destillata, 45°C) und dann auf spezielle Objektträger aufgezogen (Superfrost, Fa. Menzelgläser). Über Nacht wurden sie dann im Brutschrank (BE 400, Fa. Memmert, Schwabach) bei 37°C getrocknet. Pro Block wurde zudem eine Hämatoxylin-Eosin-Kontrolle angefertigt.

Als nächstes wurden die Schnitte in Xylol entparaffiniert und anschließend sukzessiv in Aceton, Aceton-TBS-Puffergemisch und TBS-Puffer rehydriert. Zur Demaskierung der Antigenepitope erfolgte eine Vorbehandlung in der Mikrowelle in Citrat-Puffer (pH 6,0) für 3 x 5 min.

3.3.2. Immunhistochemische Methode

Von den verschiedenen möglichen Techniken wählten wir für unsere Untersuchungen die alkalische Phosphatase-anti-alkalische Phosphatase (APAAP)-Methode, da sie a) schnell und einfach mit hoher Sensitivität durchführbar ist und weil sie b) für eine große Anzahl von monoklonalen Antikörpern klare Ergebnisse gezeigt hatte. Zudem lässt die kräftige rote Farbe die positiv markierten Zellen deutlich vortreten. Aus Gründen der Praktikabilität und Standardisierung wurde mit einem Detektionskit (Fa. Dako) gearbeitet.

Die APPAP-Methode zählt zu den indirekten Komplexmethoden, wobei zuerst der Primärantikörper von der Maus an das im Gewebe liegende Antigen bindet. Darauf wird ein Kaninchen-anti-Mausantikörper als Brückenantikörper eingesetzt, damit im nächsten Schritt der APAAP-Komplex, bestehend aus monoklonalen Maus-IgG-Antikörpern gegen alkalische Phosphatase, binden kann. Es handelt sich hierbei um einen Enzym-anti-Enzym-Komplex.

Die Schnitte wurden nach Entparaffinierung, Rehydrierung und Vorbehandlung in der Mikrowelle dreimal mit TBS-Puffer gespült. Überschüssige Flüssigkeit wurde vom Objektträger entfernt. Als nächstes wurden die Schnitte 30 Minuten mit dem jeweiligen Primärantikörper in feuchter Kammer inkubiert. Es folgte nach vorherigem Spülen mit TBS-Puffer eine 30 minütige Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Anschließend wurden die Schnitte nach dem Spülen luftblasenfrei mit dem APAAP-Komplex überschichtet und 30 Minuten lang inkubiert. 10 Minuten vor dem Auftragen des Farbsubstrates wurden die Chromogen-Substrate nach immer gleichem, vorgegebenem Schema gemischt. Um die endogene alkalische Phosphatase zu blockieren wurde eine Pipettenspitze Levamisol hinzugefügt. Die Inkubationszeit betrug 25 Minuten. Die Substratlösung enthielt als Chromogen Neufuchsin.

Nach kurzem Spülen mit TBS-Puffer und dann einbringen in ein Wasserbad erfolgte die Gegenfärbung mit Hämalaun. Anschließend wurden die Schnitte mit Glycerin-Gelantine eingedeckt.

3.3.3. Arbeitsanleitung

1. Entparaffinieren in Xylol 1 x 10 Minuten
2. Rehydrierung in Aceton 1 x 10 Minuten
3. Rehydrierung in Aceton-TBS-Puffergemisch 1 x 10 Minuten
4. 3 x 5 Minuten mit TBS waschen
5. 5 Minuten kochen in Citratpuffer pH 6,0 in der Mikrowelle bei 600 Watt
6. Auffüllen der Plastikkuvetten mit aqua dest.
7. Zweimaliges Wiederholen des Vorgangs
8. Abkühlen der Schnitte für 20 Minuten
9. 3 x 5 Minuten mit TBS spülen
10. Abtrocknen des Objektträgers um den Schnitt

11. mit ca. 100 µl Primärantikörper pro Schnitt 30 Minuten inkubieren bei Raumtemperatur
 12. 3 x 5 Minuten mit TBS waschen
 13. 30 Minuten mit sekundärem Antikörper (Fa. Dako) inkubieren
 14. 3 x 5 Minuten mit TBS waschen
 15. 30 Minuten mit dem APAAP-Komplex (Fa. Dako) inkubieren
 16. 3 x 5 Minuten mit TBS waschen
 17. Mischen der Chromogen-Substrate nach vorgegebenem Schema (Fa. Dako)
 18. 25 Minuten inkubieren mit chromogener Substratlösung
 19. Spülen mit TBS
 20. Einbringen der Schnitte in ein Wasserbad
 21. 45 Sekunden Eintauchen in Hämalau
 22. Spülen mit H₂O
 23. Abtrocknen um den Schnitt herum
 24. Eindecken der gefärbten Präparate mit 170-180°C heißem Glycergel (Fa. DAKO)
- Bei den Negativ-Kontrollen wurde der Primärantikörper durch TBS-Puffer ersetzt.

3.3.4. Auswertung der Präparate

Die so hergestellten Präparate wurden anschließend am Mikroskop ausgewertet, wobei Schnitte mit starker Hintergrundfärbung noch einmal gefärbt wurden und unbrauchbare Schnitte nicht ausgewertet wurden. Die Reaktionen wurden hinsichtlich ihrer Stärke und Verteilung im Gewebe von zwei unabhängigen Untersuchern beurteilt. Es fand eine semiquantitative Auswertung statt. Entsprechend repräsentative Schnitte wurden fotografiert.

4. Ergebnisse

4.1 Auswertungskriterien und Darstellung

Die Färbungen wurden danach ausgewertet, welche Zellen und Kompartimente der Gewebe positiv waren oder bei den Tumoren, ob die Tumorzellen positiv reagierten. Bei jeder Färbung wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, die alle negativ reagierten. Die Reaktionen wurden als positiv + gewertet, wenn eine Anfärbung der Zellen zu beobachten war, wobei folgendermaßen abgestuft wurde:

1+ = schwach positiv

2+ = mäßig stark positiv

3+ = stark positiv

Nicht eindeutig als positiv zu erkennende Präparate wurden mit +/- bewertet.

Negative Reaktionen wurden mit einer 0 gekennzeichnet.

In den folgenden Tabellen sind die Organe mit ihren Geweben und Zellen und der jeweiligen Reaktionsstärke beider Antikörper aufgeführt. Bei den Tumoren sind die Tabellen nach Tumorarten aufgeteilt. Illustriert werden nicht alle Befunde, sondern nur einige Beispiele.

4.2 Normalgewebe

Tab. 4.1.: Immunhistologische Untersuchungen an adulten humanen Geweben

Gewebe	1189	677
Oesophagus		
Plattenepithel	2+	2+
Drüsenendstücke	0	0
Schaltstücke	2+	2+
Muskulatur	1+	1+
Stroma	1+	1+ - 2+
Gefäßendothel	2+	2+
Kardia (Magen)		
Foveolarepithel	0	0
Glandulae cardiacae	1+	2+
Muc. Drüsenendstck.	0	0
Hauptzellen	3+	3+
Muskulatur	1+	1+
Gefäßendothel	1+	1+
Korpus (Magen)		
Foveolarepithel	0	0 - 1+
Korpus-Drüsenkörper	2+	2+
Muskulatur	0	1+
Gefäßendothel	1+	1+
Duodenum		
Epithelien	0 - 1+	1+
Brunnersche Drüsen	0	0
Muskulatur	0	0 - 1+
Lymphfollikel	1+	2+
Ganglienzellen	2+	3+
Gefäßendothel	1+	1+
Dünndarm		
Epithelien	2+	3+
Muskulatur	1+	1+
Stroma	1+	2+
Ganglienzellen	3+	3+
Gefäßendothel	1+	1+
Kolon/Rektum		
Epithelien	1+	1+
Lymphfollikel	1+	1+
Plasmazellen	1+	1+
Gefäßendothel	1+	0

Gewebe	1189	677
Pankreas		
Epithelien	1+	2+
Langerhans-Inseln	3+	1+
Gangepithel	2+	2+
Gefäßendothel	1+	1+
Speicheldrüse		
Muköse Endstücke	0	0
Seröse Endstücke	1+	1+ - 2+
Schaltstücke	1+	1+
Streifenstücke	1+	1+
Gefäßendothel	0 - 1+	0 - 1+
Glandula sublingualis		
Gefäßendothel	1+	0 - 1+
Muköse Endstücke	0	0
Seröse Endstücke	2+	2+
Streifenstücke	1+	1+
Schaltstücke	1+	1+
Parotis		
Gefäßendothel	1+	1+
Azinus	0	0
Streifenstücke	1+	1+
Schaltstücke	1+	1+
Endstücke	0	0
Leber		
Hepatozyten	2+	2+
Gallengänge	0	0
Gefäßendothel	1+	1+
Gallenblase		
Epithel	0	0
Muskulatur	2+	1+
Gefäßendothel	2+	1+
Ductus cysticus		
Epithel	3+	3+
Muskulatur	2+	1+
Ganglienzellen	3+	3+
Gefäßendothel	2+	2+

Tab. 4.1.(fortgesetzt): Immunhistologische Untersuchungen an adulten humanen Geweben

Gewebe	1189	677
Appendix		
Epithelien	1+	3+
Muskulatur	1+	1+
Lymphfollikel	1+	2+
Plasmazellen	2+	2+
Gefäßendothel	1+	1+
Hoden		
Leydigische Zwischenzellen	3+	1+
Sertoli-Zellen	1+ - 2+	1+
Keimzellen	1+ - 2+	1+
Gefäßendothel	1+	1+
Rete testis		
Epithel	2+	2+
Nebenhoden		
Ductus epididymidis	2+	2+
Ductulus efferens	2+	2+
Gefäßendothel	1+	1+
Samenblase		
Epithel	2+	3+
Muskulatur	1+	1+
Gefäßendothel	2+	2+
Ductus deferens		
Epithel	2+	3+
Längsmuskelschicht	0	+/-
Ringmuskelschicht	2+	3+
Gefäßendothel	2+	3+
Prostata		
Drüsenepithel	2+	2+
Muskulatur	1+	1+
Gefäßendothel	1+ - 2+	1+ - 2+
Niere		
Tubuli	1+	1+
Glomerula	0	0
Markepithel	0	0
Gefäßendothel	0 - 1+	0 - 1+
Harnblase		
Schirmzellen	2+	1+
Urothel	2+	1+
Muskulatur	2+	1+
Plasmazellen	2+	2+
Fibroblasten	1+ - 2+	1+ - 2+
Peripherer Nerv		-
Ureter		
Urothel	2+	2+
Muskulatur	1+	1+
Gefäßendothel	2+	2+

Gewebe	1189	677
Ductus choled.		
Epithel	0	0
Muskulatur	1+	1+
Gallengansdrüsen	2+ - 3+	3+
Gefäßendothel	1+	1+
Endometrium		
Drüsenepithel	3+	2+
Stromazellen	0	1+
Myometrium	1+	1+
Gefäßendothel	1+	2+
Plazenta		
Chorionepithel	3+	2+
Amnionepithel	2+	2+
Trophoblast	2+ - 3+	2+
Stromazellen	0	+/-
Gefäßendothel	0	1+
Eihäute		
Chorionepithel	3+	1+
Amnionepithel	3+	2+
Deziduazellen	3+	1+
Fibroblasten	3+	1+ - 2+
Cervix Uteri		
Drüsenepithel	0	0
Gefäßendothel	1+	0-1
Stroma	1+	0-1
Tuba uterina		
Epithel	2+	3+
Muskulatur	0	1+
Gefäßendothel	1+	2+
Mamma		
Ep. Brustdrüsenlobuli	2+	2+
Ductus lactiferi	2+	2+
Fibroblasten	0	1+
Plasmazellen	2+	2+
Gefäßendothel	0	0
Schilddrüse		
Follikelepithel	2+	1+ - 2+
Stroma	1+	1+
Gefäßendothel	0	0
Epithelkörperchen		
	0	0
Thymus		
Hassal-Körperchen	2+ - 3+	2+
Follikel	1+	2+
Mantelzone	1+	1+
Sternhimmelmakroph	1+	1+

Tab. 4.1.(fortgesetzt): Immunhistologische Untersuchungen an adulten humanen Geweben

Gewebe	1189	677
Nebenniere		
Zona glomerulosa	2+	1+
Zona fasciculata	1+ - 2+	1+
Zona reticularis	3+	1+
Mark	0	0
Gefäßendothel	1+	1+
Fettgewebe	0	0
Gefäßendothel	0	0
Lunge		
Bronchialepithel	2+	1+
Alveolarepithel	1+ - 2+	1+
Bronchialdrüsen	1+	1+
Knorpel	3+	1+
Muskulatur	1+	1+
Alveolarmakrophage	2+	2+
Elastische Fasern	2+ - 3+	2+ - 3+
Gefäßendothel	1+	1+
Hauptbronchus		
Gefäßendothel	1+	1+
Knorpel	2+ - 3+	1+
Muskulatur	1+	1+
Bronchialdrüsen	2+	2+
Endokard	0	0
Fibroblasten	2+ - 3+	2+ - 3+
Milz	+	+
Tonsille	+/-	+/-

Gewebe	1189	677
Lymphknoten	+/-	+/-
Kieferhöhle		
Respirat. Epithel	0	0
Plasmazellen	3+	3+
Gefäßendothel	1+	1+
Skelettmuskulatur	2+	1+
Haut		
Epidermis	2+	1+ - 2+
Dermis	0	0
Subkutis	0	0
Schweißdrüsen	0	0
Gefäßendothel	0	0
Medulla oblongata		
Gliazellen	0	0
Ganglienzellen	1+ - 2+	2+ - 3+
Kleinhirnwurm		
Stratum granul.	1+	1+
Gliazellen	0	1+
Ganglienzellen	1+	2+
Purkinje-Zellen	1+	0
Dura Mater	0	0
Hirnbasisarterie		
Glatte Muskulatur	1+ - 2+	1+
Vasa vasorum	1+	1+
Elastische Fasern	0	0

Beide Antikörper zeigten gegen die Faktor VII-aktivierende Protease eine positive intrazytoplasmatische Reaktion in einer Vielzahl von Epithelien. Dagegen war die Reaktion der meisten mesenchymalen Stromazellen in komplexen Geweben negativ. Insgesamt war die Immunreaktion der verschiedenen Epithelien mit dem Antikörper aus dem Klon 677 schwächer als die der Antikörper aus dem Klon 1189, die in der Regel eine intensivere intrazytoplasmatische Reaktion aufwiesen. Eine besonders stark positive Reaktion zeigten die Leydigischen Zwischenzellen des Hodeninterstitiums mit dem monoklonalen Antikörper 1189, wohingegen die übrigen Zellen des Hodens nur schwach positiv reagierten. Der Zyto- und Synzytiotrophoblast der Plazenta zeigte mit mAK 1189 eine sehr starke, teils feingranuläre Reaktion; und auch die dezidualen Zellen, das Chorionepithel und die Fibroblasten der Eihäute ließen mit dem Klon 1189 eine starke histologische Anfärbbarkeit erkennen. Beim Endometrium war eine verstärkt apikale Färbung des

hochprismatischen Epithels des Drüsenkörpers zu sehen, auch intensiver ausfallend mit mAK 1189. In der Leber zeigten die Gallengänge keine, die Hepatozyten dagegen eine deutliche Reaktion mit beiden Antikörpern. Durch intensive Reaktion mit mAK 1189 traten die endokrinen Zellen der Langerhans-Inseln bei der Färbung des Pankreas hervor. Beim Urothel der Harnblase fiel die sehr starke Reaktion der Schirmzellen mit mAK 1189 auf.

Hingegen zeigten das hoch-zylindrische Flimmerepithel, die glatte Muskulatur und das Gefäßendothel des Ductus deferens, das Epithel der Samenblase, des Appendix und des Dünndarms mit dem Antikörper von Klon 677 eine deutlich stärkere Immunreaktion als mit dem Antikörper von Klon 1189. Einen gleichwertig starken Befund konnte man am hochzylindrischen Epithel des Ductus cysticus und am belegzellhaltigen Drüsenkörper der Magenkardia erheben. Wie bei der Magenkardia reagierte beim Magenkorpus das Foveolarepithel negativ, der Drüsenkörper ließ aber mit beiden AK eine deutliche Positivität erkennen. Eine mäßig starke Reaktion zeigte das Drüsenepithel der Prostata mit beiden Klonen. Die Epithelien und Tubuli der Niere reagierten insgesamt nur schwach, die Glomerula in allen Fällen negativ. Deutlich angefärbt waren bei der Nebenniere mit dem mAK 1189 die Zona reticularis, auch die anderen Zonen der Rinde waren positiv. Die Reaktionen mit dem mAK 677 waren dagegen in allen Zonen schwach. Das Mark zeigte mit beiden AK eine negative Reaktion. Innerhalb der Lunge/Bronchien trat der Knorpel durch starke Färbung hervor, allerdings nur mit dem mAK 1189. Die Endothelzellen verschiedener Gefäße reagierten meist schwach positiv, negativ mit beiden mAK reagierten die der Mamma, der Schilddrüse, des Fettgewebes und der Haut, mit dem mAK 1189 auch die der Plazenta. Mäßig stark positive Reaktionen der Gefäßendothelien mit beiden mAK waren beim Ösophagus, Ductus cysticus, bei der Samenblase und beim Ureter zu erkennen, bei der Gallenblase dagegen nur mit dem mAK 1189, bei der Tuba uterina und beim Endometrium nur mit dem mAK 677. Eine stark positive Reaktion der Gefäßendothelien zeigte der Ductus deferens mit dem mAK 677, mäßig stark mit dem mAK 1189. Generell stark positive Reaktionen mit beiden Antikörpern zeigten in Gewebsverbänden gelegene Plasmazellen, sowie Ganglienzellen und die Nervenzellen der Großhirnrinde. Endothelzellen kleiner und mittelgroßer arterieller und venöser Gefäße zeigten mit beiden Antikörpern eine mäßig intensiv positive Immunreaktion. Die Färbungen der lymphatischen Organe ergaben grenzwertige Reaktionen, die nicht als eindeutig positiv gewertet werden konnten.

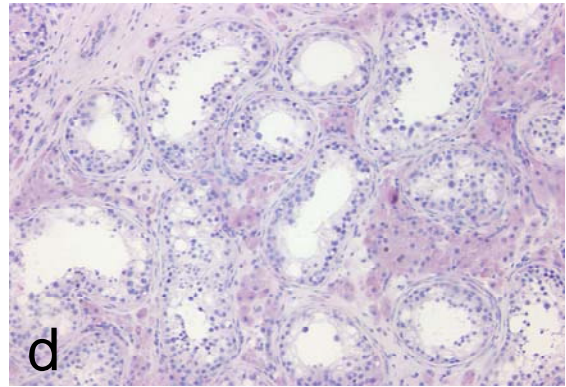
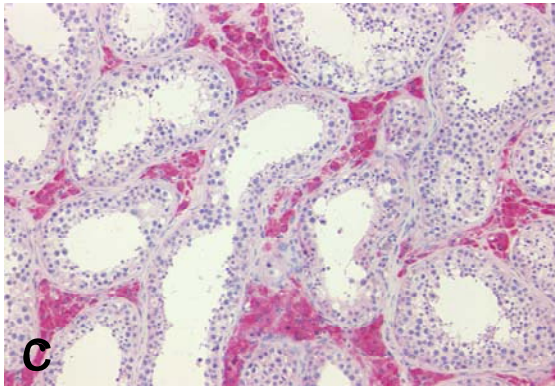
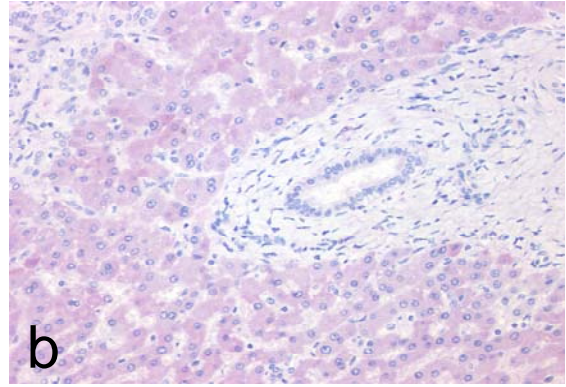
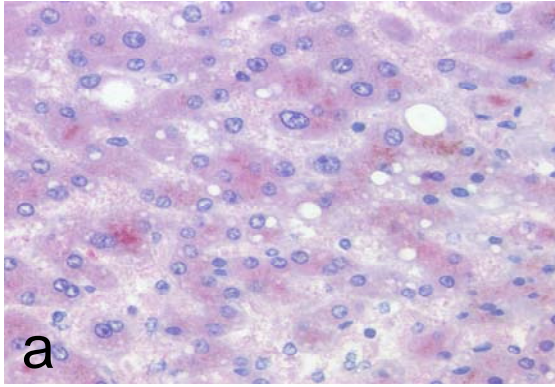


Abb.2

- a. Leber: Granuläre zytoplasmatische immunhistochemische Reaktion in den Hepatozyten; mAK 1189 – 400fach
- b. Leber/Gallengang: Positive Reaktion der Hepatozyten, die Gallengänge negativ; mAK 677 – 200fach
- c. Hoden: Hoden mit stark positiven Leydigschen Zwischenzellen; mAK 1189 – 100fach
- d. Hoden: Hoden, nur schwach positive Leydigsche Zwischenzellen; mAK 677 – 100fach

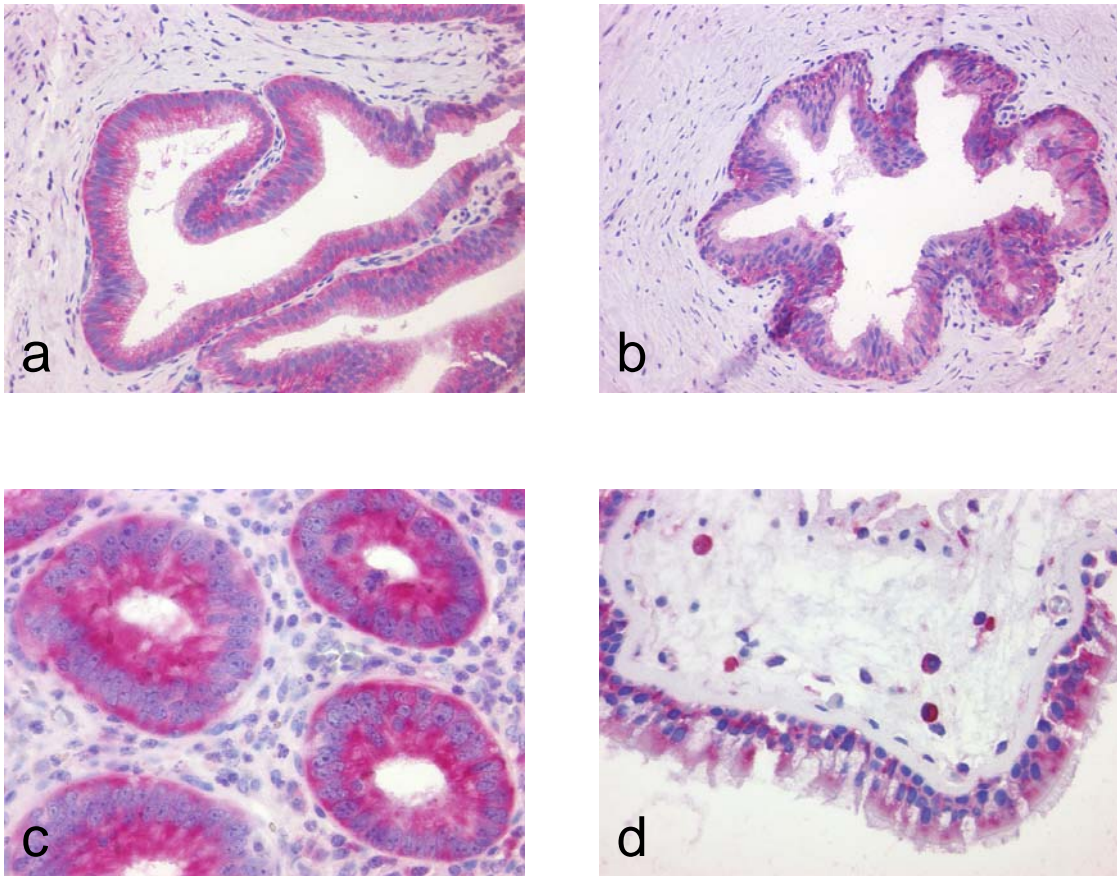


Abb.3

- a. Ductus cysticus: Stark positive Reaktion der Epithelzellen; mAK 677 – 200fach
- b. Ductus deferens: Stark positive Reaktion der Epithelzellen; mAk 677 – 200fach
- c. Appendix: Stark positive Reaktion der Kryptenepithelzellen; mAK 677 – 400fach
- d. Kieferhöhle: Stark positive Reaktion der Plasmazellen; mAK 677 – 400fach

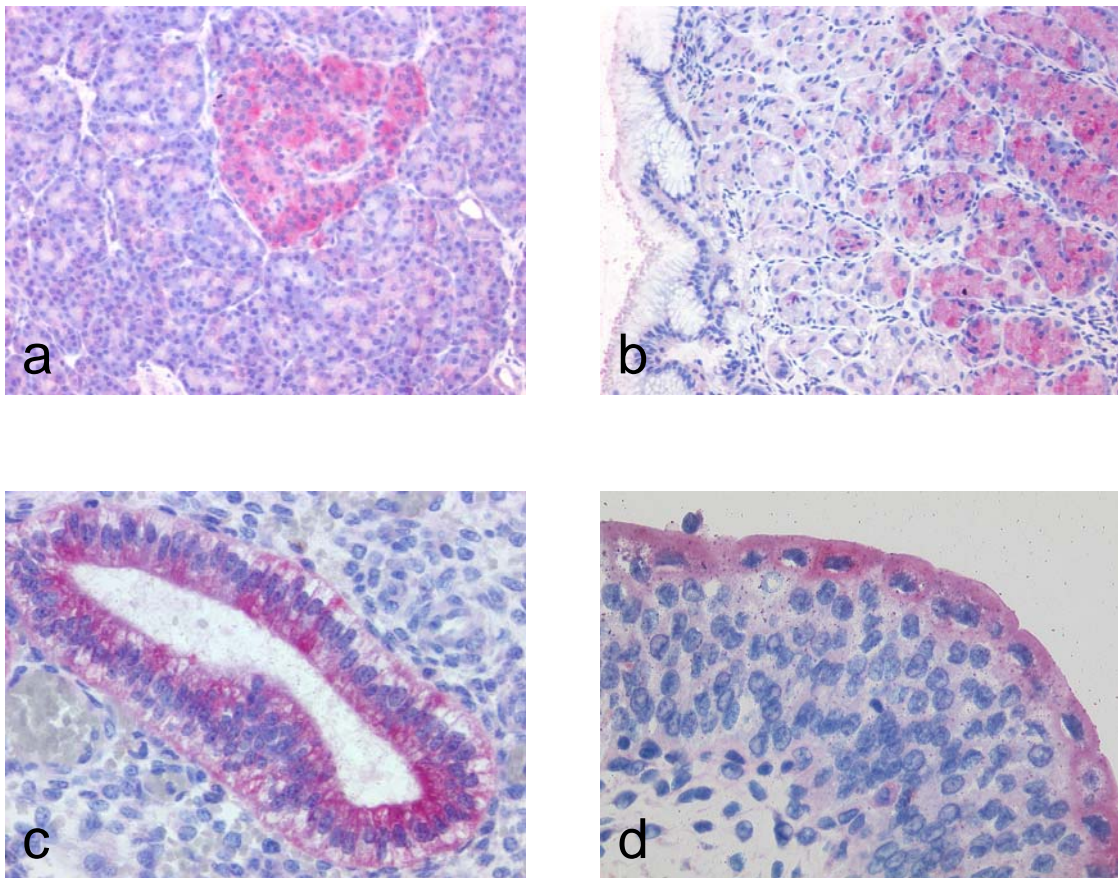


Abb.4

- a. Pankreas: Stark positive Reaktion der Langerhanschen Inselzellen und schwache Reaktion der Azinuszellen; mAK 1189 – 200fach
- b. Magenkorpus: Stark positive Reaktion der Hauptdrüsen; mAK 1189 – 200fach
- c. Endometrium: Stark positive Reaktion des Drüsenepithels, betont apikal; mAK 1189 – 400fach
- d. Harnblase: Urothel mit stark positiver Reaktion der Schirmzellen; mAK 1189 – 400fach

4.3 Nierenzellkarzinome

Tab. 4.3.: Immunhistologische Untersuchungsergebnisse an Nierenzellkarzinomen

Klarzellige NZK

Journal - Nr.	1189	677
9601250	0	0
9602235	0	0
9608663	0	0
9610898	0	0
9618516	0	0
9622421	0	0
9715770	0	0
9815556	0	0
9816587	0	0
9816944	0	0

Journal - Nr.	1189	677
9820482	0	0
9825643	0	0
9901812	0	0
9907092	0	0
9910880	0	0
9914607	0	0
9925774	0	0
9926306	0	0
9929491	0	0
0004730	0	0

Chromophile NZK

Journal - Nr.	1189	677
9517361	0	0
9619454	0	0
9620024	0	0
9706677	0	0
9721811	0	0
9809882	0	0
9812079	0	0

Journal - Nr.	1189	677
9815662	0	0
9902984	0	0
9914138	0	0
9914351	0	0
9925537	0	0
0018307	0	0
0030288	0	0

Chromophobe NZK

Journal - Nr.	1189	677
9506734	0	0
9621548	0	0
9804434	0	0

Journal - Nr.	1189	677
9903496	0	0
0033482	0	0

Sarkomatoide NZK

Journal - Nr.	1189	677
9705211	2+	2+
9800270	1+	1+

Journal - Nr.	1189	677
9823798	2+	2+
0034351	2+	2+

Die untersuchten Kollektive unterschiedlich differenzierter Nierenzellkarzinome reagierten mit Ausnahme der sarkomatoid differenzierten alle negativ. Die Tumorzellen sowohl der klarzelligen als auch der chromophilen und chromophoben NZK zeigten keine Reaktion mit den Antikörpern der beiden Klone. Bei drei von vier sarkomatoiden NZK war die Reaktion mit beiden Antikörpern mäßig stark, der andere Fall zeigte eine schwach positive immunhistologische Färbung.

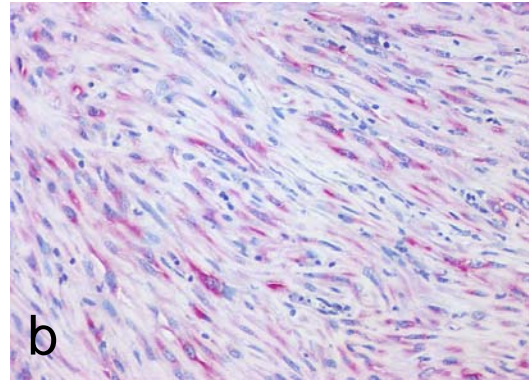
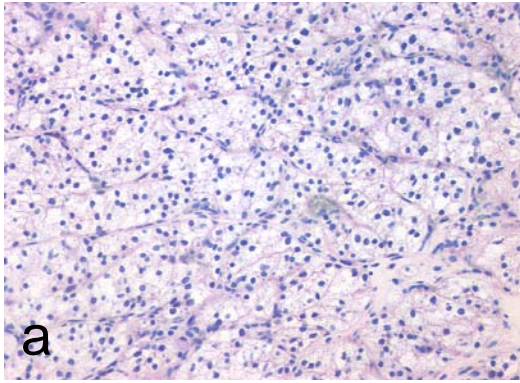


Abb. 5

- a. Klarzelliges NZK: Negative feingranuläre Reaktion der Tumorzellen; mAK 677 – 200fach
- b. Sarkomatoides NZK: Zytoplasmatische, variierend stark positive Reaktion der spindelförmigen Tumorzellen; mAK 1189 – 200fach

4.4 Hodentumoren

Tab. 4.3.: Immunhistologische Untersuchungsergebnisse an Hodentumoren

Klassische Seminome

Journal - Nr.	1189	677
9808954	0	0
9814656	0	0
9818490	0	1+
9819473	0	0
9825983	0	0
9904782	1+	2+
9913729	1+	2+
9914883	1+	0
9918679	0	0
9919605	1+	1+

Journal - Nr.	1189	677
9927704	0	0
0000992	0	0
0007409	0	0
0008036	0	0
0012053	0	0
0012941	0	1+
0013920	0	0
0017900	0	1+
0035805	0	1+

Anaplastische Seminome

Journal - Nr.	1189	677
9509537	1+	1+

Embryonale Karzinome

Journal - Nr.	1189	677
9508014	1+	1+
9508682	0	1+
9708300	1+	1+
9715197	0	0
9715880	0	1+
9716939	0	0
9719244	0	1+

Journal - Nr.	1189	677
9800733	0	1+
9900630	1+	1+
9923618	1+	1+
0012705	1+	1+
0012711	1+	1+
0012937	0	2+
0033377	0	1+

Chorionkarzinome

Journal - Nr.	1189	677
9800733	3+	2+

Journal - Nr.	1189	677
9917889	3+	3+

Tab. 4.3.(fortgesetzt): Immunhistologische Untersuchungsergebnisse an Hodentumoren

Dottersacktumoren

Journal - Nr.	1189	677
9616390	1+	1+
9708300	1+	2+
9708341	0	1+

Journal - Nr.	1189	677
9724610	1+	1+
9800733	1+	1+

Reife Teratome

Journal - Nr.	1189	677
9708300	1+	1+
9713569	1+	1+

Journal - Nr.	1189	677
9800733	-	0

Unreife Teratome

Journal - Nr.	1189	677
0000672	0	0

Maligne Teratome

Journal - Nr.	1189	677
9715197	0	1+
9724610	0	0

Journal - Nr.	1189	677
0012937	1+	1+
0033377	0	1+

Leydigzelltumoren

Journal - Nr.	1189	677
9614324	2+	1+
9708902	1+ - 2+	1+

Journal - Nr.	1189	677
0012816	1+ - 2+	2+

Adenomatoidtumoren

Journal - Nr.	1189	677
9518343	2+	1+
9703779	0	1+

Journal - Nr.	1189	677
9718890	2+	2+
9922660	2+	2+

Die seminomatösen Hodentumoren zeigten in den Tumorzellen in den meisten Fällen keine oder eine schwache intrazytoplasmatische Reaktion mit beiden mAK. Bei den nichtseminomatösen Keimzelltumoren reagierten die Chorionkarzinome mit den synzytialen Riesenzellen sehr stark positiv. Von den Embryonalen Karzinomen zeigten wenige mit den Antikörpern aus dem Klon 677 gefärbten eine stärkere immunhistologische Reaktion, die mit dem mAK 1189 reagierten alle schwach positiv oder negativ. Die Dottersacktumoren zeigten größtenteils eine schwach positive Anfärbbarkeit beider Antikörper. Die Teratome reagierten entweder schwach positiv oder negativ mit beiden mAK. Die Leydigzelltumoren wiesen eine schwache bis mäßig starke positive Anfärbbarkeit auf. Eben solche Reaktionen ließen auch die Adenomatoidtumoren erkennen. Bei diesen gutartigen Tumoren war kein Unterschied in der Stärke der Reaktion zwischen den beiden Klonen 1189 und 677 zu erkennen.

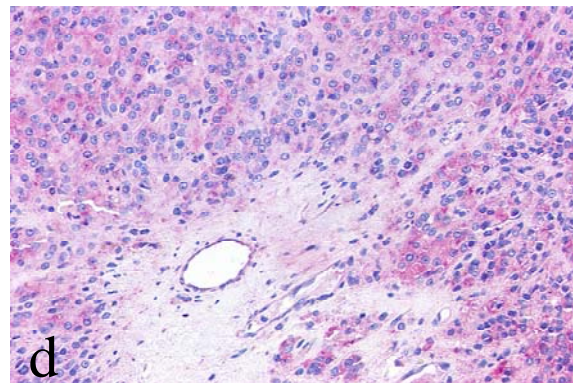
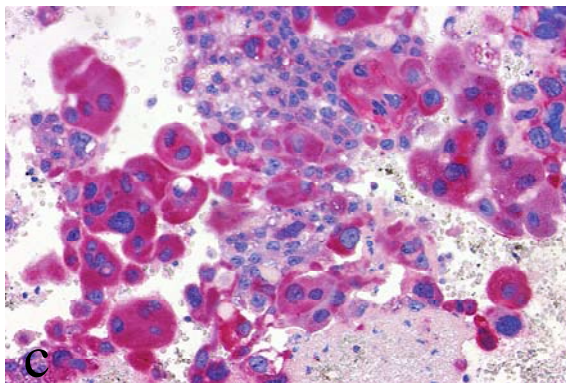
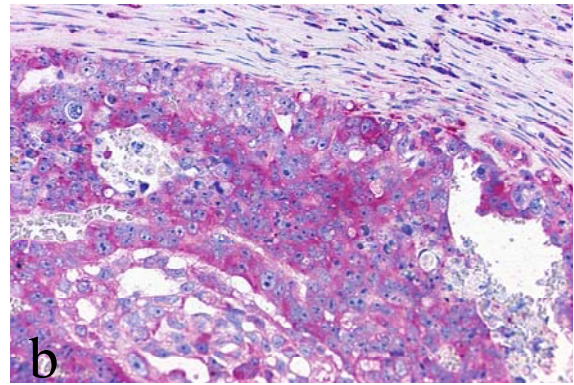
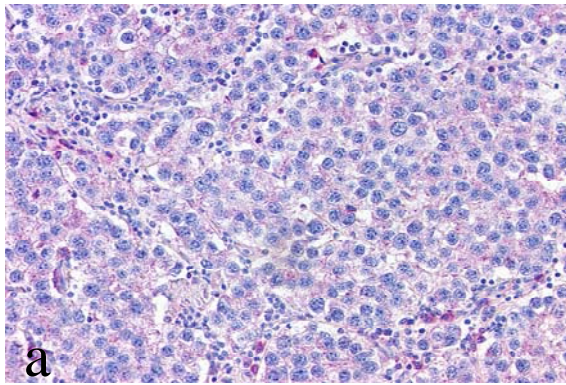


Abb. 6

- a. Klassisches Seminom: Negative Reaktion der Tumorzellen; mAK 677 – 200fach
- b. Embryonales Karzinom: Mittelgradige zytoplasmatische Reaktion der Tumorzellen, Stroma negativ; mAK 677 – 200fach
- c. Chorionkarzinom: Sehr stark positive Reaktion, insbesondere der synzytialen Riesenzellen des Tumors; mAK 1189 – 400fach
- d. Leydigzelltumor: Mittelgradige Reaktion der Tumorzellen; mAK 677 – 200fach

4.5 Adenokarzinome der Prostata

Tab. 4.4.: Immunhistologische Untersuchungsergebnisse an Prostatakarzinomen

Cribriforme

Journal - Nr.	1189	677
9601206	1+	1+
9610389	1+	1+
9617284	0	0
9723612	1+	2+
9801233	1+	2+

Journal - Nr.	1189	677
9812782	1+	1+
9824953	0	0
9913004	0	1+
9913706	1+	2+
9916317	1+ - 2+	1+

Wenig differenzierte

Journal - Nr.	1189	677
9700206	0	0
9710641	0	2+
9714028	0	1+

Journal - Nr.	1189	677
9807538	1+ - 2+	2+
9823121	1+	1+ - 2+
0001862	0	1+

Hoch differenzierte

Journal - Nr.	1189	677
9609218	0	0
9622041	1+	1+
9713514	1+	1+

Journal - Nr.	1189	677
9715405	0	0
9718969	0	1+
9825077	0	0

Pluriform differenzierte

Journal - Nr.	1189	677
9704807	1+	1+ - 2+
9801574	0	0
9821215	1+	1+
9903786	0	1+
9904222	1+	1+
9910955	1+	1+
9913313	0	1+
9928944	1+	1+
9904129	1+	1+
9910744	0	0

Journal - Nr.	1189	677
0001133	0	1+
0006483	0	1+
0015528	1+	1+
0016245	0	1+
0024501	1+	1+
0031631	0	1+
0038299	1+	1+
0034167	1+	1+
0035114	0	1+

Unterschiedlich differenzierte Adenokarzinome der Prostata zeigten größtenteils eine schwache, einige eine schwach bis mäßig starke oder negative Reaktion; vereinzelte Gewebe reagierten mäßig stark positiv. Positiv reagierten hierbei die Drüsenepithelien, das Stroma dagegen in den meisten Fällen negativ. Zwischen den verschiedenen Tumordifferenzierungen war in der Stärke der Reaktion kein nachweisbarer Unterschied zu erkennen. Auch zwischen den beiden mAK konnte kein eindeutig stärkerer Befund des mAK 677 oder 1189 gegenüber dem anderen erhoben werden.

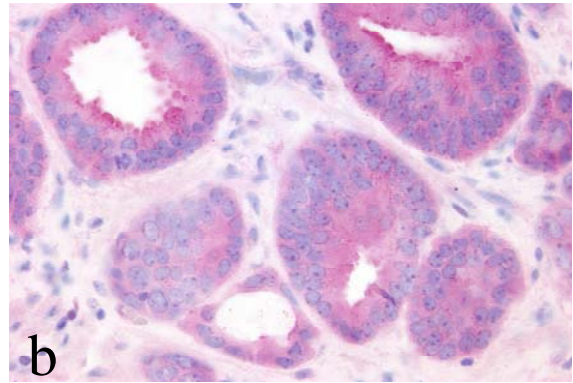
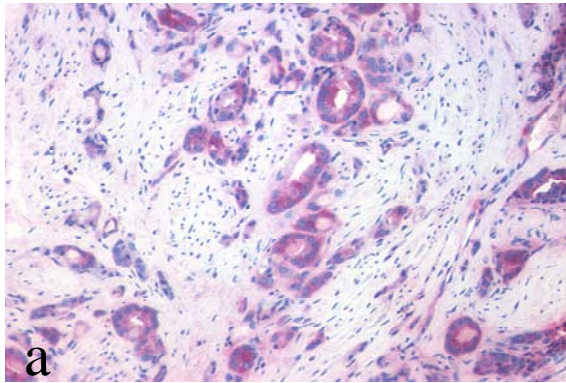


Abb. 7

Wenig differenziertes glanduläres Adenokarzinom der Prostata, mäßig stark positive Reaktion der Zellen des glandulären Tumors

a. mAK 677 – 200fach

b. mAK 677 – 400fach

5. Diskussion

5.1 Nachweis der Immunreaktivität von FSAP

Im Rahmen dieser Arbeit wurde anhand von immunhistochemischen Färbungen mit hoch spezifischen mAK gegen FSAP das Verteilungsmuster der Protease in einer großen Anzahl verschiedener humaner Gewebe und in urologischen Tumoren untersucht.

In einem großen Teil der untersuchten Normalgewebe erwies sich eine Expression von FSAP. Vor allem zeigten verschiedene Epithelien einschließlich der endokrinen Drüsen eine positive Färbung. Die Epithelien waren gegenüber dem Stroma in den meisten Fällen wesentlich immunreaktiver. Überwiegend konnte eine stärkere Immunreaktion des Klon 1189 gegenüber dem Klon 677 in den verschiedenen Normalgeweben nachgewiesen werden. In einigen Geweben zeigte sich aber auch eine stärkere Expression mit dem Klon 677. Eine regelmäßig starke Reaktion in allen Geweben ließen Plasmazellen und Ganglienzellen erkennen. Da eine deutliche Expression der FSAP in einer Vielzahl von Gewebe- und Zelltypen vorliegt, kann FSAP nach den Ergebnissen der Untersuchungen immunhistologisch mit den verwendeten Antikörpern nicht zur Differenzierung bestimmter Zell- oder Gewebetypen herangezogen werden. Es liegen in der Literatur zu diesen Ergebnissen keine Vergleichsmöglichkeiten vor, da die vorliegende Arbeit die erste mit immunhistochemischen Methoden arbeitende Untersuchung von FSAP mit humanen Normalgeweben und malignen urologischen Tumoren ist. Die vorliegende Untersuchung gibt daher zum ersten Mal Aufschluss über die nahezu ubiquitäre Verfügbarkeit und möglicherweise auch Wirksamkeit von FSAP.

5.2 Lokalisation, Funktion und Aktivierung von FSAP

Die zytoplasmatische Immunreaktivität mit Antikörpern gegen FSAP zeigt, dass diese Protease in einem lichtmikroskopisch nicht näher identifizierbarem zytoplasmatischen Kompartiment vorhanden ist. Über die Funktion von FSAP im Zytoplasma ist damit noch nichts ausgesagt. Es lässt sich allerdings die Verteilung dieser Protease in verschiedenen Zellen und Geweben durch die Immunhistochemie

verlässlich erfassen. Im Gegensatz zu anderen hämostatischen Proteasen ist die Verteilung von FSAP sehr weitreichend (nicht nur in Endothelien, sondern auch in verschiedenen epithelialen, neuronalen und lymphatischen Geweben). Die Halbwertszeit des Proenzym in der Zirkulation beträgt ca. sechs Stunden, im Vergleich zu einigen Minuten von z.B. FVII oder Protein C, zwei klassischen Proenzymen des hämostatischen Systems. Folglich kann das Proenzym bei normalen Plasmaspiegeln von FSAP von ca. 12 µg/ml entfernte Orte erreichen, wohin es durch bisher unbekannte Mechanismen transportiert wird (Römisch et al., 2001).

Die Lokalisation von FSAP in vielen verschiedenen Zellen und Geweben im Körper könnte darauf hinweisen, dass die Reaktionen der Protease lokal kontrolliert werden (Kannemeier et al., 2001). Positiv reagierten intrazelluläre Kompartimente, was möglicherweise bedeutet, dass FSAP in diesen Zellen gebildet wird oder sekundär durch Endozytose in die Zellen gelangt. Die Hypothese der aktiven Bildung der Protease intrazellulär wird auch durch Northern blotting Studien unterstützt, die den RNA-Nachweis für die Protease in Leber, Niere und Pankreas belegen (Choi-Miura et al., 1996).

Die Leber ist als Syntheseort bekannt, von wo aus FSAP in die Zirkulation abgegeben wird. Möglicherweise sind aber auch andere Gewebe eingebunden in die Biosynthese. Durch eine spezifische Schädigung der Leber und durch eine partielle Hepatektomie wurde in einer Studie eine verstärkte Konversion vom Proenzym in die aktive tc-Form von FSAP in der Maus festgestellt. Diese Ergebnisse lassen eine spezifische Aktivierung der Protease im Plasma nach Verletzung der Leber vermuten. Möglicherweise ist FSAP beteiligt an der Kaskade des Geweberemodellings in der Leber; wobei FSAP Urokinase aktivieren würde, Urokinase aktiviert wiederum die Matrix-Metalloproteasen (MMPs), welche dann extrazelluläre Matrix (ECM) für die Regeneration der Leber abbauen (Choi-Miura et al., 2001b). Die Bindung an polyanionische Glykosaminoglykane (wie Heparin, Dermatansulfat, Hyaluronsäure), die ihrerseits an Zelloberflächen oder an der ECM verankert sind, kann zur Autoaktivierung von FSAP beitragen (Nakazawa et al., 2005). Verschiedene Untersuchungen demonstrierten FSAP als Kininogen-, Vitronectin-, Fibronectin- und Fibrinogenspaltendes Enzym, wobei die letzten drei spezifische Matrix-Proteine sind und eine essentielle Rolle als Zelladhäsionsmoleküle spielen. Die Eigenschaft von FSAP mit ECM/Zelloberflächen

zu interagieren weist auf eine mögliche Teilnahme an der Regulation von Zelladhäsion und Proliferation oder am Matrixabbau hin (Etscheid et al., 2002b; Kreß et al., 2002).

Ergebnisse einer Studie von Vostrov et al. (2000) deuten darauf hin, dass FSAP im Serum möglicherweise in einem Komplex mit anderen Faktoren vorliegt, welche die proteolytische Aktivität regulieren. Wenn FSAP aus dem Komplex freigesetzt ist, würde die proteolytische Aktivität schnell verfallen. Dies lässt vermuten, dass FSAP-Proteolyse in manchen Fällen einen lokalisationspezifischen transienten Charakter hat. Bei der Degradation großer Mengen von HA während der Wundheilung könnte FSAP in dem betroffenen Gebiet zum Einsatz kommen. Die Lokalisation und der potentiell transiente Charakter deuten auf eine mögliche Funktion von FSAP in Wundheilungsprozessen hin.

Ein physiologischer Zusammenhang zwischen zellassoziertem FSAP an vaskulären Wänden und der Initiierung der Blutgerinnung kann durch die histologischen Untersuchungen und Funde dieser Arbeit unterstützt werden. Die immunhistologischen Ergebnisse zeigten eine Expression dieses Faktors in der großen Mehrzahl der Gefäßendothelien verschiedener Normalgewebe. Durch vaskuläre Verletzungen könnte FSAP mit Plasmakomponenten wie dem FVII in Kontakt kommen. Dieser würde sofort aktiviert und so die extrinsische Gerinnung starten.

Möglicherweise ist das menschliche Endothel selbst in der Lage, FSAP zu aktivieren, wodurch Blutgerinnung und Fibrinolyse beeinflusst werden könnten. Wenn zelluläre Verletzungen selbst einen Aktivierungsmechanismus darstellen, könnte der limitierte Kontakt von extra- und intrazellulären Komponenten als einleitender Vorgang der Hämostase dienen (Nakazawa et al., 2002). Inzwischen ist bekannt, dass durch Zellschäden freigesetzte RNA (extracellular RNA) in der Lage ist als Cofactor für die (Auto-)Aktivierung von FSAP zu wirken (Nakazawa et al., 2005).

Wegen der starken Affinität zu Glykosaminoglykanen wurde eine Studie durchgeführt, um die Wirkung von FSAP auf vaskuläre Strukturen zu charakterisieren. Die Ergebnisse zeigten eine spezifische Interaktion von FSAP mit humanen vaskulären glatten Muskelzellen (Kannemeier et al., 2002). Aufgrund ihrer Affinität zu Glykosaminoglykanen ist es wahrscheinlich, dass die Protease eine Rolle in zell-assozierten oder extrazellulären proteolytischen Ereignissen spielt (Römisch et al., 2002a).

Die Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungen deuten auf neuartige, noch unentdeckte Funktionen der Protease hin. Die physiologischen Funktionen von FSAP sind noch nicht geklärt, aber die verschiedenen Studien lassen eine Aufgabe in der Hämostase vermuten.

5.3 Expression von FSAP im Tumorgewebe

Die Tumorangiogenese wird wesentlich durch spezifische und unspezifische Funktionen von verschiedenen Elementen des hämostatischen Systems wie TF, Thrombin, Fibrin, PA, Plasminogen und Thrombozyten beeinflusst und kontrolliert (Woitukiewicz et al., 2001). Neben Urokinase und verschiedenen anderen proteolytischen Enzymen ist auch PAI-1 eingebunden in das Geweberemodelling während der Invasion und der Metastasierung von Tumorzellen. In einer immunhistochemischen Studie an endometrialen Hyperplasien und Tumoren wurde eine starke Erhöhung von uPA und PAI-1 in Tumoren gegenüber normalem Endometrium festgestellt (Taponeco et al., 2001).

Eine andere immunhistochemische Studie zeigte, dass eine Lokalisation der Antigene von uPA und PAI-1 hauptsächlich in Tumorzellen zu beobachten war, viel weniger in Stromazellen. Am stärksten war die Immunreaktivität beim Adenokarzinom (Papadopoulou et al., 2002). uPA, PAI-1 und uPAR wurden auch bei Tumoren der Niere exprimiert, wobei die Stärke der Expression sich als abhängig vom Tumor-Grading erwies (Swiercz et al., 1998). Nach Hofmann et al. (1996) sind uPA, uPAR und PAI-1 starke und unabhängige Indikatoren für ein frühzeitiges Tumorrezidiv beim Nierenzellcarzinom. Nach Gavrillov et al. (2001) korreliert die Expression von uPA und uPAR mit der Invasivität der Tumorzellen und trägt dazu bei, die Prognose von Tumoren der Prostata und anderen Organen zu bestimmen. Bei einer Studie mit verschiedenen gastrointestinalen Tumoren und Lebermetastasen zeigten alle Tumoren 2-13fach höhere Spiegel der Antigene (ELISA) und der mRNA (Northern blotting) von uPAR (Sier et al., 1993).

Aktive Urokinase ist bekannt als extravaskulärer Plasminogenaktivator, eingebunden in eine Vielzahl von Prozessen des Gewebeumbaus und der Pathologie der Angiogenese. Prourokinase ist ein Hauptsubstrat von aktiver FSAP. Demzufolge wurde in dieser Arbeit das Verteilungsmuster von FSAP in urologischen Tumoren

untersucht. Ein Großteil der untersuchten Tumoren stellte sich FSAP-positiv dar. Insgesamt war keine stärkere Immunreaktion des Klon 1189 oder 677 gegenüber dem anderen Klon zu erkennen.

Von den untersuchten Hodentumoren zeigte der überwiegende Anteil eine schwache Immunreaktion auf FSAP, einige reagierten auch mäßig stark positiv. Auffällig waren die Chorionkarzinome mit einer in jedem Fall sehr intensiven Immunreaktivität der synzytialen Riesenzellen. Wegen einer sehr geringen Fallzahl aufgrund des seltenen Vorkommens kann aber darüber keine allgemeingültige Aussage gemacht werden.

Die klarzelligen Nierenzellkarzinome reagierten alle schwach positiv oder negativ. Die anderen Differenzierungen zeigten eine schwache bis mäßig starke Immunreaktivität. Stärkere Reaktionen waren bei den spindelartigen Zellen der sarkomatoiden Nierenzellkarzinome zu erkennen. Die geringe Fallzahl und die nicht in allen Fällen vorkommende Reaktion schränken jedoch die Allgemeingültigkeit der Aussage ein.

Bei den Prostatakarzinomen wies ein Großteil schwach positive oder negative Immunreaktionen auf die Protease auf. Es war kein Unterschied im Expressionsverhalten zwischen den verschiedenen differenzierten Adenokarzinomen zu erkennen.

Den Ergebnissen zufolge stellt die Expression von FSAP kein Differenzierungsmerkmal für die untersuchten Malignome dar. Die verwendeten mAK lassen sich weder zur Diagnostik maligner urologischer Tumoren einsetzen, noch lassen die Expressionsmuster es zu, Aussagen zur Prognose der verschiedenen Malignome zu treffen.

FSAP ist ein Marker mit ubiquitärem Verteilungsmuster in einer Vielzahl von menschlichen Geweben mit intrazytoplasmatischen Reaktionen. Die größtenteils positiven Reaktionen der urologischen Tumoren lassen vermuten, dass das tumortransformierte Gewebe die Fähigkeit zur Bildung und/oder Aufnahme der Protease nicht verloren hat.

6. Zusammenfassung

6.1 Zusammenfassung

Die „Faktor VII-aktivierende Protease“ ist eine neuartige Serinprotease, die unabhängig von TF den Gerinnungsfaktor VII aktiviert. Außerdem ist sie in der Lage fibrinolytisch als potenter Aktivator von Prourokinase zu wirken. Aufgrund ihrer starken Bindungsaffinität an Glykosaminoglykane wurde sie auch als „plasma hyaluronan binding protein“ (PHBP) beschrieben.

Erste Untersuchungen haben in einer Northern blotting Studie eine Expression von der Protease in Leber, Skelettmuskulatur, Niere und Pankreas gezeigt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Verteilung des Faktors auf Proteinebene in Gewebeproben von menschlichen Normalgeweben und Tumoren untersucht.

Als Verfahren wurde die Immunhistochemie eingesetzt. Mit Hilfe der APAAP-Methode und zweier spezifischer, gegen FSAP gerichteter monoklonaler Antikörper wurde der Expression der Antigene in den genannten Geweben nachgegangen. Eine positive intrazytoplasmatische Reaktion zeigten vor allem verschiedene Epithelien, das Stroma reagierte in vielen Fällen negativ. Eine Expression von FSAP wurde in einer Vielzahl von normalen humanen Geweben und in allen Arten und Differenzierungen der untersuchten urologischen Tumoren nachgewiesen. Einzelne Zelltypen wie z.B. Plasmazellen zeigten in allen untersuchten Organen eine sehr starke Antigen-Expression. Aufgrund des großen Spektrums der positiv reagierenden Zellen und Gewebe, ließ sich diese Expression jedoch nicht als Differenzierungsmerkmal nutzen. Zwischen den verschiedenen histologischen Tumortypen konnten keine Unterschiede im Expressionsverhalten oder Verteilungsmuster der Protease aufgezeigt werden. Nach den vorliegenden Ergebnissen ist nicht davon auszugehen, dass FSAP als ein für bestimmte Tumoren typisches Merkmal aufzufassen wäre. Die Antikörper gegen FSAP lassen sich demnach weder zur immunologischen Diagnostik verschiedener urologischer Malignome noch zur Prognosestellung dieser sinnvoll einsetzen.

Im Gegensatz zu anderen typischen hämostatischen Proteasen, lässt das Vorkommen von FSAP in einer großen Anzahl diverser Zellen und Gewebe auf eine weite Verteilung der Protease schließen.

Sie ist ein ubiquitär vorhandenes Protein, das sich in nicht bekannten intrazellulären Komponenten befindet. Es bleibt in weiteren Studien zu klären, in welchen Organen und Zellen FSAP synthetisiert wird und in welche Zellen oder Gewebe es sekundär aufgenommen wird. Die physiologischen Funktionen der Protease sind bisher noch nicht in allen Einzelheiten geklärt. Die Ergebnisse verschiedener Studien über FSAP deuten vorrangig auf Aufgaben in der Hämostase hin. Möglicherweise kommt die im Gefäßendothel vorhandene Protease durch Verletzungen in Kontakt mit dem im Plasma vorhanden Faktor VII und startet so auf exogenem Weg die Blutgerinnung.

6.2 Abstract

Factor-VII-activating protease (FSAP) is a novel serine protease which activates coagulation factor VII independently of tissue factor (TF). Additionally it can promote fibrinolysis as a potent activator of prourokinase. Due to its high binding affinity for glycosaminoglycans it has also been described as "plasma hyaluronan binding protein". Northern blot studies initially showed the expression of the protease in liver, skeletal muscles, kidney and pancreas.

In our study, we investigated the distribution of FSAP at the protein level in healthy and tumor tissues.

Using immunohistochemistry, more precisely the alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase (APAAP) method, we investigated the expression of the antigens in the tissues mentioned above using two monoclonal anti-FSAP antibodies. A positive cytoplasmic reaction was demonstrated in a multitude of healthy human tissues and in different types of urological tumors and different stages of development of the tumors that were analyzed.

Single cell-types like plasma cells exhibited a very high antigen expression in all analyzed organs.

Since such a broad spectrum of cells and tissues showed an expression, FSAP could not be used as a selection marker. We were unable to show any differences in expression and distribution of FSAP between the different tumor types. On the basis of our results, we cannot assume that FSAP could be a distinctive marker for certain tumors. Therefore the anti-FSAP antibodies can not be used either for immunological clinical diagnostics for various urological malignant tumors or for their prognosis.

In contrast to other typical hemostatic proteases the presence of FSAP in a high number of different cells and tissues suggests that this protease is widely spread. It is a ubiquitous protein with unknown intracellular localization. Further studies are required to show in which organs and cells FSAP is synthesized and into which cells and tissues it is taken up.

The details of the physiological functions of FSAP have not been clarified. The results of several studies suggest mainly a function in hemostasis. Possibly the protease which is present in the vascular endothelium gets into contact with factor VII in the plasma during injury and thereby activates exogenic blood coagulation.

7. Literaturverzeichnis

Adamson AS, Francis JL, Witherow RO, Snell ME

Procoagulant properties of benign and malignant prostatic tissue

Br J Urol 1994; 74:204-209

Bajaj SP, Rapaport SI, Brown SF

Isolation and Characterization of human factor VII. Activation of the factor VII by factor Xa

J Biol Chem 1981; 256:253-259

Böcker W, Denk H, Heitz U

Pathologie

Urban und Schwarzenberg 1997

Callander NS, Varki N, Rao LV

Immunohistochemical identification of tissue factor in solid tumors

Cancer 1992; 70:1194-201

Carmeliet P, Moons L, Herbert JM, James C, Florea L, Lijnen R, Collen D

Urokinase but not tissue plasminogen activator mediates arterial neointima formation in mice

Circ Res 1999; 81:829-839

Choi-Miura NH, Yoda M, Saito K, Takahashi K, Tomita M

Identification of the substrates for plasma hyaluron bind protein.

Biol Pharm Bull 2001a; 24:140-143

Choi-Miura NH, Otsuyama K, Sano Y, Saito K, Takahashi K, Tomita M

Hepatic Injury-Specific Conversion of Mouse Plasma Hyaluronan Binding Protein to the Active Hetero-Dimer Form

Biol Pharm Bull 2001; 24:892-896

Choi-Miura NH, Saito K, Takahashi K, Yoda M, Tomita M

Regulation Mechanism of the Serine Protease Activity of Plasma Hyaluron Binding Protein

Biol Pharm Bull 2001c; 24:221-225

Choi-Miura NH, Takahashi K, Yoda M, Saito K, Mazda T, Tomita M

Proteolytic Activation and Inactivation of the Serine Protease Activity of Plasma Hyaluron Binding Protein

Biol Pharm Bull 2001d; 24:448-452

Choi-Miura NH, Tobe T, Sumiya J, Nakano Y, Sano Y, Mazda T, Tomita M

Purification and Characterization of a novel Hyaluron-Binding Protein (PHBP) from Human Plasma: It has three EGF, a kringle and a Serine Protease Domain, Similar to Hepatocyte Growth Factor Activator

J Biochem 1996; 119:1157-1165

Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmermann GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM

Endothelial Cells in Physiology and in the Pathophysiology of Vascular Disorders

Blood 1998; 91:3527-3561

Clowes AW, Clowes MM, Au YPT, Reidy MA, Belin D

Smooth muscle cells express urokinase during mitogenesis and tissue-type plasminogen activator during migration in injured rat carotid artery

Circ Res 1990; 67:61-67

Coughlin SR

Protease-Activated Receptors and Platelet Function

Thrombosis and Haemostasis 1999; 82:353-356

Denko NC, Giaccia AJ

Tumor Hypoxia, the physiological link between Trousseau's syndrome (carcinoma-induced Coagulopathy) and metastasis

Cancer Res 2001; 61:795-798

Esmon CT, Xu J, Gu JM, Qu D, Laszik Z, Ferrell G, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Taylor FB, Esmon NL

Endothelial Protein C Receptor

Thrombosis and Haemostasis 1999, 82:251-258

Etscheid M, Beer N, Seitz R, Dodt J

Regulation of the hyaluron-binding serine protease from human plasma

Ann Haematol 2002a; 81:A16

Etscheid M, Beer N, Fink E, Seitz R, Dodt J

Cleavage of HMW kininogen and release by the hyaluronan-binding protease from human plasma

Ann Haematol 2002b; 81:A16

Etscheid M, Hunfeld A, König H, Seitz R, Dodt J

Activation of proPHBSP, the Zymogen of a Plasma Hyaluron Binding Serine Protease, by an Intermolecular Autocatalytic Mechanism

Biol Chem 2000, 381:1223-1231

Fischer C, Klein B, Weimar B, Weidner W

Trousseau's syndrome in renal cell carcinoma

Br J of Urology 1996; 78: 471-472

Gavrilov D, Kenzior O, Evans M, Calaluca R, Folk WR

Expression of urokinase plasminogen activator and receptor in conjunction with the ets family and AP-1 complex transcription factors in high grade prostate cancers

Eur J Cancer 2001; 37:1033-1040

Greiling H, Gressner AM

Lehrbuch der klinischen Chemie und Pathobiochemie

Schattauer 1995

Hashimoto K, Tobe T, Sumiya J, Saguchi K, Sano Y, Nakano Y, Choi-Miura NH,
Tomita M

*Cloning of the cDNA for a Mouse Homologue of the Human PHBP: a Novel
Hyaluron-Binding Protein*

Biol Pharm Bull 1997; 20:1127-1130

Hofmann R, Lehmer A, Buresch M, Hartung R, Ulm K

*Clinical relevance of urokinase plasminogen activator, its receptor, and its inhibitor in
patients with renal cell carcinoma*

Cancer 1996; 78:487-492

Hunfeld A, Etscheid M, König H, Seitz R, Dodt J

*Detection of a novel plasma serine protease during purification of vitamin K-
dependent coagulation factors*

FEBS Letters 1999; 456:290-294

Kannemeier C, Feussner A, Stohr HA, Weisse J, Preissner KT, Römisch J

Factor VII and single-chain plasminogen activator-activating protease

Activation and autoactivation of the proenzyme

Eur J Biochem 2001; 268:3789-3796

Kannemeier C, Al-Fakhri N, Preissner KT, Kanse SM

*Factor VII-activating protease (FSAP) inhibits growth factor-mediated cell
proliferation and migration of vascular smooth muscle cells*

FASEB Journal 2004; 18:728-730

Knoblauch B, Kellert J, Battmann A, Kannemeier C, Preissner K-T, Roemisch J
A histological study of FVII-activating protease (FSAP) distribution in human tissue.
- *An Immunhistological Approach* -
Ann Haematol 2002; 81:A42

Kreß J, Beer N, Seitz R, Dodt J, Etscheid M
Interaction of the plasma hyaluronan-binding serine protease with extracellular matrix proteins
Ann Haematol 2002; 81:A47

Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskeras F, Greer JP, Rodgers GM
Wintröbe's Clinical Hematology, Vol. 1
Williams & Wilkins, 1999

Marutsuka K, Suzumiya J, Kataoka H, Komada N, Kono M, Sumiyoshi A
Correlation between urokinase-type plasminogen activator production and the metastatic ability of human rectal cancer cells.
Invasion Metastasis 1991; 11:181-191

Miyazawa K, Shimomura T, Kitamura A, Kondo J, Morimoto Y, Kitamura N
Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for a human serine protease responsible for activation of hepatocyte growth factor. Structural similarity of the protease precursor to blood coagulation factor XII.
J Biol Chem 1993; 268:10024-10028

Murphy WM, Beckwith JB, Farrow GM
Atlas of Tumor Pathologie, Tumors of the Kidney, Bladder, and Related Urinary Structures
Armed Forces Institute of Pathology, 1994

Nakazawa F, Kannemeier C, Römisch J, Preissner KT
Cellular effectors enhance the (auto)activation of factor VII activating protease (FSAP)
Ann Hematol 2002; 81:A58

Nakazawa F, Kannemeier C, Shibamiya A, Song Y, Tzima E, Schubert U, Koyama T, Niepmann M, Trusheim H, Engelmann B, Preissner KT

Extracellular RNA is a natural cofactor for the (auto-)activation of Factor VII-activating protease (FSAP)

Biochem J 2005; 385:831-838

Papadopoulou S, Scorilas A, Yotis J, Arnogianaki N, Plataniotis G, Agnanti N, Talieri M

Significance of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression in human colorectal carcinomas

Tumour Biol. 2002; 23:170-178

Pepper MS

Extracellular Proteolysis and Angiogenesis

Thrombosis and Haemostasis 2001; 86:346-55

Preissner KT, Nawroth PP, Kanse SM

Vascular protease receptors: integrating haemostasis and endothelial cell functions

Journal of Pathology 2000; 190:360-372

Rao LV

Tissue factor as a tumor procoagulant

Cancer Metastasis Rev 1992; 11:249-266

Remmele W

Pathologie, Band 5

Springer 1997

Rodriguez R, Walsh P

Trousseau's syndrome in a patient with metastatic prostate cancer

J of Urology 2000; 163:1877

Roemisch J

Factor VII Activating Protease (FSAP): A novel Protease in Hemostasis

Biol Chem 2002a; 383:1119-1124

Roemisch J, Feussner A, Nerlich C, Stoehr HA, Weimer T

The frequent Marburg I polymorphism impairs the prourokinase activating potency of the factor VII-activating protease (FSAP)

Blood Coag Fibrin 2002b; 13:433-441

Römisch J, Feussner A, Stöhr HA

Quantitation of the factor VII- and single-chain plasminogen activator-activating protease in plasma of healthy subjects

Blood coagulation & fibrinolysis 2001; 12:375-383

Römisch J, Feussner A, Vermöhlen S, Stöhr HA

A protease isolated from human plasma activating Factor VII independent of tissue factor

Blood Coagulation and Fibrinolysis 1999a; 10:471-479

Römisch J, Vermöhlen S, Feussner A, Stöhr HA

The FVII Activating Protease Cleaves Single-Chain Plasminogen Activators

Haemostasis 1999b; 29: 292-299

Roemisch J, Feussner A, Stoehr HA

The FVII activating protease mediates fibrinolytic effects activating single-chain plasminogen activators

Ann Haematol 1999c; 78:A24

Ross R

The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s

Nature 1993; 362:801-809

Ruf W, Mueller BM

Tissue Factor Signaling

Thrombosis and Haemostasis 1999; 82:175-182

Sánchez-Ortiz RF, Fraker DL, Malkowicz SB

Renal cell carcinoma presenting with mesenteric thrombosis and Anticardiolipin Antibodies: Echoes of Trousseau syndrome?

J of Urology 1998; 159:2078

Shi GP, Sukhova GKB, C.L., Grubb AM, N., Ducharme A, Rhode LH, Lee RT, Ridker PM, Libby P, Chapman HA

Cystatin C deficiency in human atherosclerosis and aortic aneurysms

J Clin Invest 1999; 104:1191-1197

Siegbahn A

Cellular Consequences upon Factor VIIa Binding to Tissue Factor

Haemostasis 2000; 30:41-47

Sier CF, Quax PH, Vloedgraven HJ, Verheijen JH, Griffioen G, Ganesh S, Lamers CB, Verspaget HW

Increased urokinase receptor levels in human gastrointestinal neoplasia and related liver metastases.

Invasion Metastasis 1993; 13:277-288

Sumiya J, Asakawa S, Tobe T, Hashimoto K, Saguchi K, Choi-miura NH, Shimizu Y, Minoshima S, Shimizu N, Tomita M

Isolation and Charakterization of the Plasma Hyaluron-Binding Protein (PHBP) Gene (HABP2)

J Biochem 1997; 122:983-990

Swiercz R, Wolfe JD, Zaher A, Jankun J

Expression of the plasminogen activation system in kidney cancer correlates with ist aggressive phenotype

Clin Cancer Res. 1998; 4:869-877

Taponeco F, Curcio C, Giuntini A, Nardini V, Fornaciari G, Artini PG, D`Ambrogio G, Genazzani AR

Expression and prognostic significance of urokinase and plasminogen activator inhibitor type-1 in endometrial hyperplasia and cancer.

J Exp Clin Cancer Res 2001; 20:239-246

Ulbright TM, Amin MB, Young RH

Atlas of Tumor Pathology, Tumors of the Testis, Adnexa, Spermatic Cord, and Scrotum

Armed Forces Institute of Pathology, 1999

van Deijk WA, van Dam-Mieras MC, Muller AD

Activation of factor VII in patients with carcinoma of the prostate. A preliminary report.

Haemostasis 1983; 13:198-200

van` t Veer C, Mann KG

The regulation of the factor VII-dependent coagulation pathway: rationale for the effectiveness of recombinant factor VIIa in refractory bleeding disorders.

Semin Thromb Hemost 200; 26:367-372

Vassalli JD, Sappino PS, Belin D

The plasminogen Activator/Plasmin System

J Clin Invest 1991; 88:1067-1072

Vostrov A, Quitschke W

*Plasma hyaluron-binding protein PHBP is a serine protease**

J Biol Chem 2000; 275: 22978-22985

Wojtukiewicz MZ, Sierko E, Klement P, Rak J

The hemostatic system and angiogenesis in malignancy.

Neoplasia 2001; 3:371-384

Wojtukiewicz MZ, Zacharski LR, Memoli VA, Kisiel W, Kudryk BJ, Rousseau SM, Stump DC

Malignant Melanoma Interaction with Coagulation and Fibrinolysis Pathways In Situ
Am J Clin Pathol 1990; 93:516-521

Young RH, Srigley JR, Amin MB, Ulbright TM, Cubilla AL

Atlas of Tumor Pathology, Tumors of the Prostate Gland, Seminal Vesicles, Male Urethra, and Penis

Armed Forces Institute of Pathology, 2000

Zacharski LR, Memoli VA, Rousseau SM

Coagulation-cancer interaction in situ in renal cell carcinoma
Blood 1986; 68:394-399

Zhao W, Wang X, Qu B, Huang X, Wang H

Clinical significance of plasma tissue factor pathway and urokinase-type plasminogen activator system in cancer patients

Chin Med J 2002; 115:702-704

8. Anhang

8.1 Reagentien und Lösungsansätze

Spülpuffer TBS:

- 18g Tris Base (Trizma Base, Fa. Sigma)
- + 137g Tris HCL (United States Biochemicals, Cleveland)
- + 175,6g NaCl (Roth, Karlsruhe)
- + 2500 ml Aqua dest.

Der pH-Wert sollte zwischen 7,4 und 7,6 liegen; die Lösung wird dann auf 20 l mit Aqua dest. aufgefüllt.

Citratpuffer:

- 9 ml Stammlösung A
- + 41 ml Stammlösung B
- + 450 ml Aqua dest.

Stammlösung A: 21,01g Zitronensäure (0,1 molar, Merck, Darmstadt) + 1000 ml Aqua dest.

Stammlösung B: 29,41g Natriumcitrat (0,1 molar, Merck, Darmstadt) + 1000 ml Aqua dest.

Die Stammlösungen werden im Kühlschrank aufbewahrt.

Hämalaun:

- 1g Hämatoxylin (Merck, Darmstadt)
- + 0,2g NaJO₃ (Merck, Darmstadt)
- + Kalilaun (Merck, Darmstadt)
- + 1000 ml Aqua dest.
- + 50g Chloralhydrat (Merck, Darmstadt)
- + 1g Zitronensäure (Merck, Darmstadt)

Eosin:

Stammlösung: 10g Eosin (Merck, Darmstadt) + 1000 ml 96% Alkohol

Eosin-Gebrauchslösung: 100 ml Stammlösung

+ 100 ml 70% Alkohol

+ 3-4 Tropfen 100% Essigsäure (Merck, Darmstadt)

DAKO ChemMate™ Detektionskit:

APAAP, Maus

Code-Nr. K 5000

Enthaltene Reagentien:

Flasche A: Sekundärantikörper (120 ml, gebrauchsfertig), Kaninchen anti-Maus Immunglobuline in Pufferlösung, die Hintergrund reduzierende Komponenten und Natriumazid enthält

Flasche B: APAAP-Immunkomplex (120 ml, gebrauchsfertig), lösliche Immunkomplexe, aufbereitet aus intestinaler alkalischer Phosphatase vom Kalb und monoklonale Maus-Antikörper gegen diese alkalische Phosphatase, in Pufferlösung, die Hintergrund-reduzierende Komponenten, Stabilisatoren und Natriumazid enthält.

Flasche C: Chromogen Red 1 (8 ml konzentriert x 28)

Flasche D: Chromogen Red 2 (8 ml konzentriert x 28)

Flasche E: Chromogen Red 3 (8 ml konzentriert x 28)

Flasche F: AP Substratpuffer (250 ml, gebrauchsfertig)

Flasche G: Levamisol (1 ml konzentriert x 250)

8.2 Abkürzungsverzeichnis

AP	alkalische Phosphatase
APAAP	alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase
APTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
BTTP	british testicular tumour panel
ECM	extra cellulare matrix
EGF	epidermal-growth-factor
FSAP	factor seven activating protease
FVII	Faktor VII
HGF	hepatocyte growth factor
HA	hyaluronic acid
mAK	monoklonaler Antikörper
NZK	Nierenzellkarzinom
PA	Plasminogenaktivator
PAI-1	plasminogen activator inhibitor type 1
PHBP	plasma hyaluronan-binding protein
PHBSP	plasma hyaluronan binding serine protease
PSA	prostata spezifisches Antigen
PSAP	prostataspezifische saure Phosphatase
sc	single-chain
sc-PA	single-chain plasminogen activator
sct-PA	single-chain plasminogen activator of tissue
scu-PA	single-chain plasminogen activator of urokinase
tc	two-chain
tctPA	two-chain plasminogen activator of tissue
tcuPA	two-chain plasminogen activator of urokinase
TBS	tris buffered saline
TF	tissue factor
uPA	urokinase plasminogen activator
uPAR	urokinase plasminogen activator receptor
WHO	world health organisation

8.3 Erklärung

Ich erkläre:

„Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten und nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

8.4 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Keil, geb. Kellert
Vorname: Judith
Geburtsdatum: 02.03.1975
Geburtsort: Bielefeld
Anschrift: Glaubrechtstr. 12
35392 Gießen
Familienstand: geschieden
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1981-1985 Grundschule in Osnabrück
1985-1987 Orientierungsstufe in Osnabrück
1987-1994 Gymnasium in Osnabrück, Abschluss: Abitur

Auslandsaufenthalte

1994/95 Diakonisches Jahr in England
1998 Studiensemester in Parma, Italien

Hochschulausbildung

1996-2003 Studium der Humanmedizin an der
Justus-Liebig-Universität Gießen
1998 Ärztliche Vorprüfung
1999 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2002 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2002-2003 Praktisches Jahr (JLU Gießen,
Evangelisches Krankenhaus Gießen)
2003 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Berufliche Tätigkeiten

01/04-09/04

Ärztin im Praktikum, Abteilung für Anästhesiologie,
Universitätsklinikum Gießen

Seit 10/04

Assistenzärztin, Abteilung für Anästhesiologie,
Universitätsklinikum Gießen

8.5 Danksagung

In erster Linie danke ich Herrn Prof. Dr. A. Schulz, Direktor des Institutes für Pathologie der JLU - Gießen für die Möglichkeit der Nutzung des Datenmaterials und der Forschungseinrichtungen seines Institutes und für die Betreuung und Hilfestellung während der Fertigstellung der Arbeit.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. B. Knoblauch, Chefarzt der Abteilung für Pathologie der Hochtaunus-Kliniken für die Übertragung des Themas, die Betreuung und die Unterstützung bei Sichtung und Auswertung des histologischen Materials.

Herrn Prof. Dr. K.T. Preissner danke ich für die Kooperation und für die Anregungen und konstruktive Kritik im wissenschaftlichen Bereich.

Zu großem Dank verpflichtet bin ich Herrn Frank Dönges, der mir bei der Herstellung der Gewebeschnitte und anderer technischer Tätigkeiten mit Rat und Tat zur Seite stand.

Hilfe und Anleitung der nachfolgend Genannten haben ebenfalls zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen. Mein herzlicher Dank gilt daher auch: Frau Gudrun Jurat, Frau Cornelia Anders, Frau Petra Hahn-Kohlberger, Frau Christa Grunewald und Frau Marlene Stein.

Meinen Eltern danke ich für die Zeit und Unterstützung, die sie mir für mein Studium im Allgemeinen und diese Arbeit im Besonderen zur Verfügung gestellt haben.

Abschließend danke ich Herrn Dirk Uphus für seine Unterstützung, nicht nur in EDV-Angelegenheiten.