

Aus der Klinik und Poliklinik für Chirurgie der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf
Abteilung für Allgemeinchirurgie

Prof. Dr. med. J. R. Izbicki

**UNTERSUCHUNGEN ZUR MODULATION DER EXPRESSION DES
FIBROBLAST-ASSOCIATED (FAS/APO-1/CD95)-RECEPTOR
UND SEINES NATÜRLICHEN LIGANDEN (FAS-LIGAND) BEI
LEBERMETASTASEN UND LEBERMETASTASENREZIDIVEN
KOLOREKTALER KARZINOME:**

HÄUFIGKEIT UND PROGNOTISCHE BEDEUTUNG

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von
Michael Renken

aus Soltau

Hamburg
2001

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: *23. Oktober 2001*

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Dekan: *Prof. Dr. Ch. Wagener*

Referent: *Priv. Doz. Dr. S. B. Hosch*

Koreferent: *Prof. Dr. J. Izbicki*

Inhalt

INHALT.....	I
TABELLENVERZEICHNIS	III
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	III
1 EINLEITUNG	1
1.1 PROBLEMSTELLUNG	1
1.2 LEBERMETASTASEN KOLOREKTALER KARZINOME	2
1.3 DER ZELLTOD	4
1.3.1 Nekrose.....	4
1.3.2 Apoptose	4
1.4 DAS FAS-SYSTEM	7
1.4.1 Fas(APO-1/CD95)-Rezeptor (FasR) und Fas-Ligand (FasL)	7
1.4.2 Expression von FasR und FasL.....	9
1.4.3 Bedeutung und Funktion des Fas-Systems	9
1.4.3.1 Innerhalb des Immunsystems.....	9
1.4.3.2 Für nicht-immunkompetente Zellen	10
1.4.4 Signaltransduktion („apoptotic pathway“).....	10
1.4.5 Expression von FasR und FasL auf malignen soliden Tumoren	14
2 MATERIAL UND METHODEN.....	16
2.1 PATIENTEN	16
2.1.1 Primäre Lebermetastasen	16
2.1.2 Lebermetastasenrezidive.....	17
2.2 NACHBEOBACHTUNG	19
2.3 IMMUNHISTOCHEMIE	20
2.3.1 Gewebeaufbereitung	20
2.3.2 Antikörper und Färbekontrollen.....	20
2.3.3 Immunhistochemische Färbungen.....	21
2.3.3.1 APAAP-Technik.....	22
2.3.3.2 ABC-Technik	23
2.4 AUSWERTUNG.....	25
2.4.1 FasR-Expression	25
2.4.2 FasL-Expression	27

2.5 STATISTISCHE ANALYSEN	28
3 ERGEBNISSE	29
3.1 ERGEBNISSE DER IMMUNHISTOCHEMIE	29
3.1.1 FasR-Expression	29
3.1.1.1 FasR-Expression auf primären Lebermetastasen	29
3.1.1.2 FasR-Expression auf Lebermetastasenrezidiven	30
3.1.2 FasL-Expression	33
3.1.2.1 FasL-Expression auf primären Lebermetastasen	33
3.1.2.2 FasL-Expression auf Lebermetastasenrezidiven	34
3.1.3 Koexpression von FasR und FasL	36
3.2 ERGEBNISSE DER NACHBEOBACHTUNG	38
3.2.1 Primäre Lebermetastasen	38
3.2.2 Lebermetastasenrezidive	40
3.3 KORRELATION DER NACHBEOBACHTUNGSDATEN MIT ETABLIERTEN PROGNOSEPARAMETERN	41
3.4 KORRELATION DER NACHUNTERSUCHUNGSDATEN MIT DEN ERGEBNISSEN DER IMMUNHISTOCHEMIE	46
3.4.1 Einfluß der FasR-Downregulation auf Rezidivrate und Gesamtüberleben	46
3.4.2 Einfluß der FasL-Expression auf Rezidivrate und Gesamtüberleben	49
3.4.3 Einfluß des FasR/FasL-Expressionsmusters auf Rezidivrate und Gesamtüberleben	51
4 DISKUSSION	53
5 ZUSAMMENFASSUNG	61
LITERATURVERZEICHNIS	62
DANKSAGUNG	73
LEBENS LAUF	74
ERKLÄRUNG	75
PUBLIKATIONEN	76

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Exemplarische Darstellung der FasR- und FasL-Expression.....	15
Tab. 2	Charakteristika der Patienten und deren Lebermetastasen	18
Tab. 3	Darstellung der Resektionverfahren und des Resektionsstatus.....	19
Tab. 4	Verwendete Antikörper.....	21
Tab. 5	Semiquantitative Bewertung der FasR-Expression.....	26
Tab. 6	Semiquantitative Bewertung der FasL-Expression	28
Tab. 7	Übersicht über die Expressionsmuster von FasR und FasL	37
Tab. 8	Inzidenz von Rezidiven während der Nachbeobachtung	39
Tab. 9	Inzidenz von Lokalrezidiven während der Nachbeobachtung	40
Tab. 10	Inzidenz von Rezidiven bei Lebermetastasenrezidiv-Patienten	41
Tab. 11	Analyse der Nachbeobachtungsdaten.....	45
Tab. 12	Einfluß der FasR-Expression auf Rezidivrate und Gesamtüberleben	48
Tab. 13	Einfluß der FasL-Expression auf Rezidivrate und Gesamtüberleben.....	50
Tab. 14	Einfluß des Expressionsmusters auf Rezidivrate und Gesamtüberleben	52

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Nekrose und Apoptose im Überblick	6
Abb. 2	Struktur des FasR	8
Abb. 3	Schematische Darstellung der Signaltransduktion	13
Abb. 4	Übersicht über die FasR-Expression auf primären Lebermetastasen.....	29
Abb. 5	Übersicht über die FasR-Expression auf Lebermetastasenrezidiven.....	30
Abb. 6	Lebermetastase mit FasR-Downregulation	31
Abb. 7	Lebermetastase mit FasR-Downregulation (Ausschnittsvergrößerung).....	31
Abb. 8	FasR-positive Lebermetastase.....	32
Abb. 9	FasR-positive Lebermetastase (Ausschnittsvergrößerung).....	32
Abb. 10	Übersicht über die FasL-Expression auf primären Lebermetastasen	33
Abb. 11	Übersicht über die FasL-Expression auf Lebermetastasenrezidiven	34
Abb. 12	FasL-positive Lebermetastase	35
Abb. 13	FasL-positive Lebermetastase (Ausschnittsvergrößerung).....	35
Abb. 14	Darstellung der Koexpression von FasR und FasL	37
Abb. 15	Gesamtüberleben in Abhängigkeit von Resektionsstatus.....	42

Abb. 16	Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Manifestationsform der Lebermetastasen (synchron vs. metachron).....	43
Abb. 17	Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Manifestationsform der Lebermetastasen (solitäre vs. zwei vs. multiple Lebermetastasen)	44
Abb. 18	Modulation des Fas-Systems durch Tumorzellen.....	60

1 Einleitung

1.1 Problemstellung

Patienten mit kolorektalen Karzinomen haben ein hohes Risiko, im Verlauf ihrer Erkrankung Lebermetastasen zu entwickeln. Die Inzidenz einer isolierten Lebermetastasierung liegt zum Zeitpunkt der Resektion des Primärtumors bei etwa 25% [79]. Den meisten Patienten kann in diesem Stadium der Tumorerkrankung lediglich ein palliatives Therapieverfahren (lokale und systemische Chemotherapie, Embolisation, Chemoembolisation, u.a.) angeboten werden [16,20]. Den einzigen Therapieansatz mit kurativer Intention stellt unverändert die chirurgische Resektion der kolorektalen Lebermetastase dar. Wichtige Voraussetzungen für ein operatives Vorgehen sind dabei die Resektabilität der Tochtergeschwulst und die funktionelle Operabilität des Patienten [20]. Trotz verbesserter chirurgischer Techniken und adjuvanter Therapiemöglichkeiten erleidet jedoch ein Großteil dieser Patienten ein systemisches oder lokoregionäres Rezidiv. So entwickeln etwa 43% der Patienten erneut Metastasen in der verbliebenen Restleber, bei weiteren 31% kommt es postoperativ zum Auftreten von Metastasen an anderen Lokalisationen [31]. Die postoperative 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) von Patienten mit kurativ intendiert resezierten Lebermetastasen liegt zwischen 25–35% [18,31,43].

Bei der Suche nach möglichen Ursachen für die hohe Inzidenz einer syn- oder metachronen Lebermetastasierung beim kolorektalen Karzinom scheint es sinnvoll, sich die Pathogenese von Tumorwachstum und Metastasierung zu vergegenwärtigen: Voraussetzung für eine Dissemination von Tumorzellen ist ein lokal-invasives Wachstum des Tumors mit Penetration kleiner Blut- oder Lymphgefäße und anschließender Loslösung einzelner Tumorzellen. Während ihrer Passage im zirkulatorischen System und der Absiedelung in Sekundärorgane sind die Tumorzellen einer großen Anzahl potentiell traumatischer und letaler Noxen ausgesetzt [70]. An dieser Stelle kommt dem Immunsystem eine besondere Bedeutung bei der Überwachung der Tumorgenese und –progression zu. Neben der komplement-vermittelten Immunabwehr sind auch spezielle Effektorzellen des zellulären Immunsystems (T-Lymphozyten, Natürliche Killerzellen u.a.) in der Lage, neoplastisch veränderte Zellen anhand spezifischer Proteinstrukturen auf der Zelloberfläche zu erkennen und durch verschiedene Formen der zellvermittelten Zytotoxizität zu eliminieren.

Von besonderer Relevanz scheint hierbei der „fibroblast-associated-receptor“ (Fas/APO-1/CD95) und sein natürlicher Ligand (Fas-Ligand) [25,38,49]. Bei diesen Molekülen handelt es sich um zwei transmembranäre Membranproteine, die zur Familie der Tumornekrose-/Nervenwachstumsfaktoren (TGF/NGF) gezählt werden. Der Oberflächenrezeptor Fas (FasR) vermittelt nach Interaktion mit seinem Liganden (FasL) den apoptotischen Zelltod [38,78]. Auf diesem Wege können funktionell nutzlose, virusinfizierte, neoplastisch transformierte oder anderweitig geschädigte Zellen eliminiert werden [38,87]. Neben Zellen des Immunsystems wird FasR normalerweise von einer Vielzahl adulter Gewebe exprimiert [33,54,87], während FasL vornehmlich von Zellen des Immunsystems und immunprivilegierten Geweben exprimiert wird [1,52,85]. Bei Tumoren sind Modulationen der FasR- und FasL-Expression häufige Ereignisse [51,82,85]. Vieles deutet darauf hin, daß sich Tumorzellen zum einen durch die Herunterregulation der FasR-Expression („down-regulation“) dem Angriff durch Effektorzellen entziehen können („escape from immune surveillance“) und zum anderen in der Lage sind, durch starke Expression („up-regulation“) des FasL ihrerseits Apoptose bei den Immunzellen zu induzieren („counterattack-model“) [24,26,82,85].

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Expression von FasR und FasL auf Lebermetastasen kolorektaler Karzinome zu untersuchen und durch Korrelation mit histopathologischen Parametern und Daten der Überlebensanalyse die prognostische Bedeutung einer FasR/FasL-Expression zu eruieren. Die Darstellung der immunregulatorischen Moleküle FasR und FasL erfolgte über zwei indirekte immunhistochemische Färbemethoden, die Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase (APAAP-)-Methode und die Avidin-Biotin-Komplex (ABC-)-Technik [14,59].

1.2 Lebermetastasen kolorektaler Karzinome

Patienten mit kolorektalen Karzinomen haben heute aufgrund verbesserter chirurgischer Techniken und multimodaler Therapieansätze mit einer 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) von 50% eine insgesamt recht günstige Prognose [16,42]. Einigkeit besteht darüber, daß die Lebermetastasierung die primäre Determinante für das Langzeitüberleben bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen darstellt. In etwa 25% der Fälle sind zum Zeitpunkt der Primärtumoroperation bereits Metastasen (synchrone Lebermetastasen) in der Leber vorhanden, weitere 25% der Patienten entwickeln nach der Resektion ihres kolorektalen Karzinoms Lebermetastasen

(metachrone Lebermetastasen) [18,31,79]. Hingegen werden in Autopsien bei über 65%-90% der Patienten, die an ihrem kolorektalen Krebsleiden versterben, Lebermetastasen gefunden [18,84]. Die hohe Inzidenz der Lebermetastasierung erklärt sich durch die anatomische Lage und physiologische Funktion der Leber. Tumorzellen von kolorektalen Karzinomen gelangen primär über das portale Venensystem (Metastasierung vom „Pfortader-Typ“), lymphatische Drainage oder intraperitoneale Dissemination in die Leber. Rektumkarzinome metastasieren entweder hämatogen über die Pfortader oder die V.cava (Metastasierung vom „Cava-Typ“) oder entlang zentripetaler und lateraler Lymphsysteme in die Lunge [19,42,70].

Die einzige Therapieform mit kurativen Ansatz stellt bis heute die chirurgische Resektion der kolorektalen Lebermetastasen dar [31,36,84]. Dabei sind Vorgehen und Art der Operation abhängig von Anzahl, Lokalisation und Größe der Lebermetastasen. Die Operationsletalität bei resezierenden Eingriffen liegt dabei heute unter 5% [43,71]. Bei den Operationstechniken wird zwischen anatomischen und nicht-anatomischen Resektionen unterschieden. Zu den anatomischen Resektionen zählen:

- Die Segmentresektion (Segmentektomie): Ein ganzes Lebersegment wird entfernt.
- Die Hemihepatektomie: Entfernung einer (chirurgischen) Leberhälfte rechts bzw. links der Fissura principalis in der V.cava-Gallenblasenlinie.
- Die Trisegmentektomie: Durch die Resektion von bis zu 80% des Lebergewebes stellt diese Operation den größten operativen Eingriff dar. Bei der rechtsseitigen Trisegmentektomie werden z.B. die Segmente IV-VIII entfernt.

Andere Operationen, wie erweiterte Hemihepatektomien, Keilexzisionen, Wedge- oder Enukleationsresektionen werden zu den nicht-anatomischen Resektionen gezählt [66]. Bei funktionell inoperablen Patienten und nicht-resektablen Metastasen kommen eine Reihe anderer Therapieformen, wie die lokale und systemische Chemotherapie, die Kryo-, Mikrowellen- und Lasertherapie sowie die lokale Injektion von Alkohol zum Einsatz [43,79].

In der Literatur finden sich stark variierende Angaben über die postoperative 5-JÜR für Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen. Autoren groß angelegter Studien beziffern die 5-JÜR mit 21%, während einzelne Veröffentlichungen über eine 5-JÜR von bis zu 48% berichten [65]. In Abhängigkeit von der Anzahl und Lokalisation der Lebermetastasen kann durch eine chirurgische Therapie für die Patienten eine mediane Überlebenszeit von etwa 25-30 Monaten erzielt werden [36,66]. Unbehandelte kolorektale Lebermetastasen führen in Abhängigkeit von Anzahl und Ausdehnung meist innerhalb eines Jahres nach Diagnosestellung zum Tode [18,66].

Doch trotz kompletter Resektion der Lebermetastasen mit tumorfreien Resektionsrändern (R0) kommt es bei etwa 70% der Patienten postoperativ zur Entwicklung von Rezidiven. Diese sind meistens erneut in der Leber (43%), der Lunge (20%) oder benachbarten Strukturen (10%) lokalisiert [31,71]. Von diesen Patienten mit einem Lebermetastasenrezidiv sind wiederum nur etwa 20% operabel [65]. Die hohe Inzidenz von Rezidiven legt den Schluß nahe, daß es bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung einer Lebermetastasierung zu einer lokalen oder systemischen Dissemination von Tumorzellen gekommen sein muß, die jedoch mit den derzeitigen Staging-Untersuchungen nicht erfaßt werden kann [2].

1.3 Der Zelltod

Die Erforschung des physiologischen Zelltodes hat in den letzten 20 Jahren großes wissenschaftliches Interesse erfahren. Trotz neuer Erkenntnisse über die Pathophysiologie des Zelltodes wird über eine einheitliche Nomenklatur, die den Zelltod in seinen verschiedenen Formen beschreibt, nach wie vor diskutiert [44].

1.3.1 Nekrose

Der Begriff „provozierter Zelltod“ (Nekrose) charakterisiert die morphologischen Veränderungen innerhalb einer Zelle, die durch einen extrinsischen Reiz ausgelöst werden und über Karyopyknose, Karyorhexis und Karyolyse zu ihrem Absterben führen. Der auslösende Reiz kann physikalischen (ionisierende Strahlung), biologischen (infektiöse Keime) oder chemischen (toxische Substanzen) Ursprungs sein und führt über eine Stoffwechselstörung zum Zelltod. [61]. Pathophysiologisch kommt es zur irreversiblen Schädigung von Ionenpumpen der Zellmembran. Dadurch bricht das osmotische Gleichgewicht zusammen, was zum Anschwellen der Zelle (s. Abb. 1, Fig. 1A) und dadurch zum Zerreißen der Organell-, Lysosomen- und Zellmembranen führt. Fettsäuren, Proteolysate, lysosomale Enzyme und verschiedenste Mediatoren werden in den Extrazellulärraum freigesetzt, die durch ihre starken chemotaktischen Eigenschaften Entzündungszellen anziehen (s. Abb. 1, Fig. 1B). Die Folge ist eine akute Entzündungsreaktion, die zum Untergang von ganzen Gewebsverbänden führen kann [44,61].

1.3.2 Apoptose

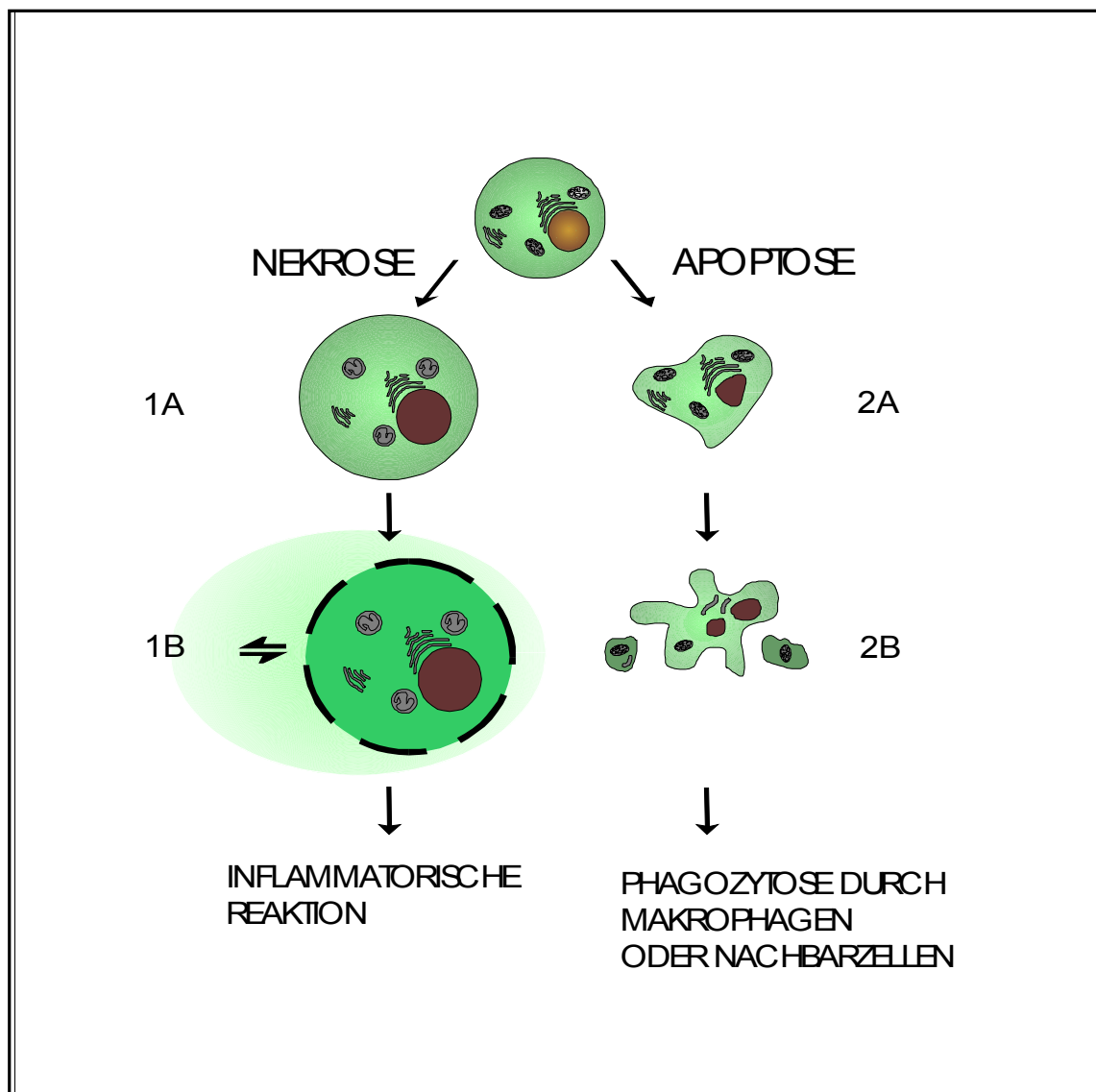
Beim „programmierten Zelltod“ (Apoptose) handelt es sich um eine Form des Zelltodes, der in der Literatur einerseits als Sonderform der Nekrose betrachtet, andererseits dieser aber auch gegenübergestellt wird [*29,61]. Bei der Apoptose

kommt es zum disseminierten Untergang von Zellen, die „wie einzelne Blätter von einem herbstlichen Baum abfallen“ (gr. *apó*: von, *ptósis*: abfallen) [29]. Die Apoptose ist das unmittelbare oder mittelbare Resultat eines zelleigenen Selbstzerstörungsprozesses. Sie kann durch verschiedenste physikalische, chemische, virale, hormonale oder zytokine Faktoren induziert werden oder ohne von außen erkennbare Ursache ablaufen, wenn die Zelle einer Art „inneren Uhr“ folgend am Ende ihrer Lebenszeit ist [29,44,61]. Nach der Aktivierung des Apoptosemechanismus kommt es zur Modifikation von Transkription und Translation. Es entstehen letale Proteine, die über eine Aktivierung von spezifischen Endonukleasen die Fragmentierung des DNA-Strangs in apoptose-spezifische oligonukleosomale Einheiten von ca. 180 Basenpaaren bewirken [41,50]. Das Chromatin kondensiert und lagert sich an die Innenseite der Kernmembran. Dabei kann es zum völligen Kernzerfall (Karyorhexis) kommen. Im weiteren Verlauf schrumpft das Zellvolumen („Schrumpfnekrose“), die Organellen verdichten sich und die Zell-Zellkontakte werden zunehmend aufgehoben (s. Abb 1, Fig. 2A). An der Oberseite der Plasmamembran läßt sich das Ausstülpfen von Zytoplasmablasen („budding phenomenon“) beobachten, die jede Art von Zell- und Kernbestandteilen enthalten können (s. Abb. 1, Fig 2B). Diese inhomogenen Bläschen, die mikroskopisch als Apoptose-Körperchen (z.B. „councilman-bodies“ in der Leber) imponieren, können von speziellen Makrophagen, Nachbar- und epithelialen Zellen phagozytiert oder in ein Drüsenlumen abgestoßen werden [29,44,61]. Die Aufnahme von Zellresten durch benachbarte Zellen stellt dabei eine Besonderheit bei der Apoptose („cellular cannibalism“) dar [44]. Durch die spezifischen Veränderungen der Zelle während der Apoptose unterbleibt die Zerstörung von Zellmembranen und damit die Freisetzung chemotaktischer Substanzen weitestgehend. Eine akute Entzündungs- oder Gewebsreaktion findet nicht statt [29,44]. Die Apoptose läuft im Vergleich zur Nekrose sehr schnell ab. Während bei der Nekrose von der Schädigung bis zur Lyse der Zelle etwa 24 Stunden vergehen, beträgt die Zeitspanne von der Induktion der Apoptose bis zur vollständigen Phagozytose der Zelle nur 3-6 Stunden [50,61].

Es ist möglich, apoptotische Zellen aufgrund der charakteristischen morphologischen Veränderungen schon auf routinemäßig gefärbten Gewebsschnitten zu erkennen [44]. Um genauere Aussagen über Apoptosen in Geweben machen zu können, wurden ausgefeiltere Techniken entwickelt, die auf dem Nachweis apoptose-spezifischer biochemischer Veränderungen oder der Expression von apoptose-assoziierten Proteinen basieren. So werden z.B. die bei der Apoptose entstehenden charakteristischen DNA-Fragmente für den Nachweis apoptotischer Zellen

herangezogen. Verschiedene Techniken ermöglichen es, die feien Enden der DNA-Abschnitte zu detektieren und auf diesem Wege spezifisch einzelne apoptotische Zellen im Gewebsverband nachzuweisen [22,23]. Bei der „terminal deoxytransferase-mediated dUTP nick-end labeling“ (TUNEL) - Technik handelt es sich um eine gängige Methode zum Nachweis von Apoptosen: Über das Enzym „terminal deoxynucleotidyl transferase“ (TdT) können die freien 3'-OH Enden der DNA-Bruchstücke immunhistochemisch markiert und dadurch apoptotische Zellen nachgewiesen werden [39,41,80]. Auf diesem Wege kann dann der sogenannte Apoptose-Index errechnet werden, der das Verhältnis von apoptotischen zu gesunden Zellen in dem untersuchten Gewebsschnitt angibt. Bei Tumoren wird der Apoptose-Index zunehmend als Parameter herangezogen, um das Vordringen von Tumoren in das umliegende Gewebe zu erfassen [69].

Abb. 1 Nekrose und Apoptose im Überblick [44]



1.4 Das Fas-System

1.4.1 Fas(APO-1/CD95)-Rezeptor (FasR) und Fas-Ligand (FasL)

Das Fas-System setzt sich aus dem Fas-Rezeptor (FasR) und seinem natürlichen Liganden (FasL) zusammen. Es handelt sich bei diesen Molekülen um spezielle Membranproteine, die aufgrund ihrer Struktur und Funktion zur Superfamilie der Tumornekrose-/Nervenwachstumsfaktoren (TNF/NGF) gezählt werden [49,75,87].

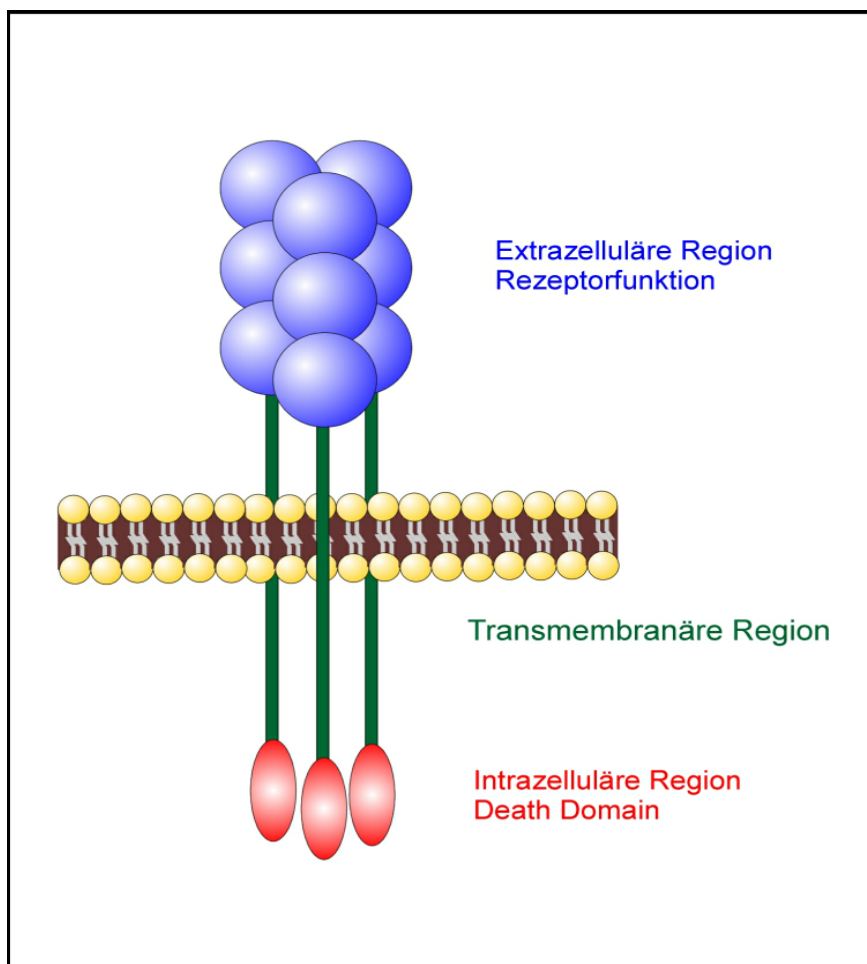
Der FasR ist ein glykolisiertes Membranprotein der Klasse I mit einem Molekulargewicht von etwa 45 kDa [38,49]. Der Genlocus für den FasR liegt auf dem langen Arm des Chromosom 10q23 [87]. Die Grundstruktur des FasR lässt sich in einen extrazellulären, transmembranären und intrazellulären Abschnitt gliedern (s. Abb. 2). Die extrazelluläre COOH-terminale Region ist der Bereich, wo es zur Interaktion mit dem komplementären FasL und dadurch zur Induktion eines Signals kommt. Sie setzt sich aus drei homologen Domänen zusammen, die räumlich ein Trimer formen und aus insgesamt etwa 157 Aminosäuren (AS) bestehen. Biochemisch weist diese Region einen hohen Gehalt an Cystin auf [33,49,54]. Der transmembranäre Abschnitt stellt die Verbindung zwischen extra- und intrazellulärer Region des FasR her und ist für die Signaltransduktion durch die Lipid-Doppelmembran der Zelle verantwortlich. Dieser Abschnitt ist aus 17 hydrophoben AS aufgebaut [33]. Von der intrazellulären N-terminalen Region des FasR wird das Signal auf spezielle Proteine übertragen, die für die Transduktion des Apoptose-Signals im Zytoplasma von besonderer Bedeutung sind. Hierfür ist der FasR mit einer für ihn charakteristischen Region ausgestattet, die in der Literatur als Todesdomäne („death domain“, DD) bezeichnet wird [49]. Die DD besitzt eine spezifische Aminosäuresequenz, die sich aus 68 AS zusammensetzt. Insgesamt umfaßt die intrazelluläre Region etwa 145 AS [10,33].

Der FasL ist ein Membranprotein der Klasse II mit einem Molekulargewicht von etwa 40 kDa [73,74]. Das Gen des humanen FasL ist auf dem Chromosom 1q23 lokalisiert [74,75]. Es handelt sich beim FasL ebenfalls um ein transmembranäres Protein, das strukturell eine große Homologie zum FasR aufweist [56,75]. Die extrazelluläre COOH-terminale Region ist verantwortlich für die Interaktion mit dem FasR und aus etwa 179 AS aufgebaut. Durch einen transmembranären Abschnitt aus 22 hydrophoben AS wird die Verbindung zur zytoplasmatischen Region hergestellt. Die intrazelluläre N-terminale Abschnitt ist reich an Prolin, besitzt aber im Gegensatz zum FasR keine

spezielle Signalsequenz, die für die Transduktion eines Signals ins Zellinnere notwendig wäre [73,75].

Im Serum von Patienten konnten ferner freie nicht-membranständige Formen des FasR und FasL nachgewiesen werden, die als sFasR und sFasL („s“ für engl. „souple“: gelöst) bezeichnet werden [12,77,78]. Der Ursprung und die physiologische Funktion dieser freien Moleküle ist nicht genau bekannt. Es wird angenommen, daß sie durch enzymatische Abspaltung einer spezifischen Matrix-Metalloproteinase (MMP) aus der membranständigen Molekülform des FasR und FasL hervorgehen und die Homöostase des Immunsystems negativ beeinflussen [77]. Von einigen Autoren werden sie im Zusammenhang mit Erkrankungen gesehen, die zu verschiedenen Störungen der Autoimmunität führen [72,77,78]. Eine andere Theorie geht davon aus, daß sich Zellen durch die Sekretion von sFasL vor Effektorzellen des Immunsystems schützen [76].

Abb. 2 Struktur des FasR [54,38,49]



1.4.2 Expression von FasR und FasL

Es besteht derzeit noch kein vollständiger Überblick über die physiologische Expression von FasR und FasL. Man findet eine Expression des FasR auf adulten humanen Geweben wie Thymus, Leber, Ovarien, Lunge, Herz und Nieren [33,54,87]. Des weiteren läßt sich der FasR auf immunkompetenten Zellen, wie T-Lymphozyten [62], B-Lymphozyten [81], Monozyten und Granulozyten nachweisen [52,85].

Der FasL wird vornehmlich von Zellen des Immunsystems exprimiert. So läßt er sich auf immunkompetenten Zellen, wie aktivierten T-Lymphozyten [1,73,78], B-Lymphozyten [85], natürlichen Killerzellen (NK), zytotoxischen T-Lymphozyten, Neutrophilen, Monozyten und Makrophagen nachweisen [1,52,85]. Daneben konnte er in neueren Untersuchungen auf der Oberfläche von verschiedenen nicht-immunkompetenten Zelltypen, wie den Sertoli-Zellen des Hodens [5], Orbitazellen der vorderen Augenkammer [25], neuronalen Zellen im ZNS [62], fetalen Throphoblasten [34], Hepatozyten [11] und Epithelzellen von Haut [40] und Ösophagus [24] dargestellt werden (s. Tab. 1).

1.4.3 Bedeutung und Funktion des Fas-Systems

1.4.3.1 Innerhalb des Immunsystems

Das Fas-System scheint von großer Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Homöostase innerhalb des Immunsystems. Verschiedene Effektorzellen des Immunsystems (T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Makrophagen, u.a.) sind in Abhängigkeit von ihrem Lebensalter und ihrer Funktion in der Lage, den FasR und/oder FasL zu exprimieren. So führt z.B. die Aktivierung der Effektorzellen während einer Immunreaktion zur Expression von FasL. Über den FasL als einen Mediator der zellvermittelten Zytotoxizität kann der apoptotische Zelltod bei FasR-positiven Zielzellen induziert werden, was in diesem Fall der Beseitigung von z.B. geschädigten, virusinfizierten oder neoplastisch transformierten Zellen dient [52,85]. Andererseits exprimieren die Effektorzellen zu nicht genau bekannten Zeitpunkten den FasR und entwickeln damit selbst eine Sensitivität gegenüber FasL-vermittelter Apoptose [27,57]. Es wird angenommen, daß dieser Mechanismus der Selektion und Elimination von funktionell nutzlosen Immunzellen während des Reifungsprozesses der Lymphozyten in den primären Lymphorganen oder nach Beendigung einer Immunreaktion dient. Durch diesen „Selbstmord“ der Immunzellen in den sekundären Lymphorganen oder der peripheren Blutbahn wird die physiologische Zellzahl konstant gehalten [1,15,38,81]. Deutlich wurden diese Zusammenhänge bei Beobachtungen an Mäusen,

denen aufgrund einer genetischen Mutation ein funktionsfähiges Fas-System fehlt. Derartige „lymphoproliferative“ (lpr)- und „generalized lymphoproliferative disease“(gld)-Mäuse zeigen klinisch die massive Proliferation und Akkumulation von strukturell veränderten Lymphozyten in den peripheren Lymphorganen [56,74,88]. Obwohl es zur Fremderkennung dieser derart veränderten Lymphozyten kommt, hat der Organismus aufgrund des defekten Fas-Systems keine Möglichkeit, überzählige oder fehlerhafte Lymphozyten zu beseitigen und dadurch die Homöostase des Immunsystems aufrechtzuerhalten [38,86].

1.4.3.2 Für nicht-immunkompetente Zellen

Das Expressionsmuster von FasR und FasL und die Funktion des Fas-Systems auf humanen nicht-immunkompetenten Zell- und Gewebstypen ist noch nicht hinreichend geklärt. Es wird angenommen, daß die Zellen der meisten Gewebstypen durch die Expression von FasR sensibel gegenüber FasL-induzierter Apoptose sind und so im Falle einer Schädigung, Virusinfektion oder neoplastischen Transformation durch die Effektorzellen des Immunsystems beseitigt werden können [38,49]. Auf einigen Zellen, wie den Sertolizellen des Hodens [5] und Orbitalzellen der vorderen Augenkammer [25] wurde hingegen auch die Expression eines funktionsfähigen FasL nachgewiesen und aufgrund dieser Beobachtung die Hypothese von einer Sonderstellung dieser Gewebe innerhalb des Immunsystems aufgestellt. Man nimmt an, daß Gewebsverbände mit FasL-positiven Zellen in der Lage sind, z.B. im Rahmen von Entzündungsreaktionen infiltrierende Lymphozyten zu eliminieren und sich dadurch dem Einfluß des Immunsystems zu entziehen [5,25,62]. Weiterhin haben aktuelle Studien die basale Expression von FasR und FasL auf Lebergewebe [28] und der Ösophagusschleimhaut [24] belegt. Die physiologische Bedeutung dieser simultanen Expression von FasR und FasL ist nicht geklärt. Es existieren Hypothesen, die eine Koexpression von FasR und FasL im Zusammenhang mit verschiedenen pathophysiologischen Vorgängen, wie z.B. im Rahmen einer alkoholtoxischen- oder drogeninduzierten Hepatitis [28,37] oder als Besonderheit für stark regenerative Gewebe ansehen [82].

1.4.4 Signaltransduktion („apoptotic pathway“)

Die über das Fas-System vermittelte Signalkaskade läßt sich grob in drei Abschnitte gliedern. Im ersten Schritt kommt es durch die Interaktion von FasL und FasR zur Konformationsänderung der Todesdomäne („death domain“, DD) am zytoplasmatischen Anteil des FasR. Der zweite Schritt beinhaltet die Assoziation einer Reihe von zytoplasmatischen Proteinen, die für die Weiterleitung des Signals von Bedeutung sind. Im letzten Schritt werden „cytosolic aspartate-specific proteases“

(Caspasen) aktiviert, die schließlich für die letalen Veränderungen innerhalb der Zelle verantwortlich sind [10] (s. Abb. 3).

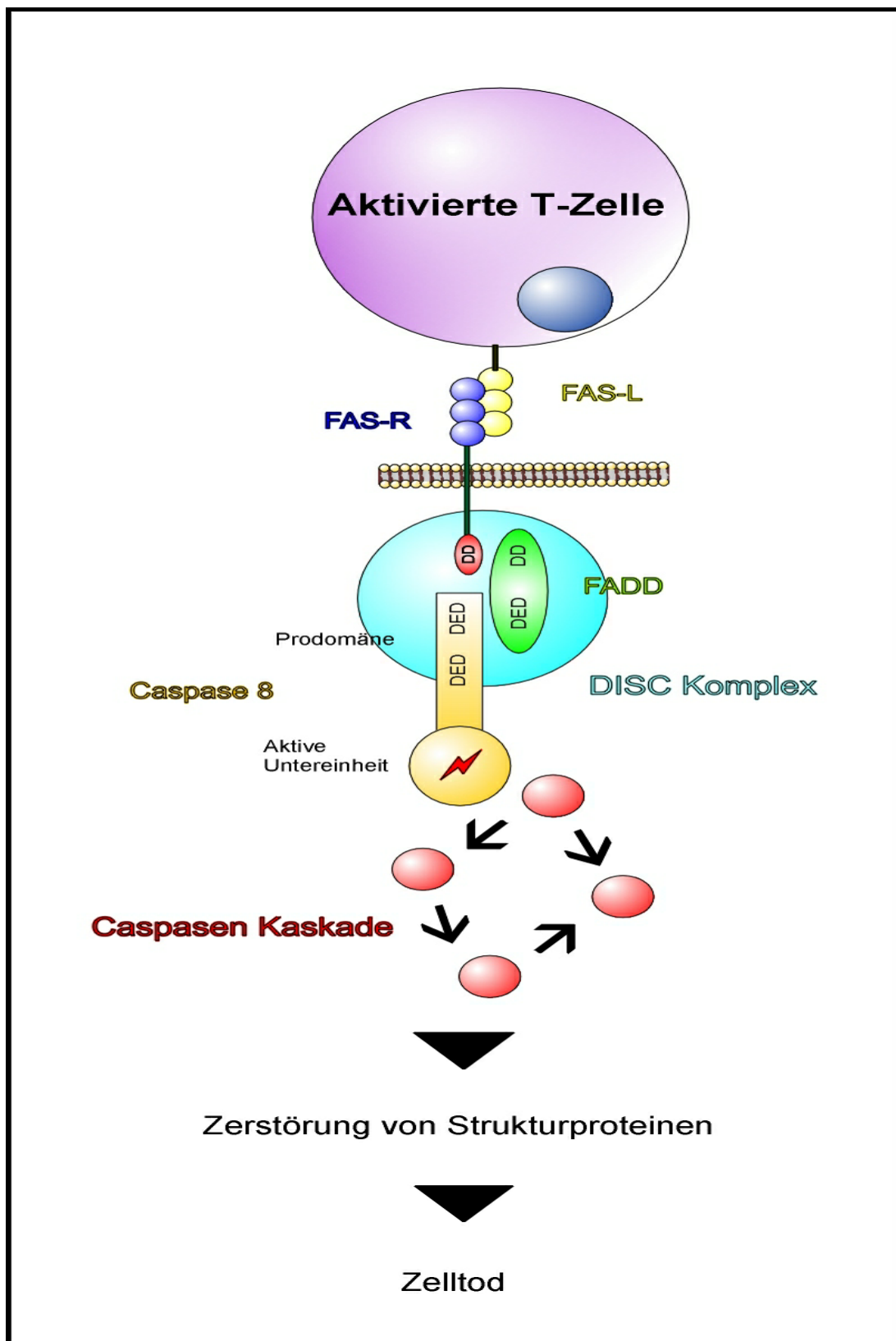
Bis heute existieren nur ungenaue Vorstellungen über die einzelnen Schritte der Signalkaskade. Es wird angenommen, daß die Interaktion mit dem FasL zur Trimerisierung der extrazellulären Domäne des FasR führt [10]. Hierdurch wird ein Signal induziert, daß über den transmembranären Abschnitt zur intrazellulären Region des FasR weitergeleitet wird. Daraufhin kommt es zur Änderung der räumlichen Konformation an der Todesdomäne (DD), wodurch die Bindung des „Fas-associated domain with death domain“ (FADD)- Moleküls ermöglicht wird [8,10]. Durch seine spezielle Proteinstruktur kommt dem FADD Molekül eine Adapterfunktion zu, die unentbehrlich für die Signaltransduktion ist. Die Bindung an den FasR basiert auf einer physikalischen Anziehung zwischen der DD des FasR und einer homologen DD, die am C-terminalen Ende des FADD Moleküls lokalisiert ist. Am N-terminalen Ende verfügt FADD über eine Region, die als „death effector domain“ (DED) bezeichnet wird und für die Rekrutierung der Caspase 8 (s.u.) notwendig ist [10]. Parallel zu diesen Vorgängen werden vier „cytotoxicity-dependent APO-1-associated“ (CAP)- Proteine assoziiert [8]. Bei CAP-1 und CAP-2 handelt es sich um biochemisch modifizierte Formen des FADD Moleküls („serine-phosphorylated FADD“), die Proteine CAP-3 und CAP-4 werden als strukturelle Bestandteile der Caspase 8 angesehen [47].

In der Literatur werden die intrazelluläre Domäne des FasR, das FADD-Adaptermolekül und die CAP-Proteine unter dem Begriff „death inducing signaling complex“ (DISC)- Komplex zusammengefaßt [8,48]. Mit dem DISC-Komplex soll eine Art „erste Instanz“ bei der Signaltransduktion beschrieben werden. Es wird angenommen, daß durch FasR-FasL-Interaktion ausgelöste Signale auf dieser Stufe moduliert (z.B. inhibitorisch) und anschließend auf die Caspase 8 übertragen werden [10]. Für die Signaltransduktion stellt die Aktivierung der Caspase 8 ein zentrales Ereignis dar, durch das der terminale Abschnitt der Apoptose eingeleitet wird. Von der Struktur der Caspase 8, die in der Literatur auch als CAP-4, FLICE oder MACH bezeichnet wird, existieren recht genaue Vorstellungen [47]. Am N-terminalen Ende des Proteins befinden sich zwei DED Einheiten, die eine deutliche Homologie zur DED des FADD Moleküls aufweisen. Diese spezielle Region wird als Prodomäne (CAP-3) der Caspase 8 bezeichnet. Die enzymatisch aktive Untereinheit befindet sich am entgegengesetzten C-terminalen Ende [10]. Es wird vermutet, daß die beiden DED Einheiten im inaktiven Zustand der Caspase 8 aneinander gebunden sind, um eine Selbstaktivierung zu verhindern. Durch die Bindung an den FasR kommt es zur Änderung der räumlichen Konformation des FADD-Moleküls [10]. Wahrscheinlich wird hierdurch die Anlagerung einer DED Einheit der Prodomäne von Caspase 8 an die

homologe DED des FADD Moleküls ermöglicht. Dies führt zur autokatalytischen Dissoziation der Caspase 8. Während die Prodomäne (CAP-3) am FADD Molekül gebunden bleibt, kommt es zur Abspaltung der aktiven Untereinheit [10]. Es wird vermutet, daß die Untereinheit in mehrere katalytisch aktive Einheiten zerfällt, die anschließend u.a. die Mobilisierung der Caspase 3 bewirken. Wodurch die anderen Caspasen nun genau aktiviert werden, ist noch unklar. Es wird aber angenommen, daß eine Caspase nicht direkt alle Mitglieder der Caspasen-Familie aktivieren kann [89]. Im aktivierten Zustand katalysieren Caspasen die enzymatische Abspaltung der AS Cystin vom Aspartat-Rest komplexer Proteinstrukturen. Heute sind etwa 14 Caspasen bekannt. Die Caspasen 2, 8, 9 und 10 werden als Auslöser („initiators“) der Apoptose angesehen, während die Caspasen 3, 6 und 7 („executioners“) für die eigentliche Spaltung von Proteinen verantwortlich sind. Im Gegensatz dazu spielen die Caspasen 1 und 11 wohl für die Apoptose keine Rolle, sondern scheinen für die Mobilisierung von Zytokinen bedeutsam zu sein. Über die Caspasen 4, 5, 12, 13 und 14 ist bis heute wenig bekannt [89]. Alle Caspasen sind in der Lage, sich gegenseitig durch autokatalytische Spaltung zu aktivieren, wodurch eine Caspasen-Kaskade („downstream of caspases“) ausgelöst wird, die letztendlich für die irreversiblen letalen Veränderungen innerhalb der Zelle verantwortlich ist [8,10,48]. Auf zytoplasmatischer Ebene bewirken sie die Zerstörung von komplexen Strukturproteinen der Nukleoli und des Zytoskeletts (Laminin, Actin, Fodrin, Zytokeratin 18, Katenin β , u.a.), während Endonukleasen (DNAsen) auf nukleärer Ebene die Fragmentierung des DNA-Strangs in apoptose-spezifische nukleosomale Einheiten katalysieren [69,89]. Diese enzymatische Degeneration von wichtigen zellulären Bausteinen führt letztendlich zum Tod der Zelle [41,90,94].

Aktuelle Studien lassen vermuten, daß ein zweiter Mechanismus existiert, über den der terminale Abschnitt der Apoptose eingeleitet werden kann. Es wird angenommen, daß die aktivierte Caspase 8 über die Spaltung von Proteinen der bcl-2 Familie die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien bewirken kann [58]. Proteine der bcl-2 Familie werden im direkten Zusammenhang zur Apoptose gesehen [30,32]. Man teilt sie in solche ein, die den apoptotischen Zelltod vorantreiben („death-promoting“) oder ihn inhibieren („death-inhibiting“). Es wird vermutet, daß sie an bestimmten Stellen der intrazellulären Signalübertragung agieren und Einfluß darauf haben, ob es letztendlich zum apoptotischen Tod einer Zelle kommt oder nicht [69]. Durch das Cytochrom c wird wahrscheinlich die Caspase 9 aktiviert, die wiederum eine Mobilisierung der Caspase 3 bewirkt. Durch die Aktivierung der Caspase 3, die von zentraler Bedeutung für die Mobilisierung weiterer Caspasen ist, kommt es auf diesem alternativen Weg zur Initiierung der Caspasen-Kaskade und damit zur Apoptose [58].

Abb. 3 Schematische Darstellung der Signaltransduktion [8,10,47]



1.4.5 Expression von FasR und FasL auf malignen soliden Tumoren

Die onkologische Forschung beschäftigt sich seit längerem mit der Expression von FasR und FasL auf verschiedenen malignen soliden Tumoren. Bei vergleichenden Untersuchungen von Tumoren und deren Ursprungsgeweben (z.B. bei Kolonkarzinomen [45], Hepatozellulären Karzinomen [72] und Pankreaskarzinomen [83]) fällt auf, daß die gesunden Ursprungsgewebe eine physiologische FasR-Expression aufwiesen, während die Expression des FasR auf den neoplastisch transformierten Tumorzellen nur schwach oder überhaupt nicht nachzuweisen war (s. Tab 1). In der Literatur wird dies als „down-regulation“ (Downregulation) des FasR bezeichnet [24,72,76,83].

Im Gegensatz dazu läßt sich eine Expression des FasL auf unterschiedlichen malignen Tumoren, wie z.B. Kolonkarzinomen [52], Hepatozellulären Karzinomen [72], Pankreaskarzinomen [82], Bronchialkarzinomen [51], Malignen Melanomen [26], Chorionkarzinomen [4], Ösophaguskarzinomen [24], Astrozytomen [62] und Lebermetastasen kolorektaler Karzinome [68] belegen, während die meisten der untersuchten gesunden Ursprungsgewebe FasL-negativ sind (s. Tab 1). Man spricht hier von einer „up-regulation“ des FasL bei Tumoren. Durch in vitro Experimente an Zellkulturen kann gezeigt werden, daß es sich bei dem von Tumoren exprimierten FasL um ein voll funktionsfähiges Molekül handelt. FasL-positive Zelllinien humaner Tumoren sind in der Lage in Ko-Kultivierung mit FasR-positiven Zielzellen (z.B. Lymphozyten) Apoptose bei den Zielzellen zu induzieren [51,53,62,72,83].

Diese Beobachtungen lassen vermuten, daß Tumoren durch die Modulation der FasR- und/oder FasL-Expression Vorteile in der Auseinandersetzung mit der anti-tumoralen Immunabwehr erlangen. Zum einen könnten sich Tumorzellen durch die Downregulation des FasR der endogenen Immunabwehr entziehen („escape from immune surveillance“) und wären über die Expression eines funktionsfähigen FasL zum anderen in der Lage, ihrerseits Apoptose bei den Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TILs) zu induzieren („counterattack-model“) [53,83].

Tab. 1 Exemplarische Darstellung der FasR- und FasL-Expression

Zell- oder Gewebstyp	FasR				FasL		
		[Ref.]		[Ref.]			[Ref.]
T- Lymphozyten	ex	[62,85]			ex		[73,78,91]
B- Lymphozyten	ex	[81,85]			ex		[85]
Makrophagen					ex		[51]
NK- Zellen	ex	[85]			ex		[85]
Leukämiezellen					ex		[77]
Kolonmukosa	ex	[45]			neg		[68]
Kolonkarzinom	ex	[52]	down	[45]	ex		[52,53,68]
Leber	ex	[72]			neg		[85]
HCC			down	[72]	ex		[72]
Lebermetastasen					ex		[68]
Haut	ex	[40]			ex		[40]
Malignes Melanom	neg	[26]			ex		[26]
Spinaliom	ex	[40]			ex		[40]
Basaliom	neg	[40]			ex		[40]
Astrozytom					ex		[62]
Ösophagus	ex	[24]			ex		[24]
Ösophaguskarzinom			down	[24]	ex		[24]
Prostatakarzinom	ex	[63]			neg		[63]
Bronchialkarzinom					ex		[51]
Pankreas	ex	[83]			neg		[83]
Pankreaskarzinom	ex	[82,83]			ex		[82,83]

ex Expression

neg keine Expression

down die Autoren gehen von einer Downregulation des FasR aus

2 Material und Methoden

2.1 Patienten

Die Durchführung der vorliegenden Studie wurde von der Ärztekammer Hamburg genehmigt. Von 83 Patienten, die sich in dem Zeitraum von März 1992 bis Juli 1999 im Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf einer chirurgischen Behandlung ihrer kolorektalen Lebermetastasen unterzogen, konnten repräsentative Proben aus den Resektionpräparaten entnommen werden. Das Resektat wurde anschließend im Kerninstitut für Pathologie des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf (Leitender Direktor: Prof. Dr. U. Helmchen) histologisch untersucht und beurteilt.

Für diese Studie standen Gewebeproben von 48 Männern und 35 Frauen zur Verfügung. Das Alter der Patienten betrug zum Operationszeitpunkt zwischen 32 und 82 Jahren (Altersmedian= 62 Jahre). Von den Patienten wurden 72 (86,7%) zum Zeitpunkt der Studie erstmalig an einer Lebermetastase operiert, bei 11 Patienten (13,3%) handelte es sich um Lebermetastasenrezidive. Hinsichtlich ihres klinischen Verlaufs wurden primäre Lebermetastasen und Lebermetastasenrezidive gesondert beurteilt.

2.1.1 Primäre Lebermetastasen

Es konnten Gewebeproben von insgesamt 72 primären Lebermetastasen gesammelt werden. In 25 Fällen (34,7%) handelte es sich um synchrone und in 47 Fällen (65,3%) um metachrone Lebermetastasen. Darunter befanden sich 40 solitäre Metastasen (55,6%), bei 16 Patienten (22,2%) lagen zum Zeitpunkt der Operation zwei und bei weiteren 16 Patienten (22,2%) multiple (≥ 3 Filiae) isolierte Lebermetastasen vor. Histologisch handelte es sich ganz überwiegend um mäßigdifferenzierte ($n= 67$), selten um niedrigdifferenzierte ($n= 4$) oder hochdifferenzierte ($n= 1$) Zellen von metastasierten Adenokarzinomen. Das Primärtumorstadium der Patienten umfaßte 6 (8,3%) Stadium I-, 7 (9,7%) Stadium II-, 25 (34,8%) Stadium III- und 19 (26,4%) Stadium IV– Tumoren (Einteilung nach der „union against cancer“(UICC)-Klassifikation [9,46]). Bei 15 (20,8%) Patienten war das Stadium des Primärtumors nicht zu eruieren (s. Tab. 2). Die Zeitspanne zwischen der Operation des Primärtumors und der chirurgischen Resektion metachroner Lebermetastasen betrug zwischen 4 und 85 Monate (Median= 16 Monate). Die chirurgische Therapie umfaßte 30 (41,6%) Hemihepatektomien, 3 (4,3%)

erweiterte Hemihepatektomien, 22 (30,6%) Segmentresektionen und 8 (11,1%) Keilexzisionen. Bei 9 (12,4%) Patienten wurde ein kombiniertes Operationsverfahren gewählt. In 5 Fällen wurde eine Hemihepatektomie durch eine Segmentresektion und in 4 Fällen eine Segmentresektionen durch eine Keilexzision ergänzt. Bei 55 (76,4%) Patienten konnte die Lebermetastase vollständig entfernt werden (R0-Resektion), bei 11 (15,3%) Patienten ließen sich mikroskopisch (R1-Resektion) und bei 6 (8,3%) Patienten makroskopisch (R2-Resektion) Metastasenreste am Resektionsrand nachweisen (s. Tab. 3).

2.1.2 Lebermetastasenrezidive

Es wurden Proben von 11 Patienten mit einem Lebermetastasenrezidiv gesammelt. Bei 6 (54,5%) Patienten handelte es sich um eine solitäre Metastase, bei 3 (27,3%) Patienten lagen zwei und bei 2 (18,2%) Patienten multiple isolierte Metastasen vor. Alle Metastasen zeigten das histologische Bild eines mäßig-differenzierten Adenokarzinoms. Das Primärtumorstadium dieser Patienten umfaßte 4 (36,4%) Stadium III- und 5 (45,5%) Stadium IV- Tumoren. Bei 2 (18,2%) Patienten war das Primärtumorstadium nicht zu ermitteln (s. Tab. 2). Zu den Operationstechniken gehörten 5 (45,6%) Hemihepatektomien, 3 (27,2%) Segmentresektionen und 3 (27,2%) kombinierte Operationen. Bei 9 (81,8%) Patienten gelang eine R0-Resektion, 2 (18,2%) Patienten wurden R1-reseziert (s. Tab. 3).

Tab. 2 Charakteristika der Patienten und deren Lebermetastasen

Charakteristika	Primäre Lebermetastasen (n= 72) Anzahl (%)	Lebermetastasen- rezidive (n= 11) Anzahl (%)
Altersmedian	62 Jahre	61 Jahre
Männer	46 (63,9)	2 (18,2)
Frauen	26 (36,1)	9 (81,8)
Primärtumorstadium		
UICC Stadium I	6 (8,3)	0
UICC Stadium II	7 (9,7)	0
UICC Stadium III	25 (34,8)	4 (36,4)
UICC Stadium IV	19 (26,4)	5 (45,4)
UICC Stadium unbekannt	15 (20,8)	2 (18,2)
Manifestationsform		
Synchrone Lebermetastase	25 (34,7)	-
Metachrone Lebermetastase	47 (65,3)	-
Solitärmetastase	40 (55,6)	6 (54,5)
2 Metastasen	16 (22,2)	3 (27,3)
Multiple Metastasen (≥ 3 Filiae)	16 (22,2)	2 (18,2)
Differenzierungsgrad		
hochdifferenziert (G1)	1 (1,4)	0
mäßigdifferenziert (G2)	67 (93,1)	11 (100)
niedrigdifferenziert (G3)	4 (5,5)	0

Tab. 3 Darstellung der Resektionverfahren und des Resektionsstatus

Operationsverfahren und Resektionsstatus	Primäre. Lebermetastasen (n= 72) Anzahl (%)	Lebermetastasen- rezidive (n= 11) Anzahl (%)
Operationsverfahren		
Hemihepatektomien	30 (41,6)	5 (45,6)
Erweiterte Hemihepatektomien	3 (4,3)	0
Segmentresektionen	22 (30,6)	3 (27,2)
Keilexzisionen	8 (11,1)	0
Kombinierte Operationen	9 (12,4)	3 (27,2)
Resektionsstatus		
R0-Resektion	55 (76,4)	9 (81,8)
R1-Resektion	11 (15,3)	2 (18,2)
R2-Resektion	6 (8,3)	0

2.2 Nachbeobachtung

Von 66 Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen und allen 11 Patienten mit einem Lebermetastasenrezidiv, die sich einer operativen Therapie unterzogen haben, konnten postoperativ Nachuntersuchungsdaten erhoben werden. Zu diesem Zweck wurden die Hausärzte in halbjährlichen Abständen schriftlich kontaktiert und durch einen Fragebogen zu Lokalisation und Zeitpunkt des Auftretens von Lokalrezidiven, Fernmetastasen, Todeszeitpunkt und –ursache der Patienten befragt.

Der postoperative Beobachtungszeitraum betrug bei den Patienten mit einer primären Lebermetastase zwischen 3 und 86 Monaten (Median= 16 Monate). Patienten mit Lebermetastasenrezidiv wurden minimal 4 und maximal 79 Monate (Median= 11 Monate) nachbeobachtet. Dabei wurde das Operationsdatum bei der Metastasenresektion als Beginn und der letzte Besuch des Patienten bei seinem Hausarzt, bzw. der Todestag, als Ende des Nachbeobachtungszeitraumes festgelegt.

2.3 Immunhistochemie

2.3.1 Gewebeaufbereitung

Nach der chirurgischen Resektion der Lebermetastase wurde aus dem Operationspräparat eine repräsentative Gewebprobe gewonnen. Es wurde angestrebt, Gewebe aus dem marginalen Rand der Metastase mit anliegendem gesundem Lebergewebe zu entnehmen. Zur Konservierung wurden die Proben in Tissue Tek (Miles Inc., Netherlands, Code 4583) eingebettet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C im Tiefkühler gelagert. Für die immunhistochemischen Färbungen wurden von den Gewebsblöcken im Kryostaten (Microm GmbH, Germany, Code Nr. HM 505 E) 5-7 μm dicke serielle Gewebsschnitte angefertigt und auf speziell beschichtete Adhäsions-Objektträger (Marienfeld, Germany, Code 901236) gebracht.

2.3.2 Antikörper und Färbekontrollen

Der Fas-Rezeptor wurde mittels des monoklonalen Maus-Antikörpers DX2 (Pharmingen, U.S.A., Code 33451A) nachgewiesen. Es handelt sich hierbei um einen IgG₁ κ Antikörper, der spezifisch an die glykolisierte extrazelluläre Domäne des Fas-Rezeptors bindet. In Vorversuchen wurde durch Verdünnungsreihen eine geeignete Konzentration zur optimalen Darstellung des FasR ermittelt. Sie betrug 1 $\mu\text{g/ml}$, was einer Verdünnung von 1:500 entspricht (s. Tab. 4).

Zur Darstellung des FasL wurden in Vorversuchen Antikörper der Firma Pharmingen (Pharmingen, U.S.A., Code 65431A), Transduction Laboratories (Transduction Laboratories, U.S.A., Code F37720) und der Firma Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology, U.S.A., Code sc-956-G) getestet. Die besten Ergebnisse waren mit dem polyklonalen IgG Kanninchen-Antikörper Q20 der Firma Santa Cruz zu erzielen, der spezifisch an die extrazelluläre Domäne des Fas-Liganden bindet. Er wurde in einer Konzentration von 0,4 $\mu\text{g/ml}$ (Verdünnung 1:500) eingesetzt (s. Tab 4).

Tab. 4 Verwendete Antikörper

Spezifität	Hersteller	Klon	Ig-Subtyp	Konz.	Referenzen
FasR	Pharmingen	DX 2	IgG ₁	1µg/ml	[13,82,83]
FasL	Santa Cruz	Q 20	IgG	0,4 µg/ml	[24,83]

Um falsch-negative Ergebnisse auszuschließen, wurden bei jeder immunhistochemischen Färbung Positivkontrollen mitgefärbt. Dabei handelte es sich um Gewebsschnitte, die sicher das gesuchte Antigen aufwiesen. Zum Nachweis des FasR wurden Präparate von gesunder Kolonmukosa, für den FasL Schnitte von Lebermetastasen eines malignen Melanoms verwendet.

Zum Ausschluß falsch-positiver Ergebnisse durch unspezifische Antikörperbindung wurde von jedem Präparat eine Isotypkontrolle angefertigt. Hierzu wurden Folgeschnitte des entsprechenden Tumors mit einem Prä-Immunserum in der gleichen Konzentration wie der Primärantikörper inkubiert. Dieses Serum entstammte derselben Spezies wie der Primärantikörper und enthielt außer dem spezifischen Antikörper sämtliche Immunglobulin-Komponenten. Als Isotypkontrolle für den anti-Fas-Rezeptor Antikörper wurden Maus-Immunglobuline (Sima Immuno Chemicals, U.S.A., Code MOPC-21), für den anti-Fas-Liganden Antikörper Kaninchen-Immunglobuline (Sigma Immuno. Chemicals, U.S.A, Code I8140) verwendet.

2.3.3 Immunhistochemische Färbungen

Zur Darstellung des FasR und FasL wurden zwei ähnliche immunhistochemische Färbemethoden verwendet:

- **Die Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase (APAAP)–Technik**
- **Die Avidin : Biotinylated Enzyme Complex (ABC)-Technik**

Diese Techniken gehören zu den indirekten immunhistochemischen Färbemethoden, bei denen man die spezifische Bindung eines unkonjugierten Primärantikörpers an das gesuchte Antigen nutzt. Diese Anlagerung wird durch Zugabe eines Antikörpers (Sekundär- oder Brückenantikörper) lokalisiert, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist. Ein Enzym katalysiert im letzten Schritt die Umsetzung eines Chromogen-Substrats, was zu einer lokalen Farbreaktion führt.

2.3.3.1 APAAP-Technik

Bei dieser Färbemethode wird der an sein natürliches Antigen gebundene Primärantikörper zu Komplexbildung genutzt. Ein Brückenantikörper stellt die Verbindung von Primärantikörper und APAAP-Komplex her. Da der Brückenantikörper im Überschuß zugegeben wird, bindet nur die eine Hälfte seines Fab-Fragments an den Primärantikörper, die zweite bleibt frei für die Bindung an den Antikörper des APAAP-Komplexes. Die Komplexe bestehen aus dem Enzym Alkalische Phosphatase (aus Kälberdarm gewonnen) und einem monoklonalen Maus-anti-Alkalische-Phosphatase Antikörper. Um die Anlagerung visuell darzustellen, wurde für unsere Versuchsreihe eine Farbreaktion mit Neufuchsin gewählt. Durch die Alkalische Phosphatase wird das Substrat Naphtolphosphat-Ester hydrolysiert. Es entstehen Phenole, die mit Diazoniumsalzen (Chromogen) reagieren und unlösliche Azofarbstoffe bilden. Das Chromogen Neufuchsin bildet ein intensiv rotes Reaktionsprodukt [59].

Durchführung

- I. Trocknen der Gewebsschnitte für 30 min bei Raumtemperatur.
- II. Fixierung in 96% Ethanol für 2 min.
- III. Waschen für 8 min in Tris-Puffer (s. Ansatz 1).
- IV. Inkubation mit AB-Serum: Das AB-Serum (Biotest, Germany, Code 805135) wurde 1:10 in Tris-Puffer verdünnt und für 10 min aufgetragen. Durch die Inkubation der Schnitte mit einem antikörperfreien AB-Serum von Spendern mit der Blutgruppe AB wurde die unspezifische Absorption des Primärantikörpers an Bindegewebelementen minimiert, wodurch Hintergrundfärbungen weitgehend unterbunden wurden.
- V. Inkubation mit den Primärantikörpern (s. Tab. 4) für 1 h.
- VI. Waschen 2 x 5 min in Tris-Puffer.
- VII. Inkubation mit dem Brückenantikörper: Der Brückenantikörper (Dako, Denmark, Code Z259) wurde 1:50 (Konz.: 64µg/ml) in Tris-Puffer verdünnt und für 30 min aufgetragen.
- VIII. Waschen 2 x 5 min in Tris-Puffer.
- IX. Inkubation mit dem APAAP-Komplex: Der APAAP-Komplex (Dako, Denmark, Code D651) wurde 1:100 (Konz.: 0,9µg/ml) in Tris-Puffer verdünnt und für 30 min appliziert.
- X. Waschen 2 x 5 min in Tris-Puffer.
- XI. Inkubation mit dem Substratansatz: Der Substratansatz (s. Ansatz 2) wurde hergestellt und für 30 min aufgetragen. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten

Kammer im Dunkeln. Das Blocken der endogenen Alkalischen Phosphatase erfolgte durch die im Substratansatz enthaltene Levamisole (Sigma, U.S.A., Code L9756).

XII. Spülen 2 x 10 sec in Aqua dest.

XIII. Kernfärbung mit Hämatoxilin Gill (Sigma, U.S.A., Code GHS-1-32) für 18 sec.

XIV. Spülen 30 sec unter fließendem Leitungswasser.

XV. Spülen 2 x 10 sec in Aqua dest.

Ansatz 1: Herstellung des Tris-Puffers

48,46g Tris (Life Technologies, U.S.A., Code 15504020) wurden in Aqua dest. gelöst. Von der Stammlösung wurden 1225ml abgenommen und 100ml 2 mol/l HCL und 42,4g NaCl zugefügt. Die Lösung wurde mit Aqua dest. auf 5 l aufgefüllt und der pH auf 7,4 eingestellt.

Ansatz 2: Herstellung des Substrates

Lösung 1

450ml Tris-Puffer

0,18g Levamisole

Lösung 2

0,075 Naphtolbiphosphat

2,25ml Dimethylformamid

Lösung 3

0,9g Natriumnitrit

22,5ml Aqua dest.

Lösung 4

0,9ml Neufuchsin

Nach dem Ansetzen der einzelnen Lösungen wurde Lösung 4 in Lösung 3 gegeben. Anschließend wurde eine Minute gewartet, dann die Mischung zusammen mit Lösung 2 in Lösung 1 geschüttet. Das fertige Substrat wurde vor der Applikation filtriert.

2.3.3.2 ABC-Technik

Die ABC-Technik (Avidin : Biotinylated Enzyme Complex) gehört zu den neueren immunhistochemischen Nachweismethoden. Sie basiert auf der Fähigkeit des Glykoproteins Avidin, 4 Moleküle des Vitamins Biotin mit einer hohen Affinität (Affinität $>10^{15} \text{ M}^{-1}$) physikalisch zu binden. Der Primärantikörper wird durch einen Biotin-konjugierten Sekundärantikörper gebunden. Anschließend wird ein Peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex zugesetzt. Die freien Bindungsstellen des Avidinmoleküls ermöglichen die Bindung an das Biotin des Sekundärantikörpers. Über das Enzym Peroxidase wird die Umsetzung eines Chromogen-Substrats katalysiert. In

dieser Färbung wurde das Chromogen DAB (3,3'-diaminobenzidine-tetrahydrochlorid) verwendet, das durch Oxidation eine intensive lokale Braunfärbung hervorruft.

Durchführung

- I. Trocknen der Gewebsschnitte für 30 min bei Raumtemperatur.
- II. Fixierung in kaltem Azeton für 3 min.
- III. Waschen 2 x 5 min in PBS-Puffer (s. Ansatz 1).
- IV. Blocken der endogenen Peroxidase in 1% Wasserstoffperoxid für 10 min.
- V. Spülen in Aqua dest.
- VI. Waschen 2 x 5 min in PBS-Puffer.
- VII. Avidin-Biotin Blocken: Körpereigenes Avidin und Biotin wurde durch Applikation eines gebrauchsfertigen Avidin- und Biotin-Blocker¹ für jeweils 15 min abgesättigt. Durch diesen Schritt wurden unspezifische Anfärbungen des Hintergrundes minimiert.
- VIII. Waschen 2 x 5 min in PBS-Puffer.
- IX. Inkubation mit Pferdeserum: 1 Tropfen (50µl) Pferdeserum¹ wurden in 5ml PBS-Puffer verdünnt und für 20 min appliziert. Durch die Inkubation mit diesem Non-Immunserum wurden elektrische Ladungen auf Kollagen und anderen Bindegewebelementen abgesättigt und dadurch die unspezifische Absorption des Primärantikörpers reduziert. Dadurch wurden unspezifische Hintergrundfärbungen minimiert.
- X. Inkubation mit den Primärantikörpern (s. Tab. 4) für 1 h.
- XI. Waschen 2 x 5 min in PBS-Puffer.
- XII. Inkubation mit dem Sekundärantikörper: 2 Tropfen (100µl) Sekundärantikörper¹ und 2 Tropfen (100µl) Pferdeserum¹ wurden in 5 ml PBS-Puffer verdünnt und für 30 min aufgetragen.
- XIII. Waschen 2 x 5 min in PBS-Puffer.
- XIV. Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Komplex¹: 2 Tropfen (100µl) Reagenz A¹ wurde mit 2 Tropfen (100µl) Reagenz B¹ in 5 ml PBS-Puffer verdünnt und für 30 min aufgetragen.
- XV. Waschen 2 x 5 min in PBS-Puffer.
- XVI. Inkubation mit dem DAB-Substrat: Laut Anleitung des Herstellers (Dako, U.S.A., ChemMate, Code Nr. K5001) wurden 240µl DAB in 12 ml Substratpuffer verdünnt und zum Nachweis des FasR für 2 min, für den FasL 3min aufgetragen.
- XVII. Spülen unter fließendem Leitungswasser für 10 sec.

- XVIII. Spülen in Aqua dest. für 10 sec.
- XIX. Kernfärbung: Gegenfärbung für 5 min in Mayer's Hämatoxin (Sigma, U.S.A., Code MHS-32) .
- XX. Spülen unter fließendem Leitungswasser für 7 min.
- XXI. Waschen in Aqua dest.
- XXII. Deckeln der Gewebsschnitte mit Glyceringelantine (Merck, Germany, Code 1.09242).

¹ Alle Reagenzien waren im Kit (Vector, U.S.A., ABC elite Kit, Code PK-6200) enthalten.

Ansatz 1 Herstellung des PBS-Puffers:

40g NaCl, 1g KCL, 7,2g Na₂PO₄ und 1,2g KH₂PO₄ wurden in 10 l Aqua dest. gelöst und der pH auf 7,4 eingestellt.

2.4 Auswertung

Die lichtmikroskopische Auswertung und Beurteilung der immunhistochemisch gefärbten Gewebsschnitte erfolgte im Doppelblindverfahren durch zwei unabhängige Begutachter ohne Kenntnis der Patientendaten. Bei abweichenden Ergebnissen wurden die Präparate noch einmal gemeinsam beurteilt und ein Konsens wurde hergestellt. Da die mit der ABC-Technik gefertigten Gewebsschnitte von besserer Qualität waren, wurden diese zur weiteren Auswertung herangezogen. Zur Bewertung der Expression von FasR und FasL wurden unterschiedliche Gruppen gebildet, um sowohl auf den prozentualen Anteil der angefärbten Zellen und die Intensität der Anfärbung einzugehen, als auch um eine möglichst klare Abgrenzung zu der vorherigen oder nachfolgenden Gruppe zu ermöglichen und auf diesem Wege Überschneidungen zu vermeiden.

2.4.1 FasR-Expression

Zur Auswertung der FasR-Expression wurde der prozentuale Anteil der spezifisch angefärbten (FasR-positiven) Zellen geschätzt und anschließend in 3 Gruppen subsumiert: 61-100% positive Zellen, 31-60% positive Zellen und weniger als 30% positive Zellen. Um auch die Intensität der Anfärbung zu berücksichtigen, wurden auch hier Gruppen gebildet: keine Anfärbung (-), schwache Anfärbung (+), mäßiggradige

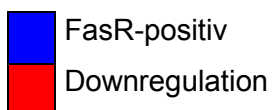
Anfärbung (++) und starke Anfärbung (+++). Durch Kombination der einzelnen Gruppen ergaben sich 4 Kategorien:

- **Kategorie 3 - normale FasR-Expression:**
mindestens 61% der Zellen zeigen eine starke oder mäßiggradige Anfärbung.
- **Kategorie 2 - verminderte FasR-Expression:**
mindestens 61% der Zellen zeigen eine schwache oder
mindestens 31-60% eine starke oder mäßiggradige Anfärbung.
- **Kategorie 1 – starke Reduktion der FasR-Expression:**
31-60% der Zellen zeigen eine schwache oder
weniger als 30% eine starke oder mäßiggradige Anfärbung.
- **Kategorie 0 – fehlende FasR-Expression:**
weniger als 30% der Zellen zeigen eine schwache Anfärbung oder
es ist keine Expression nachweisbar.

Als FasR-positiv wurden solche Gewebsschnitte beurteilt, die aufgrund ihrer Anfärbung in die Kategorie 3 und 2 fielen. Von einer Downregulation des FasR wurde gesprochen, wenn die Färbeergebnisse der Kategorie 1 und 0 entsprachen (s. Tab. 5)

Tab. 5 Semiquantitative Bewertung der FasR-Expression

Positive Zellen (%)	Intensität	Kategorie	Bewertung
61 – 100%	++ / +++	3	normale Expression
	+	2	verminderte Expression
	-	0	fehlende Expression
31 - 60%	++ / +++	2	verminderte Expression
	+	1	starke Reduktion
	-	0	fehlende Expression
< 30%	++ / +++	1	starke Reduktion
	- / +	0	fehlende Expression



2.4.2 FasL-Expression

Zur Bewertung der FasL-Expression wurde ebenfalls die Intensität der Anfärbung (s.o.) beurteilt und der Anteil an spezifisch angefärbten (FasL-positiven) Zellen geschätzt. Es erfolgte eine Einteilung in 4 Gruppen: 76-100% positive, 51-75% positive, 31-50% und weniger als 30% positive Zellen. Durch Kombination der Daten ergaben sich 4 Kategorien:

- **Kategorie 3 - starke FasL-Expression:**
mindestens 76% der Zellen zeigen eine starke Anfärbung.
- **Kategorie 2 – mäßige FasL-Expression:**
mindestens 76% der Zellen zeigen eine mäßiggradige oder
zwischen 51-75% der Zellen eine starke oder mäßiggradige oder
mindestens 31-50% eine starke Anfärbung.
- **Kategorie 1 – schwache FasL-Expression:**
mindestens 51% der Zellen zeigen eine schwache oder
mindestens 31-50% eine mäßiggradige oder schwache oder
weniger als 30% eine starke Anfärbung.
- **Kategorie 0 – fehlende FasL-Expression:**
weniger als 30% der Zellen zeigen eine mäßiggradige oder schwache Expression
oder
es ist keine Anfärbung feststellbar.

Als FasL-positiv wurden solche Gewebsschnitte beurteilt, die aufgrund ihrer Anfärbung der Kategorie 3 oder 2 entsprachen. Schnitte, die in die Kategorie 1 oder 0 fielen, wurden als FasL-negativ gewertet (s. Tab 6.).

Tab. 6 Semiquantitative Bewertung der FasL-Expression

Positive Zellen (%)	Intensität	Kategorie	Bewertung
76 – 100%	+++	3	starke Expression
	++	2	mäßige Expression
	+	1	schwache Expression
	-	0	fehlende Expression
51 – 75%	++ / +++	2	mäßige Expression
	+	1	schwache Expression
	-	0	fehlende Expression
31- 50%	+++	2	mäßige Expression
	++ / +	1	schwache Expression
	-	0	fehlende Expression
< 30%	+++	1	schwache Expression
	++ / + / -	0	fehlende Expression

 FasL-negativ
 FasL-positiv

2.5 Statistische Analysen

In der univariaten Analyse wurden 4-Felder-Tafeln mit Hilfe des χ^2 -Tests ausgewertet und wann immer nötig mit dem Fisher-Exakt-Test auf die Gleichheit zweier binominaler Verhältnisse hin überprüft. Für die Analyse des rezidivfreien Intervalls und der Gesamtüberlebenszeit wurden Kaplan-Meier-Analysen und der Log-Rank-Test verwendet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0.05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

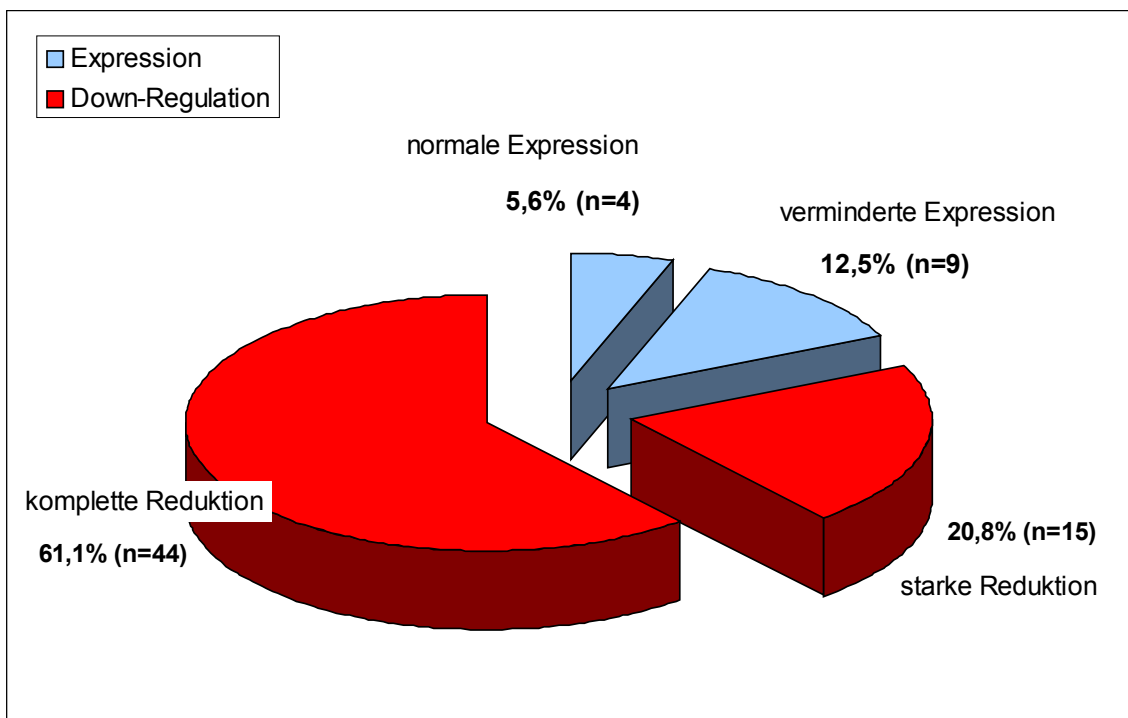
3.1 Ergebnisse der Immunhistochemie

3.1.1 FasR-Expression

3.1.1.1 FasR-Expression auf primären Lebermetastasen

Es wurden 72 primäre kolorektale Lebermetastasen auf ihre FasR-Expression hin untersucht. Bei insgesamt 59 (81,9%) Lebermetastasen ergaben die immunhistochemischen Untersuchungen die Downregulation des FasR: In 44 Fällen (61,1%) war ein kompletter Verlust und in 15 Fällen (20,8%) eine starke Reduktion des FasR nachweisbar. Dreizehn (18,1%) Lebermetastasen exprimierten den FasR: 9 (12,5%) Lebermetastasen zeigten eine verminderte und 4 (5,6%) eine normale FasR-Expression (s. Abb. 4).

Abb. 4 Übersicht über die FasR-Expression auf primären Lebermetastasen



3.1.1.2 FasR-Expression auf Lebermetastasenrezidiven

Es wurden 11 Lebermetastasenrezidive kolorektaler Karzinome auf ihre FasR-Expression hin untersucht. Die immunhistochemischen Färbungen ergaben in 9 Fällen (81,8%) eine komplette Reduktion und damit die Downregulation des FasR. Zwei (18,2%) Metastasenrezidive wiesen eine Expression des FasR auf: Sie zeigten eine verminderte FasR-Expression (s. Abb. 5).

Abb. 5 Übersicht über die FasR-Expression auf Lebermetastasenrezidiven

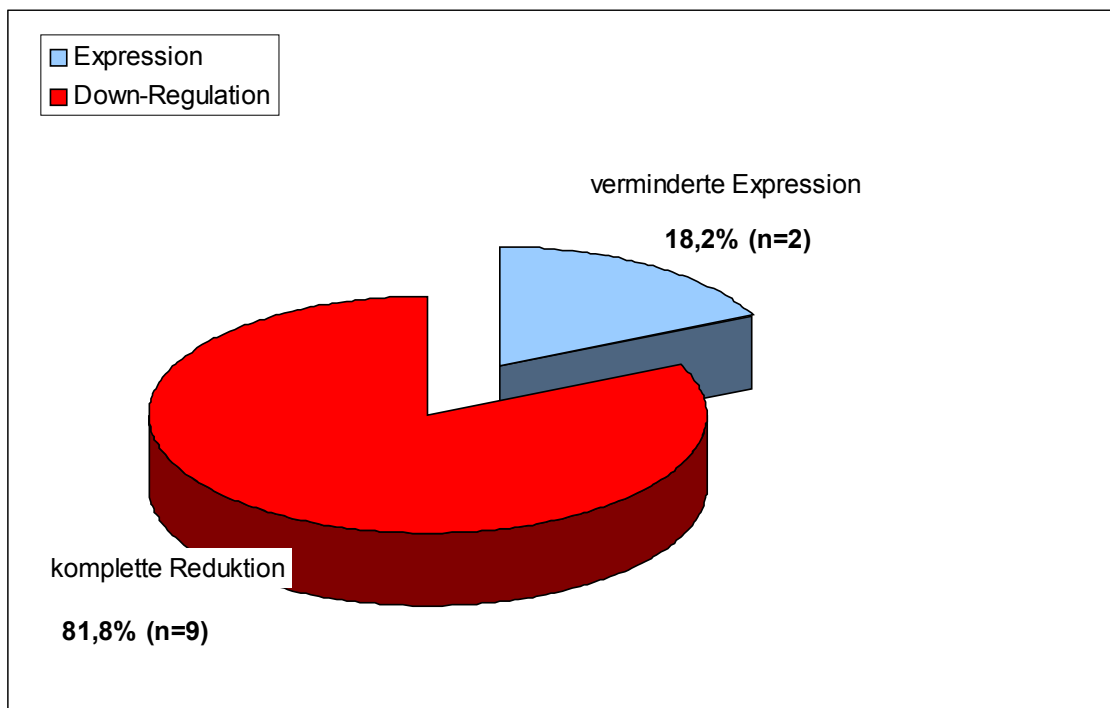


Abb. 6 Lebermetastase mit FasR-Downregulation

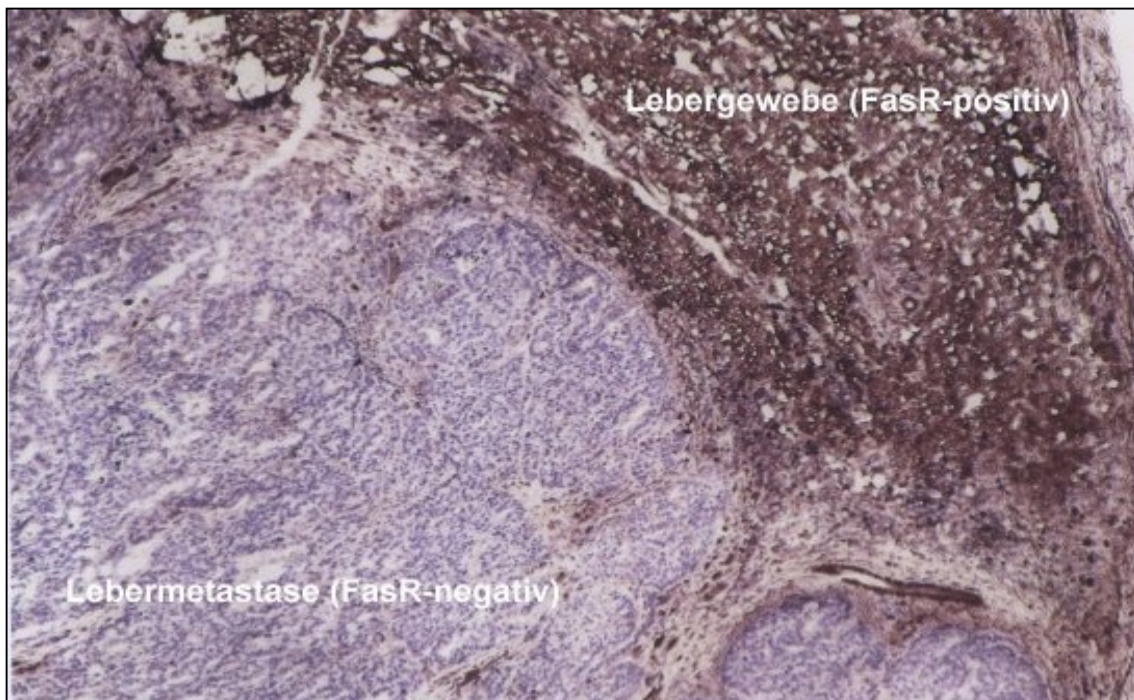


Abb. 7 Lebermetastase mit FasR-Downregulation (Ausschnittsvergrößerung)

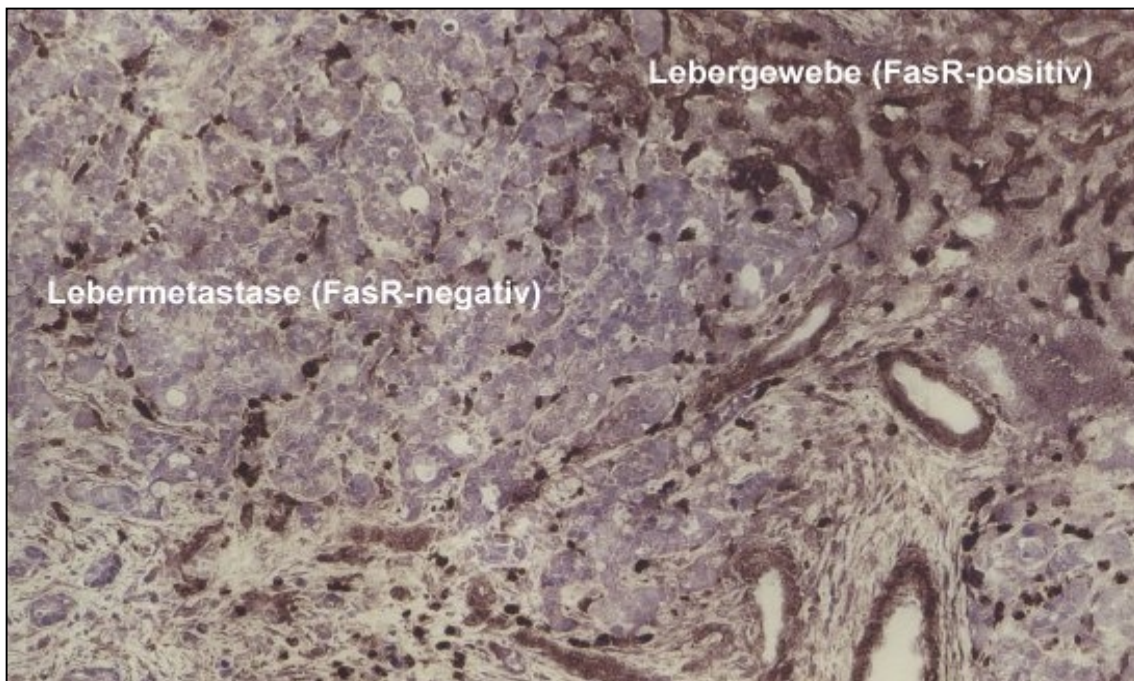


Abb. 8 FasR-positive Lebermetastase

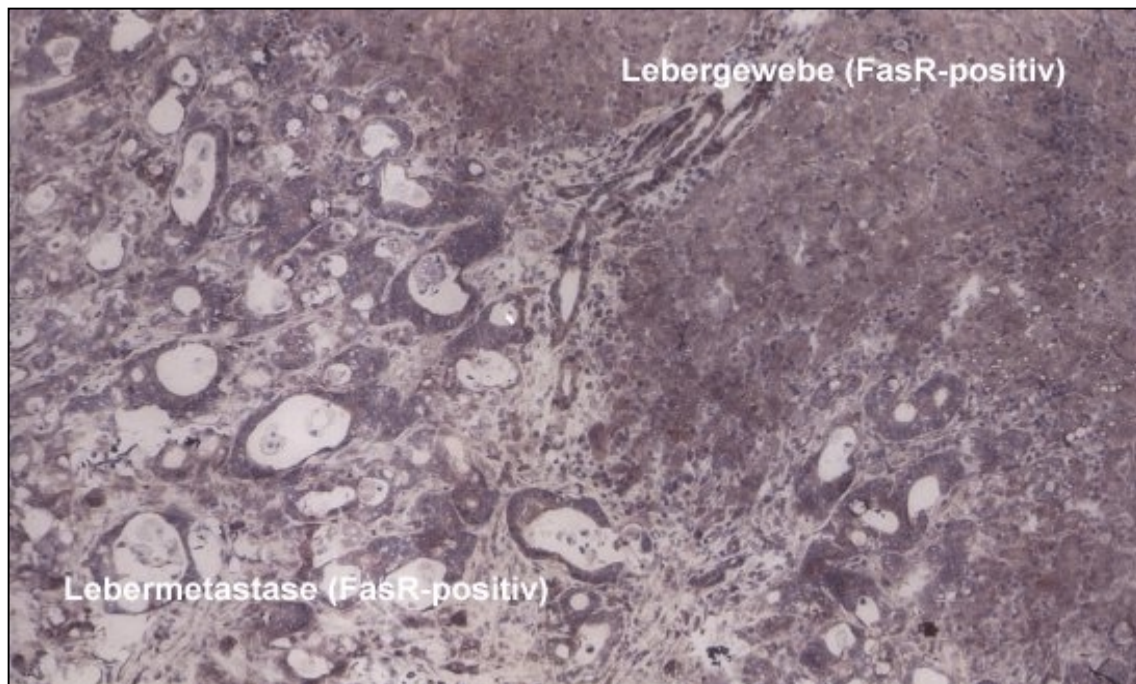
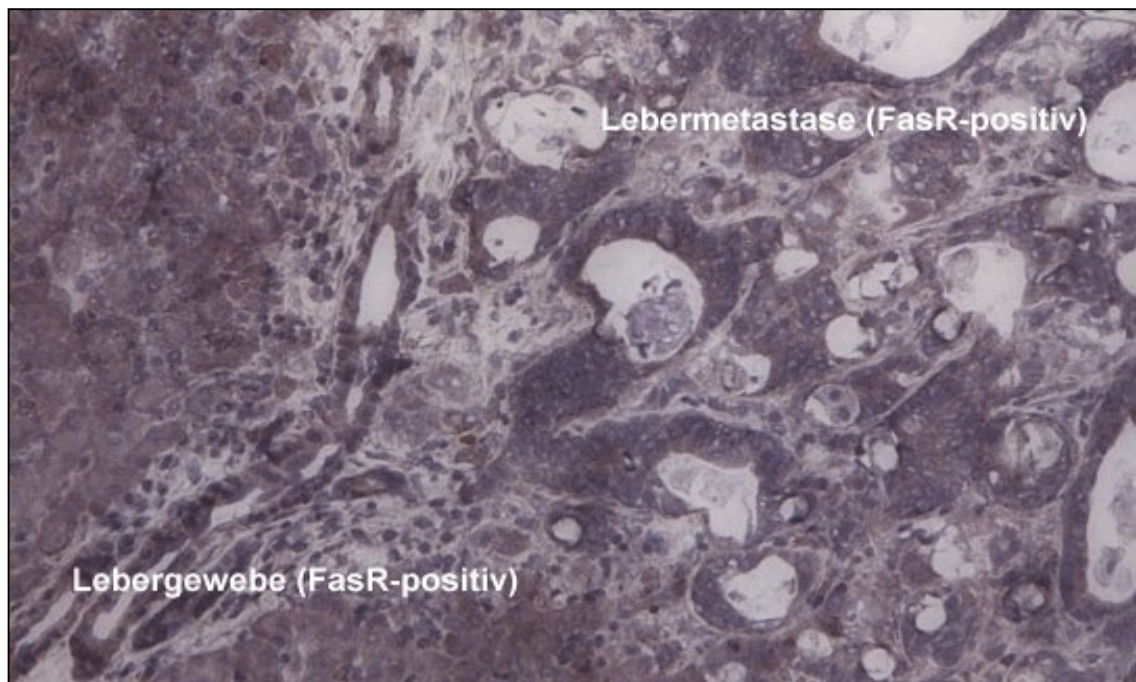


Abb. 9 FasR-positive Lebermetastase (Auschnittsvergrößerung)

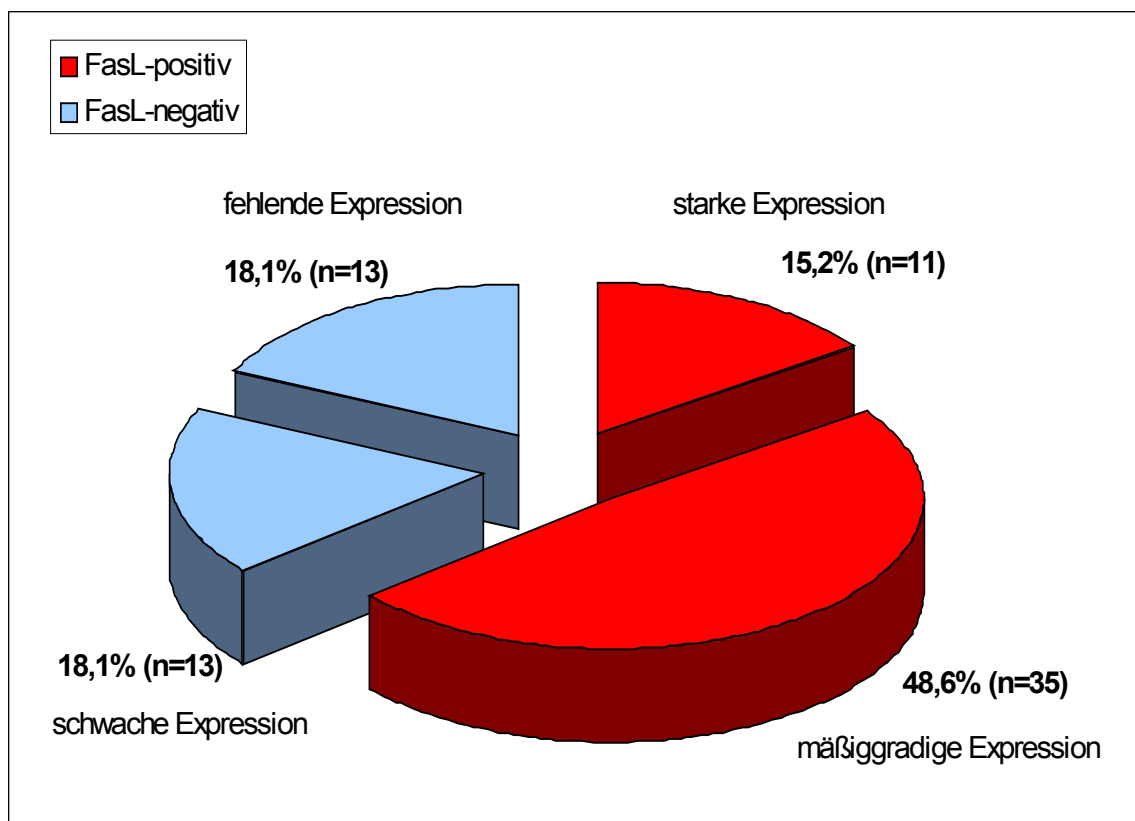


3.1.2 FasL-Expression

3.1.2.1 FasL-Expression auf primären Lebermetastasen

Es wurden 72 kolorektale Lebermetastasen auf ihre FasL-Expression hin untersucht. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen wiesen bei insgesamt 46 (63,8%) Lebermetastasen eine FasL-Expression nach: 11 (15,2%) Lebermetastasen zeigten eine starke und 35 (48,6%) Lebermetastasen eine mäßiggradige Expression von FasL. Als FasL-negativ wurden hingegen 26 (36,2%) Lebermetastasen beurteilt: In jeweils 13 (18,1%) Fällen ließ sich nur eine schwache, bzw. keine Expression des FasL nachweisen (s. Abb. 10).

Abb. 10 Übersicht über die FasL-Expression auf primären Lebermetastasen



3.1.2.2 FasL-Expression auf Lebermetastasenrezidiven

Von den untersuchten Lebermetastasenrezidiven (n= 11) ergaben die immunhistochemischen Färbungen bei insgesamt 6 (54,6%) Gewebsschnitten eine FasL-Expression: 1 (9,1%) Lebermetastasenrezidiv wies eine starke und 5 (45,5%) wiesen eine mäßiggradige Expression des FasL auf. Zwei (18,2%) Metastasenrezidive zeigten nur eine schwache FasL-Expression, während in 3 (27,2%) Fällen keine Expression des FasL nachweisbar war (s. Abb. 11).

Abb. 11 Übersicht über die FasL-Expression auf Lebermetastasenrezidiven

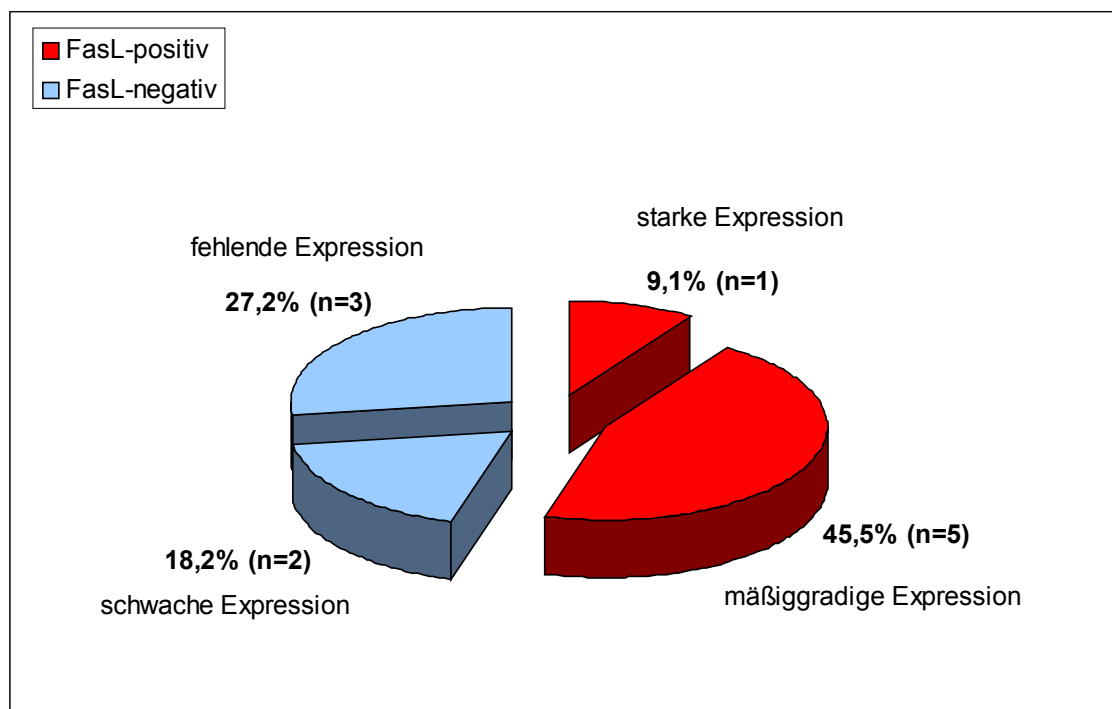


Abb. 12 FasL-positive Lebermetastase

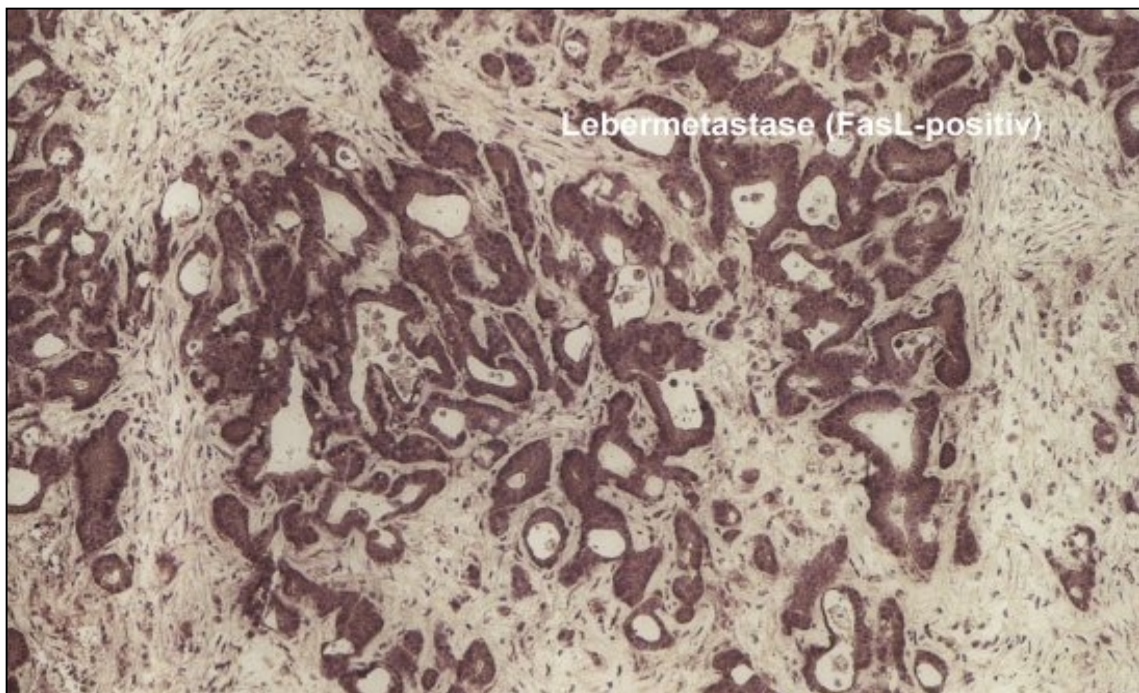
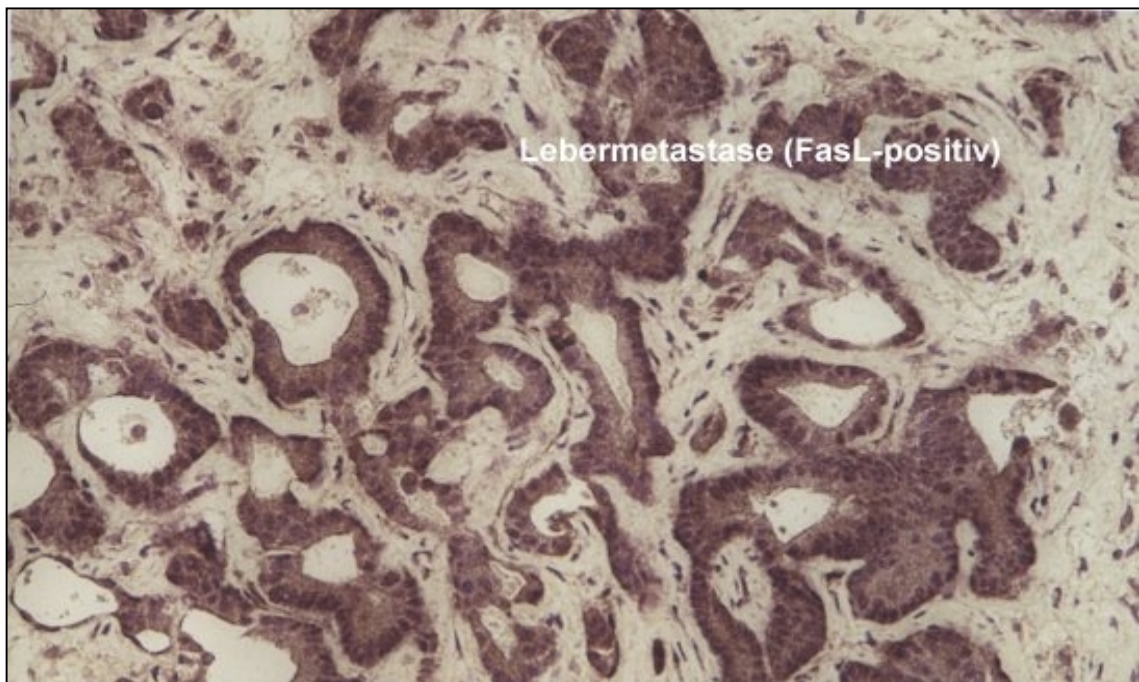


Abb. 13 FasL-positive Lebermetastase (Ausschnittsvergrößerung)



3.1.3 Koexpression von FasR und FasL

Bei den meisten der untersuchten kolorektalen Lebermetastasen (n= 36 / 50%) ließ sich eine FasL-Expression belegen, während der FasR downreguliert war (FasR-/FasL+). In 23 (31,9%) Fällen konnte weder eine FasR-Expression noch eine FasL-Expression nachgewiesen werden (FasR-/FasL-). Bei 10 (13,9%) Lebermetastasen zeigte sich eine Koexpression der beiden Antigene (FasR+/FasL+). Drei (4,2%) Lebermetastasen wiesen den FasR, aber keinen FasL auf (FasR+/FasL-).

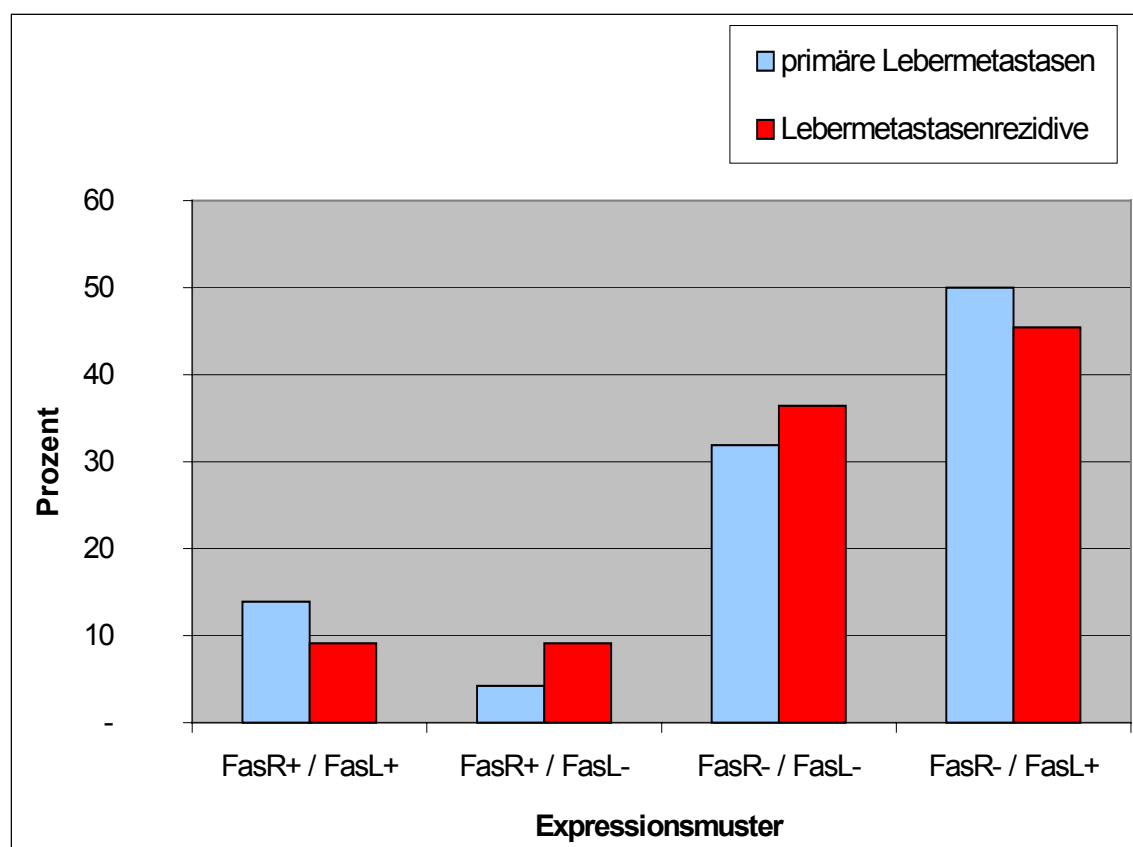
Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen brachten für Lebermetastasenrezidive ähnliche Ergebnisse wie bei den primären Lebermetastasen. Bei 5 (45,4%) Lebermetastasenrezidiven ließ sich die Downregulation des FasR bei gleichzeitiger Expression von FasL belegen (FasR-/FasL+). Auf 4 (36,4%) Lebermetastasenrezidiven ließ sich weder eine FasR- noch eine FasL-Expression nachweisen (FasR-/FasL-). Ein (9,1%) Lebermetastasenrezidiv wies eine Koexpression der Antigene (FasR+/FasL+) auf, während 1 (9,1%) Lebermetastasenrezidiv eine FasR-Expression, aber keine FasL-Expression (FasR+/FasL-) zeigte (s. Abb. 14 und Tab. 7).

Die statistische Analyse ergab keine signifikanten Ergebnisse, wenngleich auffiel, daß auch bei den Lebermetastasenrezidiven das Koexpressionsmuster FasR-/FasL+ am häufigsten vertreten war (p= 0,280).

Tab. 7 Übersicht über die Expressionsmuster von FasR und FasL

Expressionsmuster	Primäre Lebermetastasen (n= 72) Anzahl (%)	Lebermetastasenrezidive (n= 11) Anzahl (%)
FasR + / FasL +	10 (13,9)	1 (9,1)
FasR + / FasL –	3 (4,2)	1 (9,1)
FasR – / FasL –	23 (31,9)	4 (36,4)
FasR – / FasL +	36 (50)	5 (45,4)

FasR +	FasR-Expression	FasL +	FasL-Expression
FasR –	Downregulation des FasR	FasL –	keine Expression des FasL

Abb. 14 Darstellung der Koexpression von FasR und FasL

3.2 Ergebnisse der Nachbeobachtung

3.2.1 Primäre Lebermetastasen

Für die postoperative Nachuntersuchung von primären kolorektalen Lebermetastasen standen Daten von insgesamt 66 Patienten zur Verfügung. Bei 23 (34,9%) Patienten wurde eine synchrone und bei 43 (65,1%) Patienten eine metachrone Metastase reseziert. In 37 Fällen (56,1%) handelte es sich um eine Solitärmetastase, bei 14 (21,2%) Patienten lagen zwei und bei 15 (22,7%) Patienten multiple (≥ 3) Metastasen in der Leber vor. Das Tumorstadium des kolorektalen Primärtumors umfaßte 6 (9,1%) UICC Stadium I -, 5 (7,6%) Stadium II -, 26 (39,4%) Stadium III - und 22 (33,3%) Stadium IV - Tumoren. Von 7 (10,6%) Patienten konnte das Tumorstadium des Primärtumors nicht mehr ermittelt werden. In 50 (75,8%) Fällen wurde die Lebermetastase R0-, in 11 (16,6%) Fällen R1- und in 5 (7,6%) Fällen R2-reseziert.

Während des Nachuntersuchungszeitraums verstarben 30 (45,5%) Patienten an den Folgen ihres Tumorleidens. Bei insgesamt 31 Patienten (46,9%) kam es nach operativer Resektion der kolorektalen Lebermetastase zur Entwicklung eines Rezidivs. Von den 31 Rezidiven traten 12 (38,8%) isoliert in einem Organ auf: 7 (22,7%) in der verbliebenen Restleber, 3 (9,7%) in der Lunge, 1 (3,2%) im Peritoneum und 1 (3,2%) im Knochen. In 17 (54,8%) Fällen entwickelten die Patienten zeitgleich Rezidive in verschiedenen Organen: 8 (25,9%) Patienten wiesen Rezidivmetastasen in der verbliebenen Restleber und der Lunge, 3 (9,7%) Patienten in der Restleber und dem Peritoneum, 1 (3,2%) Patient in der Restleber und dem Dünndarm und 1 (3,2%) Patient in der Restleber und dem Gehirn auf. Bei 2 (6,4%) Patienten fanden sich Metastasen in der Lunge und dem Gehirn, bei 1 (3,2%) Patienten in der Lunge und der Nebenniere und bei ebenfalls 1 (3,2%) Patienten in der Milz und dem Ovar. In 2 (6,4%) Fällen konnte die Lokalisation der Rezidive nicht eruiert werden.

Zusammenfassend entwickelten insgesamt 20 (30,3%) Patienten Metastasenrezidive in der verbliebenen Leber. Diese traten bei 7 (10,6%) Patienten isoliert in der verbliebenen Restleber, bei 13 (19,7%) Patienten zeitgleich mit einer weiteren Metastase außerhalb der Restleber in Erscheinung. Bei insgesamt 22 (33,3%) Patienten wurden Rezidive außerhalb der Leber diagnostiziert. In 9 (13,6%) Fällen traten diese Rezidive isoliert an anderer Lokalisation (Lunge, Peritoneum und Knochen) ohne erneute Beteiligung der Leber auf (s. Tab. 8).

Tab. 8 Inzidenz von Rezidiven während der Nachbeobachtung

Lokalisation(en)	Anzahl der Rezidive	Anteil (%) alle Patienten (n= 66)	Anteil (%) Rezidivpatienten (n= 31)
Isolierte Manifestation			
Leber	7	10,7	22,7
Lunge	3	4,5	9,7
Peritoneum	1	1,5	3,2
Knochen	1	1,5	3,2
Multiple Manifestation			
Leber + Lunge	8	12,2	25,9
Leber + Peritoneum	3	4,5	9,7
Leber + Dünndarm	1	1,5	3,2
Leber + ZNS	1	1,5	3,2
Lunge + ZNS	2	3,0	6,4
Lunge + Nebenniere	1	1,5	3,2
Milz + Ovar	1	1,5	3,2
Lokalisation nicht bekannt	2	3,0	6,4
Summe	31	46,9	100,0
Lebermetastasenrezidive			
(insgesamt)	20	30,3	64,5
• davon isoliertes Lebermetastasenrezidiv	7	10,6	22,6
• davon Lebermetastasenrezidiv + Rezidiv anderer Lokalisation	13	19,7	41,9
Rezidive außerhalb der Leber			
(insgesamt)	22	33,3	70,9
• davon isoliertes Rezidiv außerhalb der Leber	9	13,6	29,0

Des weiteren entwickelten 7 (10,6%) Patienten während des Nachuntersuchungszeitraums ein lokoregionäres Rezidiv des kolorektalen Primärtumors. In 4 (57,1%) Fällen trat dieses Lokalrezidiv nach der Resektion der Lebermetastase isoliert auf, in 3 (42,9%) Fällen wurden gleichzeitig Fernmetastasen diagnostiziert: Bei einem Patienten (14,3%) lag zusätzlich zum Lokalrezidiv ein Lebermetastasenrezidiv, bei 2 (28,6%) Patienten ein Lebermetastasenrezidiv und je eine weitere Fernmetastase am Dünndarm, bzw. in der Lunge vor (s. Tab. 9)

Tab. 9 Inzidenz von Lokalrezidiven während der Nachbeobachtung

Lokalisation(en)	Anzahl	Anteil (%) alle Patienten (n= 66)	Anteil (%) Patienten mit Lokalrezidiv (n= 7)
Kolorektales Lokalrezidiv (isoliert)	4	6,1	57,1
Kolorektales Lokalrezidiv und Fernmetastase in der Leber	1	1,5	14,3
Kolorektales Lokalrezidiv und Fernmet. in Leber und Lunge	1	1,5	14,3
Kolorektales Lokalrezidiv und Fernmet. in Leber und Dünndarm	1	1,5	14,3
Summe	7	10,6	100,0

3.2.2 Lebermetastasenrezidive

Von allen 11 Patienten, die an einem Lebermetastasenrezidiv operiert wurden, konnten postoperativ Nachuntersuchungsdaten erhoben werden. Während des Zeitraums der Nachuntersuchung verstarben 4 (36,4%) Patienten an den Folgen ihres Tumorleidens. Insgesamt entwickelten 5 (45,5%) Patienten nach der Resektion des Lebermetastasenrezidivs ein erneutes Rezidiv. Unter den 5 Patienten mit erneuten Rezidiven kam es in 4 (80%) Fällen abermals zur Manifestation einer Lebermetastase, in 1 (20%) Fall erlitt der Patient zusätzlich eine Lungenmetastase (s. Tab. 10).

Tab. 10 Inzidenz von Rezidiven bei Lebermetastasenrezidiv-Patienten

Lokalisation(en)	Anzahl der Rezidive	Anteil (%) alle Patienten (n= 66)	Anteil (%) Rezidivpatienten (n= 5)
Isolierte Manifestation			
Leber	4	36,4	80,0
Multiple Manifestation			
Leber + Lunge	1	9,1	20,0
Summe	5	45,5	100,0

3.3 Korrelation der Nachbeobachtungsdaten mit etablierten Prognoseparametern

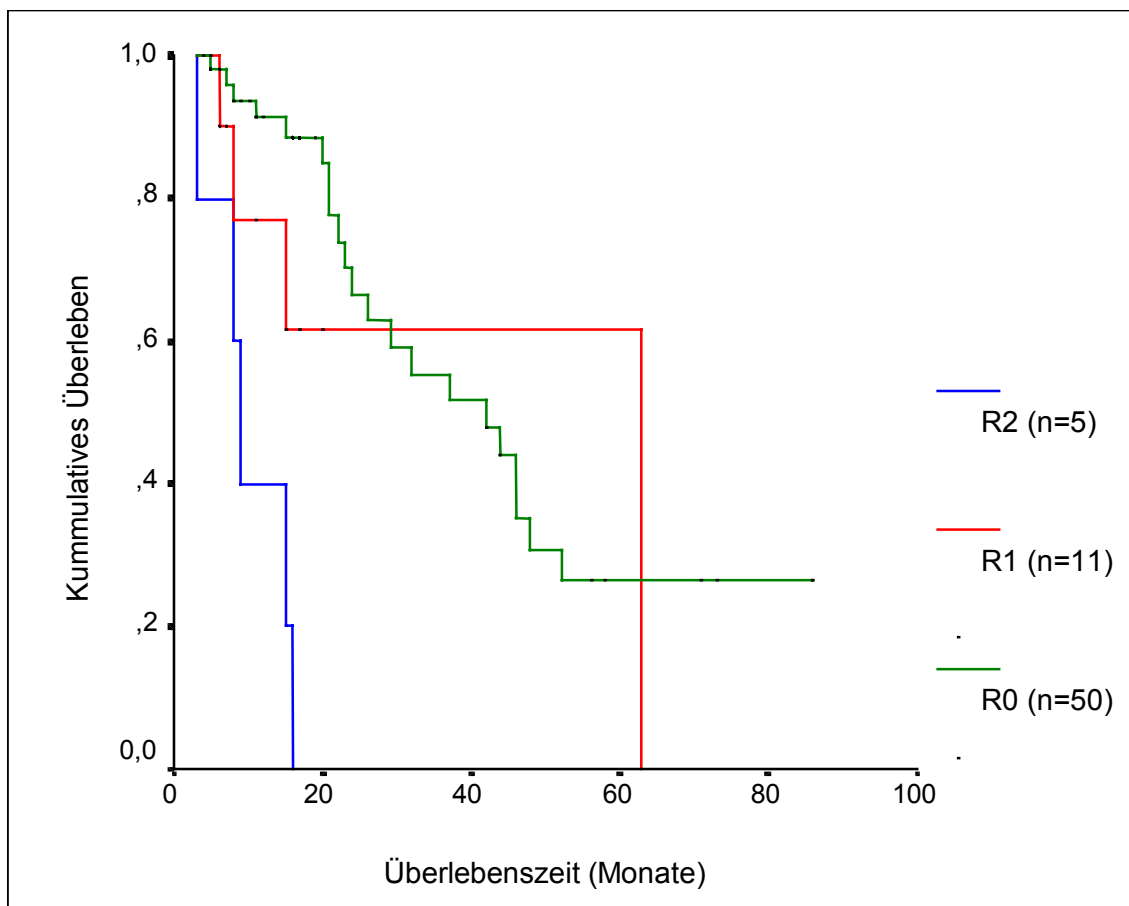
In die Analyse der Nachuntersuchung gingen nur Daten von Patienten ein, die an einer primären Lebermetastase (n= 66) operiert wurden. Aufgrund der geringen Fallzahl wurde bei Patienten mit Lebermetastasenrezidiven auf eine Korrelation der experimentellen Daten mit den Ergebnissen der Nachbeobachtung verzichtet.

Bei der Analyse der Rezidivfreien- und Gesamtüberlebenszeit erwies sich der Resektionsstatus (R-Status) der Lebermetastase als statistisch signifikanter Faktor. Es entwickelten 23 von 50 (46%) R0-, 3 von 11 (27,3%) R1- und 4 von 5 (80%) R2-resezierten Patienten innerhalb des Nachbeobachtungszeitraums Fernmetastasen oder ein lokoregionäres Rezidiv. Dabei betrug das rezidivfreie Intervall bei den R0-resezierten Patienten im Median 24 Monate, bei den R1-resezierten 56 Monate und bei den R2-resezierten 8 Monate ($p= 0,0533$). Zum erneuten Rezidiv in der verbliebenen Restleber kam es in der Gruppe der R0-resezierten Patienten bei 13 (26%), in der Gruppe der R1-resezierten Patienten bei 2 (18,2%) und der Gruppe der R2-resezierten Patienten bei 3 (60%) Patienten. Bis zum Nachweis des Lebermetastasenrezidivs vergingen bei den R0-resezierten Patienten im Median 68 Monate, bei den R1-resezierten 56 und bei den R2-resezierten nur 13 Monate ($p= 0,0444$). Auch bei der Analyse des Gesamtüberlebens zeigte sich, daß Patienten, bei denen eine R0-Resektion der Leber nicht gelang, signifikant früher und häufiger tumorbedingt

verstarben. So verstarben im Beobachtungszeitraum 21 (42%) R0-resezierte, 4 (36,4%) R1-resezierte und 5 (100%) R2-resezierte Patienten an den Folgen ihres Tumorleidens. Von der Lebermetastasenoperation bis zum Tod vergingen in der Gruppe der R0-resezierten Patienten im Median 42, in der Gruppe der R1-resezierten Patienten 63 Monate und in der Gruppe der R2-resezierten Patienten 9 Monate ($p < 0,0001$) (s. Abb. 15 und Tab. 11).

Abb. 15 Gesamtüberleben in Abhängigkeit von Resektionsstatus

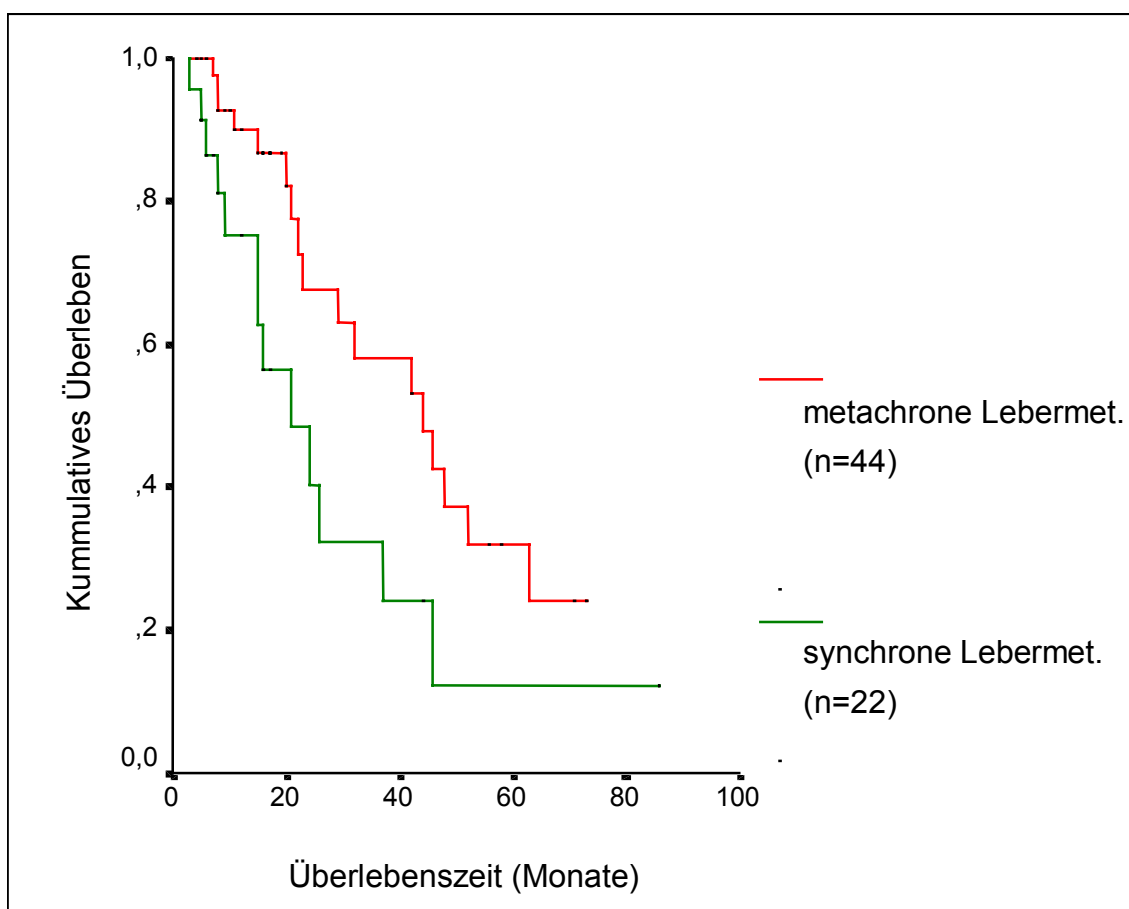
(R0-Resektion vs. R1-Resektion vs. R2-Resektion, $p < 0,0001$)



Des weiteren zeigte sich, daß Patienten mit synchroner Lebermetastasierung signifikant früher und häufiger metastasische Fernmetastasen oder ein lokoregionäres Rezidiv entwickelten als Patienten mit metachroner Lebermetastasierung. So erlitten 13 von 22 (59,1%) Patienten mit synchronen Lebermetastasen ein metastasisches Rezidiv, während dies bei Patienten mit metachroner Lebermetastasierung 17mal (38,6%) der Fall war. Das Intervall bis zum Rezidivnachweis war dabei bei Patienten mit synchroner Lebermetastasierung mit 10 Monaten im Median deutlich kürzer als bei Patienten mit metachroner Lebermetastasierung, bei denen im Median 52 Monate bis

zum Rezidivnachweis vergingen ($p=0,0075$). Dieser Zusammenhang ließ sich auch bei der Analyse des postoperativen Überlebens verifizieren. Von den Patienten mit synchroner Lebermetastasierung verstarben 13 (59,1%), von den Patienten mit metachroner Lebermetastasierung 17 (38,6%) im Nachuntersuchungszeitraum. Die mediane Gesamtüberlebenszeit betrug bei synchroner Lebermetastasierung nur 21 Monate, bei metachroner Lebermetastasierung dagegen 44 Monate ($p=0,0261$) (s. Tab. 11 und Abb. 16).

Abb. 16 Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Manifestationsform der Lebermetastasen (synchron vs. metachron, $p=0,0261$)

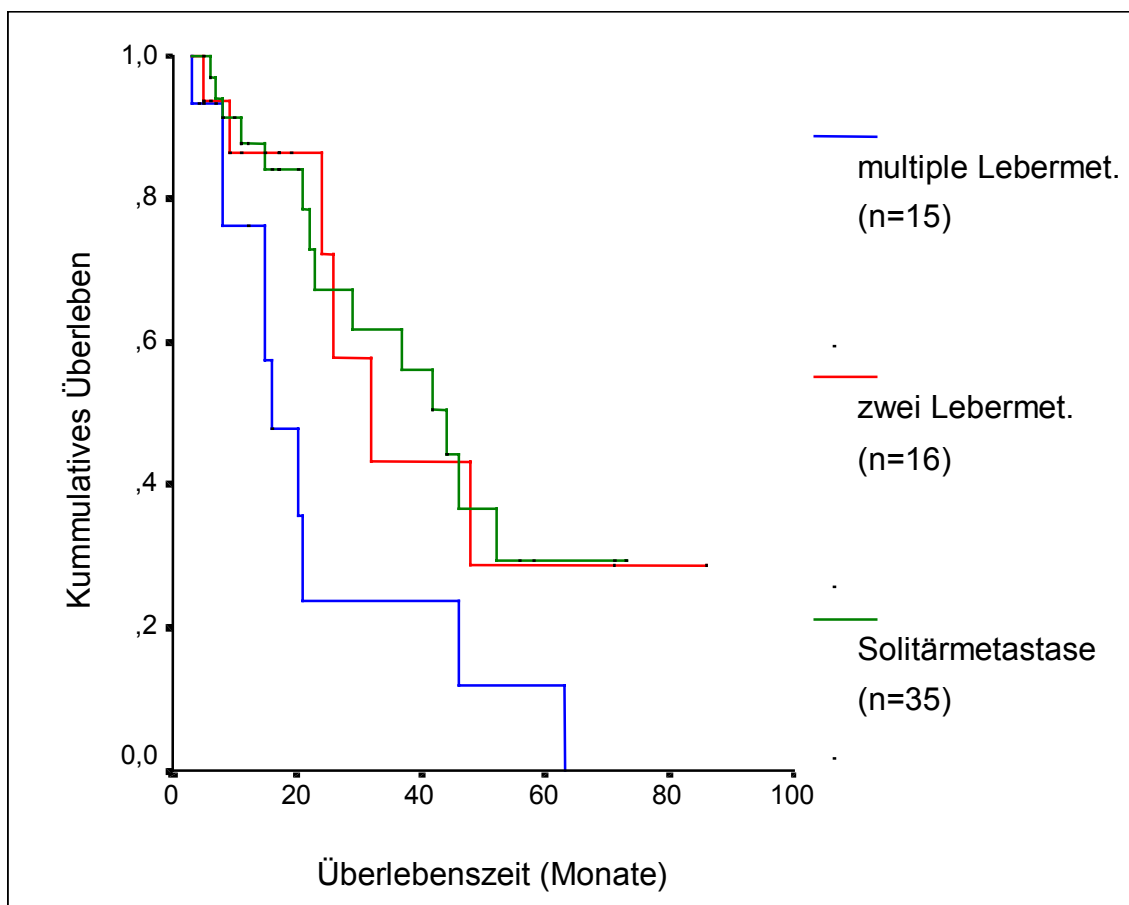


Auch bei der Analyse der Manifestationsform der Lebermetastase (Solitärmetastase vs. 2 Lebermetastasen vs. multiple Lebermetastasen) und rezidivfreiem Überleben ergaben sich signifikante Zusammenhänge. So verstarben innerhalb des postoperativen Beobachtungszeitraums 14 von 35 (40%) Patienten mit einer Solitärmetastase, während 6 von 16 (37,5%) Patienten mit zwei Lebermetastasen und 10 von 15 (66,7%) Patienten mit multipler Lebermetastasierung ihrer Erkrankung

erlagen. Dabei betrug die mediane Gesamtüberlebenszeit für Patienten mit einer Solitärmetastase 44 Monate, für Patienten mit zwei Lebermetastasen 32 Monate und für Patienten mit multiplen Metastasen 21 Monate. Dieser Zusammenhang war statistisch signifikant ($p=0,0294$) (s. Abb. 17). Bei der Analyse des rezidivfreien Überlebens ergaben sich hingegen keine signifikanten Zusammenhänge. Sechzehn von 35 (45,7%) Patienten mit Solitärmetastasen, 5 von 16 (31,2%) Patienten mit zwei und 9 von 15 (60%) Patienten mit multiplen Lebermetastasen entwickelten Fernmetastasen oder ein lokoregionäres Rezidiv. Dabei betrug die mediane Dauer bis zur Diagnose des Rezidivs bei Patienten mit Solitärmetastasen 24, bei Patienten mit zwei Metastasen 48 und bei Patienten mit multiplen Lebermetastasen 13 Monate ($p=0,1388$) (s. Tab. 11).

Abb. 17 Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Manifestationsform der Lebermetastasen

(Solitärmetastase vs. 2 Metastasen vs. multiple Metastasen, $p=0,0294$)



Tab. 11 Analyse der Nachbeobachtungsdaten

	R0-rezezierte Patienten (n= 50) R1-rezezierte Patienten (n= 11) R2-rezezierte Patienten (n= 5)			Patienten mit synchronen LM (n= 22) Patienten mit metachronen LM (n= 44)		Patienten einer LM (n= 35) Patienten mit zwei LM (n= 16) Patienten mit multiplen LM (n= 15)		
Rezidive gesamt Anzahl (%)	23/50 (46)	3/11 (27,3)	4/5 (80)	13/22 (59,1)	17/44 (38,6)	16/35 (45,7)	5/16 (31,2)	9/15 (60)
Rezidivfreies Intervall (Median, Monate)	24	56	8	10	52	24	48	13
Signifikanzniveau (p)	p= 0,0533			p= 0,0075		p= 0,1388		
Lebermetastasen- Rezidive Anzahl (%)	13/50 (26)	2/11 (18,2)	3/5 (60)	10/22 (45,4)	9/44 (20,4)	9/35 (25,7)	3/16 (18,7)	7/15 (46,7)
LM-rezidivfreies Intervall (Median, Monate)	68	56	13	13	22	46	64	56
Signifikanzniveau (p)	p= 0,0444			p= 0,0230		p= 0,0654		
Verstorbene Pat. Anzahl (%)	21/50 (42)	4/11 (36,4)	5/5 (100)	13/22 (59,1)	17/44 (38,6)	14/35 (40)	6/16 (37,5)	10/15 (66,7)
Gesamtüberleben (Median, Monate)	42	63	9	21	44	44	32	21
Signifikanzniveau (p)	p< 0,0001			p= 0,0261		p= 0,0294		

3.4 Korrelation der Nachuntersuchungsdaten mit den Ergebnissen der Immunhistochemie

Für diese Analyse wurden nur Daten von Patienten herangezogen, die an einer primären kolorektalen Lebermetastase operiert wurden und deren Metastasen R0-reseziert wurden (n= 50). Dabei wurden Patienten mit fehlender oder stark reduzierter FasR-Expression (Downregulation) der Gruppe von Patienten mit mäßig reduzierter bzw. normaler FasR-Expression (keine Downregulation) gegenübergestellt. Hinsichtlich der Beurteilung des FasL wurden Patienten mit starker bzw. mäßiger FasL-Expression (Expression des FasL) mit Patienten mit schwacher oder fehlender FasL-Expression (keine Expression des FasL) verglichen.

3.4.1 Einfluß der FasR-Downregulation auf Rezidivrate und Gesamtüberleben

In diese Analyse gingen die Daten von 39 (78%) Lebermetastasen mit einer downregulierten FasR-Expression und 11 (22%) Lebermetastasen ein, bei denen keine Downregulation der FasR-Expression vorlag: Drei (6%) Lebermetastasen wiesen eine normale und 8 (16%) eine verminderte Expression des FasR auf. In 12 (24%) Fällen war die Expression des FasR stark reduziert, 27 (54%) Lebermetastasen waren FasR-negativ.

In der Gruppe der Patienten mit FasR-downregulierten Lebermetastasen kam es bei 16 von 39 (41%) Patienten und bei den nicht FasR-downregulierten Lebermetastasen bei 7 von 11 (63,6%) Patienten während des Nachbeobachtungszeitraums zur Entwicklung von hepatischen und/oder extrahepatischen Rezidiven: Bei 1 von 3 (33,3%) Patienten mit normaler FasR-Expression, bei 6 von 8 (75%) Patienten mit verminderter FasR-Expression, bei 3 von 12 (25%) Patienten mit einer starken Reduktion des FasR und bei 13 von 27 (48,1%) mit fehlender FasR-Expression. Von der Operation der Lebermetastase bis zum Nachweis der Rezidive vergingen bei den Patienten mit FasR-Downregulation im Median 40 Monate, bei den nicht FasR-downregulierten Lebermetastasen 11 Monate ($p= 0,0785$). In der Gruppe der Patienten mit FasR-Downregulation entwickelten 10 von 39 (25,6%) Patienten, in der Gruppe der FasR-positiven Patienten 4 von 11 (36,4%) ein Lebermetastasenrezidiv: 4 von 8 (50%) Patienten mit verminderter FasR-Expression, bei 1 von 12 (8,3%) Patienten mit starker Reduktion und 9 von 27 (33,3%) Patienten mit fehlender Expression des FasR. Bis zur Diagnose des Lebermetastasenrezidivs vergingen bei den Patienten mit FasR-

downregulierten Lebermetastasen im Durchschnitt 60,8 Monate, bei den nicht FasR-downregulierten Lebermetastasen 29,6 Monate ($p = 0,0303$).

In dem Beobachtungszeitraum verstarben 18 von 39 (45,2%) Patienten mit einer Downregulation des FasR und 3 von 11 (27,3%) Patienten mit vorhandener FasR-Expression an den Folgen ihres Tumorleidens: keiner der Patienten mit normaler Expression des FasR, 3 von 8 (37,5%) Patienten mit verminderter FasR-Expression, 4 von 12 (33,3%) Patienten mit starker Reduktion und 14 von 27 (51,9%) mit fehlender Expression des FasR. Die Gesamtüberlebenszeit vom Zeitpunkt der Lebermetastasenoperation bis zum Ende der Nachuntersuchung betrug für Patienten mit downreguliertem FasR im Median 42 Monate und für Patienten mit FasR-positiven Metastasen im Median 46 Monate ($p = 0,6946$) (s. Tab.12).

Tab. 12 Einfluß der FasR-Expression auf Rezidivrate und Gesamtüberleben

	Normale FasR-Expression (n= 3)	Verminderte FasR-Expression (n= 8)	Starke Reduktion des FasR (n= 12)	Fehlende Expression des FasR (n= 27)	Downregulation des FasR (n= 39)	Keine Downregulation des FasR (n= 11)
Rezidive gesamt Anzahl (%)	1/3 (33,3)	6/8 (75)	3/12 (25)	13/27 (48,1)	16/39 (41)	7/11 (63,6)
Rezidivfreies Intervall Median (Ø) ¹	7 (7,5)	11 (18,7)	- (58,8)	40 (38,4)	40 (46,9)	11 (18,1)
Signifikanzniveau (p)	p= 0,2520				p= 0,0785	
LM-Rezidive Anzahl (%)	0/3 (0)	4/8 (50)	1/12 (8,3)	9/27 (33,3)	10/39 (25,6)	4/11 (36,4)
LM-rezidivfreies Intervall Median (Ø) ¹	-	14 (27,4)	- (79,1)	52 (47,8)	- (60,8)	- (29,6)
Signifikanzniveau (p)	p= 0,2427				p= 0,0303	
Verstorbene Pat. Anzahl (%)	0/3 (0)	3/8 (37,5)	4/12 (33,3)	14/27 (51,9)	18/39 (45,2)	3/11 (27,3)
Gesamtüberleben Median (Ø) ¹	-	46 (38,9)	48 (54,6)	29 (38,2)	42 (43,9)	46 (40,2)
Signifikanzniveau (p)	p= 0,8654				p= 0,6946	

¹ Angabe in Monaten

3.4.2 Einfluß der FasL-Expression auf Rezidivrate und Gesamtüberleben

Insgesamt wurden für diese Analyse die Daten von 35 (70%) primären kolorektalen Lebermetastasen mit positiver FasL-Expression und 15 (30%) mit fehlender FasL-Expression ausgewertet: 8 (16%) Lebermetastasen wiesen eine starke, 27 (54%) eine mäßige und 6 (12%) eine schwache Expression des FasL auf. Bei 9 (18%) Lebermetastasen war keine Expression des FasL nachweisbar.

Insgesamt kam es bei 6 von 15 (40%) Patienten mit verminderter oder fehlender FasL-Expression und bei 17 von 35 (48,6%) Patienten mit mäßiger oder starker FasL-Expression zur Manifestation von hepatischen und/oder extrahepatischen Rezidiven. Vier von 8 (50%) Patienten mit starker Expression des FasL, 13 von 27 (48,1%) Patienten mit mäßiger, 5 von 6 (83,3%) Patienten mit schwacher und 1 von 9 (11,1%) Patienten mit fehlender FasL-Expression entwickelten Rezidive. Bis zum Nachweis der Rezidive vergingen in der Gruppe der Patienten mit FasL-Expression im Median 27, in der Gruppe ohne FasL-Expression 24 Monate ($p=0,9811$). Weiterhin wurden bei 5 von 15 (33,3%) Patienten, die keine FasL-Expression aufwiesen, und bei 9 von 35 (25,7%) Patienten mit FasL-Expression Lebermetastasenrezidive diagnostiziert: bei 4 von 8 (50%) Patienten mit einer starken Expression des FasL, bei 5 von 27 (18,5%) Patienten mit mäßiger, bei 4 von 6 (66,7%) Patienten mit schwacher und 1 von 9 (11,1%) Patienten mit fehlender FasL-Expression. Bis zum Nachweis der Lebermetastasenrezidive vergingen bei Patienten ohne FasL-Expression durchschnittlich 38,2 Monate, bei den Patienten mit FasL-Expression 60,2 Monate ($p=0,3907$). Insgesamt verstarben in der Patientengruppe mit Lebermetastasen ohne FasL-Expression 5 von 15 (33,3%) Patienten, in der Patientengruppe mit FasL-Expression 16 von 35 (45,7%) Patienten während des Zeitraums der Nachbeobachtung: 5 von 8 (62,5%) Patienten mit starker, 11 von 27 (40,7%) mit mäßiger, 4 von 6 (66,7%) Patienten mit schwacher und einer von 9 (11,1%) Patienten mit fehlender FasL-Expression. Die Gesamtüberlebenszeit vom Zeitpunkt der Lebermetastasenoperation bis zum Ende des Nachuntersuchungszeitraums betrug für Patienten ohne FasL-Expression im Median 44 Monate, für Patienten mit FasL-Expression auf den kolorektalen Lebermetastasen 42 Monate ($p=0,9151$) (s. Tab. 13).

Tab. 13 Einfluß der FasL-Expression auf Rezidivrate und Gesamtüberleben

	Starke FasL-Expression (n= 8)	Mäßige FasL-Expression (n= 27)	Schwache FasL-Expression (n= 6)	Fehlende Expression des FasL (n= 9)	Expression des FasL (n= 35)	Keine Expression des FasL (n= 15)
Rezidive gesamt Anzahl (%)	4/8 (50)	13/27 (48,1)	5/6 (83,3)	1/9 (11,1)	17/35 (48,6)	6/15 (40)
Rezidivfreies Intervall Median (Ø) ¹	52 (42)	16 (41,2)	10 (13,8)	- (51,9)	27 (41,8)	24 (31,4)
Signifikanzniveau (p)	p= 0,1429				p= 0,9811	
LM-Rezidive Anzahl (%)	4/8 (50)	5/27 (18,5)	4/6 (66,7)	1/9 (11,1)	9/35 (25,7)	5/15 (33,3)
LM-rezidivfreies Intervall Median (Ø) ¹	52 (42)	- (68,9)	10 (20,5)	- (51,9)	- (60,2)	- (38,2)
Signifikanzniveau (p)	p= 0,0679				p= 0,3907	
Verstorbene Pat. Anzahl (%)	5/8 (62,5)	11/27 (40,7)	4/6 (66,7)	1/9 (11,1)	16/35 (45,7)	5/15 (33,4)
Gesamtüberleben Median (Ø) ¹	46 (46,3)	32 (43,9)	22 (29,8)	- (50,7)	42 (45,0)	44 (37,4)
Signifikanzniveau (p)	p= 0,5400				p= 0,9151	

¹ Angabe in Monaten

3.4.3 Einfluß des FasR/FasL-Expressionsmusters auf Rezidivrate und Gesamtüberleben

Für diese Analyse wurden die Daten von 8 (26%) primären kolorektalen Lebermetastasen mit gleichzeitiger Expression des FasR und FasL (FasR+/FasL+), 3 (6%) Lebermetastasen mit ausschließlicher Expression des FasR (FasR+/FasL-), 12 (24%) Lebermetastasen ohne FasR- und FasL-Expression (FasR-/FasL-) und 27 (54%) Metastasen mit fehlender FasR-Expression, aber positiver FasL-Expression (FasR-/FasL+) ausgewertet.

Bei 6 von 8 (75%) Lebermetastasen mit positiver FasR- und FasL-Expression, bei 1 von 3 (33,3%) Metastasen mit alleiniger Expression des FasR, bei 5 von 12 (41,7%) Metastasen ohne Expression von FasR/FasL und 11 von 27 (40,7%) Metastasen mit fehlender FasR- aber positiver FasL-Expression kam in dem Nachbeobachtungszeitraum zur Manifestation eines hepatischen und/oder extrahepatischen Rezidivs. Dabei vergingen bis zur Diagnose bei FasR+/FasL+ Lebermetastasen im Median 11 Monate, bei den FasR+/FasL- Lebermetastasen 10 Monate, bei den FasR-/FasL- Metastasen 24 Monate und den FasR-/FasL+ Lebermetastasen 52 Monate ($p=0,1402$). In der Gruppe der FasR- und FasL-positiven Lebermetastasen entwickelten 3 von 8 (37,5%) Patienten, in der Gruppe der FasR-positiven und FasL-negativen 1 von 3 (33,3%), in der Gruppe der FasR- und FasL-negativen 4 von 12 (33,3%) und in der Gruppe der FasR-negativen/FasL-positiven 6 von 27 (22,2%) ein Lebermetastasenrezidiv. Das lebermetastasen-rezidivfreie Intervall betrug bei den FasR+/FasL+ Lebermetastasen im Durchschnitt 29,3 Monate, bei den FasR+/FasL- Lebermetastasen 26 Monate, bei den FasR-/FasL- Metastasen 39,3 Monate und den FasR-/FasL+ Lebermetastasen 63,9 Monate ($p=0,5302$). Während des Nachbeobachtungszeitraums verstarben insgesamt 3 von 8 (37,5%) Patienten mit vorhandener FasR- und FasL- Expression, keiner der Patienten mit alleiniger FasR-Expression, 5 von 12 (41,7%) der Patienten mit fehlender FasR- und FasL-Expression und 13 von 27 (48,1%) Patienten mit negativen FasR und positivem FasL. Die durchschnittliche Überlebenszeit betrug für die Patienten mit FasR+/FasL+ Lebermetastasen 36,9 Monate, bei den FasR-/FasL- Metastasen 30,9 Monate und den FasR-/FasL+ Lebermetastasen 46,4 Monate ($p=0,3744$) (s. Tab. 14).

Tab. 14 Einfluß des Expressionsmusters auf Rezidivrate und Gesamtüberleben

	FasR+/FasL+ Lebermetastasen (n= 8)	FasR+/FasL- Lebermetastasen (n= 3)	FasR-/FasL- Lebermetastasen (n= 12)	FasR-/FasL+ Lebermetastasen (n= 27)
Rezidive gesamt Anzahl (%)	6/8 (75)	1/3 (33,3)	5/12 (41,7)	11/27 (20,7)
Rezidivfreies Intervall Median ($\emptyset$) ¹	11 (14,8)	10 (26)	24 (28,6)	52 (48,8)
Signifikanzniveau (p)	p= 0,1402			
LM-Rezidive Anzahl (%)	3/8 (37,5)	1/3 (33,3)	4/12 (33,3)	6/27 (22,2)
LM-rezidivfreies Intervall Median ($\emptyset$) ¹	- (29,3)	10 (26,0)	- (39,3)	- (63,9)
Signifikanzniveau (p)	p= 0,5302			
Verstorbene Pat. Anzahl (%)	3/8 (37,5)	0/3 (0)	5/12 (41,7)	13/27 (48,1)
Gesamtüberleben Median ($\emptyset$) ¹	37 (36,9)	- -	22 (30,9)	42 (46,4)
Signifikanzniveau (p)	p= 0,3744			

¹ Angabe in Monaten

4 Diskussion

Die Immundiagnostik maligner Neoplasien nimmt in der onkologischen Diagnostik und Forschung einen immer breiteren Raum ein. Gestützt auf die Erkenntnis, daß das Immunsystem zur Erkennung und selektiven Eliminierung von Tumorzellen befähigt ist, wurden u.a. mit Hilfe monoklonaler Antikörper zahlreiche Antigenstrukturen auf Malignomen identifiziert und hinsichtlich ihres Einflusses auf den klinischen Verlauf der Tumorerkrankung untersucht [70,38]. Heute gilt als gesichert, daß sich Tumoren verschiedenster Mechanismen bedienen, um der spezifischen anti-tumoralen Immunabwehr zu entgehen, und auf diesem Wege Kolonisations- und Progressionsvorteile erlangen. Hierzu zählt z.B. die Downregulation von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1, VCAM-1 oder E-Selectin auf der Oberfläche von Tumorzellen, welche die Adhäsion aktivierter Lymphozyten an der Zellmembran unterstützen [92].

In diesem Zusammenhang wird die Modulation der FasR-Expression oder -Funktion als ein wichtiger Mechanismus angesehen, dessen sich humane Tumoren bedienen, um die gegen sie gerichtete Immunabwehr zu umgehen. Experimentelle Arbeiten zu diesem Thema zeigen, daß es bei menschlichen Malignomen, wie z.B. dem Mammakarzinom [35], Hepatozellulären Karzinom [72] oder Ösophaguskarzinom [24] während der neoplastischen Transformation der Zellen zur Reduktion oder zum totalen Verlust einer FasR-Expression kommt (Downregulation). Im Gegensatz dazu haben verschiedene Autoren laborexperimenteller Studien nachgewiesen, daß maligne Tumoren, wie das Kolonkarzinom [52,53], Pankreaskarzinom [83], Ösophaguskarzinom [6] oder Prostatakarzinom [63] den FasR in einem hohen Prozentsatz exprimieren. Weiterführende Untersuchungen zu diesen Ergebnissen haben aber gezeigt, daß der von malignen Tumoren exprimierte FasR häufig funktionslos ist. Hierfür werden intrazelluläre Defekte oder protektive Proteine (z.B. Protein-Tyrosin-Phosphatasen, FAP-1) verantwortlich gemacht, die zur Störung der intrazellulären Transduktion des Apoptose-Signals führen [64,82]. Es wird im allgemeinen angenommen, daß sich Tumoren durch die Downregulation oder die Modulation der Funktion von FasR vor FasL-vermittelter Apoptose durch aktivierte Lymphozyten schützen und dadurch der gegen sie gerichteten zellulären Immunabwehr entgehen können [24,83].

Die Expression von FasL wird als eine weitere Überlebensstrategie von Tumorzellen angesehen [91]. Umfangreiche Studien belegen die zentrale Rolle des FasL für die spezifische zelluläre Immunabwehr: Der FasL schafft immun-privilegierte Bedingungen

in der Augenkammer [25] und im Hodengewebe [5], wirkt mit bei der Regulation und Beendigung von Immunreaktionen [1] und hat Einfluß auf die Transplantatabstoßung [25]. Die wohl wichtigste Funktion des FasL liegt aber in der Induktion von Apoptose bei FasR-exprimierenden Zielzellen durch Effektorzellen (aktivierte Lymphozyten, u.a.) des Immunsystems. Untersuchungen zur FasL-Expression zeigen, daß durch die FasL-Expression von nicht-lymphoiden Geweben weitreichende immunsuppressive Effekte erzielt werden können, da sowohl aktivierte T-Lymphozyten [1], B-Lymphozyten [85], Natürliche Killerzellen, wie auch neutrophile Zellen und Monozyten [7] sensitiv gegenüber FasL-vermittelter Apoptose sind. Ergebnisse onkologischer Studien weisen die Expression von FasL auf verschiedenen humanen Tumorentitäten, wie z.B. dem Malignen Melanom [26], Hepatozellulären Karzinom [72], Astrozytom [62], Bronchialkarzinom [51], Kolonkarzinom [53] und auf Lebermetastasen kolorektaler Adenokarzinome [68] nach. In vitro Experimente mit Zellkulturen belegten die Funktion des von malignen Tumoren exprimierten FasL: Isolierte FasL-positive Tumorzellen sind in der Lage bei ko-kultivierten Jurkat-Zellen (Jurkat-Zellen: lymphozytäre FasR-positive Zelllinie mit hoher Sensibilität gegenüber FasL-vermittelter Apoptose [53]) Apoptose zu induzieren. Durch weiterführende Studien an Mäusen kann direkt gezeigt werden, daß Tumoren ihre Progression durch die Expression von FasL positiv beeinflussen können [26]. Während es bei gesunden Mäusen durch die Injektion von FasL-positiven Melanomzellen zur schnellen Genese multipler Tumoren kommt, entwickeln lpr-Mäuse, denen aufgrund eines genetischen Defekts ein funktionsfähiges Fas-System fehlt, nur sehr zögerlich Melanome. Man versucht sich dies dadurch zu erklären, daß die Lymphozyten der lpr-Mäuse keinen FasR exprimieren und dadurch eine gewisse Resistenz gegenüber FasL-vermittelter Apoptose aufweisen. Die Immunität der Lymphozyten gegenüber dem von den Melanomzellen exprimierten FasL verhindert die Induktion von Apoptose unter den Tumor-infiltrierenden-Lymphozyten (TILs), wodurch diese ihre anti-tumorale Funktion weiter wahrnehmen und die Tumorprogression effizienter kontrollieren können. Aktuelle Studien belegen, daß Zellen maligner Tumoren durch die Expression von FasL in der Lage sind, direkt Apoptose bei FasR-positiven Zellen gesunder Organe und den TILs zu induzieren, und dadurch eine wirksame Unterdrückung der lokalen Immunabwehr hervorrufen [3,93]. Man nimmt an, daß darin die zentrale Bedeutung einer FasL-Expression auf Tumoren liegt, da Tumorzellen beim Überleben im Organismus vielfältigen Attacken durch das Immunsystem ausgesetzt sind und daher eine ausgeprägte Sensibilität gegenüber den verschiedenen zytotoxischen Abwehrmechanismen besitzen [60]. Die Expression eines Moleküls, das die anti-tumorale Immunabwehr unterdrückt, würde somit protektiv wirken und Vorteile für die Progression und Proliferation des Tumors bieten. Bei dem

FasL handelt es sich um ein solches Molekül. Als Mediator einer gewissen Immuntoleranz scheint der FasL damit der Lage zu sein, immun-privilegierte Bedingungen für Gewebe, also wahrscheinlich auch für maligne Tumoren, zu schaffen [7].

In der vorliegenden Studie haben wir die Expression von FasR und FasL immunhistochemisch bei 77 primären Lebermetastasen und 11 Lebermetastasenrezidiven kolorektaler Karzinome untersucht. Hierbei ließ sich die Downregulation des FasR bei 81,9% der untersuchten kolorektalen Lebermetastasen und 81,8% der Lebermetastasenrezidive nachweisen. Nur 5,6% der Lebermetastasen wiesen eine normale FasR-Expression auf, während kein Lebermetastasenrezidiv FasR-positiv war. Hingegen konnte eine hohe Prävalenz der FasL-Expression auf Lebermetastasen kolorektaler Karzinome nachgewiesen werden. Es zeigten insgesamt 63,8% der untersuchten primären Lebermetastasen und 54,6% der Lebermetastasenrezidive eine deutliche Expression von FasL. Andere Gruppen, die sich mit der Expression von FasR und FasL auf kolorektalen Tumoren und kolorektalen Lebermetastasen beschäftigt haben, kommen zu ähnlichen Ergebnissen. In einer umfangreichen Untersuchung von Möller et al. [45] ließ sich bei allen Präparaten von gesunder Kolonschleimhaut eine FasR-Expression nachweisen, während nur 12,8% der Kolonkarzinome (n= 258) eine normale FasR-Expression aufwiesen. In 39,1% Fällen war die Expression des FasR auf Kolonkarzinomen deutlich reduziert und in 48,1% der Fälle ganz aufgehoben. Von den untersuchten Lebermetastasen (n= 10) waren 80% komplett FasR-negativ, während je 10% eine schwache, bzw. normale Expression des FasR zeigten. Möller et al. vermuten, daß die physiologische FasR-Expression auf gesunder Kolonschleimhaut während der neoplastischen Transformation der Zellen dauerhaft verlorenght und somit auch hepatisch disseminierte Tumorzellen keinen FasR mehr exprimieren. Zu anderen Ergebnissen gelangten O'Connell et al. [52], die Expression von FasR und darüber hinaus auch die Expression von FasL auf kolorektalen Karzinomen (n= 31) untersucht haben. Sie fanden bei allen Kolonkarzinomen sowohl FasR-positive Regionen als auch Bereiche mit deutlicher FasL-Expression, während ebenfalls untersuchte gesunde Kolonmukosa FasL-negativ war. Die Autoren gehen davon aus, daß es analog der FasR-Downregulation während der neoplastischen Zelltransformation zur Upregulation von FasL kommt. O'Connell et al. untersuchten in einer früheren Studie an Zelllinien kolorektaler Karzinome (SW 620-Zellen) die Funktion von FasR und FasL [53]. Dabei zeigte sich, daß es sich bei dem von den Karzinomzellen exprimierten FasL um ein voll funktionsfähiges Molekül handelt: In einem Ko-Kultivierungsexperiment mit SW 620-

Zellen und Jurkat-Zellen konnte durch quantitative Messung der apoptose-spezifischen DNA-Fragmente ein hoher Apoptose-Index bei den Jurkat-Zellen nachgewiesen werden. Um sicherzugehen, daß es sich tatsächlich um FasL-vermittelte Apoptose handelt, wurden die Jurkat-Zellen in einem Kontrollversuch mit einem FasR-spezifischen antikörperähnlichen Oligopeptid behandelt, welches den FasR blockiert, ohne eine eigene intrinsische Aktivität zu entfalten. Wie erwartet zeigte sich, daß diese Jurkat-Zellen deutlich geringere Apoptoseraten nach Kultivierung mit SW620-Zellen aufwiesen. In einem anderen Versuch konnte gezeigt werden, daß die FasR-positiven SW 620-Zellen resistent gegenüber FasL-vermittelter Apoptose sind: Die Inkubation der SW620-Zellen mit einem agonistischen (Apoptose-auslösenden) anti-FasR Antikörper CH11 hatte keine erhöhten Apoptoseraten bei den Karzinomzellen zur Folge. O'Connell et al. schließen aus ihren Untersuchungen, daß eine Art „counterattack-model“ auch für kolorektale Karzinome existiert, da Zellen kolorektaler Karzinome trotz einer FasR-Expression resistent gegenüber FasL-vermittelter Apoptose sind und dadurch in der Lage sein müßten, sich dem Zugriff durch aktivierte Lymphozyten zu entziehen. Diese Hypothese stützen Untersuchungen bei anderen Karzinomentitäten, wie z.B. dem Ösophaguskarzinom [6], Magenkarzinom [7] oder Pankreaskarzinom [83]. Weiterhin wird im allgemeinen angenommen, daß Tumoren durch die Expression eines funktionsfähigen FasL ihrerseits in der Lage sind, direkt Apoptose bei FasR-positiven Effektorzellen des Immunsystems (aktivierte Lymphozyten, u.a.) zu induzieren, und sich dadurch immun-privilegierte Bedingungen schaffen [52,53]. Eine aktuelle Studie von Favre-Felix et al. steht jedoch im Widerspruch zu dieser Hypothese [17]. Bei in vitro Untersuchungen mit verschiedenen Zelllinien von Kolonkarzinomen (SW 480, SW 620, HT 29, Caco-2, HCT116, HCT15 und HCT8) und FasR-positiven Zielzellen (Jurkat-Zellen und lymphoide L1210-Zellen) konnte bei Ko-Kultivierung keine signifikant erhöhte Apoptoserate unter den Zielzellen detektiert werden. Ebenso war es zwar möglich, FasL-mRNA aus Karzinomzell-Extrakten zu isolieren, aber nicht immunhistochemisch die FasL-Expression auf Tumorzellen nachzuweisen. Favre-Felix et al. vermuten einen anderen Mechanismus als das „counterattack-model“, der Karzinomen eine gewisse immunologische Immunität verleiht. So wäre es denkbar, daß es durch den vom Tumor ausgehenden permanenten Entzündungs- und Aktivierungsreiz zum „autokrinen Selbstmord“ unter FasR/FasL-koexprimierenden Lymphozyten kommt, die um den Tumor herum kumulieren [15,17].

Über die Expression von FasR und FasL bei kolorektalen Lebermetastasen und den Einfluß auf den weiteren Verlauf der Tumorerkrankung ist bisher wenig bekannt.

Shiraki et al. [68] haben die Expression von FasR und FasL bei 4 Lebermetastasen untersucht. Sie konnten auf den kolorektalen Lebermetastasen keine FasR-Expression nachweisen, während der FasL auf allen untersuchten Lebermetastasen nachweisbar war. Analog zu den Ergebnissen von O'Connell et al. [53] belegten in vitro Experimente mit Zelllinien die Funktionsfähigkeit des von Kolonkarzinomzellen exprimierten FasL. Die Ergebnisse der Untersuchungen lassen Shiraki et al. annehmen, daß disseminierte Tumorzellen kolorektaler Karzinome durch die Expression eines funktionsfähigen FasL zum einen in der Lage sind, TILs zu eliminieren („counterattack-model“) und zum anderen direkt Apoptose bei gesunden FasR-positiven Hepatozyten zu induzieren. Yoong et al. [91] gehen in einer aktuellen Studie noch weiter. Sie haben Lebermetastasen kolorektaler Karzinome (n= 15), an die Metastasen angrenzende Hepatozyten und TILs immunhistochemisch auf die FasR/FasL-Expression hin untersucht. Der FasR konnte sowohl auf den Hepatozyten und den TILs als auch auf den Zellen der Lebermetastasen nachgewiesen werden. Dabei fiel zum einen auf, daß die FasR-Expression bei den Hepatozyten im direkten Tumorrandbereich am stärksten ausgeprägt war und zur Peripherie eher schwächer wurde. Zum anderen war die FasR-Expression bei den Tumorzellen auf die luminale (apikale) Seite der Zellmembran polarisiert. Die Expression von FasL konnte auf allen Tumorzellen und bei über 85% der TILs nachgewiesen werden, während die Hepatozyten ausnahmslos FasL-negativ waren. Des weiteren wurde der Bereich zwischen Tumor und angrenzendem Lebergewebe auf Apoptosen hin untersucht. Es fanden sich besonders viele apoptotische Hepatozyten am direkten Invasionsrand des Tumors, während nur wenige Tumorzellen selbst Apoptosen zeigten. Durch anschließende in vitro Experimente mit Zelllinien isolierter Hepatozyten, TILs und Karzinomzellen konnten verschiedene Interaktionen demonstriert werden. Zum einen scheint der von den Hepatozyten exprimierte FasR funktional zu sein: Nach Inkubation kultivierter Hepatozyten mit einem agonistischen anti-FasR Antikörper kam es zur Apoptose bei einem Großteil der Hepatozyten. Zum anderen sind sowohl TILs als auch SW 620-Zellen in der Lage, Apoptose bei Hepatozyten induzierten: Durch Ko-Kultivierung von TILs und Hepatozyten kam es bei der Hälfte der Hepatozyten, in Ko-Kultur von SW 620-Zellen und Hepatozyten bei etwa einem Viertel der Hepatozyten zur Apoptose. Diese Ergebnisse sind kongruent mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. Yoong et al. schließen aus ihren Beobachtungen, daß die zelluläre Lokalisation des FasR von besonderer Bedeutung für seine Funktion ist. Sie nehmen an, daß der FasR bei Tumorzellen an der luminalen Seite der Zellmembran exprimiert wird, wo er unerreichbar für die TILs ist. Damit wäre die zelluläre anti-tumorale Immunantwort wirkungslos und die Effektorzellen des Immunsystems würden um den Tumor herum

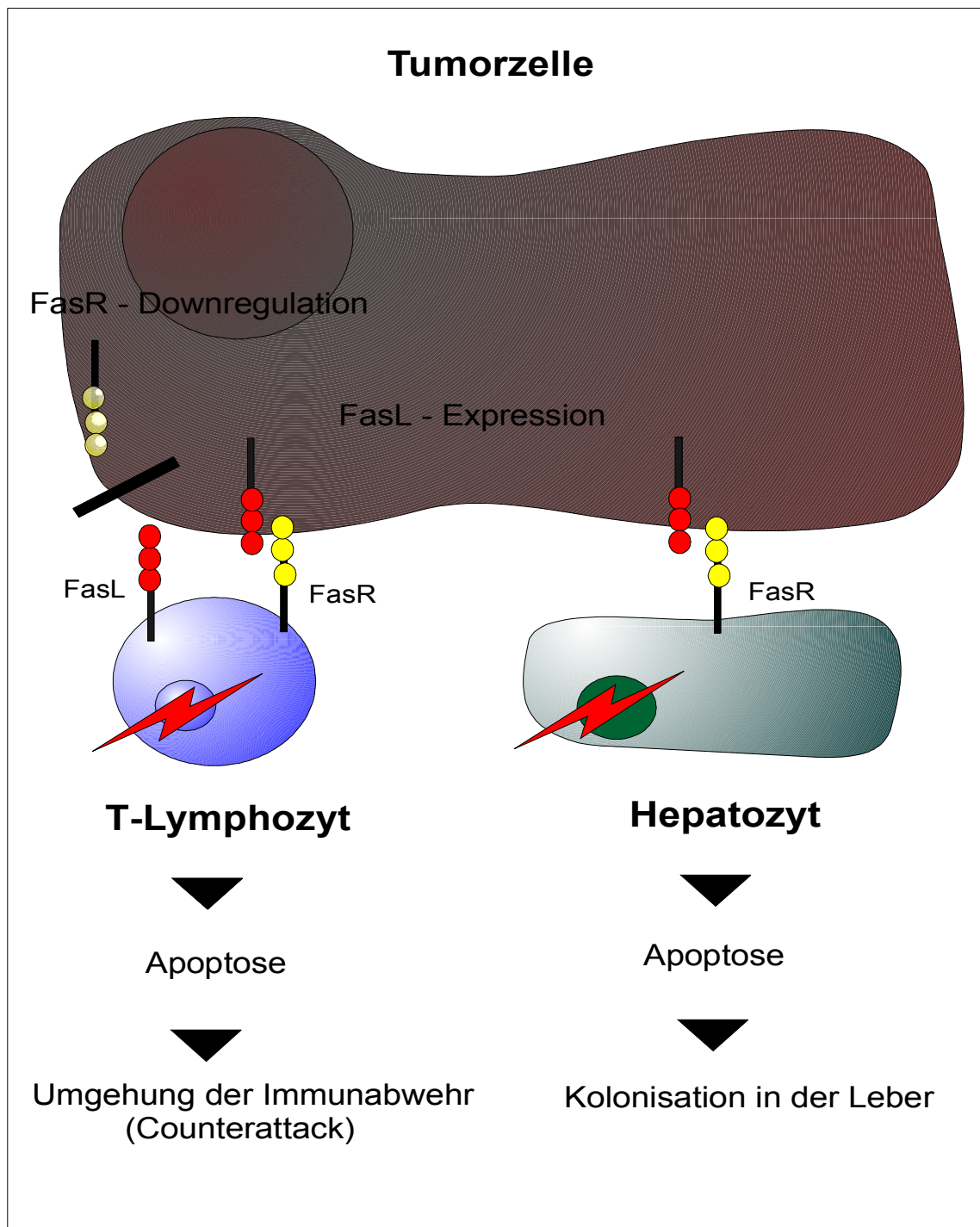
akkumulieren. Da den TILs keine FasR-exprimierenden Tumorzellen als Zielzellen zur Verfügung stehen, wäre es weiterführend denkbar, daß sie bei den angrenzenden gesunden Hepatozyten Apoptose induzieren. Auf diesem Wege würden die Tumorzellen die gegen sie gerichtete Immunaktion dazu nutzen, in das umliegende gesunde Lebergewebe zu invadieren [91]. Durch einen ähnlichen Mechanismus erklärt man sich die Destruktion von gesunden Hepatozyten im Verlauf einer durch Alkohol induzierten Hepatitis [21]. Des weiteren nehmen die Autoren wie auch Shiraki et al. an, daß in die Leber disseminierte FasL-positive Tumorzellen in der Lage sind, direkt Apoptose bei den Fas-sensitiven Hepatozyten zu induzieren [91]. Zusammenfassend läßt sich vermuten, daß ähnlich wie beim Hepatozellulären Karzinom [72] ein „counterattack-model“ für Lebermetastasen kolorektaler Karzinome zu existieren scheint [55,68,72].

Die ausgeführten Beobachtungen legen nahe, daß all diese verschiedene Strategien, die zur Modulation der Expression von FasR und/oder FasL führen, den disseminierten Tumorzellen kolorektaler Karzinome erleichterte Bedingungen für die Kolonisation und anschließende Progression in der Leber verschaffen. Durch die verschiedenen Möglichkeiten der FasR-Inaktivierung entziehen sie sich dem direkten Zugriff durch die Effektorzellen des Immunsystems („escape from immune surveillance“) und durch die Expression eines funktionsfähigen FasL scheinen sie einerseits in der Lage zu sein, aktivierte Lymphozyten zu eliminieren („counterattack-model“) und andererseits eine Destruktion von gesundem Lebergewebe zu induzieren [68,72,83] (s. Abb.12).

Wenngleich die Modulation des Fas-Systems auf malignen Tumoren Gegenstand umfangreicher onkologischer Studien war, ist nach wie vor nicht geklärt, welchen Einfluß die Downregulation des FasR oder die Expression des FasL auf den klinischen Verlauf der Tumorerkrankung hat. Shibakita et al. [67] haben die prognostische Relevanz der FasR/FasL-Expression beim Ösophaguskarzinom untersucht. Sie fanden heraus, daß die Downregulation des FasR mit einer schlechteren Prognose der Patienten korrelierte, während die Expression von FasL keinen Einfluß auf den klinischen Verlauf der Tumorerkrankung zeigte. Obwohl sich aus den laborexperimentellen Studien vielfältige Hinweise darauf ergeben, daß die Modulation des Fas-Systems bei malignen Neoplasien Einfluß auf die Tumorprogression zu haben scheint, konnten in der vorliegenden Studie keine signifikanten Zusammenhänge zwischen der Expression von FasR und/oder FasL und der Rezidiv- oder Sterberate nachgewiesen werden. Jedoch fiel auf, daß innerhalb des postoperativen Beobachtungszeitraums tendenziell mehr Patienten mit einer FasR-Downregulation als

Patienten mit vorhandener FasR-Expression an den Folgen ihres Tumorleidens verstarben (45,2% vs. 27,3%). Ebenso entwickelten Patienten mit FasL-positiven Lebermetastasen in Vergleich zu Patienten ohne FasL-Expression häufiger Rezidive (48,6% vs. 40%) und verstarben häufiger und früher (45,7% vs. 33,4%). Des weiteren fiel beim Vergleich der Koexpressionsmuster von FasR/FasL auf, daß 50% der primären Lebermetastasen und 45,4% der Lebermetastasenrezidive eine Downregulation des FasR bei gleichzeitiger Expression des FasL aufwiesen. Obwohl es bei Patienten mit einem solchen Expressionsmuster im Vergleich relativ selten zur Entwicklung von Rezidiven kam, verstarben von ihnen mehr Patienten (48,1%) während des Nachbeobachtungszeitraums als Patienten mit einer FasR/FasL-Koexpression (37,5%), Patienten ohne FasR/FasL-Expression (41,7%) oder Patienten mit ausschließlicher FasR-Expression (0%). Möglicherweise ist die relativ kurze Beobachtungszeit (Median= 16 Monate) unserer Studie ein Grund dafür, daß aus diesen Tendenzen keine signifikanten Zusammenhänge zwischen der FasR- und FasL-Expression und dem klinischen Verlauf der Patienten sichtbar wurden. Es ist denkbar, daß die Expression der beiden Moleküle in einem fortgeschrittenen Stadium, wie es die Lebermetastasierung darstellt, gar keine entscheidende Rolle mehr für den klinischen Verlauf spielt, da es im Verlauf der Tumorprogression vom Primärtumor über die metastasierungsfähige Tumorzelle zur manifesten Metastase zu einer zunehmenden genetischen Instabilität mit Akkumulation vielfältiger Gendefekte kommt, wobei die Modulation des Fas-Systems nur eine Veränderung unter vielen darstellt. Da bei einem Großteil der Patienten bei Diagnose hepatischer Makrometastasen eine bereits generalisierte Tumorerkrankung wahrscheinlich ist, scheint eine Untersuchung der FasR/FasL-Expression im Hinblick auf den postoperativen klinischen Verlauf daher nur bei einer speziellen Subgruppe von Patienten mit kleinen Solitärmetastasen sinnvoll.

Abb. 18 Modulation des Fas-Systems durch Tumorzellen [68]



5 Zusammenfassung

Der Oberflächenrezeptor Fas(APO-1/CD95)-Rezeptor vermittelt nach Interaktion mit seinem Liganden (FasL) den apoptotischen Zelltod in einer Reihe von physiologischen und pathologischen Prozessen [49]. Neben Zellen des Immunsystems wird der FasR normalerweise von einer Vielzahl adulter Normalgewebe exprimiert [33,59,87], während der FasL vornehmlich von Zellen des Immunsystems und immunprivilegierten Geweben exprimiert wird [1,73,78]. Es gibt vielfältige Hinweise darauf, daß Tumoren in der Lage sind, sich durch die Modulation der Expression von FasR und/oder FasL Vorteile in der Auseinandersetzung mit dem Immunsystem zu verschaffen. Durch die Downregulation des FasR könnten sich Zellen kolorektaler Karzinome der endogenen Immunabwehr entziehen („escape from immune surveillance“, [83]) oder über die Neo-Expression eines funktionsfähigen FasL ihrerseits Apoptose bei aktivierten Lymphozyten („counterattack-model“, [53]) und angrenzenden Fas-sensitiven Hepatozyten [68] induzieren. In dieser Untersuchung wurde die Expression der beiden Moleküle mittels immunhistochemischer Färbetechniken auf 72 primären Lebermetastasen und 11 Lebermetastasenrezidiven kolorektaler Karzinome untersucht. Es konnte eine Downregulation des FasR auf 81,9% der primären Lebermetastasen und 81,8% der Lebermetastasenrezidive nachgewiesen werden. Der FasL wurde hingegen von 63,9% der Lebermetastasen und 54,6% der Lebermetastasenrezidive exprimiert. Insgesamt war auf 50% der untersuchten Gewebsschnitte eine Downregulation des FasR bei gleichzeitiger Expression des FasL nachzuweisen. Durch Korrelation der Nachuntersuchungsdaten mit den Ergebnissen der Immunhistochemie konnten keine statistisch signifikanten Zusammenhänge hinsichtlich einer prognostischen Bedeutung des Expressionsmusters von FasR und FasL nachgewiesen werden. Es fiel jedoch auf, daß Patienten mit FasR-Downregulation postoperativ tendenziell früher und häufiger verstarben als Patienten mit normaler FasR-Expression (45,2% vs. 27,3%, $p=0,6946$). Zum anderen entwickelten Patienten mit FasL-positiven Lebermetastasen in Vergleich zu Patienten ohne FasL-Expression mehr Rezidive (48,6% vs. 40%, $p=0,9811$) und verstarben früher und häufiger (45,7% vs. 33,4%, $p=0,9151$). Die Ergebnisse dieser Studie belegen, daß die Modulation der FasR/FasL-Expression ein häufiges Ereignis bei Lebermetastasen kolorektaler Tumoren ist. Obwohl diese Veränderungen als wichtige Mechanismen für die Tumorprogression angesehen werden [91], konnte in dieser Studie kein statistisch relevanter Einfluß einer modulierten FasR/FasL-Expression auf die Prognose der Patienten nachgewiesen werden.

Literaturverzeichnis

1. Alderson M.R., Tough T.W., Davis-Smith T., Braddy S., Falk B., Schooley K.A., Goodwin R.G., Smith C.A., Ramsdell F., Lynch D.H. (1995) Fas Ligand Mediates Activation-induced Cell Death in Human T Lymphocytes. *J. Exp. Med.* 181: 71-77
2. Ambiru S., Miyazaki M., Isono T., Ito H., Nakagawa K., Shimizu H., Kusashio K., Furuya S., Nakajima N. (1999) Hepatic Resection for Colorectal Metastases. *Dis. Col. Rec.* 42: 632-639
3. Arai H., Chan S.Y., Bishop D.K., et al. (1997) Inhibition of the alloantibody response by CD95 ligand. *Nat. Med.* 3: 843-848
4. Bamberger A.M., Schulte H.M., Thuneke I., Erdmann I., Bamberger C.M., Asa S.L. (1997) Expression of apoptosis-inducing Fas ligand (FasL) in human first and third trimester placenta and choriocarcinoma cells. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 82: 3173-3175
5. Bellgrau D., Gold D., Selawry H., Moore J., Franzusoff A., Duke R.C. (1995) A role for CD95 ligand in preventing graft reaktion. *Nature* 377: 630-632
6. Bennett M.W., O'Connell J., O'Sullivan G.C., Brady C., Roche D., Collins J.K., Shanahan F. (1998) The Fas Counterattack In Vivo: Apoptotic Depletion of Tumor-Infiltrating Lymphocytes Associated with Fas Ligand Expression by Human Esophageal Carcinoma. *J. Immunol.* 160: 5669-5675
7. Bennett M.W., O'Connell J., O'Sullivan G.C., Roche D., Brady C., Kelly J., Collins J.K., Shanahan F. (1999) Expression of Fas ligand by human gastric adenocarcinomas: a potential mechanism of immune escape in stomach cancer. *Gut* 44: 156-162
8. Boldin M.P., Goncharov T.M., Goltsev Y.V., Wallach D. (1996) Involvement of MACH, a Novel MORT1/FADD-Interacting Protease, in Fas/APO-1- and TNF Receptor-Induced Cell Death. *Cell* 85: 803-815

9. Borner M., Maurer C. (1998) Die adjuvante Therapie des kolorektalen Karzinoms - Stand 1998. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 128: 763-769
10. Budihardjo I., Oliver H., Lutter M., Lou X., Wang X. (1999) Biochemical Pathways of Caspase Activation During Apoptosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15: 269-290
11. Chen M.K., Strande L.F., Beierle E.A., Kain M.S., Geldziler B.D., Doolin E.J. (1999) Fas-Mediated Induction of Hepatocyte Apoptosis in a Neuroblastoma and Hepatocyte Coculture Model. *J. Surg. Res.* 84: 82-87
12. Cheng J., Zhou T., Liu C., Shapiro J.P., Brauer M.J., Kiefer M.C., Barr P.J., Mountz J.D. (1994) Protection from Fas-Mediated Apoptosis by a Soluble Form of the Fas Molecule. *Science* 263: 1759-1762
13. Cifone M.G., De Maria R., Roncaioli P., Rippo M.R., Azuma M., Lanier L.L., Santoni A., Testi R. (1993) Apoptotic Signaling through CD95 (Fas/Apo-1) Aktivates an Acid Sphingomyelinase. *J. Exp. Med.* 177: 1547-1552
14. Cordell J.L., Falini B., Erber W.N., Ghosh A.K., Abdulaziz Z., MacDonald S., Pulford K.A.F., Stein H., Mason D. (1984) Immunoenzymatic Labeling of Monoclonal Antibodies Using Immune Complexes of Alkaline Phosphatase and Monoclonal Anti-alkaline Phosphatase (APAAP Complexes). *J. Histochem. Cytochem.* 32: 219-229
15. Dhein J., Waiczak H., Bäuml C., Debatin K.M., Krammer P.H. (1995) Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature* 373: 438-441
16. Douglass H.O. (1987) Adjuvant Treatment in Colorectal Cancer: An Update. *World J. Surg.* 11: 478-492
17. Favre-Felix N., Fromentin A., Hamman A., Solary E., Martin F., Bonnotte B. (2000) Cutting Edge: The Tumor Counterattack Hypothesis Revisited: Colon Cancer Cells Do Not Induce T Cell Apoptosis Via the Fas (CD95, APO-1) Pathway. *J. Immunol.* 164: 5023-5027

18. Fegiz G., Ramacciato G., Gennari L., Doci R., Pezzuoli G., Leggeri A., Peracchia A., Montorsi W., D'Angelo F., Aurello P. (1991) Hepatic Resection for Colorectal Metastases: The Italian Multicenter Experience. *J. Surg. Oncol. Supp.* 2: 144-154
19. Fidler I.J. (1990) Critical Factors in the Biology of Human Cancer Metastasis: Twenty-eight G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Res.* 50: 6130-6138
20. Gall F.P., Hermanek P. (1992) Wandel und derzeitiger Stand der chirurgischen Behandlung des colorectalen Carcinoms. *Chirurg* 63: 227-234
21. Galle P.R., Hofmann W.J., Wlaczak H. (1995) Involvement of the CD95 (APO1/Fas) receptor and ligand in liver damage. *J. Exp. Med.* 182: 1223-1230
22. Garvrieli Y., Sherman Y., Ben-Sasson S.A. (1992) Identification of Programmed Cell Death In Situ via Specific Labeling of Nuclear DNA Fragmentation. *J. Cell Biol.* 119: 493-501
23. Gold R., Schmied M., Giegerich G., Breitschopf H., Hartung H.P., Toyka K.V., Lassmann H. (1994) Differentiation between Cellular Apoptosis and Necrosis by Combined Use of In situ Tailing and Nick Translation Techniques. *Lab. Invest.* 71: 219-225
24. Gratas C., Tohma Y., Barnas C., Taniere P., Hainaut P., Ohgaki H. (1998) Up-Regulation of Fas (APO-1/CD95) Ligand and Down-Regulation of Fas Expression in Human Esophageal Cancer. *Cancer Res.* 58: 2057-2062
25. Griffith T.S., Ferguson T.A. (1997) The role of FasL-induced apoptosis in immune privilege. *Immunol. Today* 18: 240-244
26. Hahne M., Rimoldi D., Schröter M., Romero P., Schreier M., French L.E., Schneider P., Bornand T., Fontana A., Lienard D., Cerottini J.C., Tschopp J. (1996) Melanoma Cell Expression of Fas(Apo-1/CD95) Ligand: Implications for Tumor Immune Escape. *Science* 274: 1363-1366

27. Hasunuma T., Hoa T.T.M., Aono H., Asahara H., Yonehara S., Yamamoto K., Sumida T., Gay S. (1996) Induction of Fas-dependent apoptosis in synovial infiltrating cells in rheumatoid arthritis. *Int. Immunol.* 8: 1595-1602
28. Hiroyasu S., Shiraishi M., Koji T., Mamadi T., Sugawa H., Muto Y. (1999) Analysis of the Fas System and Bcl-2 in Rat Liver Allograft Rejection. *J. Surg. Res.* 84: 204-211
29. Hockenbery D. (1995) Defining Apoptosis. *Am. J. Path.* 146: 16-19
30. Hockenbery D., Nunez G., Miliman C., Schreiber R.D., Korsmeyer S.J. (1990) Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348: 334-336
31. Hughes K.S., Simon R., Songhorabodi S., et al. (1986) Resection of the liver for colorectal carcinoma metastases: A multi-institutional study of patterns of recurrence. *Surgery* 100: 278-284
32. Itoh N., Tsujimoto Y., Nagata S. (1993) Effect of bcl-2 on Fas Antigen-Mediated Cell Death. *J. Immunol.* 151: 621-627
33. Itoh N., Yonehara S., Ishii A., Yonehara M., Mizushima S.I., Sameshima M., Hase A., Seto Y., Nagata S. (1991) The Polypeptide Encoded by the cDNA for Human Cell Surface Antigen Fas Can Mediate Apoptosis. *Cell* 66: 233-243
34. Kauma S.W., Huff T.F., Hayes N., Nilkaeo A. (1999) Placental Fas Ligand Expression Is a Mechanism for Maternal Immune Tolerance to the Fetus. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 84: 2188-2194
35. Keane M.M., Ettenberg S.A., Lowry G.A., Russel E.K., Lipkowitz S. (1996) Fas expression and funktion in normal and malignant breast cell lines. *Cancer Res.* 56: 4791-4798
36. Klar E., Herfarth C. (1999) State-of-the-Art: Gastroenterologische Chirurgie. *Praxis* 88: 18-24

37. Kondo T., Suda T., Fukuyama H., Adachi M., Nagata S. (1997) Essential roles of the Fas ligand in development of hepatitis. *Nat. Med.* 3: 409-413
38. Krammer P.H., Dhein J., Walczak H., Behrmann I., Mariani S., Matiba B., Fath M., Daniel P.T., Knipping E., Westendorp M.O., Stricker K., Bäumler C., Hellbardt S., Germer M., Peter M.E., Debatin K.M. (1994) The Role of APO-1-Mediated Apoptosis in the Immune System. *Immunol. Rev.* 142: 175-191
39. Labat-Moleur F., Guillermet C., Lorimier P., Robert C., Lantuejoul S., Brambilla E., Negoescu A. (1998) TUNEL Apoptotic Cell Detection in Tissue Sections: Critical Evaluation and Improvement. *J. Histochem. Cytochem.* 46: 327-334
40. Lee S.H., Jang J.J., Lee J.Y., Kim S.Y., Park W.S., Shin M.S., Dong S.M., Na E.Y., Kim K.M., Kim C.S., Kim S.H., Yoo N.J. (1998) Fas ligand is expressed in normal skin and in some cutaneous malignancies. *Brit. J. Derm.* 139: 186-191
41. Li X., Melamed R.M., Darzynkiewicz Z. (1996) Detection of Apoptosis and DNA Replication by Differential Labeling of DNA Strand Breaks with Fluorochromes of Different Color. *Exp. Cell Res.* 222: 28-37
42. Link K.H., Staib L., Kreuser E.D., Berger H.G. (1996) Adjuvant Treatment of Colon and Rectal Cancer: Impact of Chemotherapy, Radiotherapy and Immunotherapy on Routine Postsurgical Patient Management. *Rec. Res. Cancer Res.* 142: 311-352
43. Lise M., Da Pian P.P., Nitti D., Pilati P.L., Prevaldi C. (1990) Colorectal Metastases to the Liver: Present Status of Management. *Dis. Col. Rect.* 33: 688-694
44. Majno G., Joris I. (1995) Apoptosis, Oncosis, and Necrosis: An Overview of Cell Death. *Am. J. Path.* 146: 3-15
45. Möller P., Koretz K., Leithäuser F., Brüderlein S., Henne C., Quentmeier A., Krammer P.H. (1994) Expression of APO-1 (CD95), a Member of the NGF/TNF Receptor Superfamily, in normal and neoplastic Colon Epithelium. *Int. J. Cancer* 57: 371-377

46. Müller M. (1996) Chirurgie für Studium und Praxis. Medizinische Verlags- und Informationsdienste, Breisach
47. Muzio M., Chinnaiyan A.M., Kischkel F.C., O'Rourke K., Shevchenko A., Ni J., Scaffidi C., Bretz J.D., Zhang M., Gentz R., Mann M., Krammer P.H., Peter M.E., Dixit V.M. (1996) FLICE, A Novel FADD-Homologous ICE/CED-3-like Protease, Is Recruited to the CD95 (Fas/Apo-1) Death-Inducing Signaling Complex. *Cell* 85: 817-827
48. Muzio M., Stockwell B.R., Stennicke H.R., Salvesen G.S., Dixit V.M. (1998) An Induced Proximity Model for Caspase-8 Activation. *J. Biol. Chem.* 273: 2926-2930
49. Nagata S., Golstein P. (1995) The Fas Death Factor. *Science* 267: 1449-1456
50. Negoescu A., Lorimier P., Labat-Moleur F., Drouet C., Robert C., Guillermet C., Brambilla C., Brambilla E. (1996) In Situ Apoptotic Cell Labeling by the TUNEL Method: Improvement and Evaluation on Cell Preparations. *J. Histochem. Cytochem.* 44: 959-968
51. Niehans G.A., Brunner T., Frizelle S.P., Liston J.C., Salerno C.T., Knapp D.J., Green D.R., Kratzke R.A. (1997) Human Lung Carcinomas Express Fas Ligand. *Cancer Res.* 57: 1007-1012
52. O'Connell J., Bennett M.W., O'Sullivan G.C., Roche D., Kelly J., Collins J.K., Shanahan F. (1998) Fas Ligand Expression in Primary Colon Adenocarcinomas: Evidence that the Fas Counterattack is a prevalent Mechanism of Immune Evasion in Human Colon Cancer. *J. Pathol.* 186: 240-246
53. O'Connell J., O'Sullivan G.C., Collins J.K., Shanahan F. (1996) The Fas Counterattack: Fas-mediated T Cell Killing by Colon Cancer Cells Expressing Fas Ligand. *J. Exp. Med.* 184: 1075-1082

54. Oehm A., Behrmann I., Falk W., Pawlita M., Maier G., Klas C., Li-Weber M., Richards S., Dhein J., Trauth B.C., Ponsting H., Krammer P.H. (1992) Purification and Molecular Cloning of the APO-1 Cell Surface Antigen, a Member of the Tumor Necrosis Factor/Nerve Growth Factor Receptor Superfamily. *J. Biol. Chem.* 267: 10709-10715
55. Ogasawara J., Watanabe-Fukunaga R., Adachi M., Matsuzawa A., Kasugai T., Kitamura Y., Itoh N., Suda T., Nagata S. (1993) Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 364: 806-809
56. Orlinick J.R., Elkon K.B., Chao M.V. (1997) Separate Domains of the Human Fas Ligand Dictate Self-association and Receptor Binding. *J. Biol. Chem.* 272: 32221-32229
57. Owen-Schaub L.B., Radinsky R., Kruzel E., Berry K., Yonehara S. (1994) Anti-Fas on Nonhematopoietic Tumors: Level of Fas/APO-1 and bcl-2 Are not Predictive of Biological Responsiveness. *Cancer Res.* 54: 1580-1586
58. Pinkoski M.J., Brunner T., Green D.R., Lin T. (2000) Fas and Fas ligand in gut and liver. *Am. J. Physiol.* 278: 354-366
59. Ponder B.A., Wilkinson M.M. (1981) Inhibition of Endogenous Tissue Alkaline Phosphatase Conjugates in Immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 29: 981-984
60. Rayner A.A., Grimm E.A., Lotze M.T. (1985) Lymphokine-activated-killer (LAK) cells: analysis of factors relevant to the immunotherapy of human cancer. *Cancer* 55: 1327
61. Riede U.N., Schaefer H.E. (1995) Allgemeine und spezielle Pathologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
62. Saas P., Walker P.R., Hahne M., Quiquerez A.L., Schuriger V., Perrin G., French L., Van Meir E.G., De Tribolet N., Tschopp J., Dietrich P.Y. (1997) Fas Ligand Expression by Astrocytoma In Vivo: Maintaining Immune Privilege in the Brain? *J. Clin. Invest.* 99: 1173-1178

63. Sasaki Y., Ahmed H., Takeuchi T., Moriyama N., Kawabe K. (1998) Immunohistochemical study of Fas, Fas ligand and interleukin-1 β converting enzyme expression in human prostatic cancer. *Br. J. Urol.* 81: 852-855
64. Sato T., Irie S., Kitada S., Reed J.C (1995) FAP-I: A Protein Tyrosine Phosphatase That Associates with Fas. *Science* 268: 411-414
65. Scheele J., Altendorf-Hofmann A. (1999) Resection of colorectal liver metastases. *Langenbecks Arch. Surg.* 384: 313-327
66. Schumpelnick V., Bleese N.M., Mommsen U. (1999) *Chirurgie*. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
67. Shibakita M., Tachibana M., Dhar D.K., Kotoh T., Kinugasa S., Kubota H., Masunaga R., Nagasue N. (1999) Prognostic Significance of Fas and Fas Ligand Expressions in Human Esophageal Cancer. *Clin. Cancer Res.* 5: 2464-2469
68. Shiraki K., Tsuji N., Shioda T., Isselbacher K.J., Takahashi H. (1997) Expression of Fas ligand in liver metastases of human colonic adenocarcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 6420-6425
69. Soini Y., Pääkkö P., Lehto V.P. (1998) Histopathological Evaluation of Apoptosis in Cancer. *Am. J. Path.* 153: 1041-1053
70. Spremulli E.N., Dexter D.L. (1983) Human Tumor Cell Heterogeneity and Metastasis. *J. Clin. Oncol.* 1: 496-507
71. Steele G., Ravikumar T.S. (1989) Resection of Hepatic Metastases from Colorectal Cancer. *Ann. Surg.* 210: 127-138
72. Strand S., Hofmann W.J., Hug H., Müller M., Otto G., Strand D., Mariani S.M., Stremmel W., Krammer P.H., Galle P.R. (1996) Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells - A mechanism of immune evasion? *Nat. Med.* 2: 1361-1366

73. Suda T., Takahashi T., Golstein P., Nagata S. (1993) Molecular Cloning and Expression of the Fas Ligand, a Novel Member of the Tumor Necrosis Factor Family. *Cell* 75: 1169-1178
74. Takahashi T., Tanaka M., Brannan C.I., Jenkins N.A., Copeland N.G., Suda T., Nagata S. (1994) Generalized Lymphoproliferative Disease in Mice, Caused by a Point Mutation in the Fas Ligand. *Cell* 76: 969-976
75. Takahashi T., Tanaka M., Inazawa J., Abe T., Suda T., Nagata S. (1994) Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity. *Int. Immunol.* 6: 1567-1574
76. Tanaka M., Itai T., Adachi M., Nagata S. (1998) Downregulation of Fas ligand by shedding. *Nat. Med.* 4: 31-36
77. Tanaka M., Suda T., Haze K., Nakamura N., Sato K., Kimura F., Motoyoshi K., Mizuki M., Tagawa S., Ohga S., Hatake K., Drummond A.H., Nagata S. (1996) Fas ligand in human serum. *Nat. Med.* 2: 317-322
78. Tanaka M., Suda T., Takahashi T., Nagata S. (1995) Expression of the functional soluble form of human Fas ligand in activated lymphocytes. *EMBO J.* 14: 1129-1135
79. Taylor I. (1996) Liver metastases from colorectal cancer: lessons from past and present clinical studies. *Br. J. Surg.* 83: 456-460
80. Tornusciolo D.R.Z., Schmidt R.E., Roth K.A. (1995) Simultaneous Detection of TDT-Mediated dUTP-Biotin Nick End-Labeling (TUNEL)-Positive Cells and Multiple Immunohistochemical Markers in Single Tissue Sections. *Bio. Tech.* 19: 800-805
81. Trauth B.C., Klas C., Peters A.M.J., Matzku S., Möller P., Falk W., Debatin K.M., Krammer P.H. (1989) Monoclonal Antibody-Mediated Tumor Regression by Induction of Apoptosis. *Science* 245: 301-305

82. Ungefroren H., Voss M., Jansen M., Roeder C., Henne-Bruns D., Kremer B., Kalthoff H. (1998) Human Pancreatic Adenocarcinomas Express Fas and Fas Ligand Yet Are Resistant to Fas-mediated Apoptosis. *Cancer Res.* 58: 1741-1749
83. Von Bernstorff W., Spanjaard R.A., Chan A.K., Lockhart D.C., Sadanaga N., Wood I., Peiper M., Goedegebuure P.S., Eberlein T.J. (1999) Pancreatic cancer cells can evade immune surveillance via nonfunctional Fas (APO-1/CD95) receptor and aberrant expression of functional Fas ligand. *Surgery* 125: 73-84
84. Vetto J.T., Hughes K.S., Rosenstein R., Sugarbaker P.H. (1990) Morbidity and Mortality of Hepatic Resection for Metastatic Colorectal Carcinoma. *Dis. Col. Rect.* 33: 408-413
85. Walker P.R., Saas P., Dietrich P.Y. (1997) Role of Fas Ligand (CD95L) in Immune Escape. The Tumor Cell Strikes Back. *J. Immunol.* 158: 4521-4524
86. Watanabe-Fukunaga R., Brannan C.I., Copeland N.G., Jenkins N.A., Nagata S. (1992) Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356: 314-317
87. Watanabe-Fukunaga R., Brannan C.I., Itoh N., Yonehara S., Copeland N.G., Jenkins N.A., Nagata S. (1992) The cDNA Structure, Expression, and Chromosomal Assignment of the Mouse Fas Antigen. *J. Immunol.* 148: 1274-1279
88. Watson M.L., Rao J.K., Gilkeson G.S., Ruiz P., Eicher E.M., Pisetsky D.S., Matsuzawa A., Rochelle J.M., Seldin M.F. (1992) Genetic Analysis of MRL-lpr Mice: Relationship of the Fas Apoptosis Gene to Disease Manifestations and Renal Disease-modifying Loci. *J. Exp. Med.* 176: 1645-1656
89. Wolf B.B., Green D.R. (1999) Suicidal Tendencies: Apoptotic Cell Death by Caspase Family Proteinases. *J. Biol. Chem.* 274: 20049-20052
90. Wyllie H. (1997) Apoptosis and carcinogenesis. *Eur. J. Cell. Biol.* 73: 189-197

91. Yoong K.F., Afford S.C., Randhawa S., Hubscher S.G., Adams D.H. (1999) Fas/Fas Ligand Interaktion in Human Colorectal Hepatic Matastases. Am. J. Path. 154: 693-703
92. Yoong K.F., Hubscher S.G., Adams D.H. (1998) Vascular adhesion protein-1 and ICAM-1 support the adhesion of tumor infiltrating lymphocytes to tumor endothelium in human hepatocellular carcinoma. J. Immunol. 160: 3978-3988
93. Zeytun A., Nagarkatti M., Nagarkatti P.S. (2000) Growth of FasL-bearing tumor cells in syngeneic murine host induces apoptosis and toxicity in Fas⁺ organs. Blood 95: 2111-2117
94. Zhivotovsky B., Gahm A., Orrenius S. (1997) Two Different Proteases Are Involved in the Proteolysis of Lamin during Apoptosis. Biochem. Biophys. Res. Com. 233: 96-101

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinem verehrten Doktorvater Herrn Priv. Doz. Dr. med. Stefan. B. Hosch für die Überlassung des Themas und die ausführlichen Diskussionen, mit denen er meine Arbeit unterstützte, herzlich bedanken.

Besonders danken möchte ich Herrn Dr. med. Peter Scheunemann für die intensive wissenschaftliche Betreuung und die Zeit, die er sich genommen hat, um viele konstruktive Anregungen zu geben und die Arbeit durchzusehen.

Weiterhin möchte ich Frau Franziska Stern und Frau Silke Brilloff für die hervorragende Anleitung und technische Unterstützung im Forschungslabor danken.

Herrn Dipl. Inform. Bernd Baum schulde ich Dank für die Unterstützung bei der wissenschaftlichen Auswertung und graphischen Darstellung der Ergebnisse. Frau Regina Glawatz danke ich vielmals für die Korrektur und Durchsicht der Arbeit.

Lebenslauf



Am 22.10.1971 wurde ich als Sohn des Dipl. Ing. Architekten Werner Renken und seiner Ehefrau Doris Renken, geb. Lintelmann, in Soltau geboren. Von 1978–1982 besuchte ich die Grundschule in Schneverdingen, von 1982–1989 die kooperative Gesamtschule in Schneverdingen, bis ich von 1989–1992 auf das Gymnasium Soltau wechselte, wo ich 1992 mein Abitur bestand. Nachdem ich von 1992–1993 meinen Grundwehrdienst bei der Bundesmarine ableistete, begann ich eine Ausbildung zum Biologisch-Technischen-Assistenten (BTA) in Bückeburg. Im Sommersemester 1994 immatrikulierte ich mich an der Universität Hamburg beim Fachbereich Medizin. Im Herbst 1997 legte ich den ersten Abschnitt und im Herbst 2000 den zweiten Abschnitt der ärztlichen Prüfung ab. Zum dritten Abschnitt der ärztlichen Prüfung bin ich für November 2001 angemeldet. Mein Praktisches Jahr absolvierte ich in Hamburg: Chirurgie im AK Eilbek, Anästhesie und Intensivmedizin im AK St. Georg und Innere Medizin im AK Altona. An meiner klinisch-experimentellen Dissertation habe ich in dem Zeitraum von 1998–2001 unter der Anleitung von Herrn Priv. Doz. Dr. med. Stefan. B. Hosch in der Abteilung für Allgemeinchirurgie des Universitätskrankenhauses Hamburg–Eppendorf gearbeitet. Thema der onkologisch-orientierten Dissertation war die vorliegende Untersuchung zur Expression von FasR und FasL auf kolorektalen Lebermetastasen. Nach der Planung des Projektes und die Einarbeitung in Material und Methodik erlernte ich die Präparation und Konservierung von Gewebeproben, die Anfertigung von Gewebsschnitten und die Durchführung von verschiedenen immunhistochemischen Färbungen (ABC-, APAAP- und TUNEL-Technik). Zu meinen Aufgaben gehörte unter anderem die Entwicklung eines individuellen Färbeverfahrens zur Darstellung der beiden Oberflächenmoleküle, die Durchführung der immunhistochemischen Färbungen, die histologische Beurteilung der Schnittpräparate und die statistische Analyse der Färbeergebnisse in Korrelation mit den Daten der Patientennachuntersuchung. Die Ergebnisse dieser Studie wurden bereits auf verschiedenen Kongressen und als Abstracta vorgestellt.

Erklärung

Diese Arbeit wurde von Juli 1998 bis Juli 2001 in der Abteilung für Allgemeinchirurgie (Direktor komm. Prof. Dr. med. J. R. Izbicki) an der Chirurgischen Universitätsklinik und Poliklinik Eppendorf in Hamburg unter der Leitung von Herrn Priv. Doz. Dr. med. Stefan. B. Hosch durchgeführt.

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Publikationen

Abstracta

Scheunemann P., Hosch S.B., Renken M., Lueth M., Stoecklein N.H., Gundlach M., Izbicki J.R. (2000) Frequent modulation of FAS (APO1) and Fas ligand expression as a mechanism of tumor progression in colorectal liver metastases. Gastroenterology 118 (4): A2852

Scheunemann P., Hosch S.B., Renken M., Lüth M., Rogiers X., Izbicki J.R. (2000) Frequent Modulation of Fas (APO-1/CD95) and Fas ligand expression as a mechanism of tumor progression in colorectal liver metastases. Forumsband des 117. Kongresses d. Dt. Gesellschaft f. Chirurgie, Berlin.

Vorträge

Scheunemann P., Hosch S.B., Renken M., Lüth M., Rogiers X., Izbicki J.R.
Häufige Modulation der Fas(APO-1)/Fas-Ligand-Expression als möglicher Mechanismus der Progression von kolorektalen Lebermetastasen.
117. Kongresses der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie
Berlin; 02.-06.05.2000

Scheunemann P., Hosch S.B., Renken M., Lüth M., Gundlach M., Brunken C., Izbicki J.R.
Frequent modulation of Fas (APO-1/CD95) and Fas ligand expression as a mechanism of tumor progression in colorectal liver metastases.
San Diego; AGA 2000