

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Urologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Lothar Hertle

Die Expression der Endothelin-Achse in Harnblasenkarzinomen

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Yamini, Johann

aus Menden (Sauerland)

2007

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität
Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Volker Arolt

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Christian Wülfing

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Martin Westphal

Tag der mündlichen Prüfung: 30. April 2007

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Urologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Lothar Hertle
Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Christian Wülfing
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Martin Westphal

ZUSAMMENFASSUNG

Die Expression der Endothelin-Achse in Harnblasenkarzinomen

Yamini
Johann

Endothelin-1 (ET-1) und seine Rezeptoren ET_AR and ET_BR, zusammengefasst zur sogenannten Endothelin-Achse (ET-Achse), spielen eine bedeutende Rolle bei Karzinomen.

In dieser Arbeit wurde die Expression der ET-Achse immunhistochemisch an durch radikale Zystektomien entfernten Harnblasenkarzinomproben untersucht.

157 Gewebeproben wurden immunhistochemisch mit ET-1-Antikörpern, ET_AR-Antikörpern and ET_BR-Antikörpern behandelt. Nach semiquantitativen Analysen der Expressionsstärken wurden die Färbungsergebnisse mit klinischen und pathologischen Parametern und den Überlebenszeiten der Patienten korreliert.

Es zeigte sich eine Überexprimierung von ET-1, ET_AR and ET_BR in 26.8%, 58.8% and 76.9% der Fälle, normales Urothelgewebe blieb in allen Fällen negativ.

Es konnte kein Zusammenhang zwischen dem TNM-Stadium oder dem histologischen Grading aufgezeigt werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte aber gezeigt werden, dass Patienten mit einer ET_BR-Exprimierung zu organbegrenzten Tumoren ($p=0,16$) und zu keiner Gefässinvasivität ($p=0,09$) neigten. Dies war insbesondere in der Untergruppe der Patienten mit G3-Tumoren statistisch signifikant ($p=0,02$). Die ET_BR-Überexpression wurde mit einer günstigen krankheitsfreien Überlebensrate assoziiert ($p=0,04$).

Die ET-Achse ist im Harnblasenkarzinom überexprimiert. ET_BR scheint im Harnblasenkarzinom vorzuherrschen, und sein Vorkommen ist mit einer günstigen Prognose assoziiert. Weitere Studien sind bereits eingeleitet, um die Rolle der ET-Achse und den eventuellen Nutzen als molekulares Angriffsziel beim Harnblasenkarzinom zu charakterisieren.

Tag der mündlichen Prüfung: 30. April 2007

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	4
1.1	Das Harnblasenkarzinom	4
1.1.1	Epidemiologie	4
1.1.2	Ätiologie	5
1.1.3	Pathologie	7
1.1.4	Tumor-Staging und Tumor-Grading.....	12
1.1.5	Klinisches Beschwerdebild	17
1.1.6	Diagnostik.....	18
1.1.7	Therapie	21
1.2	Die Endothelin-Achse.....	24
1.2.1	Entdeckung des Endothelins (ET).....	24
1.2.2	Die Endothelinfamilie	25
1.2.3	Genetik, Regulation, Biosynthese und Elimination des ET	26
1.2.4	Endothelinrezeptoren	28
1.2.5	Vorkommen und Wirkungen des Endothelins	29
1.2.6	Endothelinrezeptorantagonisten	35
1.3	Fragestellung der vorliegenden Studie	37
2	MATERIALIEN UND METHODIK.....	38
2.1	Untersuchungsgut und Arbeitsablauf	38
2.2	Immunhistochemische Färbung – Grundlagen.....	39
2.2.1	Die Immunreaktion	39
2.2.2	Antikörper	39
2.2.3	Immunhistologische Färbemethoden.....	41
2.3	Material, Seren, Adjuvantien, Puffer, Primärantikörper, Brückenantikörper.....	47
2.3.1	Gewebeschnitte, Kontrollschnitte.....	47
2.3.2	Xylol, Alkohol	48
2.3.3	Citrat-Puffer	48
2.3.4	Hitzeinduzierte Demaskierung	49
2.3.5	DAKO-Autostainer	50
2.3.6	Waschpuffer	50
2.3.7	Peroxidase-Block	50
2.3.8	Antikörper-Verdünnung	51

Inhaltsverzeichnis

2.3.9	Primärantikörper ET-1	51
2.3.10	Sekundärantikörper für ET-1	51
2.3.11	Streptavidin Peroxidase (HRP).....	52
2.3.12	Primärantikörper ET _A R und ET _B R	52
2.3.13	Brückenantikörper für ET _A R und ET _B R.....	53
2.3.14	Chromogen-Substrat-System.....	54
2.3.15	Hämatoxylin.....	55
2.3.16	Kaiser´s Glycerin-Gelantine.....	55
2.4	Immunhistochemische Färbung – Arbeitsablauf in der Übersicht.....	56
2.5	Mikroskopische Auswertung.....	58
2.6	Statistische Auswertung	59
3	ERGEBNISSE	60
3.1	Datenquelle – Stammblatt.....	60
3.2	Auswertung der immunhistologischen Befunde für ET-1, ET _A R und ET _B R. 67	
3.2.1	Semiquantitative mikroskopische Auswertung.....	67
3.3	Statistische Korrelationen und Auswertungen.....	73
3.3.1	Korrelation mit dem TNM-System und dem histologischen Differenzierungsgrad	73
3.3.2	Korrelation mit den Überlebenszeiten	81
4	DISKUSSION.....	86
4.1	Endothelin-1-, ET _A R- und ET _B R -Überexpression und tumorbiologischer Zusammenhang.....	86
4.2	ET _B R als prognostischer Parameter.....	93
5	Literaturverzeichnis	96
6	Abbildungsverzeichnis.....	115
7	Lebenslauf	116
	Danksagung	117

1 EINLEITUNG

1.1 Das Harnblasenkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Harnblasenkarzinom ist der häufigste Tumor im harnableitenden System. Es macht etwa 3% aller malignen Tumoren aus. Bei Männern ist es das vierthäufigste Karzinom, nach Prostata-, Lungen- und Kolorektalem Karzinom, bei Frauen der achthäufigste maligne Tumor [55]. Die Inzidenz wurde in den USA auf 60.240 neu aufgetretene Fälle im Jahr 2004 geschätzt [1]. In Deutschland erkranken jährlich 15.000 Menschen an Harnblasenkrebs. Männer erkranken 2,5 mal so häufig wie Frauen [55].

Das Harnblasenkarzinom kann generell in jedem Alter auftreten, sogar im Kindesalter. Es findet sich aber eine altersabhängige Inzidenz: Vor dem 45. Lebensjahr werden Harnblasenkarzinome nur selten beobachtet. Die Inzidenz beträgt für Männer im Alter von 45–50 Jahren 3 Erkrankungen/100.000 Einwohner und steigt bei der Gruppe der >80-Jährigen auf >200 Erkrankungen/100.000 Einwohner [128]. Ebenso steigt die Mortalität mit zunehmendem Alter an. Seit 1950 ist die Inzidenz des Harnblasenkarzinoms um ca. 50% gestiegen. Es ist anzunehmen, dass dieser Trend mit der Erhöhung der durchschnittlichen Lebenserwartung weiter zunimmt. Im Vergleich dazu ist die Mortalität aber im selben Zeitraum um 33% gesenkt worden.

Bei Jugendlichen und Patienten, die jünger als 30 Jahre alt sind, findet man häufig oberflächliche Tumoren mit einem hohem histologischem Differenzierungsgrad und entsprechend besserer Prognose als bei älteren Patienten [105]. Da das Progressionsrisiko aber genauso hoch einzustufen ist wie bei Patienten aus einer höheren Altersgruppe, mit oberflächlichem Karzinom und der gleichen Differenzierungsstufe, wird kein Unterschied bei der Therapie bezüglich des Alters gemacht [176].

1.1.2 Ätiologie

Für die Entstehung von Harnblasenkarzinomen wird ein multifaktorieller, mehrstufiger Prozess angenommen, bei dem komplette bzw. inkomplette Faktoren die maligne Transformation in der Urothelzelle verursachen (Initiation) und proliferationsstimulierende Mediatoren in einem zweiten Schritt bzw. mehreren Schritten das Tumorwachstum realisieren (Promotion).

Mit genetischen Untersuchungen wurden verschiedene chromosomale Veränderungen beim Harnblasenkarzinom nachgewiesen. Danach stellt der Verlust von Chromosom 9 ein frühes genetisches Ereignis in der Tumorgenese dar, weshalb auf diesem Chromosom die Lokalisation eines nicht näher charakterisierten Tumorsuppressorgens vermutet wird. Alterationen des p53-Tumorsuppressorgens auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 (17p) und des Retinoblastom/Rb-Gens auf Chromosom 13 sind mit einem Tumorprogress assoziiert [57,129].

Erste Beobachtungen über den Zusammenhang zwischen einer Schadstoffexposition und der Induktion eines Blasenkarzinoms finden sich bereits Ende des 19. Jahrhunderts [143]. Hueper führte 1938 den ersten experimentellen Beweis, dass aromatische Amine Blasenkarzinome verursachen [67]. Diesem Zusammenhang wird inzwischen Rechnung getragen, indem die Blasentumorerkrankung bei Exposition mit aromatischen Aminen in entsprechenden Betrieben als Berufskrankheit nach Nr. 1301 der Berufskrankheitenverordnung anerkannt wird. Gesicherte Blasenkarzinogene aus der Gruppe der aromatischen Amine sind: 2-Naphthylamin, Benzidin, 4-Aminobiphenyl, Dichlorobenzidin, Orthodianisidin, Phenazetin, Chlornaphazin und Cyclophosphamid. Intensität und Dauer ihrer Exposition korrelieren positiv mit dem Erkrankungsrisiko [149].

Patienten nach Cyclophosphamid-Behandlung haben ein bis zu 9fach erhöhtes Risiko, ein Blasenkarzinom durch eine chemische Zystitis zu entwickeln [113]. Die meisten dieser Tumore weisen einen hohen Differenzierungsgrad auf und wachsen bereits meist zum Zeitpunkt der Diagnosestellung muskelinvasiv [174]. Seit Einführung der Zystitisprophylaxe durch Uromitexan, einem protektiven Stoff für das Urothel, ist die Therapie mit Cyclophosphamid als Blasentumorrisiko zu vernachlässigen.

In zahlreichen Studien wird für Raucher ein bis zu 4fach höheres Risiko beschrieben [27,113]. Das erhöhte Risiko wurde bei beiden Geschlechtern beobachtet. Stoppt man den Nikotinabusus, verringert sich auch das Risiko an Harnblasenkrebs zu erkranken [6]. Die Analyse des Zigarettenrauchs erbrachte vor allem den Nachweis von 2-Naphthylamin [65].

Chronische Infektionen, verbunden mit einer dauerhaften Besiedlung des Harntrakts mit Ureasebildnern oder der Reiz durch intraluminale Katheter induzieren eine Metaplasie des Urothels [76,106]. Ein ähnlicher Mechanismus wird für die auf dem Boden einer Bilharziose, welche in weiten Teilen Afrikas und in arabischen Ländern endemisch auftritt, entstandenen Blasenkarzinome diskutiert [63].

1.1.3 Pathologie

1.1.3.1 Hyperplastische, dysplastische und metaplastische Veränderungen

Das normale Harnblasenepithel wird auch als Urothel oder Übergangsepithel bezeichnet. Es ist eine spezielle Epithelschicht, welche die ableitenden Harnwege auskleidet und wie jedes Epithel einer Basalmembran aufliegt. Es besteht aus drei bis sieben Zellschichten. Der Basalmembran sitzen kleine kubische Basalzellen auf. Die proliferierten und differenzierten Zellen wandern zum Lumen der Harnblase hin, wobei sie sich vergrössern und schirmartig dem Urothel aufliegen, als sogenannte Umbrella-Zellen [88]. Sie werden durch Desquamation mit dem Urin ausgeschwemmt [59].

Das normale Epithel kann durch verschiedene Ursachen, z.B. Entzündungen oder Karzinogene, proliferativ oder metaplastisch verändert sein. So unterscheidet man die Hyperplasie von Metaplasie und Dysplasie.

Durch Proliferation kann es zu unterschiedlichen Wachstumsmustern im Sinne von Hyperplasien kommen. Die einfache Hyperplasie kann fokal oder diffus zu einer Verbreiterung des normalen Epithels führen und teilweise Atypien aufzeigen. Durch papilläre Hyperplasien ist oft eine Abgrenzung zu den sogenannten gutartigen Papillomen bzw. gutdifferenzierten Karzinomen schwierig. Darüberhinaus kann durch Invagination eine zystische Transformation auftreten. Als Extremform tritt die *Zystitis zystica* auf.

Als weitere benigne urotheliale Hyperplasie sind die *von Brunnerschen Zellnester* zu nennen. Sie gehen wahrscheinlich von Basalzellen aus und tauchen in der Submucosa auf [40].

Der *Zystitis zystica* ähnlich ist die *Zystitis glandularis*, die aber durch eine glanduläre metaplastische Veränderung der *von Brunnerschen Zellnester* gekennzeichnet ist. Diese Metaplasie wird als typische Präneoplasie für Adenokarzinome diskutiert [40].

Bei zunehmenden Atypien kommt es zum Bild der Dysplasie des Urothels. Die Dysplasien selber werden in drei Stufen unterteilt (DI-III), wobei die Übergänge fließend sind. Dysplasien ersten Grades sind Veränderungen des Urothels mit

Kernveränderung, Anisomorphie und Hyperchromasie der Zellkerne, wobei diese Zellkernveränderungen reversibel sein können. Mit zunehmender Manifestation (DII-DIII) bleiben diese Veränderungen bestehen. Die urotheliale Dysplasie ist von dem Carcinoma in situ (Cis), welches einem intraepithelialen Karzinom entspricht, mit hochgradiger Polymorphie der Kerne und Desquamation einzelner Zellen, kaum zu unterscheiden [96].

1.1.3.2 Karzinome

Harnblasentumoren lassen sich in primäre und sekundäre Tumoren unterteilen.

Bei den epithelialen Karzinomen zeigen sich histologisch in über 90% Urothel-, in ca. 7% Plattenepithel- und in ca. 1-2% Adeno- bzw. undifferenzierte Karzinome [104].

Sekundäre Blasentumoren entstehen durch Infiltration (weibliches Genitale, Prostata, Kolon) und Metastasierung (Mamma-, Magen-, Bronchialkarzinom, Melanom) anderer Tumoren und sind mit < 1% ausgesprochen selten [149].

Neubildungen papillomatöser Wachstumsformen werden aufgrund der neueren Nomenklatur nur noch dann histopathologisch als Papillom klassifiziert, wenn die Zahl der Zellschichten nicht mehr als 7 beträgt [145]. Diese Änderung in der Nomenklatur ist von erheblicher Bedeutung, da sich dadurch in neueren Arbeiten, verglichen mit älteren Arbeiten, ein wesentlich geringerer Anteil an Papillomen ergibt.

1.1.3.2.1 Carcinoma in situ (Cis)

Das Carcinoma in situ (Cis) stellt eine Sonderform des Blasenkarzinoms dar. Es handelt sich um eine, nicht die Lamina propria mucosae infiltrierende, intraepithelial wachsende Dysplasie mit Zeichen einer Entdifferenzierung (G3). Histologisch zeigen sich große Zellkerne mit hohem Chromatingehalt, prominente Nukleoli und erhöhte mitotische Aktivität. Außerdem findet sich eine Erhöhung der Zellagen der Schleimhaut mit

unregelmäßiger Zellanordnung. Das Carcinoma in situ kann sowohl als einzige Tumorentität, als auch in Kombination mit einem anderen Blasentumor vorkommen. In 38-83% entwickelt sich aus dem Carcinoma in situ innerhalb von 5 Jahren ein invasives Karzinom [4,72]. Das Carcinoma in situ tritt in 25% bei Patienten mit hochdifferenzierten, oberflächlichen Tumoren auf [89].

1.1.3.2.2 Urothelkarzinom

Mehr als 90% aller Harnblasenkarzinome sind Urothelkarzinome. Urothelkarzinome manifestieren sich in unterschiedlichen Arten: Sie können entweder eine plattenepitheliale oder drüsige Metaplasie, sowie beide Metaplasieformen gleichzeitig aufweisen [149]. Da sie vom Übergangsepithel ausgehen, werden sie im internationalen Sprachgebrauch auch als *Transitionalzellkarzinome* bezeichnet.

Die Mehrheit der Urothelkarzinome, ca. 75-85% [62], weisen bei Diagnosestellung ein Tumorstadium Ta oder T1 auf, d.h. sie wachsen oberflächlich (siehe Kap. „Tumor-Staging und Tumor-Grading“). Ebenso sind die meisten papillär und hoch bis mässig differenziert, d.h. sie liegen in einem Differenzierungsgrad G1 oder G2 vor [60]. Typischerweise kommt es bei 70 bis 80% der Patienten mit derartigen papillären Tumoren zu wiederholten lokalen Rezidiven, wobei es in 20-30% zu einer Tumorprogression mit Verschlechterung des histologischen Differenzierungsgrades kommt [54].

Alle Urothelkarzinome die ein Tumorstadium von T2 oder mehr aufweisen, gelten als invasiv. Diese Gruppe von Tumoren, die ungefähr 30% ausmacht, hat eine vielfach schlechtere Prognose.

Invasive Tumore können endo- oder exophytisch wachsen. Die endophytischen Tumoren werden auch als „solide“ Tumoren bezeichnet und können eine noduläre oder ulzerierte Oberfläche aufweisen. Wie beobachtet werden konnte, wachsen endophytische Tumoren in der Regel invasiver als exophytische [46].

1.1.3.2.3 Plattenepithelkarzinom

Die Prävalenz des Plattenepithelkarzinoms der Harnblase ist in verschiedenen Ländern der Welt sehr unterschiedlich. Sie wird mit 1% in England [33], über 3-7% in den USA [75], bis zu 75% in Ägypten beziffert. Über 80% der Plattenepithel (PE)-Tumore in Ägypten sind aufgrund des hohen Auftretens von *Schistosomiasis haematobium* zu erklären, das die Prävalenz von Plattenepithelkarzinomen erhöht [42].

Nicht durch *S. haematobium* ausgelöste PE-Tumore werden durch Rauchen und hauptsächlich durch Langzeitkatheterisierung begünstigt bzw. induziert [18,75].

Plattenepithelkarzinome sind histologisch gekennzeichnet durch keratisierende Zellgebiete, in denen einzelne Zellen konzentrisch von Plattenepithel umgeben werden [88]. Die histopathologische Einteilung der Plattenepithelkarzinome orientiert sich an den Richtlinien für das Urothelkarzinom. Mehr als 80% der Plattenepithelkarzinome sind mäßiggradig bis schlecht differenziert und wachsen bereits zum Zeitpunkt der Erstdiagnose muskelinvasiv [149]. Daraus ergibt sich die extrem ungünstige Prognose.

Die Therapie der Wahl ist gewöhnlich die totale Zystektomie, die evtl. mit einer Bestrahlungstherapie einhergeht. Chemotherapie ist für diese Art des Blasenkarzinoms nicht geeignet.

1.1.3.2.4 Adenokarzinom

Adenokarzinome machen weniger als 2% aller Blasentumore aus [75,107]. Dieses seltene Harnblasenkarzinom soll von den Urachusresten des Blasendaches (= *Urachuskarzinom*) oder von den periprostatistischen Drüsen ausgehen. Im Gegensatz zu den Urothelkarzinomen sind die Adenokarzinome solitäre Tumoren. Ursache für ihre ebenfalls schlechte Prognose ist, dass die meisten Adenokarzinome der Harnblase bei Diagnosestellung bereits weit fortgeschritten sind und invasiv wachsen [149].

1.1.3.2.5 Andere Karzinome

Die seltenen mesenchymalen Tumoren der Harnblase können sowohl benigner (Fibrom, Myxom, Leiomyom, Hämangiom, Neurofibrom, Neurinom, Phäochromozytom) als auch maligner (Leiomyosarkom, Fibrosarkom, Rhabdomyosarkom, retikuloendotheliale Tumoren) Natur sein. Sie sind mit < 1% ausgesprochen selten.

Ein weiterer, seltener epithelialer Tumor der Harnblase ist das primäre maligne Melanom. Die Prognose ist ungünstig, eine Heilung ist bis heute nicht beschrieben worden [149].

Es gibt ebenso Harnblasenmetastasen von Magenkarzinomen und Nierenzellkarzinomen, die aber sehr selten beobachtet werden.

1.1.4 Tumor-Staging und Tumor-Grading

Die Stadieneinteilung des Harnblasenkarzinoms erfolgt nach der TNM-Klassifikation für urologische Tumoren der Union International Contre le Cancer (UICC) und nach dem Differenzierungsgrad der Tumorzellen (Grading) (WHO).

Die histologische WHO-Klassifikation urothelialer Harnblasentumoren und abnormer flacher Urothelläsionen wurde 1999 aktualisiert [114]. Die Klassifizierung und Definition verschiedener flacher urothelialer Läsionen und einiger Varianten invasiver urothelialer Karzinome wurden hinzugefügt (s. Tab. 1.1). Die Aktualisierung war notwendig, um der Biologie der verschiedenen Läsionen besser gerecht zu werden sowie eine schärfere Trennung zwischen benignen und malignen urothelialen Prozessen zu ziehen. Die Präzisierung der Terminologie soll den Vergleich von Studienergebnissen erleichtern [58].

Ein wichtiger Klassifikationsfaktor der Harnblasenkarzinome ist die Infiltrationstiefe, die in der Stadieneinteilung nach der TNM-Klassifikation berücksichtigt wird (s. Tab. 1.2). Im Stadium Ta ist der Tumor auf die Blasenmukosa beschränkt. Die Infiltration des subepithelialen Bindegewebes bis an die untere Begrenzung (Lamina propria) heran, bezeichnet man als Stadium T1. Nach Durchbrechen des Tumors durch die Lamina propria hindurch in die oberflächliche Muskelschicht liegt das Stadium T2 vor. Im Stadium T3 ist das perivesikale Gewebe infiltriert, während bei Infiltration der Nachbarorgane des kleinen Beckens (Prostata, Samenblasen, Uterus, Vagina) das Stadium T4 erreicht ist (s. Abb 1.1).

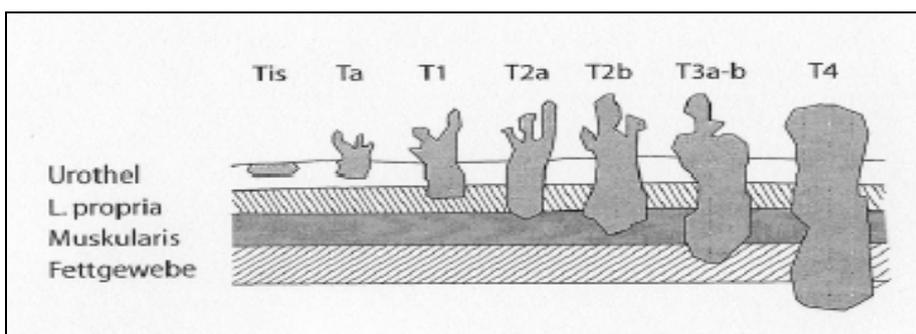


Abbildung 1.1: Stadieneinteilung der Harnblasenkarzinome (aus Rübben, Otto: "Uroonkologie"; Springer Verlag 2000)

Normal

Normales Urothel

Hyperplasie

Flache Hyperplasie

Papilläre Hyperplasie

Flache Läsionen mit Atypien

Reaktive (inflammatorische) Atypie

Atypie unklarer Bedeutung

Dysplasie (low-grade intraurotheliale Neoplasie)

Carcinoma in situ (high-grade intraurotheliale Neoplasie)

Papilläre urotheliale Neoplasien

Papillom

Invertiertes Papillom

Papilläre Neoplasie mit niedrig-malignem Potential

Papilläres urotheliales Karzinom (low-grade)

Papilläres urotheliales Karzinom (high-grade)

Invasive Neoplasien

Invasion der Lamina propria

Invasion der Muskulatur

Tabelle 1.1: WHO/ISUP-Konsensus-Klassifikation 1999 [114]

T = lokale Ausdehnung des Primärtumors

Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Ta	Nichtinvasiver papillärer Tumor
Tis	Carcinoma in situ: "flacher Tumor"
T1	Tumor infiltriert subepitheliales Bindegewebe
T2	Tumor infiltriert Muskulatur
T2a	Tumor infiltriert oberflächliche Muskulatur
T2b	Tumor infiltriert tiefe Muskulatur
T3	Tumor infiltriert perivesikales Gewebe
T3a	mikroskopisch
T3b	makroskopisch
T4	Tumor infiltriert eines der folgenden Organe: Prostata, Uterus, Vagina, Beckenwand, Bauchwand
T4a	Tumor infiltriert Prostata oder Uterus oder Vagina
T4b	Tumor infiltriert Beckenwand oder Bauchwand

Tabelle 1.2: Stadieneinteilung der Tumorausdehnung nach dem UICC TNM-System 2002 [161]

Der Zusatz (m) soll bei der entsprechenden T-Klassifizierung zusätzlich angegeben werden, um multiple Läsionen anzuzeigen.

Die Infiltrationstiefe des Tumors hat entscheidenden Einfluss auf die später zu wählende Therapieoptionen. Im klinischen Alltag wird daher in oberflächlich wachsende Karzinome (pTa, Cis, pT1) und invasiv wachsende (infiltrierende) Karzinome (\geq pT2) unterschieden. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass nach der histopathologischen Einteilung bereits im Stadium T1 eine Infiltration des subepithelialen Bindegewebes vorliegt und demnach der Tumor im klinischen Sinne nicht mehr „oberflächlich“ ist.

N = Lymphknotenbefall

Unter regionären Lymphknoten versteht man die Lymphknoten des kleinen Beckens, der Gebiete der Aa. iliaca interna et externa, des Nervus obturatorius und perivesikal, die im wesentlichen den Beckenlymphknoten unter der Bifurkation der Aa. iliaca communes entsprechen.

Nx	Regionäre LK können nicht beurteilt werden
N0	Kein Anhalt für regionäre LK
N1	Metastase in solitären LK ≤ 2 cm in größter Ausdehnung
N2	Metastase in solitären LK > 2 cm, aber < 5 cm in größter Ausdehnung oder multiple LK ≤ 5 cm
N3	Metastasen in LK > 5 cm in größter Ausdehnung

Tabelle 1.3: Stadieneinteilung des Lymphknotenbefalls nach dem UICC TNM-System 2002 [161]

M = Fernmetastasen

Die häufigen hämatogenen Metastasenorte sind die Lunge, das Skelettsystem und die Leber.

Mit Indices (z.B. M oss, pul, hep) sollte die Metastasenlokalisation angezeigt werden.

Mx	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Kein Anhalt für Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 1.4: Stadieneinteilung der Fernmetastasen nach dem UICC TNM-System 2002 [161]

G = Differenzierungsgrad

Die Differenzierung des Tumors wird in vier Grade unterteilt:

G1	gut differenziert
G2	mäßig differenziert
G3	schlecht differenziert
G4	anaplastisches Karzinom

Tabelle 1.5: Differenzierung des Tumors

Es finden sich häufig innerhalb eines Tumors unterschiedliche Differenzierungsgrade, wobei man sich bei der Beurteilung an dem Befund mit der am stärksten abweichenden Zellmorphologie orientiert. Der Differenzierungsgrad des Tumors korreliert mit dem Tumorstadium und der Überlebenszeit [144].

1.1.5 Klinisches Beschwerdebild

Die Mikro- oder Makrohämaturie stellt bei bis zu 80% der Patienten das Kardinal- und das Initialsymptom da, wobei beide Symptome häufig auch nur intermittierend nachweisbar sind. Deshalb muß bei jeder schmerzlosen Makrohämaturie ein Tumor im Urogenitaltrakt ausgeschlossen werden. In vielen Fällen finden sich zystische Beschwerden, wie Dysurie, Pollakissurie und Urgesympptomatik.

Bei fortgeschrittenem Blasenkarzinom können weitere Symptome auftreten, z.B. eine Harnstauungsniere hervorgerufen durch eine uni- oder bilateraler Obstruktion des Ureterostiums. Konsekutiv kann dies zu Flankenschmerzen, Pyelonephritis und Fieber führen.

Durch eine hämatogene Metastasierung können Knochenschmerzen, (produktiver) Husten, Veränderung der Leberenzyme resultieren.

Bei einer Rektuminfiltration zeigen sich Stuhlunregelmässigkeiten in Form von Obstipation bzw. Diarrhoe.

Ebenfalls kann sich eine B-Symptomatik durch Abgeschlagenheit, Gewichtsverlust, Appetitlosigkeit und Anämie bemerkbar machen [172].

1.1.6 Diagnostik

Bei der Diagnostik von Harnblasentumoren wird primär eine Unterscheidung zwischen oberflächlichen und invasiven Wachstum angestrebt, weil dies eine unterschiedliche Therapie zur Folge hat

Ca. 70% aller Harnblasenkarzinome weisen bei Erstdiagnose ein oberflächliches Tumorstadium auf. Sie können multipel oder solitär auftreten. Charakteristisch ist in diesen Fällen das hohe Rezidivrisiko in den ersten beiden Jahren, das zwischen 50 und 70% beträgt. In 10–30% dieser Fälle kommt es zu einer Progression des Tumorstadiums. Die Prognose, dargestellt in Tabelle 1.6, wird durch verschiedene klinische Parameter (TNM-Stadium, begleitende High-grade-Neoplasien, Zeitpunkt bis zum ersten Rezidiv etc.) und das therapeutische Vorgehen beeinflusst. Zieht man andererseits in Betracht, dass zwar ca. 80% aller T1-Patienten fünf Jahre überleben, jedoch nur ca. 64% der T1-Tumoren mit dem Differenzierungsgrad G3 eine 5-Jahres-Überlebensrate aufweisen, wird die Notwendigkeit einer über die klinischen Parameter hinaus gehenden therapeutischen Orientierung unter Einsatz zusätzlicher Informationen wie Grading, molekularbiologischer und molekulargenetischer Parameter deutlich. Der Stellenwert der molekularbiologischen und der molekulargenetischen Parameter (p53, M344, MIB-1, Ki67, E-Cadherin, Mikrosatellitenanalyse, spezifische Chromosomenveränderungen, etc.) muss allerdings noch in klinischen Studien validiert werden.

Tumorstadium	5-Jahres-Überlebensrate (%)
pTa	80–95*
pT1	53–81*
pT2	63**
pT3b	31**
pT4	21**
N1	0–30
N2/3	0
M1	0

Tabelle 1.6: 5-Jahres-Überlebensrate in Korrelation zur Tumorausdehnung [127]

* TUR-B

** Zystektomie

Obligate Untersuchungsverfahren

Klinische Untersuchung

Durch die klinische Untersuchung kann eine Hydronephrose, eine Unterbauchtumor oder eine Infiltration der Beckenorgane erfasst werden. Diese beinhaltet die Palpation der Nierenlager, des Abdomens, sowie die rektale Untersuchung der Prostata und der Ampulla recti beim Mann sowie die vaginale Untersuchung der Frau.

Urethrozystoskopie

Die Zystoskopie dient hauptsächlich zur Inspektion und ggf. zur Biopsiegewinnung durch eine transurethrale Resektion (TUR) aus tumorösen Bezirken.

Durch eine histologische Begutachtung der gewonnenen Biopsate können genaue Aussagen über den Differenzierungsgrad gemacht werden.

Ausscheidungsurographie

Mit einer Ausscheidungsurographie kann ein Tumor im Harnleiter oder Nierenbecken diagnostiziert werden und gibt Aufschluss über eine etwaige Stauung der Nieren.

Die transurethrale Resektion (TUR)

Zunächst werden hierbei die exophytischen Tumoranteile reseziert, desweiteren die Tumorbasis einschließlich Blasenwandmuskulatur und die Tumorränder. Das hierbei gewonnene Gewebe wird anschließend einzeln histopathologisch untersucht. Dies erlaubt eine Beurteilung hinsichtlich Tumorart, Differenzierung und Infiltrationstiefe. In gleicher Sitzung entnommene Probenbiopsien (Mapping) aus Blasenboden, Blasendach, Blasen hinterwand, beiden Seitenwänden, und beim Mann der prostatistischen Harnröhre, dienen der Identifikation weiterer Tumorherde, begleitender Dysplasien, oder eines Carcinoma in situ. Im Rahmen einer TUR-B kann mittels bimanueller Palpation in Narkose die Beweglichkeit der Harnblase als Kriterium für extravasikales Tumorwachstum beurteilt werden.

*Fakultative Untersuchungsverfahren**5-Aminolävulinsäure-induzierte Fluoreszenzzytoskopie (AFE)*

Mit der Fluoreszenzzytoskopie mit 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) können gezielte Biopsien bzw. Resektionen flacher urothelialer Läsionen, die mit bloßem Auge schwer oder nicht erkennbar sind, durchgeführt werden. Hierbei wird 5-ALA intravesikal instilliert. Mittels blauvioletterm Lichtes erfolgt die Fluoreszenzanregung wobei die Fluoreszenz unter Verwendung eines gelben Langpaßfilters, welcher in das Okular der Beobachtungsoptik des Zystokops eingebaut ist, erkannt werden kann [91]. Insbesondere flache Läsionen grenzen sich mit hohem Kontrast gegenüber der normalen Schleimhaut ab. In mehreren prospektiven Studien konnte eine Sensitivität von 90–95% nachgewiesen werden [44,74,92,94,193]. Darüber hinaus zeigten zwei multizentrische randomisierte Phase-III-Studien eine signifikante Reduktion der Residualtumorraten nach TUR unter fluoreszenzkontrollierten Bedingungen gegenüber der Resektion unter Weißlicht [93,146].

CT, MRT, Skelettszintigraphie

Bei fortgeschrittenen Tumoren der Harnblase sollten weitere Untersuchungen, wie CT, MRT und die Skelettszintigraphie zur Bestimmung der Tumorausbreitung angeschlossen werden. Hierdurch kann eine Beurteilung bezüglich hämatogener bzw. lymphogener Fernmetastasierung (Lunge, Leber, Knochen, ZNS) erfolgen [28,87].

Das MRT ist keine obligate Untersuchungsmethode bei der Fragestellung der lokalen Ausbreitung (T/N-Stadium). Es gibt jedoch Hinweise auf eine diesbezüglich höhere Sensitivität als bei der Computertomographie [104]. Die Invasion benachbarter Organe kann allerdings mit einer relativ hohen Sensitivität und Spezifität (80%) mit beiden Verfahren beurteilt werden [14].

Die Inzidenz von Knochenmetastasen beim Harnblasenkarzinom wird in der Literatur zwischen 2% und 12% je nach lokalem Tumorstadium angegeben [20,34]. Die Indikation zur Durchführung einer Knochenszintigraphie wird unterschiedlich diskutiert und von einzelnen Autoren nur im Falle von Knochenschmerzen oder einer Erhöhung der alkalischen Phosphatase gesehen [149].

1.1.7 Therapie

Das therapeutische Vorgehen orientiert sich an Leitlinien, die von der Deutschen Krebsgesellschaft und der Deutschen Gesellschaft für Urologie aufgestellt wurden [36]. Dabei wird zunächst zwischen einer Therapie oberflächlicher (Ta, T1, Tis) und einer Therapie invasiver Harnblasenkarzinome (\geq T2a) unterschieden.

1.1.7.1 Therapie des oberflächlichen Blasenkarzinoms (pTa, pT1, pTis)

Ein tumorfreies Überleben mit gleichzeitigem Bestehen einer funktionsfähigen Blase ist primäres Ziel bei der Behandlung oberflächlicher Harnblasenkarzinome. Mittels der beschriebenen transurethralen Resektion kann dieses Ziel erreicht werden.

Große (> 3 cm), multifokale und pT1-Tumoren werden innerhalb von 1 bis 4 Wochen nachreseziert, da hier in bis zu 80% der Fälle die Erstresektion unvollständig bleibt [61]. Die derzeit gültigen Leitlinien (Stand: Juli 2004) sehen bei einem Rezidiv eines G1-Tumors, sowie bei primären Tumoren des Grades G2 und höher und entsprechenden Rezidiven eine adjuvante Instillationstherapie vor. Zur intravesikalen Rezidivprophylaxe stehen Zytostatika (Doxorubicin, Mitomycin C) und der Immunmodulator BCG (Bacillus-Calmette-Guérin) zur Verfügung. Derzeit lautet die Empfehlung bei Tumoren mit niedrigem Progressionsrisiko alternativ eine Chemo- oder Immuntherapie durchzuführen, während bei Tumoren mit hohem Progressionsrisiko (G3, Rezidiv) eine Behandlung mit BCG empfohlen wird. Bei den besonders problematischen Tumoren der Kategorie T1/G3 ist aufgrund des hohen Progressionsrisikos nach einem Rezidiv die radikale Zystektomie anzustreben. Eine radikale Zystektomie ist ebenfalls bei Patienten mit rezidivierendem Carcinoma in situ anzustreben [21].

1.1.7.2 Therapie des muskelinvasiven Blasenkarzinoms (T 2-4 N 0 M 0)

Bei den invasiven Harnblasenkarzinomen ist, soweit es der Allgemeinzustand des Patienten zulässt, die radikale Zystektomie das Standardtherapieverfahren. In speziellen Fällen, wenn eine radikale Zystektomie abgelehnt wird, oder der Zustand des Patienten einen solchen Eingriff nicht zulässt, kann nach vorausgegangener transurethraler Resektion auch eine Strahlentherapie oder eine simultan durchgeführte Radio- und Chemotherapie erwogen werden.

Die radikale Zystektomie beginnt mit einer beidseitigen Entfernung der pelvinen Lymphknoten, da eine präoperative Beurteilung mittels bildgebender Verfahren nicht aussagekräftig ist. Beim Mann werden neben der Harnblase, auch Prostata und Samenblasen entfernt. Bei Frauen werden Harnblase, gegebenenfalls Harnröhre, sowie Uterus entfernt [36].

Die Art der Harnableitung sollte dem Tumorstadium, aber auch den persönlichen Wünschen des Patienten angeglichen werden. Die häufigste angewandte Form der inkontinenten Harnableitung ist das intestinale Conduit, wobei die Harnleiter in ein ausgeschaltetes Darmstück (meist Dünndarm) implantiert werden, und das aborale Ende als inkontinentes Stoma in die Bauchwand eingenäht wird [36].

Desweiteren kann man Darmsegmente zu Ersatzblasen (Pouch) umformen. Es ergibt sich eine kontinente Form der Harnableitung, die entweder über ein Stoma, z.B. im Nabelbereich, mit einem Katheter entleert werden kann, oder mit dem Harnblasenstumpf anastomosiert werden kann [36].

Zusätzlich zur Zystektomie steht die systemische Chemotherapie zur Verfügung. Bei der zytostatischen Therapie des Harnblasenkarzinoms unterscheidet man die neoadjuvante (präoperative), die adjuvante (postoperative) und die palliative Chemotherapie.

Klinische Studien zeigten einen signifikanten positiven Effekt auf die Überlebensrate von Patienten mit fortgeschrittenem und bereits metastasiertem Tumorleiden durch neoadjuvante Chemotherapie. Es werden kombinierte Chemotherapieschemata, wie z.B. Methotrexat-Vinblastin-Cisplatin (CMV), Methotrexat-Vinblastin-Cisplatin-Doxorubicin (M-VAC) oder Gemcitabine-Cisplatin verwendet.

Studien über adjuvante Chemotherapien konnten bis jetzt keine statistisch messbare Verbesserung in Bezug auf die Langzeitüberlebensrate zeigen, was aber u.a. mit niedrigen Fallzahlen in den Studien zusammenhängt. Eine gross angelegte randomisierte Langzeitstudie soll Aufschluss über einen eventuellen Benefit einer adjuvanten Chemotherapie geben [134,147].

Eine Radiotherapie wird nur für Patienten empfohlen, die nicht die Bedingungen für eine radikale Zystektomie erfüllen, bzw. diese ablehnen. Weder prä- noch postoperativ wird die Strahlentherapie momentan als Standardverfahrenverfahren eingesetzt.

Es besteht aber die Möglichkeit, in ausgewählten Fällen die Radiotherapie mit der Chemotherapie als sogenannte Radiochemotherapie zu kombinieren, welches Vorteile bringt, z.B. bei makroskopischen Tumorresten nach erfolgter TUR [36].

1.1.7.3 Therapie des metastasierenden Blasenkarzinoms

Patienten mit einem metastasierten Harnblasenkarzinom haben eine schlechte Langzeitüberlebensprognose. Sie ist abhängig vom Ausmass der Metastasierung und schwankt zwischen 30% und 0%. Bei diesen Patienten stellt die Chemotherapie das Verfahren der Wahl dar. Als wirksamste Einzelsubstanzen erreichen Cisplatin und Methotrexat Gesamtremissionsraten von 30% bzw. 26-29% mit kompletten Remissionen von je 5% und medianen Remissionsintervallen von 3-6 Monaten [188].

Zum Erreichen einer höheren chemotherapeutischen Effizienz ist es sinnvoll, zytostatische Substanzen mit hoher antitumoraler Aktivität miteinander zu kombinieren. In der Vergangenheit wurden am häufigsten Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin und Cisplatin als sogenanntes M-VAC-Schema verwandt. Es zeigte sich aber in einer randomisierten Vergleichsstudie der Schemen M-VAC und Gemcitabine / Cisplatin, dass das M-VAC-Schema bei gleicher Effektivität durch eine niedrigere subjektive Verträglichkeit und höhere Komplikationsraten gekennzeichnet war, so dass das Gemcitabine / Cisplatin Schema inzwischen an vielen Kliniken das Standardschema zur Therapie des metastasierten Urothelkarzinoms darstellt [134,147].

1.2 Die Endothelin-Achse

Die Endothelin-Achse, bestehend aus Endothelin-1, Endothelin-2, Endothelin-3 und den ET-Rezeptoren ET_AR und ET_BR (s.u.), ist eines der wichtigsten blutdruckregulierenden Systeme des Menschen. Sie spielt eine wichtige Rolle in der Kreislauf-Homöostase und bei der Entwicklung zahlreicher Erkrankungen [90,155]. Gerade in den letzten Jahren ist Endothelin als möglicher Wachstumsfaktor bei verschiedenen Tumorerkrankungen in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses gerückt.

1.2.1 Entdeckung des Endothelins (ET)

Im Rahmen von Forschungsbemühungen, die Rolle des Endothels als stoffwechselaktives Organ aufzuklären, fand man die ersten Hinweise auf die Existenz des Endothelins.

1988 gelang es Yanagisawa et al. das Peptid aus knapp zehn Litern Kulturüberstand von Endothelzellen aus Schweineaorta zu isolieren, zu sequenzieren und seine Vorstufe Präproendothelin zu klonieren [190]. Entsprechend seinem Ursprungsort gaben sie der Substanz den Namen Endothelin (ET). Die Entdeckung von zwei weiteren Isoformen des Endothelins, die von unterschiedlichen Genen kodiert werden, wurde ein Jahr später publiziert [69]. Die zuerst entdeckte Form heisst nun Endothelin-1 (ET-1), die weiteren Endothelin-2 (ET-2) und Endothelin-3 (ET-3) [103].

Inzwischen hat sich gezeigt, dass Endotheline in Säugetierorganismen weit verbreitet sind, sie wurden inzwischen sogar in mehreren wirbellosen Spezies, sowie Fischen gefunden [78].

1.2.2 Die Endothelinfamilie

Die Endotheline gehören zu einer neuen Familie von vasoaktiven Peptiden [69]. Sie weisen folgende Gemeinsamkeiten auf: Sie bestehen aus jeweils 21 Aminosäuren, besitzen einen C-terminalen Tryptophanrest, eine kurze Sequenz geladener Aminosäuren und vier Cysteinreste, die über Disulfidbrücken die Positionen 1 und 15 sowie 3 und 11 miteinander verbinden und damit zu einer charakteristischen Haarnadelform der Moleküle beitragen.

ET-1 hat eine relative Molmasse von 2492. Es ist identisch in Mensch, Schwein und Katze [71]. ET-2 weist nur zwei und ET-3 sechs unterschiedliche Aminosäuresequenzen im Vergleich zu ET-1 auf [51,103]. Die Abbildung 1.5 zeigt die Primärstruktur von ET-1, ET-2 und ET-3.

In Mäusen wurde ein weiteres verwandtes Peptid gefunden, das nur in einer Aminosäure von der Sequenz des ET-2 abweicht. Es wurde VIC (*vasoactive intestinal contractor*) genannt und scheint nur lokal im Gastrointestinaltrakt zu wirken [150].

Die Tertiärstruktur der Endotheline weist eine helixartige Konformation im zentralen Bereich der Region Lys⁹-Cys¹⁵ auf [43,154]. An der C-terminalen Domäne befinden sich Disulfidbrücken, die entscheidend für die Wirkung zu sein scheinen, da bei Veränderungen in diesem Bereich die biologische Aktivität stark abnimmt [82,142].

Kein anderes Peptid weist eine ähnliche Struktur wie Endothelin beim Säuger auf, es wurden aber grosse Ähnlichkeiten mit Neurotoxinen wie dem α -Skorpion-Toxin und dem Bienengift Apamin festgestellt, die ebenfalls mehrere Disulfidbrücken aufweisen [189]. Es bestehen weiterhin hohe Sequenz- und Bioaktivitätshomologien mit Giften der israelischen Natter *Atractaspis engaddensis*, den Sarafotoxinen [85], welche zu Herzinfarkt durch Koronarkonstriktion führen können [181] und damit möglicherweise schon zum Ableben Kleopatras (30 v. Chr.) beitrugen. Diese Gemeinsamkeit kann für eine evolutionäre Gemeinsamkeit der Peptide, für eine sogenannte „Superfamilie“ von Peptiden, sprechen. [102].

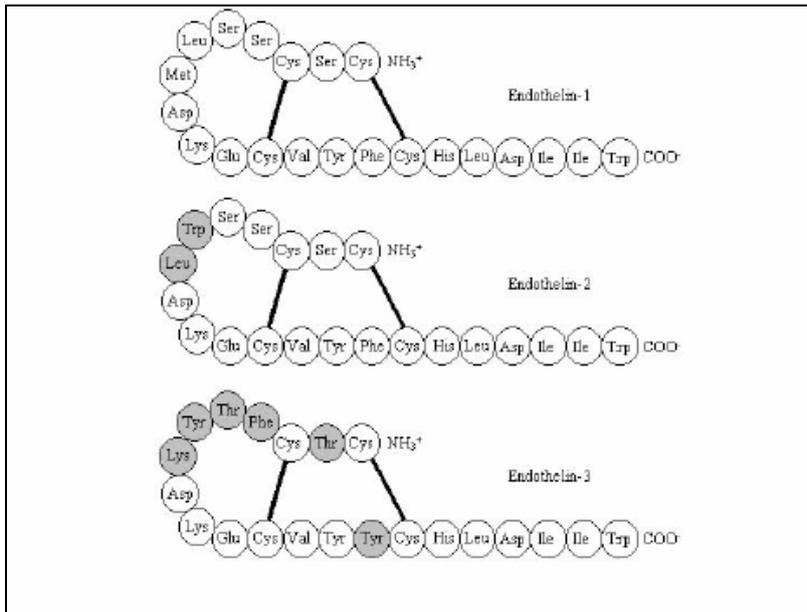


Abbildung 1.2: Primärstruktur von ET-1,ET-2 und ET-3;
 grau unterlegt sind die von ET-1 abweichenden Aminosäuren

1.2.3 Genetik, Regulation, Biosynthese und Elimination des ET

Alle 3 Vorläufer der ET-Isoformen werden durch drei separate Gene, die auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind, kodiert (Präproform) [69].

ET-1 wird von dem Präproendothelin-1 (PPET-1)-Gen auf Chromosom 6 kodiert. Das humane PPET-1-Gen beinhaltet fünf Exons und vier Introns und erstreckt sich über ca 6,8 kb DNA [22,69,70,171].

In den nicht transkribierten Genbereichen findet man regulatorische DNA-Sequenzen. So gibt es in der 5'-flankierenden Region des Gens Bindungsstellen für *nuclear factor 1*, welches über die Transformation von *growth factor-beta* die ET-1 Expression induzieren kann. In der 3'-Region findet man poly-AUUUA-mRNA kodierende Sequenzen. Diese regulieren die selektive Destabilisierung von PPET-1-mRNA und beeinflussen dadurch wahrscheinlich seine relativ kurze intrazelluläre Halbwertszeit von 15 min [70,109]. Dies könnte ein möglicher Regulationsmechanismus der ET-1-

Synthese auf Transkriptions- und Translationsebene sein. Weiterhin ist die Regulation der Präproendothelin-1-Genexpression durch hormonelle (z.B. Adrenalin) und mechanische Faktoren (z.B. mechanische Dehnung und „shear stress“) beeinflussbar [100].

Als wichtigster Inhibitor der ET-1-Synthese ist der physiologische Gegenspieler Stickstoffmonoxid (*NO*) anzusehen [25,52]. Im Gegensatz zu schwachem „shear stress“ führt starker „shear stress“ an den Gefäßwänden zur Freisetzung von *NO* und hemmt dadurch die ET-1-Expression [95,111]. Sowohl Nitropräparate (*NO*) als auch atriales natriuretisches Peptid (*ANP*) und Prostacyclin hemmen die ET-1-Synthese über die *second messenger* cGMP bzw. cAMP [53]. ET-1 induziert über den ET_B-Rezeptor die kalziumabhängige endotheliale *NO*-Synthese steigert damit die Synthese von *NO* und trägt so wahrscheinlich selbst lokal zur negativen Rückkopplung bei [178].

ET-1 entsteht aus einer 212-Aminosäure langen Vorstufe, dem Präproendothelin-1 (PPET-1), welches der Endothelin-Vorstufe beim Schwein sehr ähnlich ist [71]. Eine basenspezifische Endopeptidase spaltet das Präpro-ET-1 zu Proendothelin-1 (Pro-ET-1), auch Big-Endothelin-1 genannt. Dieses wird durch ein endothelin converting enzyme (ECE) zu reifem ET-1 aktiviert. Dieser Schritt ist unter anderem notwendig, weil ET-1 ca. 140fach stärker wirksam ist, als seine Vorstufe [81]. Yanagisawa et al. vermuten, dass ET-1 bei Bedarf de novo gebildet werden muss, da eine ET-1-Produktion in Zellkulturen frühestens 30 min nach Stimulation nachweisbar war [190]. ET-1 hat nach intravenöser Applikation eine Halbwertszeit von weniger als 5 min [179]. Der Abbau erfolgt über eine schnelle Internalisierung der ET-Rezeptorkomplexe sowie über eine Metabolisierung in Lunge und Niere [37].

1.2.4 Endothelinrezeptoren

Für die Peptide der Endothelin-Familie sind bisher drei Rezeptoren bekannt:

Der ET_A-Rezeptor (ET_AR), der ET_B-Rezeptor (ET_BR) und der ET_C-Rezeptor (ET_CR) [17]. Der Endothelin-Rezeptor ET_AR vermittelt Vasokonstriktion, während der Rezeptor ET_BR gefäß- und dosisabhängig Vasodilatation, Vasokonstriktion bzw. Entwicklungsvorgänge induziert. Der ET_C-Rezeptor wurde bisher nicht in Säugern, sondern lediglich in der Froschart *Xenopus laevis* nachgewiesen. Er hat eine besonders hohe Affinität zu ET-3 [77]. Die humanen Polypeptide sind einkettig und besitzen beide ein Molekulargewicht von ca. 50 kDa [5,151]. Die Affinität der ET-Isoformen zu den Rezeptoren ist unterschiedlich. Während ET-1 und ET-2 eine höhere Affinität zu ET_AR besitzen als ET-3, ist die Affinität für alle drei Isoformen zu ET_BR ähnlich. Die Endothelinrezeptoren sind G-Protein-gekoppelt (Gi/Gq) [139]. Sie gehören zur Gruppe der siebenfach-gefalteten Transmembran-Rezeptorproteine.

Die Rezeptoren besitzen einen Aminosäurerest (Asn59) für eine N-Glykosylierung, in der C-terminalen zytoplasmatischen Domäne sechs Cysteinreste, von denen einer palmitoyliert sein kann, unterschiedliche Serinreste, die mögliche Substrate für eine Serin/Threonin-Proteinkinase darstellen und eine Sequenz für G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Die Signaltransduktion erfolgt vorrangig mittels Gq/11 durch PLC/IP3/DAG, wodurch eine intrazelluläre Ca⁺⁺-Erhöhung stattfindet [140,165].

Die Endothelin-Rezeptoren sind vor allem im kontraktilem Apparat des vaskulären Systems, der Lunge, der Niere, der Plazenta und dem Nervensystem verbreitet. Gewebs- und gefäßspezifisch wurden starke Unterschiede in der Expression und Lokalisation der Endothelin-Rezeptoren ET-A und ET-B nachgewiesen [86].

1.2.5 Vorkommen und Wirkungen des Endothelins

ET-1, und ET-3 sind in Konzentrationen im picomolaren Bereich im Plasma vorhanden [16]. Diese Konzentration weist darauf hin, dass es sich bei Endothelin eher um einen para- bzw. autokrinen Mediator, als um ein endokrines Hormon handelt. Wagner et al. zeigten, dass ET-1 von Endothelzellen stärker abluminal an die umgebenden Muskelzellen, als in das Gefäßlumen sezerniert werden [175]. Mithilfe immunzytochemischer, immunchemischer und in-situ-Hybridisierungs-Techniken wurde die ursprüngliche Annahme, ET wäre nur im Endothel vorhanden, widerlegt. Die genannten Techniken wiesen ET und die entsprechende mRNA in einer Vielzahl von Geweben nach:

- ET-1 ist u.a. in Blutgefäßen, Herz, Lunge, Pankreas, Milz, Niere, ZNS und Harnblase, aber auch in Tumorzelllinien und Tumoren in vivo vorhanden.
- ET-2 kommt u.a. in Niere und Darm vor, aber nicht im menschlichen Plasma [163].
- ET-3 wird vor allem im Darm und ZNS exprimiert, aber nicht im Endothel oder in Herzmuskelzellen [66,103,110,157].

Neben der Vasokonstriktion hat Endothelin-1 noch weitere biologische Effekte, z.B. dosisabhängige Vasodilatation, Stimulation der Proliferation auf Muskelzellen und Fibroblasten, sowie positiv inotrope und chronotrope Effekte auf das Myokard. Außerdem ist Endothelin-1 an der Entstehung von Herz-Kreislaufkrankungen, z.B. Atherosklerose und Bluthochdruck beteiligt und spielt als Apoptose-Survival-Faktor in Endothelzellen eine wichtige Rolle, worauf im Kapitel 1.2.4.2 noch näher eingegangen wird [156].

In den folgenden Kapiteln werden hauptsächlich die Wirkungen des ET-1 beschrieben, weil dieses das bisher am intensivsten erforschte Peptid aus der Endothelin-Familie ist, und nach den bisherigen wissenschaftlichen Veröffentlichungen zufolge den grössten Stellenwert in der Tumorbilogie innehat.

1.2.5.1 Endothelin als Wachstumsfaktor

Zusätzlich zu seiner Wirkung als starker Vasokonstriktor, haben die Endotheline auch einen wichtigen Stellenwert als Faktoren zur Stimulation und Regulierung von Wachstum, Differenzierung und Entwicklung [15,138].

ET-1 stimuliert die DNA-Synthese und die Zellproliferation von verschiedenen Zellen, wie z.B. von glatten Muskelzellen, Osteoblasten, Mesangiumzellen, Fibroblasten und Melanozyten.

In ET-1-knockout-Mäusen zeigten sich kraniofaziale und kardiovaskuläre Missbildungen, die bei homozygoten Tieren nicht mit dem Leben vereinbar sind [97-99]. Auch eine Mitverursachung von kongenitalen Krankheitsbildern wie dem Pierre-Robin- oder Treacher-Collins-Syndrom wird postuliert [126].

Weiterhin wurde ein proliferativer Effekt von ET-1 auf eine Vielzahl verschiedenster Zelltypen in vitro nachgewiesen:

- Glatte Gefäßmuskelzellen: aus Ratten- und Kaninchenaorta, Schweine- und Rinderpulmonalarterie [16], Bronchien [131,180]
- Fibroblasten: Swiss 3t3- und Rat-1-Fibroblasten, Rattennierenfibroblasten, humane dermale- und Bruststromafibroblasten [16].
- Sonstige Zellen: Rattenmesangiumzellen, Rattenosteoblasten, astrozytische Rattenglia, Rindergehirn-Kapillarendothelzellen, humane Melanozyten, humane Keratinozyten [13]

Nicht nur bei ET-1, sondern auch für die anderen ET-Isoformen wurden Proliferationen beobachtet, wobei ET-2 ähnlich stark, ET-3 und das Präendothelin weniger stark proliferativ wirken.

Die Endothelin-Achse scheint auch eine Bedeutung für benigne und maligne Neoplasien zu haben. U.a. folgende neoplastische bzw. Karzinomzellen lassen sich durch ET-1 in ihrer Proliferation stimulieren:

- C₆-Gliomzellen und zerebelläre Astroglia [108,130]
- Bronchialkarzinom [2,49]
- Prostatazellkarzinom [121,123]
- Primäre und metastatische Melanomzellen [35,80]
- Ovarialzellkarzinom [112,170]
- Kolonkarzinom [38,39]
- Zervixkarzinom [7,173]
- Mammakarzinom [186]

Bagnato et al. konnten die spontane Tumorprogression in Ovarialzellkarzinomen mithilfe eines selektiven ET_AR-Antagonisten, auf die im Kapitel 1.2.6 gesondert eingegangen wird, aber nicht mit einem ET_BR-Antagonisten, hemmen. Somit konnte der ET-1-ET_AR-*pathway* als verantwortlicher Signalweg für die Tumorzellproliferation herausgefiltert werden [12].

Man geht davon aus, dass die mitogene Aktivität von ET-1 noch durch synergistische Abhängigkeiten mit anderen Wachstumsfaktoren, wie mit z.B. *EGF*, *bFGF*, *IGF*, *PDGF*, *TGF* und *IL-6*, verstärkt wird [15].

1.2.5.2 Endothelin und Apoptose

Wird die Apoptose von bestimmten Zelllinien gehemmt, kann dies zu verschiedenen Krankheitsbildern, wie z.B. zu Atherosklerose, benigner Prostatahyperplasie aber auch zu Tumorwachstum führen.

ET-1 kann nicht nur Zellwachstum induzieren, wie im vorherigen Kapitel „Endothelin als Wachstumsfaktor“ beschrieben, sondern auch die Apoptose bestimmter Zellreihen hemmen. Im Vordergrund steht dabei die Beobachtung einer ET_A-Rezeptor-vermittelten Abschwächung von Apoptose in Gefäßmuskelzellen und Fibroblasten und damit ET-1 als „*apoptosis survival factor*“ [45,156,169,182,183] .

Eberl et al. haben ET-1 und seine Wirkungsweise beim Kolonkarzinom untersucht und herausgefunden, dass ET-1 durch seine Wirkung am ET_A-Rezeptor, die durch Paclitaxel oder FAS-Liganden verursachte Apoptose hemmt [38,39]. Ebenso hemmt ET-1 die Paclitaxel-vermittelte Apoptose in Ovarialkarzinomzellen [170].

1.2.5.3 ET-1 und Osteogenese

Verschiedene Nachforschungen haben ergeben, dass ET-1 Knochenumbauvorgänge auslöst. Osteoblasten exprimieren eine hohe Anzahl von ET-1-Rezeptoren. Die Osteoblasten werden durch ET-1 einerseits zu einer höheren Produktion von kollagenen und nicht-kollagenen Proteinen stimuliert, wie z.B. den Osteoblasten-*messengern* Osteopontin und Osteocalcin [158], andererseits induziert ET-1 direkt das Osteoblastenwachstum. Weiterhin senkt ET-1 die Aktivität und Motilität von Osteoklasten [3]. Nach Zugabe von exogenem ET-1 haben Nelson et al. eine Erhöhung der alkalischen Phosphatase, einem Markerprotein für Knochenaufbau, festgestellt [122]. Zusammenfassend kann postuliert werden, dass ET-1 einen Knochenaufbau induzieren kann.

1.2.5.4 Endothelin und Angiogenese

In einigen Studien wurde festgestellt, dass die Endothelinachse einen Einfluss auf die Angiogenese hat. Das Wachstum von Endothelzellen scheint durch den ET_B-Rezeptor vermittelt zu werden, wohingegen die Mitogenese der Gefäßmuskelzellen und Perizyten vorzugsweise durch Stimulation an ET_AR gesteigert wird [19,153]. ET-1 spielt eine mehrfache Rolle in der Neovaskularisation, u.a. bei der Endothelzellproliferation, bei der Migration, Invasion von Zellen und bei der Protease-Produktion [153]. Die vermehrte Expression von ET-1 und seinem Rezeptor ist positiv mit der Dichte der Mikrogefäße, und der Expression von *vascular endothelial growth factor* (VEGF) in ovariellen Karzinomen korreliert [152]. Es wird vermutet, dass ET-1 und VEGF jeweils ergänzende und koordinierende Rollen, im Hinblick auf die Neovaskularisierung einnehmen. So wurde in Versuchen mit Ovarialtumorzelllinien unter zeit- und dosisabhängigem Einfluss von ET-1 eine vermehrte mRNA-Translation von VEGF gemessen. Vor allem unter Hypoxie-Bedingungen kam es hierbei zu einer erhöhten VEGF-Expression. Die Neovaskularisation wird dabei durch den ET_A-Rezeptor vermittelt, wie Studien mit einem ET_AR-Antagonisten, der diese gesteigerte Produktion von VEGF aufhob, zeigen konnten [152].

1.2.5.5 Die Signaltransduktion der Endothelin-Achse

Binden die Endotheline an die heptahelikalen Rezeptoren, kommt es G-Protein-vermittelt zu einer Aktivierung der *Phospholipase C* (PLC). Diese spaltet *Phosphatidylinositol* in *Inositoltriphosphat* (InsP₃) und *Diacylglycerol* (DG) [148]. Das zytosolische *Inositoltriphosphat* führt zu einem schnellen Kalziumanstieg durch Öffnung von intrazellulären Speichern [79]. Battistini et al. zeigten, dass Kalzium eine zentrale Rolle in der Regulierung der ET-1 abhängigen mitogenen Effekte hat [15]. Durch das membrangebundene *Diacylglycerol* wird die *Proteinkinase C* (PKC) aktiviert [56], die den kontraktilem Apparat für Kalzium sensibilisiert und zu einem Anstieg des intrazellulären pH-Wertes führt [159]. Andererseits fördert sie die verstärkte Transkription wachstumsfördernder Gene (*c-FOS*, *c-MYC*, *c-JUN*) [8]. Die mitogene Wirkung von ET-1 wird ausserdem der Phosphorylierung von Tyrosinresten durch eine *Proteintyrosinkinase* (PTK), sowie der Aktivierung einer *mitogenaktivierten Proteinkinase* (MAPK) zugeschrieben [12,170].

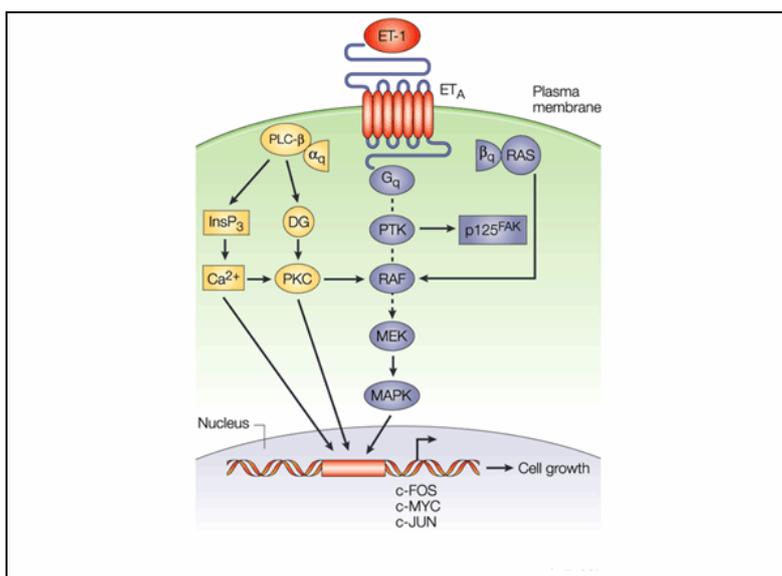


Abbildung 1.3: Die Endothelin-induzierte Signaltransduktion aus: Nelson et al.: „The endothelin axis: emerging role in cancer“ 2004 [118]

1.2.6 Endothelinrezeptorantagonisten

Die Synthese und Freisetzung sowie diverse Wirkungen der Endotheline können durch Substanzen, wie NO, ANP, Prostacyclin, Kaziumkanalblocker und auch Substanz P gehemmt werden. Diese Effekte beruhen auf unterschiedlichen, teils unbekanntem Übertragungswegen, die entweder schon die Bildung und Freisetzung, oder erst auf einer späteren Stufe in die Signaltransduktionskaskade des Endothelin eingreifen.

Die ersten ET-Rezeptorantagonisten waren Peptide. 1991 wurde *IRL 1038* als erster ET_B-selektiver Antagonist entwickelt [168]. Versuche einen ET_A-Rezeptorantagonisten zu finden, führten zur Isolierung von *BQ 123* aus dem Fermentationsprodukt des *Streptomyces misakiensis* [68]. Da peptidische Antagonisten ausschliesslich parenteral verabreicht werden können, wurde eine neue Familie von nicht-peptidischen Antagonisten entwickelt, zu denen auch der kombinierte ET_{A/B}-Rezeptorantagonist *Ro 47-0203* oder *Bosentan* gehört [31]. Von diesem stammen die ersten klinischen Erfahrungen bei Herzinsuffizienz [83].

In verschiedenen Tumoren, wie z.B. dem Prostatakarzinom, wurde entdeckt, dass es eine vermehrte Expression von ET-1 und dem ET_A-Rezeptor gibt.

In der gesunden Prostata wird ET-1 von Epithelzellen gebildet und erscheint in hoher Konzentration in der Samenflüssigkeit. Im Rahmen des Prostatakarzinoms ist der Abbau von ET-1 reduziert, weil wichtige Clearance-Mechanismen (ET_B-Rezeptor und Endopeptidasen) vermindert sind. Mit fortschreitender Erkrankung kommt es zu einer vermehrten Expression des ET_A-Rezeptors, sodass insgesamt eine erhöhte Aktivität von ET-1 am Zielorgan resultiert [50].

Der ET-1/ET_AR-*Pathway* kann über unterschiedliche Angriffspunkte das Wachstum der Tumorzellen aktivieren. Auf Prostatakarzinomzellen wirkt ET-1 (in vitro) als Mitogen und entfaltet in Kombination mit anderen Wachstumsfaktoren synergistische Effekte. Zudem führt ET-1 zu einer Aktivierung von Osteoblasten und begünstigt somit wahrscheinlich die Entstehung von Knochenmetastasen (siehe auch Kap.1.2.5.3 „ET und Osteogenese“). Angesichts der Bedeutung von ET-1 in der Pathophysiologie des Prostatakarzinoms könnten selektive ET_A-Rezeptorblocker von therapeutischem Wert sein. Im Rahmen einer randomisierten Phase-II-Studie wurde die Wirksamkeit von

Atrasentan, einem selektiven ET_A-Rezeptorantagonisten untersucht. Wie die Ergebnisse dieser Studie nahe legen, verzögert eine Therapie mit Atrasentan bei Patienten mit hormonrefraktärem Prostatakarzinom die Zeit bis zur klinischen Progression und die Zeit bis zu einem erneuten Anstieg des prostataspezifischen Antigens (PSA). Und das bei einem günstigen Nebenwirkungsprofil, das dem eines blutdrucksenkenden Mittels entspricht [29,30,117,119,120,124,167].

Im Tierexperiment konnte die Metastasenhäufigkeit auch bei Mammazellkarzinomzelllinien, nach Gabe eines selektiven ET_A-Rezeptorantagonisten verringert werden [26,115,125,191].

1.3 Fragestellung der vorliegenden Studie

Mithilfe immunohistochemischer Untersuchungen an Blasenkarzinompräparaten sollten die folgenden Fragestellungen untersucht werden:

- besteht ein quantitativer Unterschied hinsichtlich der Expression des Endothelin-1 und seiner Rezeptoren, ET_AR und ET_BR, in tumorösem Harnblasengewebe im Vergleich mit nicht entartetem Harnblasengewebe?
- Besteht weiterhin ein Unterschied bezüglich der Expression der ET-Achse in den verschiedenen Tumorarten der Harnblase: Urothelkarzinom vs. Plattenepithelkarzinom vs. Adenokarzinom?
- kann ein tumorbiologischer Zusammenhang zwischen der Expression von Endothelin-1 und seinen Rezeptoren im Tumorgewebe verifiziert werden?
- Besteht eine Korrelation zwischen der Expression der ET-Achse und pathologischen Parametern?
- hat die ET-Achse Einfluss auf die Progression des Harnblasenkarzinoms?
- Besteht beim Harnblasenkarzinom ein Zusammenhang zwischen der Expression der ET-Achse und Angiogenese?
- Hat die ET-Achse einen Einfluss auf das Überleben der Patienten?
- Kann die Expression der ET-Achse als prognostischer Parameter für das invasive Harnblasenkarzinom herangezogen werden?

2 MATERIALIEN UND METHODIK

2.1 Untersuchungsgut und Arbeitsablauf

Von allen Patienten, die sich zwischen 1989 und 1995 einer radikalen Zystektomie oder einer transurethralen Blasenresektion an der urologischen Klinik der WWU Münster unterzogen hatten, wurden die entsprechenden Akten mit den Operationsdaten und den histologischen Daten durchgesehen. Von diesem Kollektiv ausgehend wurden ausschliesslich zystektomierte Patienten ohne neoadjuvante Chemotherapie ausgewählt. Es wurden schliesslich 157 Patienten (110 Männer, 47 Frauen; Durchschnittsalter 63.2 Jahre [33-81]) selektiert. Die Dokumentation dieser Patienten umfasste die Erfassung der Patientendaten, insbesondere der Journal-Nummern des Gerhard-Domagk-Institutes für Pathologie, unter denen die jeweiligen Präparate archiviert sind, TNM-Stadium und histologisches Grading. Die klinischen Verlaufsdaten, inklusive Informationen zum Follow-up und zum Gesamt- bzw. krankheitsfreien Überleben wurden ebenfalls erhoben.

Im nächsten Schritt wurden pro Patient alle archivierten histologischen Schnitte des Operationspräparates erneut mikroskopisch evaluiert, und jeweils ein repräsentativer histologischer Schnitt mit ausreichend Tumorgewebe ausgewählt.

Daraufhin wurden die zugehörigen Paraffinblöcke aus dem pathologischen Archiv herausgesucht.

Mit einem Myotom wurden die Tumorblöcke geschnitten (3 μ m), das Gewebe auf Objektträger aufgetragen, entparaffiniert, immunhistochemisch gefärbt und mit dem Mikroskop semiquantitativ ausgewertet.

Die immunhistochemischen Befunde wurden mit den erhobenen pathohistologischen und klinischen Parametern korreliert und statistisch ausgewertet.

2.2 Immunhistochemische Färbung – Grundlagen

2.2.1 Die Immunreaktion

Die Immunhistochemie macht sich Immunreaktionen, Reaktionen zwischen Antigenen und Antikörpern, zunutze. Antigene besitzen zwei für die Immunhistochemie wichtige Eigenschaften: Sie können die Bildung von Antikörpern induzieren, weil sie einen Fremdstoff für den Wirtsorganismus darstellen, gleichzeitig haben sie auch eine spezifische Reaktivität, d.h. sie können mit genau diesen Antikörpern reagieren.

2.2.2 Antikörper

Antikörper gehören zu einer Gruppe von Proteinen, die man Immunglobuline (Ig) nennt. Nach abnehmender Quantität im Serum oder Plasma aufgelistet, umfassen die Immunglobuline 5 Hauptklassen: Immunglobulin G (IgG), IgA, IgM, IgD sowie IgE. Die in der Immunhistochemie verwandten Antikörper sind vorwiegend der IgG-Fraktion zuzuordnen.

2.2.2.1 Monoklonale Antikörper

Monoklonale Antikörper werden von Plasmazellklonen gebildet. Antikörper eines bestimmten Klons sind immunchemisch identisch und reagieren nur mit einem spezifischen Epitop des Antigens, gegen das sie gerichtet sind. Bei monoklonalen Antikörpern handelt es sich meistens um IgG-Antikörper. Bei der Herstellung monoklonaler Antikörper erfolgt zunächst die Immunisierung eines Tieres, d.h. dem Tier wird das Antigen, gegen das es die Antikörper bilden soll, injiziert. Ist der Antikörpertiter des Tieres hoch genug, erfolgt eine Splenektomie oder eine Entfernung der Lymphknoten, da hier die Plasmazellproduktion am höchsten ist. Um die Antikörper länger zu erhalten, werden die Lymphozyten mit Myelomzellen *in vitro* fusioniert. Die Fusionsprodukte nennt man dann Hybridomzellen oder auch Hybride. Eine klonale Vermehrung der Zellen erfolgt im Kulturmedium oder in der Peritonealhöhle syngenetischer Mäuse.

2.2.2.2 Polyklonale Antikörper

Polyklonale Antikörper werden von verschiedenen B-Lymphozyten gebildet und sind als Konsequenz davon immunchemisch unterschiedlich, sie reagieren daher auch mit verschiedenen Epitopen des Antigens, gegen das sie gebildet wurden. Am häufigsten werden Kaninchen zur Produktion polyklonaler Antikörper benutzt. Zur Herstellung erfolgt zunächst die Immunisierung. Meist erfolgt die Injektion subkutan, bei Schafen, z.B. auch intradermal oder intramuskulär. Dieser Vorgang wird in bestimmten Abständen wiederholt („boostern“), um somit einen höheren Antikörpertiter zu erlangen. Ist der Antikörpertiter hoch genug, entnimmt man dann den immunisierten Tieren Blut. Man lässt das Blut anschliessend gerinnen, so dass sich das Immuneserum von den festen Bestandteilen absetzt. Alle anderen überflüssigen Proteine werden mittels Chromatographie getrennt. Die endgültigen Antikörperseren entstehen nach einer Affinitätschromatographie, die antigenspezifische Antikörper insbesondere von Antikörpern, welche eine Kreuzreaktion erzeugen könnten, trennt.

2.2.3 Immunhistologische Färbemethoden

2.2.3.1 Direkte Methode

Der spezifische Antikörper ist direkt mit einem Fluorochrom oder einem Markerenzym, z.B. alkalische Phosphatase oder Peroxidase, konjugiert (siehe Abb. 2.1). Dieser reagiert dann mit dem Gewebsantigen und kann mit der folgenden Chromogensubstitution sichtbar gemacht werden. Der Vorteil dieser Methode ist, dass sie schnell durchführbar ist. Der Nachteil besteht darin, dass nur ein markierter Antikörper beteiligt ist, und es damit zu keiner Signalverstärkung kommen kann, ausserdem muss für jedes nachzuweisende Antigen ein spezifisches Konjugat zur Verfügung stehen.

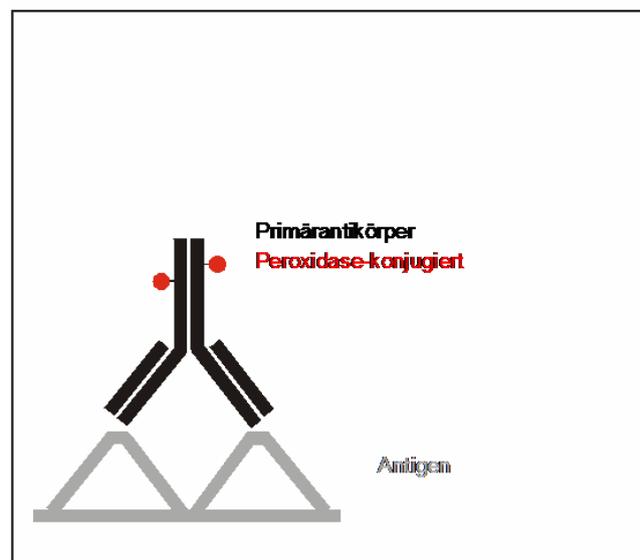


Abbildung 2.1: Direkte Methode bei immunhistochemischen Färbungen (modifiziert nach: DakoCytomation, Detektionssysteme 2004)

2.2.3.2 Indirekte Methode

Bei dieser Methode bindet ebenfalls ein spezifischer, aber unkonjugierter Primärantikörper an das Antigen der Probe. Im nächsten Schritt gibt man einen sogenannten Sekundärantikörper zu dem bereits gebundenen Primärantikörper. Der Sekundärantikörper ist spezifisch gegen die Tierspezies des Primärantikörpers gerichtet und ist mit einem Markerenzym oder Flouorchrom konjugiert (siehe Abb. 2.2)

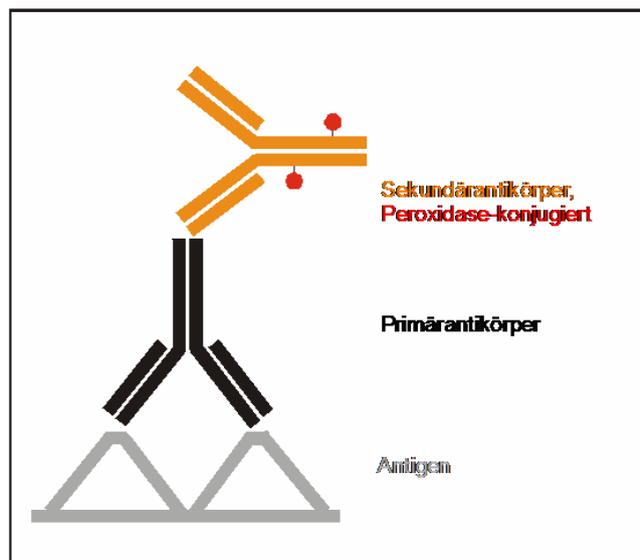


Abbildung 2.2: Indirekte Methode bei immunhistochemischen Färbungen
(modifiziert nach: DakoCytomation, Detektionssysteme 2004)

2.2.3.3 ABC-Methode

Die ABC-Methode (Avidin-Biotin-Komplex) macht sich die Affinität von Avidin zu Biotin zunutze. In unserem Versuch sind wir auf das neuere Produkt Streptavidin, ausgewichen, weil es bei diesem zu weniger unspezifischen Reaktionen, als beim Avidin, kommt. Streptavidin wird aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* isoliert.

Bei der ABC-Methode verwendet man Brückenantikörper, die mit Biotin konjugiert (biotinyliert) werden. Biotin ist ein wasserlösliches Vitamin, welches sich gut mit Antikörpern koppeln lässt. Es wird mit Multi-Link-Antikörpern gearbeitet. D.h. es liegt eine Lösung mit Brückenantikörper, aus verschiedenen Spezies (z.B. Maus, Kaninchen, usw.) vor.

An den biotinylierten Brückenantikörper bindet der ABC- Komplex. Der Komplex wird so produziert, dass an drei von vier möglichen Bindungsstellen des Avidins ein Molekül Biotin gebunden wird. An den Komplex ist ein Enzym gebunden (siehe Abb. 2.3).

Man kann wählen zwischen alkalischer Phosphatase oder, wie in unserem Versuch, Peroxidase.

Der immunologische Nachweis dieser Methode ist sehr sensitiv. Man muss aber darauf achten, endogenes Biotin, welches im Gewebe vorhanden ist, zu blockieren, da es sonst zu unspezifischen Bindungen und Hintergrundreaktionen kommt.

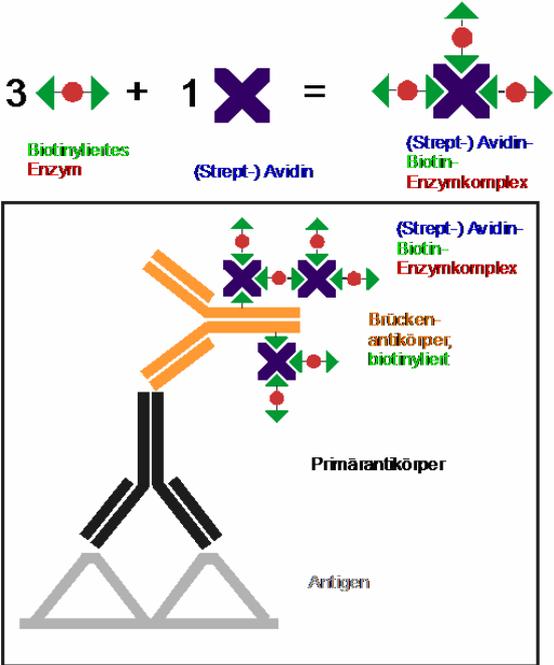


Abbildung 2.3: Streptavidin-Biotin-Komplex Methode bei immunhistochemischen Färbungen (modifiziert nach: DakoCytomation, Detektionssysteme 2004)

2.2.3.4 LSAB-Methode

Bei der Labeld-Streptavidin-Biotin Methode ist ein Enzym (hier: Peroxidase) mit Streptavidin gebunden (labeled). Das bedeutet, dass alle vier Bindungsstellen des Streptavidins für das am Brückenantikörper vorhandene Biotin frei sind (siehe Abb. 2.4).

Vorteil gegenüber der ABC-Methode ist, dass die Reaktionskomplexe kleiner sind, und es somit nicht so schnell zu sterischen Behinderungen kommt. Der Einsatz von LSAB-Systemen ist derzeit einer der spezifischsten und durch seine einfache Handhabung bevorzugten Methoden. Wir nutzten diese Methode bei dem immunhistochemischen Färbeporgang des monoklonalen ET-1-Antikörpers (s.u.)

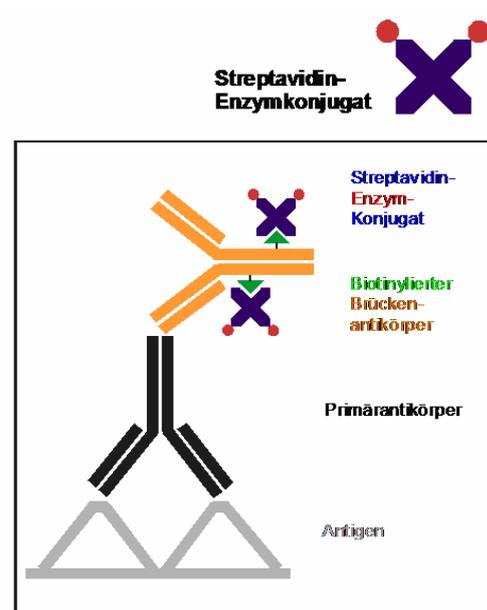


Abbildung 2.4: Labeld-Streptavidin-Biotin Methode bei immunhistochemischen Färbungen
(modifiziert nach: DakoCytomation, Detektionssysteme 2004)

2.2.3.5 Envision™-Methode

Bei dieser Methode handelt es sich um ein Biotin-freies Detektionssystem. Es besteht aus einem Dextran-Polymer, an das Antikörper und Enzyme gebunden sind. Die Antikörper können gegen Maus-, Ratte- und Kaninchen-Primärantikörper gerichtet sein. Peroxidase oder alkalische Phosphatase stellen die Enzyme dar. Der Vorteil ist die hohe Spezifität, und der nicht vorhandene störende Einfluss von endogenem Biotin (siehe Abb. 2.5).

Diese Methode wurde für die Detektion der polyklonalen Antikörper der ET_AR und ET_BR-Versuchsreihe benutzt (s.u.)

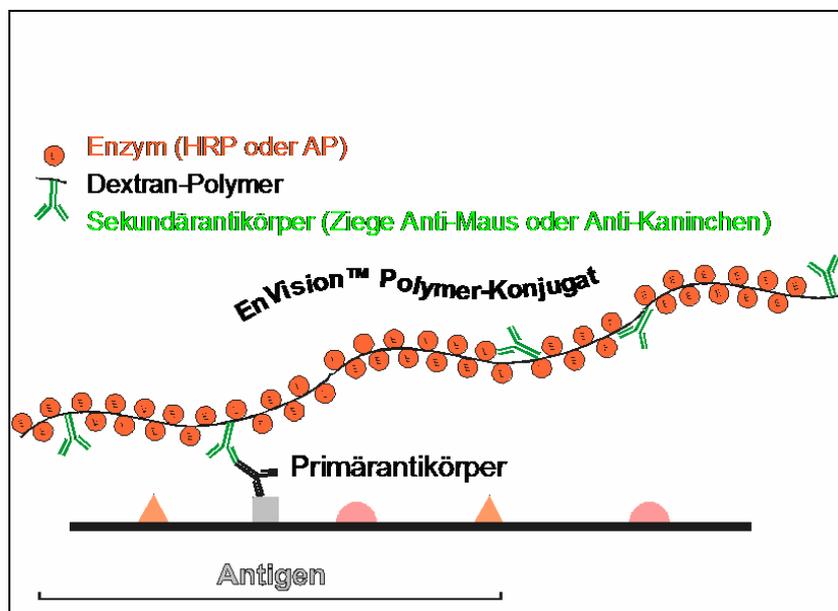


Abbildung 2.5: Label-StreptAvidin Färbemethode mit Envision™-System (modifiziert nach: DakoCytomation, Detektionssysteme 2004)

2.3 Material, Seren, Adjuvantien, Puffer, Primärantikörper, Brückenantikörper

2.3.1 Gewebeschnitte, Kontrollschnitte

Selektierte, in Paraffin eingebettete Tumorblöcke, welche Tumormaterial enthielten, wurden mit dem Mikrotom (Rotationsmikrotom HM 355 S, Firma Microm, Walldorf, Deutschland) in 3µm Dicke geschnitten und auf Poly-L-Lysin beschichtete Superfrost Plus-Objektträger gegeben. Die erste Stunde wurden die Schnitte bei 56°C, dann über Nacht bei 37°C im Brutschrank (Firma Memmert, Schwabach, Deutschland) getrocknet.

In allen Färbeserien wurde eine positive Kontrolle mitgefärbt, von der vorher ein positiver Ausfall der Farbreaktion sicher bekannt war. Diese positiven Kontrollen erlauben im Falle des Nichtgelingens der Reaktion Rückschlüsse auf etwaige Fehlerquellen.

Bei der Positivkontrolle der ET-1-Färbereihe handelte es sich um humane Blasenkarzinompräparate. Es handelte sich bei der positiven Kontrolle für die ET_AR-Färbereihe, um histologische Schnitte von Prostatakarzinomgewebe, das sicher ET_AR (s.u.) exprimierte.

Für die ET_BR-Färbereihe wurde glattes Muskelgewebe mit bekannter ET_BR -Expression gewählt.

2.3.2 Xylol, Alkohol

Vor der Inkubierung mit den verschiedenen Antikörpern mussten die Gewebeschnitte entparaffiniert und anschliessend rehydriert werden. Die Entparaffinierung wurde so gewählt, dass die Präparate 10 min in einem 99%igen Xylolbad (Entparaffinierung) verblieben, um das Paraffin vollständig aus dem Gewebe herauszulösen. Daraufhin wurden die Schnitte für jeweils mehrere Sekunden in 5 verschiedenen Alkoholbädern rehydriert. Diese lagen in einer absteigenden Konzentration von 99–70 Vol% vor. Zum Schluss wurden sie in einem Wasserbad belassen.

2.3.3 Citrat-Puffer

Der Citratpuffer wurde aus zwei Stammlösungen zusammengestellt.

- Stammlösung A: 0,1 M Citronensäure
10,5 g $C_6H_8O_7 \cdot xH_2O$ (Zitronensäuremonohydrat) auf 500 ml Aqua
dest. auffüllen
- Stammlösung B: 0,1 M Natriumcitrat
29,41 g $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ (Natriumcitrat-Dihydrat) auf 1000 ml
Aqua dest. auffüllen
- Gebrauchslösung: 18 ml Lösung A + 82 ml Lösung B mischen
Diese Lösung mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen = 10 mM
Citratpuffer
Mit 1 M Natronlauge auffüllen, bis der pH von 6,0 erreicht ist.

2.3.4 Hitzeinduzierte Demaskierung

Neben verschiedenen enzymatischen Vorbehandlungen der Schnittpräparate, die zum Nachweis bestimmter Antigene notwendig sind, ist es zur Darstellung anderer Antigene unumgänglich, eine hitzeinduzierte Antigendemaskierung vorzunehmen. Durch diese Art der Antigendemaskierung können Antikörper auch solche Epitope erkennen, welche zuvor, z.B. durch Aldehydvernetzungen, maskiert waren.

Die durch Formalinfixierung verursachte Proteinvernetzung wird durch Erhitzen der Schnitte in einer kalziumpräzipitierenden Lösung (Citrat-Puffer pH 6,0) wieder aufgehoben. So kann der Antikörper sein spezifisches Epitop wieder erkennen.

2.3.4.1 Steamer

Als Alternative zur Behandlung mit Mikrowelle, Schnellkochtopf oder Autoklav kann auch ein Wasserbad zur Antigendemaskierung eingesetzt werden.

Wie bei allen hitzebedingten Demarkierungen sollten die Objektträger mit Adhäsiven (z.B. Poly-L-Lysin) beschichtet sein, um ein Ablösen der Schnitte, zu vermeiden.

Man erhitzt den Steamer (Multi-Gourmet-Steamer, BRAUN, Typ 3216) und gibt nach 5 min Aufwärmzeit eine Küvette, gefüllt mit Citrat-Puffer (pH 6.0) und Objektträgern, mit einem Deckel verschlossen, hinzu.

Der Deckel ist insofern wichtig, weil es sonst zu einer Verdampfung des Puffers kommen kann, und vermieden werden muss, dass das am Deckel des Steamers entstandene Kondenswasser in die Pufferküvette tropft, beides würde zu Pufferkonzentrations- und pH-Wert-Änderungen führen.

Die Schnitte der ET-1 Versuchsreihe wurden für 30 Minuten im Steamer belassen.

2.3.5 DAKO-Autostainer

Ein vollautomatisches, immunhistochemisches Färbegerät der Firma DAKO (DAKO-Autostainer; DAKO Diagnostics, Hamburg) wurde für alle weiteren Inkubationsschritte benutzt.

2.3.6 Waschpuffer

Es wurde ein Tris-Puffer mit einem pH-Wert von 7,6 (+/-0,1), der Firma DAKO (DAKO Wash Buffer 10x For Automated and Manual IHC Use, code no. S 3006) benutzt, der Tween 20 enthält, ein Stoff der die Oberflächenspannung herabsetzt und molekulare, oberflächliche Verbindungen löst. Der konzentrierte Puffer wurde mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:10 verdünnt.

Zwischen jedem Inkubationsvorgang wurden die Schnitte mit diesem Puffer gespült.

2.3.7 Peroxidase-Block

Das Enzym Peroxidase für die Konjugation eines Komplexes wird aus der Wurzel des Meerrettichs gewonnen.

Peroxidase bildet mit dem Substratpuffer, H_2O_2 als Katalysator und dem Chromogen ein farbiges Endprodukt. Da Peroxidase auch endogen im Gewebe vorkommen kann, wurde bei unseren Präparaten als Peroxidaseblock, Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (DAKO ChemMate™ Peroxidase-Blocking-Solution, code no. S2023) zur Eliminierung eventuell vorhandener Peroxidase für 10 min hinzugegeben.

2.3.8 Antikörper-Verdünnung

Für die Verdünnung der Primärantikörper wurde Antikörper-Verdünnungs-Lösung der Firma DAKO (DAKO ChemMate™ Antibody Diluent, code-no. S 2022) benutzt.

2.3.9 Primärantikörper ET-1

Der monoklonale Maus-Antikörper Anti-Endothelin-1 (Anti-Endothelin-1 MAb, Clone TR.ET.48.5, Affinity Bioreagents, Golden, GO, USA), auch bezeichnet als ET-1, ist immunhistologisch gegen ein Epitop des Endothelins gerichtet, dass in 3 Isoformen (ET-1, ET-2, ET-3) vorkommt, und in den endothelialen Epithelzellen produziert wird. Dieser monoklonale Antikörper bindet spezifisch an ein Epitop von ET-1, das durch die Aminosäuren 8-16 codiert wird, und zeigt sehr geringe Kreuzreaktivität zu anderen Epitopen.

Er eignet sich besonders zur Anwendung an fixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe.

Dieser Antikörper wurde in einer Konzentration von 1:500 für 25 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

2.3.10 Sekundärantikörper für ET-1

2.3.10.1 Goat Anti-Mouse (link HRP)

Es wurde das biotylinierte Goat Anti-Mouse Immunglobulin G (IgG) der Firma DAKO (DAKO ChemMate™ Detection Kit, Rabbit/Mouse, code no. K 5001) als Sekundärantikörper für ET-1 benutzt. Für die Gewinnung dieses Immunglobulins wurden als Antigene Maus-Myelom Ig-Proteine aus verschiedenen Zellreihen isoliert. Der Antikörper gegen dieses Maus-IgG wurde aus Ziegen-Antiserum gewonnen und wird im LSAB-Verfahren als sogenannter Sekundärantikörper benutzt. Der Sekundärantikörper ist gekoppelt mit einem Biotin-Molekül. Somit kann jeder

Sekundärantikörper direkt mit mehreren Streptavidin-Molekülen, konjugiert mit Peroxidase, Verbindungen eingehen, dies erhöht die Sensitivität des Nachweisverfahrens.

Dieser Antikörper wurde für 20 Minuten bei Raumtemperatur hinzugegeben.

2.3.11 Streptavidin Peroxidase (HRP)

Streptavidin konjugiert mit Meerrettichperoxidase (HRP) wurde von der Firma DAKO (DAKO ChemMateTM Detection Kit, Streptavidin Peroxidase (HRP), code no. K 5001) bezogen. Streptavidin wird aus *Streptomyces avidinii* isoliert und in einer Zwei-Stufen Glutaraldehyd-Methode mit hochgereinigter Meerrettichperoxidase (HRP= Horseradisch Peroxidase) verbunden. Die ET-1-Schnitte wurden 20 Minuten mit diesem Enzymkomplex behandelt.

2.3.12 Primärantikörper ET_AR und ET_BR

Die zwei polyklonalen Antikörper gegen den ET_A-Rezeptor und den ET_B-Rezeptor (ET_A-Rezeptor Antiserum, Produkt Nr. 210-507-C250; ET_B-Rezeptor Antiserum, Produkt Nr. 210-506-C250, Affinity Bioreagents, Golden, CO, USA), auch bezeichnet als ET_AR und ET_BR, wurden aus Schafserum gewonnen. Als Antigen bei ET_AR wurde das endständige C-Peptid des Endothelin-A-Rezeptors bei der Ratte verwendet. Die 13-Aminosäure des endständigen C-Atoms des Endothelin-B-Rezeptors der Ratte, wurde als Immunisierungs-Antigen für ET_BR benutzt.

Diese Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:200 verwandt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

2.3.13 Brückenantikörper für ET_AR und ET_BR

2.3.13.1 Rabbit-Anti-Goat

Als Sekundärantikörper für ET_AR und ET_BR wurde das biotylinierte Rabbit-Anti-Goat Immunglobulin G (code No. E 0466) der Firma DAKO benutzt. Dieser Antikörper wurde aus Ziegenserum isoliert. Aufgrund der starken Kreuzreaktivität zwischen Schaf- und Ziegenimmunglobulinen von über 80%, konnten wir diesen Antikörper als Sekundärantikörper nutzen. Die Inkubationszeit betrug 25 Minuten bei Raumtemperatur.

2.3.13.2 Envision HRP

Die gewählte EnVision™-Detektions-Lösung der Firma DAKO (code no. K 5007) enthält ein Dextranpolymer, gekoppelt mit HRP und Ziegenantikörper, gegen Maus- und Kaninchenantigene gerichtet (siehe Abb 2.5).

Die Schnitte der ET_AR und ET_BR-Reihe wurden für 25 Minuten bei Raumtemperatur mit der EnVSION™-Detektions-Lösung inkubiert.

2.3.14 Chromogen-Substrat-System

Chromogene können mit Hilfe des Substratpuffers und dem Katalysator H_2O_2 einen Farbkomplex mit Peroxidase bilden, und somit den immunhistochemischen Komplex sichtbar machen.

2.3.14.1 HRP Substrat Puffer

Dieser Puffer (DAKO ChemMate™ Detection Kit, HRP Substrate Buffer, code no. K 5001) enthält H_2O_2 , als Katalysator für die Reaktion zwischen DAB und Peroxidase, und wurde gleichzeitig zur Verdünnung von DAB angewendet.

2.3.14.2 DAB

3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) von der Firma DAKO (DAKO ChemMate™ Detection Kit, DAB+, code no. K 5001), wurde als Chromogen-Substrat benutzt. DAB ergibt ein braunes Farbprodukt (siehe Abb 2.6).

Es hat den Vorteil, dass es in organischen Lösungsmitteln unlöslich ist.

Vor Benutzung verdünnten wir das DAB Chromogen mit dem HRP-Substrat Puffer im Verhältnis 1:500 und inkubierten alle Schnitte zweimal für jeweils 5 Minuten.

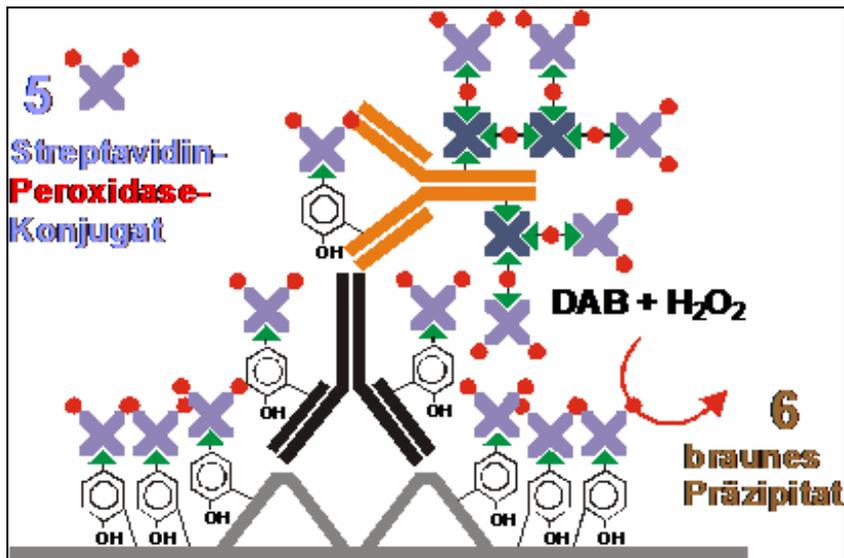


Abbildung 2.6: katalysierte Detektionsmethode mit Chromogen

2.3.15 Hämatoxylin

Zuletzt wurden die Schnitte zur histologischen Beurteilung mit Hämatoxylin (DAKO ChemMate™ Hämatoxylin, code no. S 2020) gefärbt. Dabei werden die basophilen Gewebsstrukturen (z.B. Chromatin der Zellkerne) durch das Hämatoxylin blau dargestellt. Dieser Schritt ist notwendig, weil dadurch der gesamte Schnitt erst mikroskopisch erkennbar wird.

2.3.16 Kaiser's Glycerin-Gelantine

Nach Beendigung der verschiedenen Färbeschritte wurden die Gewebeschnitte mithilfe von „Kaiser's Glycerin-Gelantine“ eingedeckt, d.h. sie wurden hiermit beschichtet und danach mit einem Deckglas versehen, das durch die Wirkung der Gelantine fest auf dem Schnitt verbleibt. Das Ausbleichen der Farben wird hiermit für längere Zeit verhindert.

2.4 Immunhistochemische Färbung – Arbeitsablauf in der Übersicht

- Schneiden und Aufziehen der Gewebeschnitte auf Lysin-beschichtete Superfrost Plus-Objektträger
- Entparaffinieren und Rehydrieren der Präparate in Xylol bzw. Alkohol

Nur ET1-Versuchsreihe:

- Vorbehandlung mit Steamer für 30 min
- Peroxidase-Block H_2O_2 für 10 min
- Spülen mit Tris Puffer
- Inkubation mit ET1-Antikörper (Verdünnung 1:500) für 25 min
- Spülen mit Tris Puffer
- Inkubation mit biotinyliertem Sekundäantikörper Link HRP Goat-Anti-Mouse für 20 min
- Spülen mit Tris Puffer
- Hinzufügen von Streptavidin konjugiert mit Peroxidase (HRP) für 20 min
- Spülen mit Tris Puffer

Nur ET_AR - und ET_BR -Versuchsreihe:

- Inkubation mit ET_AR - bzw. ET_BR -Antikörpern (Verdünnung 1:200) für 30 min
- Spülen mit Tris Puffer
- Inkubation mit Sekundäantikörper Rabbit-Anti-Sheep für 25 min
- Spülen mit Tris Puffer
- Peroxidase-Block H_2O_2 für 10 min bei ET_AR, für 5 min bei ET_BR
- Spülen mit Tris Puffer
- Envision HRP für 25 min
- Spülen mit Tris Puffer

Beide Färbereihen:

- Hinzufügen von Chromogen-Substrat-Lösung mit Substrat Puffer für 5 min
- Spülen mit Tris Puffer
- Erneutes Hinzufügen von Chromogen-Substrat-Lösung mit Substrat Puffer für 5 min
- Spülen mit Tris Puffer
- Kerngegenfärbung mit Hämatoxylin für 30 min
- Spülen mit Leitungswasser
- Eindecken der Präparate mit Kaiser's Gelatine
- Mikroskopische Auswertung
- Statistische Auswertung der immunhistochemischen Befunde und Korrelationen mit klinikopathologischen Daten; Überlebensanalyse

2.5 Mikroskopische Auswertung

Die mikroskopische Auswertung erfolgte an einem Lichtmikroskop der Firma Leitz (Wetzlar, Deutschland).

Dabei wurde insbesondere die Farbpositivität des im Schnitt vorhandenen Tumorgewebes untersucht und der Ausprägungsgrad der Färbintensität folgendermassen klassifiziert:

- | | |
|----------|---|
| 0 | = negative Anfärbung der Präparate |
| 1 | = schwache Farbintensität der Präparate |
| 2 | = mittlere Farbintensität der Präparate |
| 3 | = starke Farbinintensität der Präparate |

Der Färbegrad 0 wurde als negativ, die Färbegrade 1 bis 3 als positiv bewertet.

Weiterhin wurde die Invasivität des Tumorgewebes in Bezug auf die Gefässe beurteilt und klassifiziert:

- | | |
|----------|---------------------------|
| 0 | = keine Gefässinvasion |
| 1 | = schwache Gefässinvasion |
| 2 | = mittlere Gefässinvasion |
| 3 | = starke Gefässinvasion |

Der Invasionsgrad 0 wurde als negativ, die Invasionsgrade 1 bis 3 als positiv bewertet.

2.6 Statistische Auswertung

In einem IBM-kompatiblen Personalcomputer wurde mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogrammes Microsoft ExcelTM (Version XP) eine Tabelle erstellt, in der folgende Parameter erfasst wurden:

- ID-Nummer des urologischen Institutes
- Journal-Nummer des pathologischen Institutes
- Alter des Patienten
- Operationsdatum
- Tumortyp (Urothel- vs. Plattenepithel-, vs. Adeno-CA, vs. Karzinosarkom)
- TNMG-Stadium
- Metastasenstatus
- histologischer ET-1-Status
- histologischer ET_A-R-Status
- histologischer ET_BR-Status
- histologischer Hämangiosis-carcinomatosa-Status (HC)
- histologischer Lymphangiosis-carcinomatosa-Status (LC)
- histologischer Carcinoma-in-situ-Status (Cis)

3 ERGEBNISSE

3.1 Datenquelle – Stammblatt

Das folgende Datenstammblatt zeigt die im Archiv, von den Hausärzten und die mikroskopisch ermittelten Daten bzw. Befunde der 157 Patienten, die in die Studie eingeschlossen wurden.

Angegeben sind die ID-Nummern, unter denen die Patienten in der urologischen Klinik geführt werden, das Alter der Patienten, der ET-1, ET_AR- und ET_BR-Status, das TNM-Stadium, das histologische Grading, sowie der histologische Tumortyp. Weiterhin wurde angegeben, ob der untersuchte Tumor ein Carcinoma in situ (Cis), eine Lymphangiosis carcinomatosa (LC) oder eine Hämangiosis carcinomatosa (HC) aufweist. Aufgeführt werden ausserdem klinische Parameter, die aus dem Follow up gewonnen wurden, wie die Tumorprogressivität, das Auftreten von Rezidiven und/oder Metastasen und ob der Patient noch lebt oder bereits verstorben ist. Der Patientenstatus wurde mithilfe eines Survival-Codes weiter unterteilt: 1= rezidivfrei, 2= am Tumor verstorben, 3= an anderer Ursache verstorben, 4= lebt mit Rezidiv und 5= lost to Follow up. Die Monate der gesamten Überlebenszeit sind unter OAS (overall survival time) und die Anzahl der Monate mit rezidivfreier Überlebenszeit unter DFST (disease-free survival time) dargestellt.

Häufigster histologischer Tumortyp war mit Abstand das Urothelkarzinom mit nahezu 90%. Das Plattenepithelkarzinom war mit 13 Fällen vertreten, weiterhin wurden drei Adenokarzinome und ein Karzinosarkom untersucht.

ID	ET-1	ETAR	ETBR	Alter	T	N	M	G	Histotyp	Cis	LC	HC	Progress	Rezidiv-frei	dead	Survival-Code	Lokalrezidiv	Metastasen	OAS	DFST
48	0	0	1	43	2	0	1	3	u	0	1	.	1	0	1	2	1	1	40	18
50	0	0	0	56	3	0	0	3	u	0	0	0	1	1	0	1	0	0	126	126
53	0	0	2	71	3	0	0	3	u	0	0	0	1	1	0	1	0	0	126	126
54	0	0	0	75	3	0	0	3	u	0	1	0	1	1	0	1	0	0	107	107
55	1	0	0	56	3	0	0	3	u	0	.	.	1	1	0	1	0	0	120	120
56	0	1	1	47	3	0	0	2	u	0	1	0	1	0	1	2	1	0	21	17
57	0	1	1	67	3	2	0	3	u	0	.	.	1	0	1	2	0	1	13	7
58	0	0	1	35	3	1	0	4	u	0	.	.	1	0	1	2	0	1	60	54
61	1	1	1	63	3	0	0	3	u	0	.	.	1	1	1	3	0	0	10	10
62	0	1	1	53	3	1	0	2	u	0	1	.	1	0	1	2	1	1	142	138
63	0	1	1	68	3	1	0	3	u	0	1	0	1	1	0	1	0	0	120	120
64	0	1	1	61	4	1	0	3	u	0	1	0	1	0	1	2	0	1	27	14
66	0	0	1	70	3	1	0	3	u	0	.	.	1	0	1	2	0	0	34	34
67	.	.	.	69	3	1	0	3	u	0	0	0	1	0	1	2	0	1	14	12
68	0	0	1	66	3	1	0	4	u	0	.	.	1	1	1	3	0	0	5	5
69	0	1	0	50	3	2	0	3	u	0	0	0	1	1	0	1	0	0	112	112
70	1	1	3	41	3	2	0	3	u	0	.	.	1	0	1	2	1	0	72	57
72	0	0	1	73	4	2	1	3	u	0	.	.	1	0	1	2	0	1	6	4
73	0	0	1	55	4	2	0	3	u	0	1	0	1	0	1	2	0	1	25	23
74	0	1	1	61	2	2	0	3	u	0	.	.	1	0	1	2	0	1	14	13
75	1	1	2	68	4	2	0	4	u	0	0	0	1	0	1	2	0	1	21	15
76	.	.	.	69	1	2	0	3	u	1	1	.	0	1	1	3	0	0	43	43
77	0	1	1	48	3	3	1	3	u	1	1	0	1	0	1	2	0	1	13	10
78	1	0	1	64	3	0	0	2	u	0	.	.	1	1	1	3	0	0	84	84
80	.	.	.	69	3	0	0	3	u	0	0	0	1	1	1	3	0	0	50	50
82	0	0	1	64	2	0	0	2	u	1	0	0	1	0	1	2	1	1	112	108
83	0	1	1	77	1	0	0	2	u	0	0	0	0	1	1	3	0	0	73	73
84	.	.	.	44	1	0	0	1	u	0	.	.	1	0	1	2	0	1	93	81
85	1	0	0	63	.	0	0	2	u	1	0	0	1	0	1	2	0	1	54	47
88	.	.	.	69	2	0	0	3	u	0	0	0	1	1	0	1	0	0	119	119
92	0	1	1	52	3	0	0	3	p	0	0	0	1	1	0	1	0	0	132	132
93	0	1	1	62	2	0	0	2	u	0	.	.	0	1	0	1	0	0	177	177
94	.	.	.	54	.	0	0	2	u	0	.	.	1	0	1	2	0	1	46	44
96	0	0	1	59	1	0	0	2	u	0	0	0	0	1	0	1	0	0	142	142
97	0	0	1	77	3	0	0	3	p	0	.	.	1	1	1	3	0	0	72	72
98	0	1	1	64	3	0	0	3	u	0	0	0	1	1	0	1	0	0	135	135
99	0	1	1	68	2	0	0	3	u	0	.	.	1	0	1	2	0	1	68	60
101	1	1	2	77	4	0	0	3	u	0	.	.	1	0	1	2	0	0	3	3
103	1	0	1	66	2	0	0	3	u	0	.	.	1	0	1	2	1	1	21	18
105	0	0	1	52	1	0	0	2	u	0	.	.	1	0	1	2	0	1	35	30

ID	ET-1	ETAR	ETBR	Alter	T	N	M	G	Histotyp	Cis	LC	HC	Progress	Rezidiv-frei	dead	Survival-Code	Lokalrezidiv	Metastasen	OAS	DFST
107	0	0	1	58	3	0	0	3	u	0	.	.	1	0	1	2	0	1	13	9
108	0	1	0	76	3	0	1	3	u	0	.	.	1	0	1	2	0	1	4	4
110	1	1	2	65	2	0	0	3	u	1	.	.	1	0	1	2	1	0	27	20
111	0	0	0	50	3	0	0	2	u	0	0	0	1	0	1	2	1	0	16	5
113	0	1	1	59	3	0	0	2	u	0	0	0	1	0	1	2	0	1	21	20
114	.	.	.	75	2	0	0	2	u	1	1	0	1	0	1	2	0	1	24	19
115	0	0	1	62	4	0	0	3	u	0	.	.	1	0	1	2	1	0	3	0
117	0	1	1	67	3	0	0	3	u	0	1	0	1	0	1	2	0	0	17	17
118	0	0	0	42	4	0	0	3	u	0	1	1	1	0	1	2	1	1	11	8
119	.	.	.	67	3	0	0	3	p	0	0	0	1	0	1	2	0	1	.	.
121	0	1	1	60	1	0	0	3	u	1	0	0	0	1	1	3	0	0	18	18
122	1	1	1	78	3	0	0	2	u	0	.	.	1	1	1	3	0	0	17	17
123	1	1	1	72	3	0	0	3	u	0	.	.	1	0	1	2	0	1	18	12
124	0	1	1	74	3	0	0	3	u	0	1	0	1	1	1	3	0	0	16	16
125	0	0	0	65	3	0	0	3	.	0	1	0	1	1	1	3	0	0	6	6
128	.	.	.	68	3	0	0	3	p	0	1	.	1	0	1	3	1	0	5	5
130	1	1	2	81	3	0	0	1	p	0	.	.	1	1	1	3	0	0	8	8
133	0	0	1	62	4	1	0	3	p	0	.	.	1	1	0	1	0	0	154	154
134	0	0	0	64	3	1	0	3	u	0	1	0	1	0	1	2	1	1	12	12
136	0	1	1	71	4	1	0	3	u	0	.	.	1	1	1	3	0	0	2	1
138	0	0	1	73	4	2	0	3	u	0	.	.	1	0	1	2	0	1	18	5
139	.	.	.	68	3	2	0	3	u	0	1	.	1	0	1	2	0	1	9	1
140	0	0	0	55	3	2	0	3	u	0	1	1	1	0	1	2	0	1	16	4
142	0	0	0	72	4	2	0	3	u	0	.	.	1	0	1	2	0	0	18	12
143	0	1	1	64	3	2	1	3	u	0	0	0	1	0	1	2	0	1	1	0
144	0	1	1	65	3	2	0	3	u	0	.	.	1	1	1	3	0	0	5	5
536	0	0	1	72	1	0	0	3	u	1	1	0	0	1	0	1	0	0	44	44
539	0	0	0	76	3	0	0	3	u	0	0	0	1	0	1	2	0	1	4	.
576	0	1	1	55	3	0	0	2	u	0	1	0	1	0	1	2	0	1	38	34
577	0	1	1	67	3	1	0	3	u	0	0	0	1	1	0	1	0	0	87	87
578	0	0	0	65	3	0	0	3	u	1	1	0	1	0	1	2	0	1	23	14
579	0	0	0	59	3	0	0	2	u	0	1	.	1	0	1	2	0	0	36	.
584	2	0	1	61	3	2	0	3	u	0	1	0	1	0	1	2	1	1	14	13
585	0	1	1	61	3	1	0	3	u	0	0	0	1	1	0	1	0	0	68	68
589	1	0	1	49	3	0	0	3	u	0	0	0	1	1	0	1	0	0	65	65
590	0	0	1	60	3	0	0	3	u	0	.	1	1	0	1	2	0	0	5	5
591	0	0	1	58	4	1	0	3	u	0	1	.	1	0	1	2	0	1	25	22
593	0	0	2	71	3	0	0	3	u	0	1	0	1	0	1	2	1	0	20	18
596	0	1	1	64	4	0	0	2	u	0	1	1	1	0	1	2	0	1	6	5
634	0	0	0	42	3	1	1	3	p	0	1	1	1	1	0	1	0	0	60	60

ID	ET-1	ETAR	ETBR	Alter	T	N	M	G	Histotyp	Cis	LC	HC	Progress	Rezidiv-frei	dead	Survival-Code	Lokalrezidiv	Metastasen	OAS	DFST
642	0	1	1	68	4	1	0	3	u	1	1	1	1	0	1	2	0	1	15	0
650	0	1	1	70	2	0	0	2	u	0	0	0	1	0	1	2	0	1	19	15
651	0	0	2	68	4	1	0	3		0	0	0	1	0	1	2	1	0	33	22
680	0	1	1	65	3	0	0	3	u	0	0	0	1	1	0	1	0	0	56	56
683	1	0	0	62	4	2	0	3	u	0	0	0	1	0	1	2	0	1	23	15
689	0	1	2	47	3	2	0	3	p	0	0	0	1	0	0	5	0	0	.	.
701	0	1	2	72	2	1	0	2	u	0	1	0	0	0	0	2	0	0	.	.
703	0	0	1	68	3	0	0	3		0	1	0	1	0	1	2	0	0	9	9
704	1	1	1	66	4	0	0	3	u	1	1	0	1	0	1	2	0	0	1	0
733	0	0	1	77	3	0	0	3	u	0	0	0	1	1	1	3	0	1	4	4
735	0	1	0	44	3	2	0	3	u	0	1	0	1	0	1	2	1	1	13	10
743	0	1	1	72	3	1	0	2	u	1	1	0	1	0	1	2	0	1	9	7
745	0	1	1	69	3	0	0	3	u	0	0	0	1	1	0	1	0	0	69	69
753	2	1	1	63	3	0	0	3	u	0	0	0	1	0	0	4	0	1	.	24
754	0	1	2	74	3	1	0	2	u	0	1	0	1	0	1	2	0	1	16	9
758	0	1	.	53	.	0	0	1	u	0	0	0	0	1	0	1	0	0	104	104
761	1	1	2	76	4	0	0	3	u	1	0	0	1	1	1	3	0	0	19	19
769	0	0	1	66	3	2	0	3	u	0	0	0	1	1	0	1	0	0	42	42
779	0	2	2	79	3	0	0	2	u	0	.	.	1	1	0	1	0	0	88	88
790	1	2	0	60	3	2	0	3		0	0	0	1	0	0	4	0	1	57	23
791	1	1	0	78	2	0	0	2	u	0	1	.	1	0	1	2	1	1	22	17
794	0	1	1	54	3	0	0	3		0	1	0	1	1	0	1	0	0	77	77
797	0	1	1	79	3	0	0	3	u	0	1	0	1	0	0	4	1	0	43	41
810	2	1	1	68	3	1	0	2		0	0	0	1	0	1	2	1	0	20	16
825	0	1	0	80	3	2	0	3	u	0	0	0	1	0	1	2	0	0	5	5
827	1	1	0	60	4	2	0	3	u	0	0	0	1	0	1	2	0	1	18	14
829	0	1	3	66	3	1	0	3	u	1	0	0	1	0	1	2	0	1	21	14
835	0	0	0	42	4	0	0	2	u	0	1	0	1	1	0	1	0	0	60	60
836	0	1	2	77	1	0	0	3	u	0	1	0	1	0	1	2	0	1	43	37
846	1	1	1	59	3	0	0	3	p	0	1	.	1	0	1	2	1	1	9	7
852	0	1	0	76	3	0	0	3	u	0	1	1	1	0	0	5	0	0	.	.
854	1	1	1	74	1	0	0	3	u	0	1	0	1	0	1	2	0	1	22	18
861	0	0	1	67	3	0	0	3	u	0	1	1	1	1	0	1	0	0	41	41
884	.	.	.	53	1	0	0	4	u	0	0	0	0	1	0	1	0	0	85	85
890	0	1	1	78	4	2	0	3	u	0	1	0	1	1	0	1	0	0	46	46
891	1	0	1	68	3	0	0	3	p	0	0	0	1	0	1	2	0	1	15	12
897	0	1	2	33	3	1	0	3	p	0	0	0	1	1	0	1	0	0	42	42
898	1	2	0	74	1	0	0	3	u	0	1	0	1	0	1	2	0	1	15	12
899	0	1	1	68	3	0	0	3	p	0	0	0	1	0	1	2	0	1	2	2
900	0	0	0	49	3	0	0	2	u	0	0	0	1	0	1	2	0	1	3	2

ID	ET-1	ETAR	ETBR	Alter	T	N	M	G	Histotyp	Cis	LC	HC	Progress	Rezidiv-frei	dead	Survival-Code	Lokalrezidiv	Metastasen	OAS	DFST
983	0	1	1	49	4	0	0	3	p	1	0	0	1	0	1	2	1	1	11	7
997	0	0	0	57	3	0	0	3	u	0	0	0	1	0	0	4	0	1	67	65
1001	1	0	0	72	3	0	0	2	u	0	0	0	1	0	1	2	1	0	21	9
1105	1	1	1	62	4	2	0	2	u	0	1	0	1	0	1	2	0	0	6	3
1117	0	1	1	74	3	0	0	3	u	0	0	0	1	0	1	2	0	1	12	12
1123	0	1	1	66	2	0	0	2	u	0	1	0	1	0	1	2	0	1	24	20
1126	1	0	1	56	3	0	0	3	u	0	1	1	1	1	0	1	0	0	88	88
1133	1	1	1	62	3	0	0	3	u	0	0	0	1	0	0	5	0	0	4	4
1140	1	.	1	53	.	0	0	3	.	1	0	0	0	1	0	1	0	0	104	104
1146	0	0	2	67	2	0	0	2	u	0	0	0	0	1	0	1	0	0	92	92
1168	0	1	1	73	2	0	0	3	u	0	1	0	1	1	1	3	0	0	81	81
1169	1	0	0	62	1	0	0	1	u	1	0	0	1	0	1	2	0	1	15	14
1173	1	1	1	54	2	0	0	3	u	1	0	0	1	1	0	1	0	0	84	84
1213	0	1	1	47	4	2	0	3	u	0	1	1	1	0	1	2	0	0	2	0
1218	.	1	1	54	3	0	0	2	u	0	0	0	1	1	0	1	0	0	.	.
1219	0	0	1	64	3	2	0	3	u	0	1	0	1	0	1	2	0	1	8	4
1230	.	.	.	65	3	1	0	3	u	0	0	0	1	1	1	3	0	0	32	32
1241	0	0	1	49	2	0	0	3	u	1	0	0	1	1	0	1	0	0	84	84
1254	1	1	1	59	3	0	0	3	p	0	1	0	1	0	1	2	0	1	69	64
1256	0	1	1	41	3	0	0	3	u	0	1	.	1	0	1	2	1	0	18	7
1259	0	0	0	44	4	1	0	3	u	0	1	1	1	0	1	2	0	0	3	0
1261	.	1	1	79	2	0	0	2	u	0	0	.	1	0	1	2	0	0	72	42
1302	1	0	1	68	3	.	0	3	u	0	1	0	1	0	0	5	0	0	.	.
1303	0	1	0	73	4	2	0	4	u	0	0	0	1	0	1	2	1	1	24	.
1306	0	1	1	66	2	0	0	2	u	0	0	0	0	1	0	1	0	0	83	83
1311	1	1	2	68	2	0	0	3	u	1	0	0	1	1	0	1	0	0	102	102
1313	0	0	0	75	3	0	0	3	u	1	1	0	1	0	1	2	0	1	19	10
1321	1	1	2	57	1	0	0	2	u	0	.	.	0	1	0	1	0	0	102	102
1354	0	1	2	78	4	0	0	3	u	0	0	0	1	0	1	2	0	0	46	40
1355	1	1	1	75	3	0	0	3	u	0	1	0	1	0	0	5	0	0	.	.
1366	0	1	2	56	3	0	0	3	u	0	0	0	1	1	0	1	0	0	92	92
1372	.	.	.	52	3	0	0	4	u	0	0	0	1	0	1	2	1	0	14	4
1384	0	0	1	72	3	0	0	2	u	0	1	1	1	0	1	2	0	1	10	4
1398	0	1	2	47	1	0	0	2	u	1	0	0	0	1	0	1	0	0	87	87

Tabelle 3.1: Datenstamblatt

u = Urothelkarzinom

p = Plattenepithelkarzinom

a = Adenokarzinom

Cis = Carcinoma in situ

LC = Lymphangiosis carcinomatosa

HC = Hämangiosis carcinomatosa

OAS = gesamte Überlebenszeit in Monaten

DFST = rezidivfreie Überlebenszeit in Monaten

Dieses Datenstammbblatt diene bei den folgenden statistischen Auswertungen als Datenquelle.

Zum besseren Überblick über das Kollektiv sind die Anzahlen der verschiedenen klinikopathologischen Befunde im Folgenden nochmals zusammengefasst:

Parameter	No
Tumortyp	
Urothelkarzinom	140
Plattenepithelkarzinom	13
Adenokarzinom	3
Karzinom Sarkom	1
pT Stadium	
pT1	14
pT2	20
pT3	90
pT4	28
pN Stadium	
pN1-3	102
pN0	52
pM Stadium	
M1	6
M0	149
Histologisches Grading	
G1	3
G2	37
G3	109
G4	6

Carcinoma in situ	
ja	22
nein	135
Lymphangiosis carcinomatosa	
ja	58
nein	67
Hämangiosis carcinomatosa	
ja	13
nein	101
Tumorprogress während Follow up	
ja	14
nein	143
Tumorrezidiv während Follow-Up	
ja	57
nein	100
Lokalrezidiv während Follow-up	
ja	27
nein	130
Verstorben	109
Lebend	48
Survival-Code	
Rezidivfrei	39
Am Tumor verstorben	90
Andere Todesursache	19
Lebt mit Rezidiv	4
Lost to Follow up	5

Tabelle 3.2: Klinikopathologische Parameter

3.2 Auswertung der immunhistologischen Befunde für ET-1, ET_AR und ET_BR

3.2.1 Semiquantitative mikroskopische Auswertung

Bei der mikroskopischen Auswertung der Gewebeschnitte wurden vier verschiedene Farbtintensitätsgrade vergeben: 0 bis 4 (siehe auch Kap. 2.5). Der Färbegrad 0 wurde als negativ, die Färbegrade 1-3 als positiv klassifiziert. Aus den auf der nächsten Seite folgenden Tabellen sind die Befunde für die einzelnen Fälle zu entnehmen.

Von den insgesamt 157 Patienten des gesamten Kollektivs konnten 142 Gewebeschnitte für ET-1, 143 für ET_AR und 143 für ET_BR immunhistochemisch gefärbt und mikroskopisch ausgewertet werden. Bei den Übrigen gingen die Gewebeschnitte während des Färbeprozesses (z.B. durch Abschwimmen des Präparates bei der Autoklavierung) verloren.

Eine positive Endothelin-1-Expression fand sich in 26,8% aller Fälle. Die Expression von ET_AR war mit 58,8% höher und mit 76,9% am höchsten für ET_BR in den untersuchten Tumorgewebeschnitten. Repräsentative Ergebnisse zeigen die Abbildungen 3.2-3.4.

Fast alle positiv gefärbten Tumorgewebe wiesen schwache oder mittelgradige Expressionen auf. Eine starke Expression konnte nur bei 2 Patienten für ET_BR gefunden werden (siehe auch Tabelle 3.1).

Positive Färbungen wurden nur in Tumorgewebe nachgewiesen, falls normales Urothelgewebe auf den Objektträgern vorhanden war, ergaben sich keinerlei Färbungsreaktionen (siehe auch Abbildung 3.4).

In glatten Muskelzellen liess sich eine leichte Hintergrundfärbung für ET-1 und ET_BR nachweisen.

Färbegrad ET-1	n	%
0	104	73.2
1	35	24.6
2	3	2.2
3	0	0
negativ	104	73.2
positiv	38	26.8

Färbegrad ET _A R	n	%
0	59	41.2
1	81	56.6
2	3	2.2
3	0	0.0
negativ	59	41.2
positiv	84	58.8

Färbegrad ET _B R	n	%
0	33	23.1
1	88	61.6
2	20	13.9
3	2	1.4
negativ	33	23.1
positiv	110	76.9

Tabelle 3.3: Verteilung der ET-1, ET_AR und ET_BR-Expression auf die verschiedenen Farbintensitätsgrade

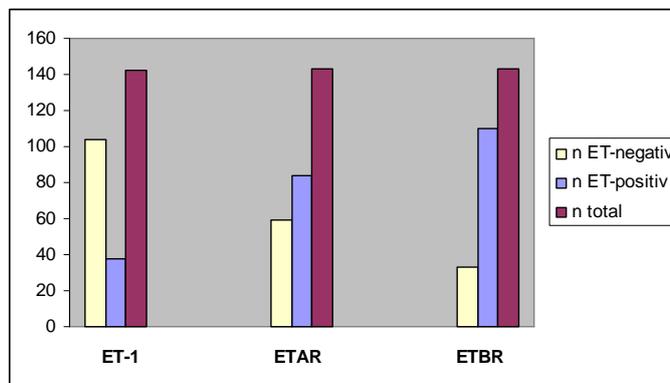


Abbildung 3.1: Verteilung der ET-1, ET_AR und ET_BR-Expression

In den folgenden Abbildungen sind repräsentative Beispiele von immunhistochemisch gefärbten Blasenkarzinomschnitten mit ET-1-, ET_AR- und ET_BR-Expression, und ein normales Urothelgewebe als Negativ-Beispiel dargestellt.

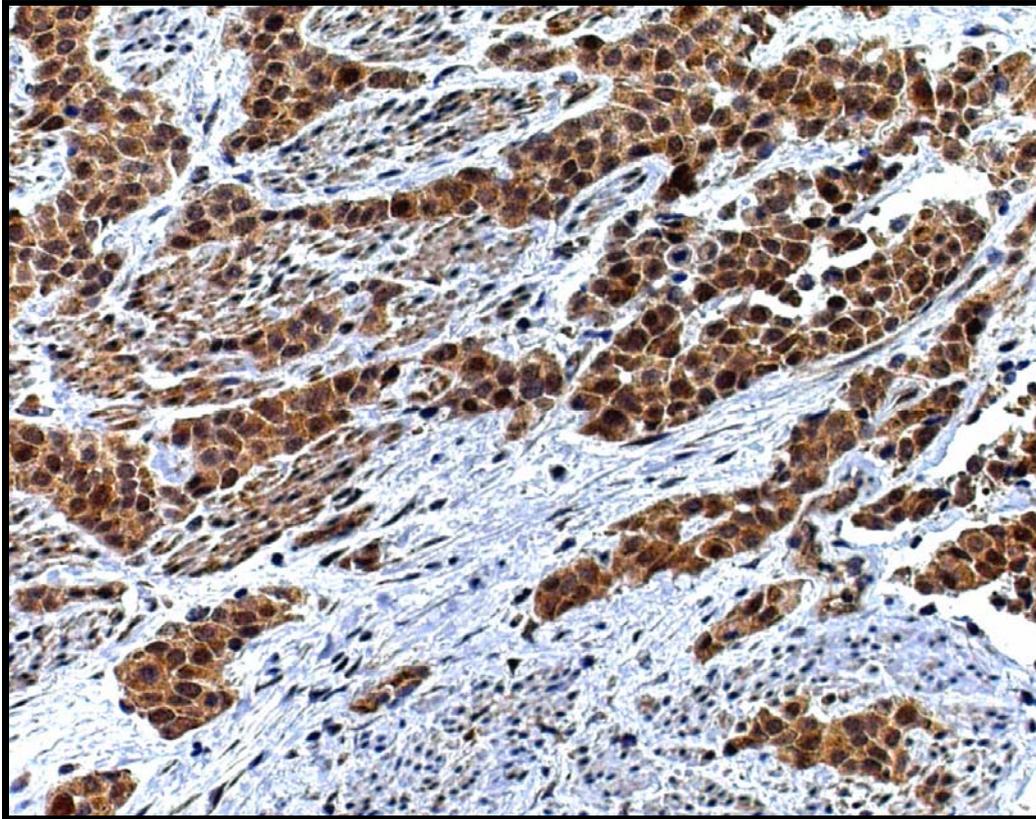


Abbildung 3.2: Urothel mit ET-1 – Anfärbung

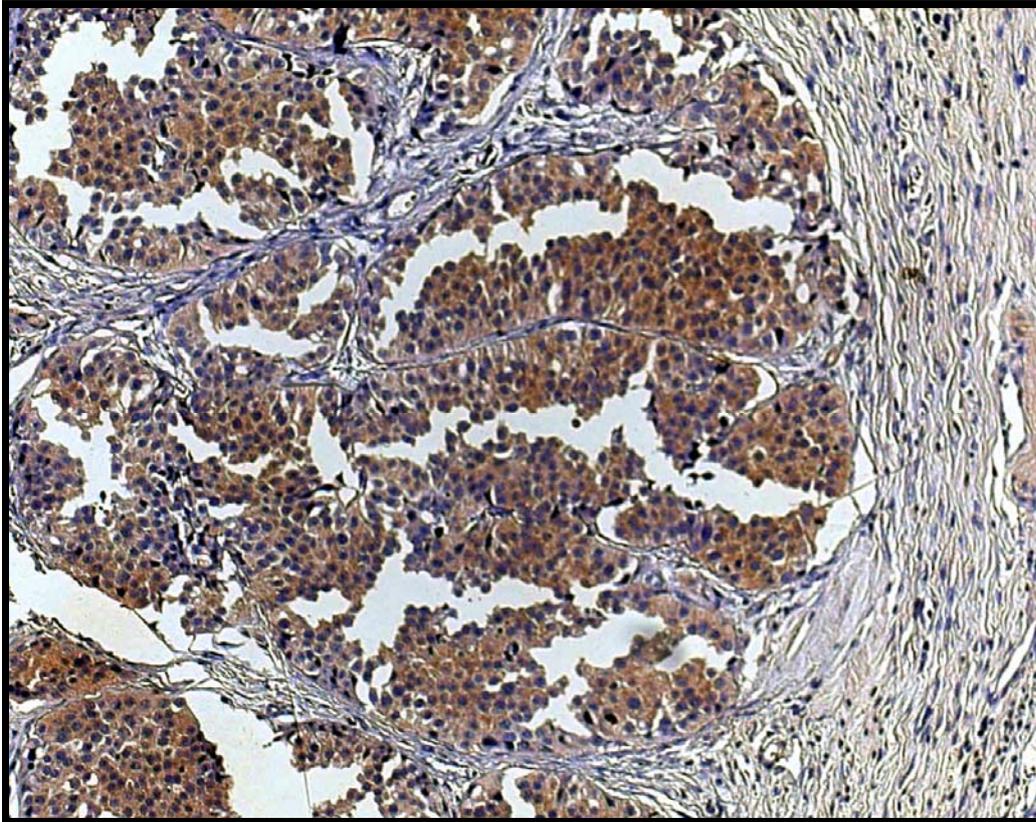


Abbildung 3.3: Urothel mit $ET_A R$ -Anfärbung

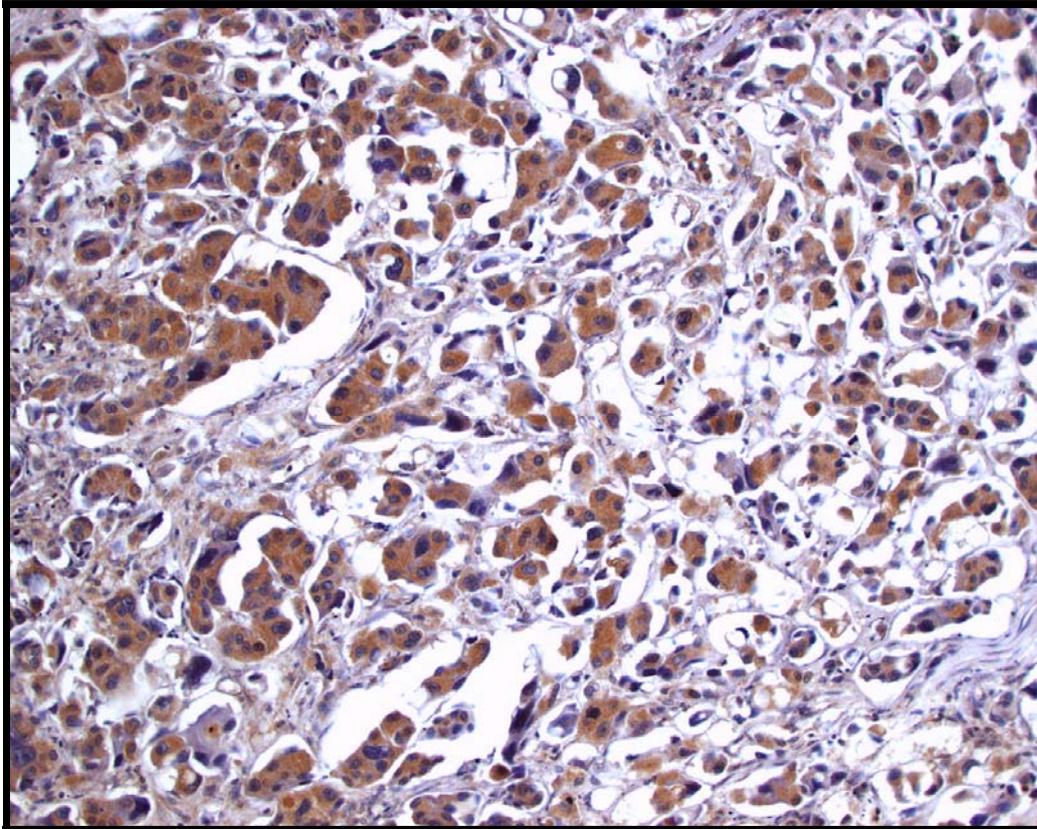


Abbildung 3.4: Urothel mit ET_bR-Anfärbung

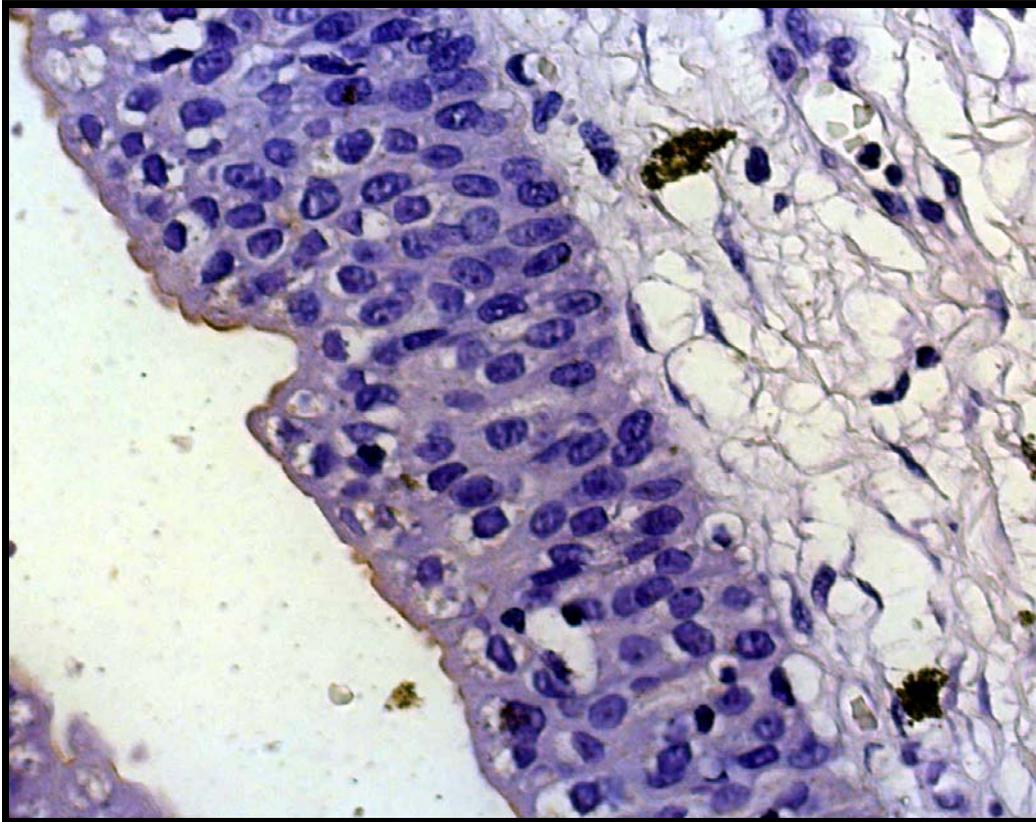


Abbildung 3.5: normales Urothel mit negativer Färbung

3.3 Statistische Korrelationen und Auswertungen

3.3.1 Korrelation mit dem TNM-System und dem histologischen Differenzierungsgrad

Die Expression von ET-1, ET_AR und ET_BR wurde jeweils mit verschiedenen pathologischen Parametern korreliert.

Die folgenden Tabellen verdeutlichen die Verteilung der einzelnen ET-Befunde in Abhängigkeit des Tumor-Stadiums, des histologischen Gradings, des Lymphknotenstatus (LK), dem Gefässinvasivitätsstatus (HC) und der verschiedenen histologischen Tumortypen.

pT-Stadium	ET-1-positiv <i>n</i>	Total	%	<i>P</i> ^a
pT1	4	11	36.3	0.82
pT2	5	18	27.8	
pT3	20	85	23.5	
pT4	7	28	25.0	

pT-Stadium	ET _A R-positiv <i>n</i>	total	%	<i>P</i> ^a
pT1	7	11	63.6	0.60
pT2	13	19	68.4	
pT3	48	85	56.4	
pT4	15	28	53.5	

pT-Stadium	ET _B R-positiv <i>n</i>	total	%	<i>P</i> ^a
pT1	9	11	81.8	0.60
pT2	17	19	89.4	
pT3	62	85	72.9	
pT4	21	28	75.0	

Tabelle 3.4: Verteilung von ET und dem T-Stadium

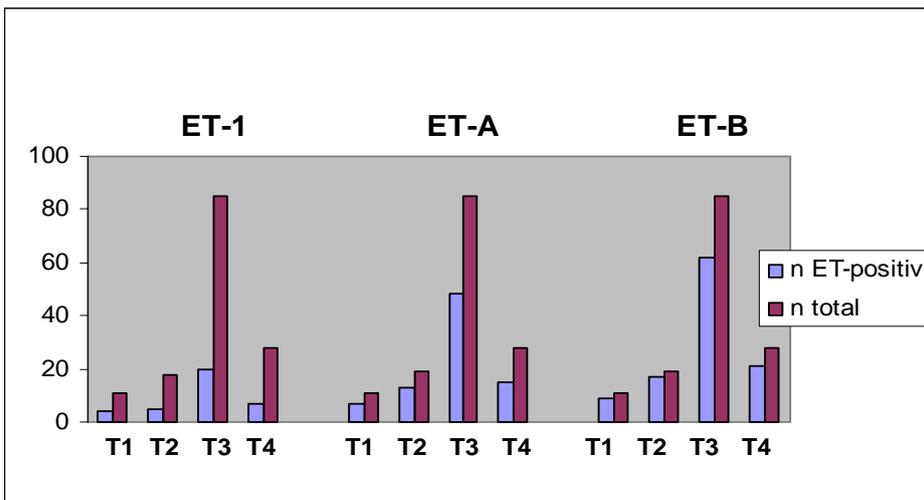


Abbildung 3.6: Verteilung von ET-1, ET_AR und ET_BR und dem T-Stadium

Grading	ET-1-positiv <i>n</i>	total	%	<i>P</i> ^a
G1	2	3	66.6	0.46
G2	8	33	24.2	
G3	27	102	26.2	
G4	1	4	25.0	

Grading	ET _A R-positiv <i>n</i>	total	%	<i>P</i> ^a
G1	2	3	66.6	0.91
G2	22	35	62.5	
G3	58	101	57.4	
G4	2	4	50.0	

Grading	ET _B R-positiv <i>n</i>	total	%	<i>P</i> ^a
G1	1	3	33.3	0.79
G2	28	35	84.6	
G3	78	101	77.2	
G4	3	4	75.0	

Tabelle 3.5: Verteilung von ET und Grading

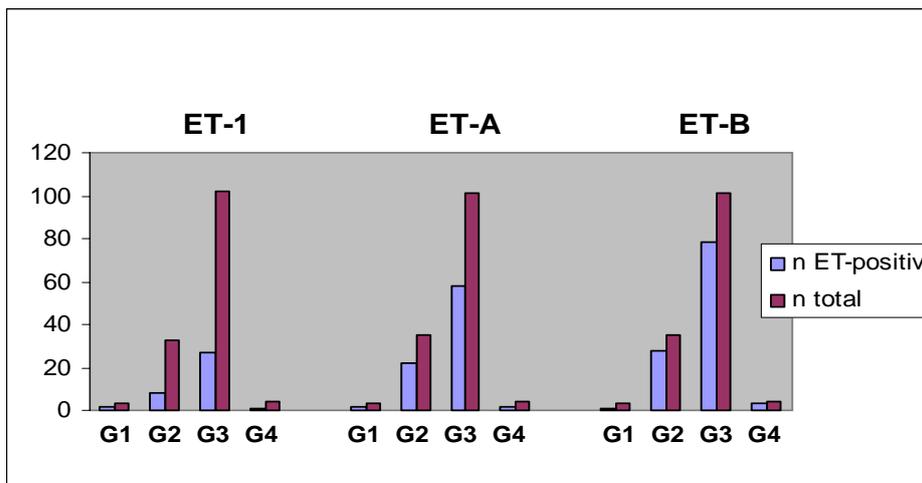


Abbildung 3.7: Verteilung von ET-1, ET_AR und ET_BR und dem G-Stadium

LK-Status	ET-1-positiv <i>n</i>	total	%	<i>P</i> ^a
negativ	29	94	30.9	0.06
positiv	8	48	16.7	

LK-Status	ET _A -positiv <i>n</i>	total	%	<i>P</i> ^a
negativ	54	95	56.8	0.56
positiv	30	48	62.5	

LK-Status	ET _B -positiv <i>n</i>	total	%	<i>P</i> ^a
negativ	73	95	76.8	0.72
positiv	36	48	75.0	

Tabelle 3.6: Verteilung von ET und dem Lymphknotenstatus (LK-Status)

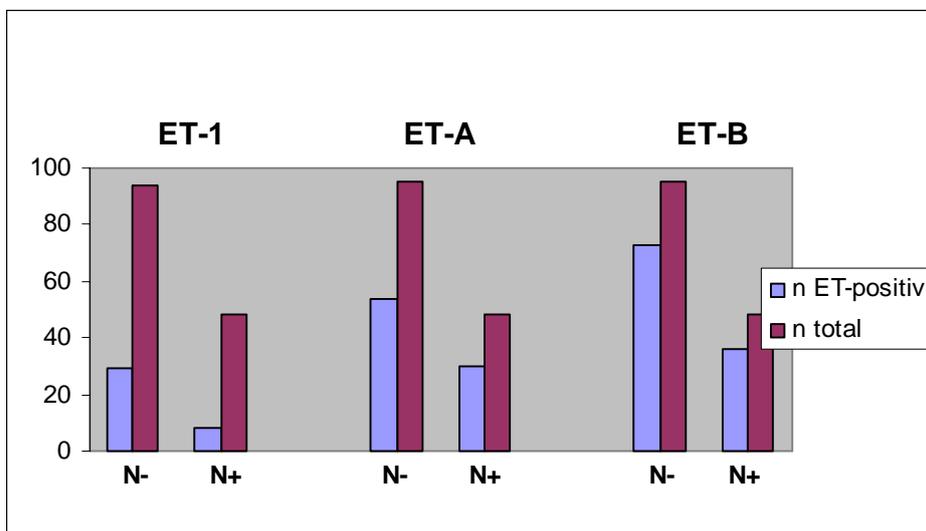


Abbildung 3.8: Verteilung von ET-1, ET_AR und ET_BR und dem Lymphknotenstatus

HC-Status	ET-1-positiv <i>n</i>	total	%	<i>P</i> ^a
negativ	24	92	26.1	0.18
positiv	1	13	7.7	

HC-Status	ET _A -positiv <i>n</i>	total	%	<i>P</i> ^a
negativ	59	92	64.1	0.02
positiv	4	13	30.8	

HC-Status	ET _B -positiv <i>n</i>	total	%	<i>P</i> ^a
negativ	70	92	76.0	0.09
positiv	7	13	53.8	

Tabelle 3.7: Verteilung von ET und der Hämangiosis carcinomatosa (HC-Status)

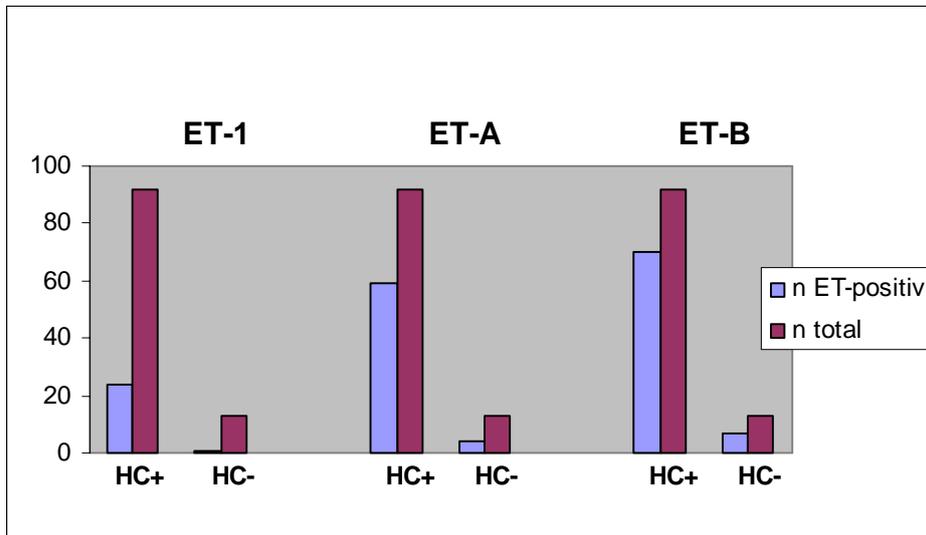


Abbildung 3.9: Verteilung von ET-1, ET_AR und ET_BR und dem HC- Status

histologischer Typ	ET-1-positiv <i>n</i>	total	%	<i>P</i> ^a
TCC	31	122	25.4	0.56
SCC	4	13	30.7	
andere	3	7	42.8	

histologischer Typ	ET _A R-positiv <i>n</i>	total	%	<i>P</i> ^a
TCC	73	123	59.3	0.89
SCC	8	13	61.5	
andere	3	7	42.8	

histologischer Typ	ET _B R-positiv <i>n</i>	total	%	<i>P</i> ^a
TCC	94	123	76.4	0.75
SCC	11	13	84.6	
andere	5	7	71.4	

Tabelle 3.8: Verteilung von ET und den verschiedenen Tumortypen

TCC: Transitional Cell Carcinoma (Urothelkarzinom)

SCC: Squamous Cell Carcinoma (Plattenepithelkarzinom)

^a χ^2 Test

P = Probability (Wahrscheinlichkeit)

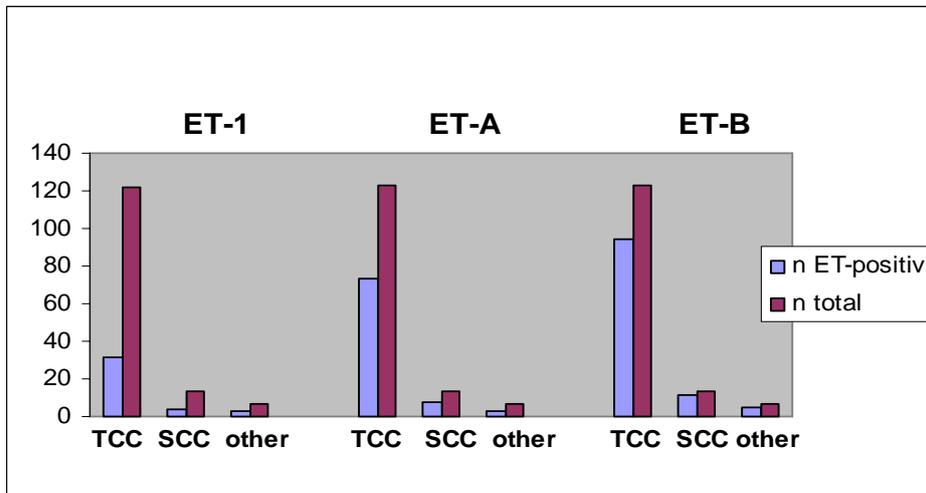


Abbildung 3.10: Verteilung von ET-1, ET_AR und ET_BR und den verschiedenen Tumortypen

TCC: Transitional Cell Carcinoma (Urothelkarzinom)

SCC: Squamous Cell Carcinoma (Plattenepithelkarzinom)

^a χ^2 Test

P = Probability (Wahrscheinlichkeit)

Wie den Tabellen zu entnehmen, fanden sich im Gesamtkollektiv keine Zusammenhänge zwischen der Expression von ET-1 und dem Tumorstadium, dem histologischen Differenzierungsgrad, einer Hämangiosis carcinomatosa oder den verschiedenen Tumorentitäten. Es war aber eine inverse Wechselbeziehung zwischen der ET-1-Expression und dem Lymphknotenstatus feststellbar: 30,9% (29/94) der Patienten mit einem negativen Lymphknotenstatus, verglichen mit 16,7% (8/48) mit einem positiven Lymphknotenstatus, wiesen eine ET-1-Expression im Tumorgewebe auf. Diese Korrelation erreichte mit $P=0.06$ aber keine statistische Signifikanz (siehe Tabelle 3.6).

Weiterhin gab es keine Korrelationen zwischen dem ET-1-Status und anderen untersuchten klinischen Parametern zum Follow-Up, wie der Tumorprogression, der Auftretenshäufigkeit von Rezidiven und dem Auftreten von Metastasen.

Die ET_A R-Expression in den untersuchten Tumorgeweben zeigte keine Assoziation mit dem Tumor-Stadium, dem histologischen Differenzierungsgrad, dem Lymphknotenstatus, oder mit anderen klinischen Parametern. Es fand sich aber eine signifikante inverse Wechselbeziehung der ET_A R-Expression mit der Auftretenshäufigkeit von Tumoren, die gefässinvasiv wachsen ($P=0.02$) (siehe Tabelle 3.7).

Für die ET_B R-Expression fand sich ebenfalls keine signifikante Korrelation zu TNM-Stadium oder dem histologischem Differenzierungsgrad.

Eine inverse Wechselbeziehung zwischen der ET_B R-Expression und der Gefässinvasivität, wie bei ET_A R, konnte aber sogar noch verstärkt nachgewiesen werden: von 92 Tumoren ohne Hämangiosis carcinomatosa, waren 70 (76,0%) ET_B R-positiv, verglichen mit 7 von 13 (53,8%) gefässinvasiven Tumoren, die ET_B R-positiv waren ($P=0,09$) (siehe Tabelle 3.7). Dieser Zusammenhang war noch offensichtlicher bei Patienten mit schlecht differenzierten Tumoren (G3), bei denen 51 von 66 (77,2%) Patienten ohne gefässinvasiven Tumoren, verglichen mit 5 von 11 (45,4%) Patienten mit gefässinvasiven Tumoren, eine positive ET_B R-Expression aufwiesen ($P=0,02$).

Zusätzlich zeigte sich in einer Subanalyse bei Patienten mit organbegrenzten Tumoren ($\leq pT2$) eine ET_B R-Überexpression im untersuchten Tumorgewebe: 26 von 29 (89,6%) Patienten mit nicht-organüberschreitenden Tumoren waren ET_B R-positiv. Im Vergleich

dazu wiesen 83 von 112 (74,7%) Patienten mit organüberschreitenden Tumoren ein positives Ergebnis für ET_BR auf (P=0,16).

Weiterhin gab es eine inverse Wechselbeziehung zu einigen weiteren untersuchten klinischen Parametern: Patienten mit positiver ET_BR-Expression hatten während des Follow-Ups seltener einen Tumorprogress und entwickelten weniger Fernmetastasen (für beides P=0,04).

3.3.2 Korrelation mit den Überlebenszeiten

Alle Patienten wurden mindestens 41 Monate (Median: 88; von 41-156 Monate) nachbeobachtet. Der Medianwert für die rezidivfreie Überlebenszeit beträgt 22 (95% Konfidenzintervall (KI): 11-33 Monate) und für die gesamte Überlebenszeit 23 (95% KI: 18-28 Monate) Monate.

Im Februar 2004 waren 109 von 157 Patienten aufgrund Ihres Tumors (n=90) oder tumorunabhängig (n=19) gestorben. Von den noch lebenden 41 Patienten, weisen 39 keinerlei Krankheitszeichen auf, bei vier Patienten wurde vor kurzem ein Rezidiv bzw. ein positiver Metastasenstatus festgestellt, und fünf Patienten sind aus dem Follow up ausgeschieden.

Mithilfe der Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse und dem Logrank-Test zum Vergleichen von Überlebenskurven wurden die ET-1, ET_AR und die ET_BR-Expression mit der krankheitsfreien Überlebensrate und der Gesamtüberlebensrate korreliert (siehe Abbildung 3.11).

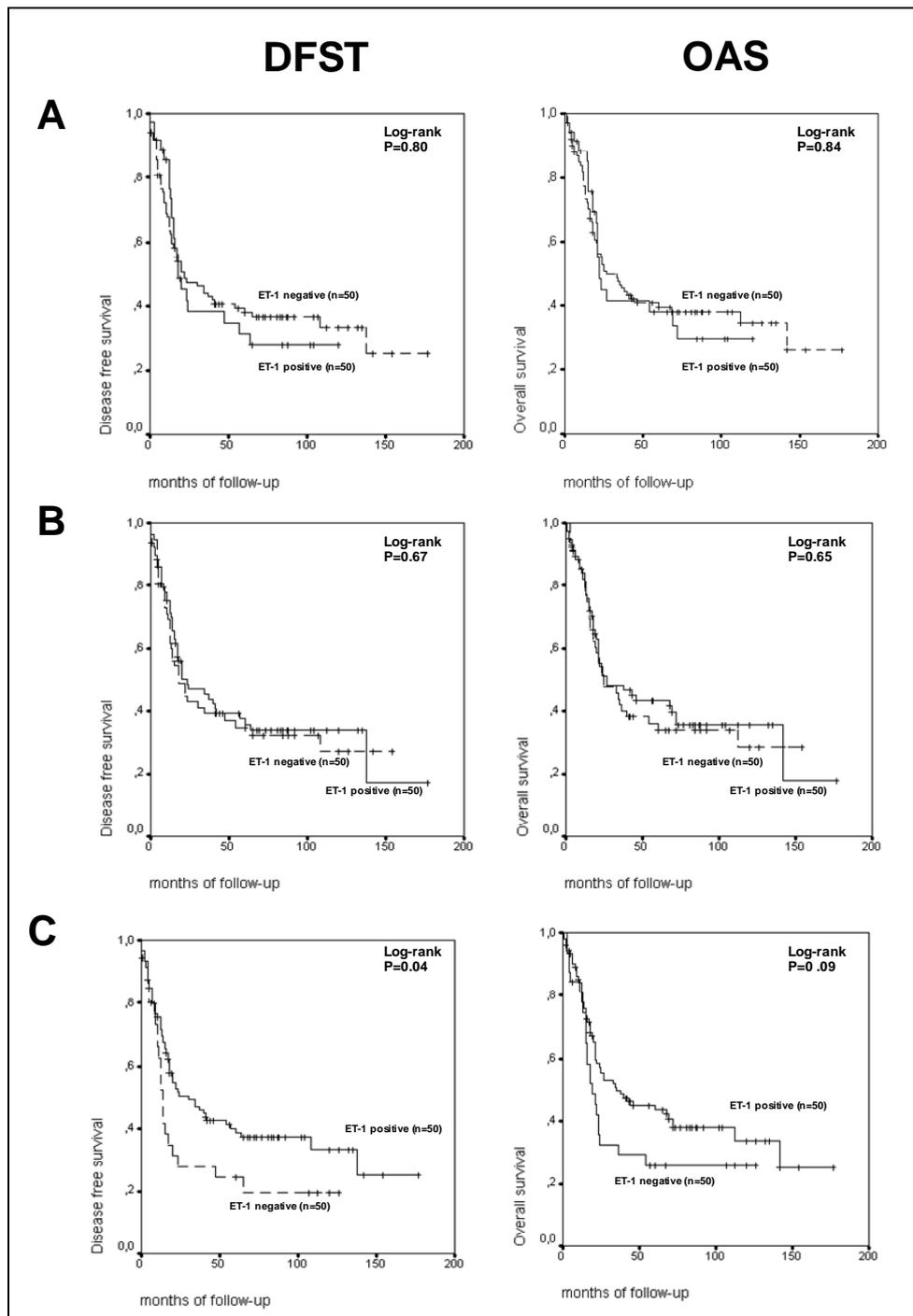


Abbildung 3.11: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse für rezidivfreie Überlebenszeit (DFST) und gesamte Überlebenszeit (OAS) in Abhängigkeit der ET-1 (A), ET_AR (B) und ET_BR (C) Expression

Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen ET-1 bzw. ET_AR und dem krankheitsfreien Überleben bzw. dem Gesamtüberleben gezeigt werden.

Die Gruppe der Patienten mit positiver ET_BR-Expression wiesen aber erheblich bessere Gesamtüberlebensraten ($P=0,09$) und signifikant bessere rezidivfreie Überlebensraten ($P=0,04$) auf, als Patienten ohne ET_BR-Expression. In der Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse konnte der Zusammenhang dargestellt werden (siehe Abbildung 3.11).

Zur genaueren Differenzierung unterteilten wir das ET_BR-Patientenkollektiv in verschiedene Untergruppen bezüglich des TNM-Stadiums, des histologischen Gradings, des Gefäßinvasivitätsstatus und dem Vorkommen von Metastasen bzw. von Rezidiven während des Follow up (siehe Tabelle 3.9)

Klinisch-pathologische Parameter	ET _B R Status	DFST Monate (95% KI)	P ^a
pT-Stadium			
pT1 + pT2 (Organbezogen)	negativ	13 (11-15)	0.0001
	positiv	96 (64-129)	
pT3 + pT4 (Organüberschreitend)	negativ	39 (20-57)	0.16
	positiv	56 (41-71)	
pN-Stadium			
Lymphknoten negativ	negativ	42 (19-65)	0.89
	positiv	83 (63-103)	
Lymphknoten positiv	negativ	28 (7-50)	0.45
	positiv	47 (26-68)	
histologisches Grading			
G1 + G2	negativ	22 (7-37)	0.07
	positiv	77 (48-106)	
G3 + G4	negativ	39 (19-59)	0.19
	positiv	65 (50-81)	
Gefäßinvasivität			
nicht vorhanden	negativ	39 (19-58)	0.05
	positiv	69 (53-85)	
vorhanden	negativ	17 (0-36)	0.94
	positiv	27 (0-56)	
Metastasen während Follow up			
nicht vorhanden	negativ	74 (39-108)	0.41
	positiv	120 (100-140)	
vorhanden	negativ	17 (10-24)	0.62
	positiv	21 (13-30)	
Lokale Rezidive während Follow up			
nicht vorhanden	negativ	47 (25-69)	0.20
	positiv	86 (68-104)	
vorhanden	negativ	12 (8-15)	0.03
	positiv	32 (13-51)	

Tabelle 3.9: Korrelation zwischen der ET_BR-Expression und der krankheitsfreien Überlebenszeit in Verbindung mit klinischen und pathologischen Parametern

^a = χ^2 Test

KI = Konfidenzintervall

DFST = disease-free survival time (Rezidivfreie Überlebenszeit)

P = Probability (Wahrscheinlichkeit)

Wie man der Tabelle 3.9 entnehmen kann, ist eine positive ET_BR-Expression im Gegensatz zu einer negativen ET_BR-Expression mit einer längeren rezidivfreien Überlebenszeit in allen Untergruppen verbunden. In der Gruppe von Patienten mit organbegrenzten Tumoren (\leq pT2) hatten die Patienten mit positiver ET_BR-Expression ein mittleres rezidivfreies Überleben von 96 Monaten, Patienten ohne ET_BR-Expression lebten im Mittel 13 Monate ohne ein Rezidiv, dies ergibt eine statistische Signifikanz mit einem $p=0,0001$ (siehe auch Tabelle 3.9).

Bei der Untergruppe von Patienten mit gut und mittelgradig differenzierten Tumoren (G1,G2) ergaben sich ähnliche Beziehungen ($p=0,07$), wie auch bei Patienten ohne gefässinvasiven Primärtumor ($p=0,05$). Auch bei Patienten, die lokale Rezidive während des Follow-up ausbildeten, war die rezidivfreie Überlebenszeit mit 32 Monaten signifikant höher, als bei Patienten mit negativer ET_BR-Expression und einer durchschnittlichen rezidivfreien Überlebenszeit von 12 Monaten ($p=0,03$) (siehe Tabelle 3.9).

4 DISKUSSION

4.1 Endothelin-1-, ET_AR- und ET_BR -Überexpression und tumorbiologischer Zusammenhang

Das invasive Harnblasenkarzinom ist eine Neoplasie, die eine aggressive Therapie benötigt. 15% aller unbehandelten Patienten erliegen dieser Krankheit innerhalb von zwei Jahren. Den therapeutischen Goldstandard stellt bis dato die radikale Zystektomie dar, eine nachfolgende Rezidivfreiheit konnte bisher nur in 50% der Fälle berichtet werden [141]. Abgesehen von der Identifikation verschiedener prognostischer Parameter, wie dem TNM-Stadium und dem histologischen Grading, sind zuverlässige Prognoseparameter begrenzt. Aus diesem Grund hat sich das Augenmerk des wissenschaftlichen Interesses auf die molekulare Ebene gerichtet. Es wird intensiv an molekularen Markern geforscht, die den Verlauf nach einer radikalen Zystektomie besser voraussagen können.

Das 1988 von Yanagisawa entdeckte Peptid Endothelin-1 (ET-1) hat nicht nur kreislaufwirksame Bedeutung, sondern besitzt auch wachstumsinduzierende Eigenschaften in verschiedenen Tumorentitäten, wie z.B. bei Karzinomen der Prostata, des Ovars, des Kolon, bei ZNS-Tumoren, sowie bei Melanomen, beim Kaposi Sarkom und bei Knochenmetastasen [118].

Weiterhin beeinflusst es die Angiogenese, die Apoptose, sowie den Knochenstoffwechsel [8,9]. Der *in vitro* beobachtete proliferative Effekt auf verschiedene neoplastische Zellen, konnte bereits teilweise durch ET-Rezeptorantagonisten aufgehoben werden [8]. *In vivo* wurde bei einigen Tumoren eine erhöhte Plasmakonzentration von ET-1 und seinen Vorläuferpeptiden gemessen. Die eigentliche Bedeutung der ET-Achse ist aber noch nicht aufgeklärt und bleibt weiterhin Gegenstand weiterführender Forschungen, die seine gesamte Bedeutung für das Wachstum maligner Zellen, sowie den Einfluss auf Knochenwachstum, Angiogenese und Apoptose aufklären sollen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die sogenannte ET-Achse, bestehend aus Endothelin-1 und seinen beiden Rezeptoren ET_AR und ET_BR, im Harnblasentumorgewebe charakterisiert. Im vorangehenden Ergebnisteil wurden aus einem Operationsgut von 157 Zystektomiepräparaten neben „klassischen“ Prognoseparametern, wie Tumorgröße, Histologie, Lymphknotenbefall und Grading, immunhistochemisch nachweisbare „Markerbefunde“ von ET-1, ET_AR und ET_BR erhoben. Die einzelnen Parameter wurden mittels χ^2 -Test auf signifikante Beziehung zueinander untersucht. Die Auswertung und Diskussion der Ergebnisse erfolgte unter besonderer Berücksichtigung tumorbiologischer Aspekte sowie unter Einbeziehung histomorphologisch auffälliger Befunde. Weiterhin wurden mithilfe der aus dem Follow up gewonnenen Daten die rezidivfreie und die Gesamt-Überlebenszeit mit der ET-Achse korreliert und geprüft, ob die ET-Achse als prognostischer Parameter dienen kann.

Wir konnten feststellen, dass in der Mehrzahl der untersuchten Präparate eine Expression der ET-Achse vorlag. Für ET-1 bekamen wir in 26,8%, für ET_AR in 58,8% und für ET_BR in 76,9% der Fälle ein positives Ergebnis. Es gab in keinem Präparat eine Anfärbung von normalem Urothelgewebe.

Erhöhte Expressionen des ET-Systems sind bei einer Vielzahl von malignen Erkrankungen gemessen worden.

In einer anderen Studie über die ET-Achse im Harnblasenkarzinom kamen Wülfing et al. zu ähnlichen Ergebnissen: Sie konnten mittels RT-PCR die mRNA von ET-1 in allen 22 untersuchten Zystektomiepräparaten finden. Auch die mRNA der beiden Rezeptoren ET_AR und ET_BR konnte in 22 bzw. 11 Fällen nachgewiesen werden. In vier Urothelkarzinomzelllinien konnte die mRNA von ET-1 und ET_AR, nicht aber von ET_BR aufgezeigt werden. Weiterhin wurde auch in dieser Studie eine immunhistochemische Färbung durchgeführt, mit ebenfalls steigender Expression von ET-1 mit 7, über ET_AR mit 13 zu ET_BR mit 18 positiven Ergebnissen. Eine immunhistochemische Anfärbung fand sich in dieser Arbeit ebenfalls nur im Zytoplasma der Tumorzellen, nicht aber in normalem Urothelgewebe [184].

Unsere Arbeit bestätigt bereits publizierte Daten bezüglich des Vorkommens der ET-Achse in anderen Tumorentitäten. In mehreren untersuchten Karzinomen ist bereits

gezeigt worden, dass die ET-Achse in die Karzinogenese involviert ist, indem sie Apoptose, Angiogenese und die Proliferation beeinflusst [118].

Nelson et al. waren die erste Forschungsgruppe, die eine Überexprimierung der Endothelin-Achse in Prostatakarzinomzellen im Vergleich zu normalem Prostatagewebe aufdeckten [123]. Alle von ihnen untersuchten Prostatakarzinomzelllinien produzierten ET-1-mRNA, und alle der untersuchten primären Prostatakarzinome, sowie 14 von 16 untersuchter Prostatametastasen wiesen homogene ET-1-Expressionen in der immunhistochemischen Färbung auf. *In vitro* stellte sich ET-1 als Mitogen für Prostatakarzinomzellen dar. Dieser Effekt war *in vivo* nicht so stark darstellbar, aber ET-1 wies synergistische Effekte mit anderen Wachstumsfaktoren in bestimmten Prostatakarzinomzelllinien auf. Im Rattenmodell induzierte ET-1 die schnelle Tyrosinphosphorylierung von EGFR, auch wenn EGF nicht vorhanden war.

Dieselben Autoren postulierten, dass Endothelin-1 eine Rolle als Mediator der osteoblastischen Reaktion beim metastasierenden Prostatakarzinom spielt. ET-1 inhibiert die Osteoklastenfunktion und nach Zugabe von exogenem ET-1 konnten Nelson et al. eine Erhöhung der alkalischen Phosphatase, einem Markerprotein für den Knochenaufbau, messen [123]. Im Mausmodell konnten sie zeigen, dass die Knochenneubildung mithilfe eines selektiven ET_ARezeptorantagonisten gesenkt werden konnte [125].

Bei Untersuchungen an verschiedenen Ovarialkarzinomzelllinien konnten Moraitis et al. die mögliche autokrine Wachstumsförderung der Tumorzellen durch ET-1 darstellen [112]. Beim Vergleich von normalen Ovarialzellen zu Ovarialkarzinomzellen fanden Bagnato et al. eine 90%ige mRNA-Expression von ET-1 in den malignen Zellen. Für ET_AR ergab sich eine Expression von 84%, für ET_BR nur in 50% der untersuchten Präparate. Weiterhin konnten Bagnato et al. darstellen, dass sich das Tumorstadium durch einen selektiven ET_ARezeptorantagonisten, nicht aber durch einen ET_B-Rezeptorantagonisten, inhibieren liess [11]. Dies veranlasste sie zu der Vermutung, dass das Tumorstadium über eine ET-1- ET_AR-Achse vermittelt würde.

Interessanterweise scheint es eine unterschiedliche quantitative Verteilung der beiden Rezeptoren für ET-1 in den verschiedenen bisher untersuchten Tumorentitäten zu

geben: Die meisten Tumore zeigen eine Überexprimierung beider Rezeptoren, beim Melanom hingegen ist ET_A R downreguliert [118]. Weiterhin ist der im normalen Prostatagewebe vorherrschende ET_B Rezeptor in den Prostatakarzinomgeweben nur vermindert darstellbar. Da ET_B R für den Abbau von ET-1 verantwortlich ist, kann dies die erhöhten ET-1-Konzentrationen in malignem Prostatagewebe erklären. Die Zugabe eines selektiven ET_A -Rezeptorantagonisten verminderte das ET-1-vermittelte Tumorwachstum [118]. Wie bereits beschrieben, ist auch beim Ovarialkarzinom ET_A R der dominierende Rezeptor [118].

Beim Prostatakarzinom und Ovarial-Ca geht die ET_A R-Hochregulation zusätzlich mit einer verminderten Expression des ET_B R einher. Ein Erklärungsansatz für dieses Phänomen könnte eine relativ verstärkte Methylierung des ET_B R-Gens sein, die zu einer downregulation der Transkription des ET_B R-Proteins führt [132].

In unserer Studie, stellten wir mittels immunhistochemischer Färbetechniken fest, dass beide Rezeptoren in Bläsentumorgewebe exprimiert werden, wobei die Expression von ET_B R stärker ausgeprägt war. Inwieweit diese höhere Expressionsdichte des ET_B -Rezeptors eine signifikante biochemische Funktion beim Harnblasenkarzinom hat, bleibt weiterhin unklar und muss in weiteren Studien evaluiert werden.

Eine ET_B R-Überexpression wurde auch in anderen Tumoren berichtet, so z.B. durch verschiedene unabhängige Forschungsgruppen, die das maligne Melanom untersucht haben. Ähnlich unserer Studie wurde in Melanomzellen eine erhöhte Expressierung des ET_B Rezeptors festgestellt. In einer Studie mit 159 Fällen fand die Forschungsgruppe um Demunter et al. mithilfe immunhistochemischer und RT-PCR-Untersuchungen eine starke ET_B R-Expression in gewöhnlichen Naevi, sowie in noch höheren Konzentrationen in dysplastischen Naevi und primären malignen Melanomen sowie in metastasierenden Melanomen. Die Expressionsrate von ET_A R war hingegen zu vernachlässigen [10,35]. Vor kurzem konnte die Arbeitsgruppe um Bagnato et al. den ET_B Rezeptor als neuen Marker identifizieren, der mit einem aggressiven Phänotyp in Melanomzellen assoziiert ist [10]. Weiterhin konnten sie mit immunhistochemischen und RT-PCR-Untersuchungen zeigen, dass ET_B R ein Progressionsmarker ist, der signifikant inhibiert werden kann durch A-192621, einem selektiven ET_B R-Inhibitor.

Dies bedeutet, dass der ET_BRezeptor als molekulares Angriffsziel für die Behandlung maligner Melanome in der Zukunft dienen kann. Diese Ergebnisse wurden durch Experimente mit einem selektiven ET_BR-Antagonisten (BQ788), der das Melanomwachstum in vitro und in vivo hemmte, noch verifiziert [101].

Das Zervixkarzinom ist oft assoziiert mit humanen Papillomaviren (HPV). Venuti et al. untersuchten den Zusammenhang zwischen dem Endothelin-System und dem HPV-assoziierten Zervixkarzinom und stellten fest, dass Endothelin-1 von den HPV-befallenen Keratinozyten produziert wird und das Zellwachstum in diesen Zelllinien induziert, im Gegensatz zu normalen Zelllinien. Alle HPV-positiven Karzinome produzierten ET-1 und exprimierten mRNA für ET-1 und für beide seine Rezeptoren, wobei HPV-negative Karzinomzelllinien nur ET_BR-mRNA exprimierten und kein ET-1 synthetisierten. Weitergehende Studien präsentierten, dass in HPV-assoziierten Zellen eine Überexprimierung von ET_AR vorlag [173]. Im Mausmodell konnte die Tumorprogressivität und die Angiogenese mit Atrasentan, einem selektiven ET_AR-Antagonisten gestoppt werden. ET_BR-Antagonisten hatten keinen Effekt. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass ET-1 Einfluss auf die Progression neoplastischer Zellen HPV-assoziiierter Karzinome, bei denen ET_AR überexprimiert ist, nimmt. Somit stellt die ET-Achse einen Angriffspunkt für eine molekulare Antitumor-Therapie dar [7].

Die Hinweise, dass ET als autokriner bzw. parakriner Wachstumsfaktor in verschiedenen humanen Tumoren wirkt, häufen sich, so auch bei Meningeomen und Glioblastomen. Kapillarendothelzellen, Neurone, und reaktive Astrozyten produzieren und sekretieren ET. Egidy et al. [41] untersuchten verschiedene primäre Tumoren des ZNS, hauptsächlich aber das Glioblastom, bezüglich einer Expressierung von ET-1 in Kombination mit TGF- β . Sie bestimmten zuerst die zelluläre Expressionsrate der ET-1-mRNA in humanen Glioblastomgeweben und in Zelllinien. Interessant war die Feststellung, dass die beiden Rezeptoren in verschiedenen Geweben unterschiedlich stark exprimiert wurden. So fand sich eine Erhöhung des PPET-1, des ECE-1 und des ET_AR in Glioblastomgefäßzellen, in den Tumorzellen aber hauptsächlich eine Erhöhung von ET_BR. Durch andere Forschungsgruppen wurde im normalen zerebralen Kortex, sowie in Meningeomen ET_AR als dominanter Rezeptor identifiziert.

Zusätzlich wurde festgestellt, dass eine Erhöhung des ET direkt mit einer Angiogenese im Tumorgewebe einhergeht und mit dem histologischen Differenzierungsgrad korrelierbar ist [41]. Weil ET mitogene Effekte auf endotheliale sowie auf vaskuläre glatte Muskelzellen besitzt, unterstützt dies die These, dass ET ein parakriner/autokriner Wachstumsfaktor ist. Somit besteht die Möglichkeit mittels Manipulation der ET-Rezeptoren, in Glioblastomen die Neovaskularisierung, den Blutfluss sowie die Replikation der Gliazellen positiv zu beeinflussen.

In unserer Studie konnten wir keine signifikante Assoziation zwischen der ET-Expression und „klassischen“ Prognosefaktoren, wie dem Patientenalter, der Tumorausdehnung, dem Lymphknotenstatus oder dem Metastasenstatus aufdecken [185]. Die exakte physiologische Rolle des Peptides Endothelin im Harnblasenkarzinom bleibt weiterhin unklar. Aufgrund der Funktion des ET als autokriner Faktor mit mitogener Aktivität, könnte es teilhaben an einer Entwicklung des Tumorwachstums in der Harnblase, wie es bereits für andere Tumorarten postuliert wurde. Bis jetzt gibt es keinen Beweis für die These, dass ET einen direkten Einfluss auf die Karzinogenese hat, obwohl es genügend Beweise gibt, dass ET direkt die DNA-Synthese stimuliert [164]. Für Endothelin wurde der mitogene Effekt auf Fibroblasten [133,166], Melanozyten [101], glatten Muskelzellen und auf das Endothel *in vitro* belegt [164]. Ebenso führt die Aktivierung von ET-Rezeptor-gekoppelten Stoffwechselwegen in glatten Muskelzellen und Swiss-3T3-Zellen zu einer gesteigerten Expression der Protoonkogene *c-fos* und *c-myc* [23,160,166]. Weiterhin wurde aufgedeckt, dass ET-1 die Expression von Plasminogenaktivator und wahrscheinlich von Kollagenase Typ IV induziert. Beide Enzyme können das Durchbrechen von Basalmembranen ermöglichen.

Den Einfluss der ET-Achse auf die Apoptose wurde zuerst von WuWong et al. beschrieben. Sie konnten als erste den Beweis erbringen, dass ET-1 die Fähigkeit besitzt Rattenfibroblasten und menschliche Endothelzellen vor dem programmierten Zelltod, der Apoptose, zu schützen [182]. Peduto Eberl et al. untersuchten die Expression von ET-1 und Fas/FasL im Kolonkarzinom. Sie zeigten, dass eine Inhibierung von ET-1 zu einer Steigerung der FasL-vermittelten Apoptose in humanen Kolonkarzinomzellen führte [137]. Dieselben Autoren erbrachten in einer neueren Studie den Beweis, das

Bosentan ein gemischter Rezeptorantagonist, der sowohl auf ET_AR als auch auf ET_BR wirkt, nicht signifikant die Fas, FLIP oder Caspase-8- Expression inhibierte, was zu der Annahme führte, dass die Apoptose nicht via den Fas/FasL-Stoffwechselweg durch ET beeinflusst wird [136].

Es wurden bisher viele Details über die Apoptose und die Angiogenese im Blasenkarzinom entdeckt, aber bis dato hat sich aus diesen Forschungen kein therapeutischer Nutzen ergeben. Man stimmt aber darin überein, dass die Angiogenese einen wichtigen Einfluss auf den Übergang vom oberflächlichem Blasenkarzinom hin zu invasiven und metastatischen Stadien hat [162].

Aufgrund dieses Wissens wurde der Einfluss von ET-1 und seinen Rezeptoren auf die tumorassoziierte Angiogenese näher untersucht. ET-1 stellte sich als starkes Mitogen für endotheliale und glatte Muskelzellen *in vitro* heraus, und es steigerte die Endothelzellproliferation, indem es VEGF, einen vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor, induzierte [135]. Stiles et al. fanden bei ihren Untersuchungen von humanen Gliomblastomen heraus, dass ET-1 und ET-3 über ET_AR und ET_BR mittels einer Proteinkinase C die Synthese von VEGF aus glatter Gefäßmuskulatur induzierten. VEGF ist ein gut untersuchter und wichtiger Mediator der Angiogenese. Mithilfe von selektiven Rezeptorantagonisten für ET_AR (BQ-123) und für ET_BR (IRL-1038) konnte die VEGF-Synthese inhibiert werden.

Ebenso wurden in Mammakarzinomen erhöhte Expressionen der ET-Achse assoziiert mit einer gesteigerten VEGF-Expression und einer verstärkten Vaskularisierung des Tumorgewebes durch die Forschungsgruppe um Wülfing et al. beschrieben [186].

ET-1 kann weiterhin verschiedene andere Wachstumsfaktoren, die einen proangiogenetischen Effekt haben, in ihrer Wirksamkeit verstärken, so z.B. PDGF. Im Rattenmodell konnte nachgewiesen werden, dass es die Angiogenese in der Kornea steigerte [19].

4.2 ET_BR als prognostischer Parameter

In unseren experimentellen Untersuchungen prüften wir mithilfe der aus dem Follow-up gewonnenen Daten, ob ET_BR eine prognostische Aussagekraft für Patienten mit Blasenkarzinom hat. Interessant erscheint die Parallele zu Befunden an Melanomengeweben, in dem ebenfalls eine deutlich erhöhte ET_BRezeptordichte gemessen wurde [35]. Im Unterschied zu unseren Untersuchungen, ergab sich bei den Melanomen aber eine schlechte Prognose bei erhöhter ET_BR-Dichte. Interessanterweise konnten wir zeigen, dass, im Gegensatz zu Melanomen, die erhöhte Expressionsdichte von ET_BR assoziiert ist mit verschiedenen Parametern, die für weniger maligne Tumoren und für eine bessere Prognose sprechen. Als wir die Überlebenszeiten mit bestimmten Untergruppen für pathologische und klinische Parameter korrelierten, zeigten Patienten mit einer positiven ET_BR-Expression eine längere rezidivfreie Überlebenszeit. Aus diesem Grund scheint es, dass ET_BR eine Rolle in der Zelldifferenzierung des Blasenkarzinoms spielt: sein Verlust könnte zu einer schlechteren Differenzierung der Tumorzellen führen, welches assoziiert ist mit schlechteren Parametern, wie z.B. höherem Tumor-Stadium, höherem histologischem Grading und Tumorprogression.

Unseren Ergebnissen zufolge haben Patienten mit einer positiven ET_BR-Expression insgesamt eine bessere Prognose als Patienten ohne ET_BR-Expression.

Wir korrelierten verschiedene klinische und pathologische Parameter mit der Expression von ET_BR und der Überlebenszeit: In der Gruppe von Patienten mit organbezogenen Tumoren (\leq pT2) hatten die Patienten mit positiver ET_BR-Expression ein mittleres Überleben von 96 Monaten, Patienten ohne ET_BR-Expression lebten im Mittel 13 Monate, dies ergibt eine statistische Signifikanz mit einem $p=0,0001$ (siehe auch Tabelle 3.9).

Bei der Untergruppe von Patienten mit gut und mittelmässig differenzierten Tumoren (G1, G2) ergab sich ein $p=0,07$ und bei Patienten ohne gefässinvasiven Primärtumor ein $p=0,05$.

Auch bei ET_BR-positiven Patienten, die lokale Rezidive während des Follow-up ausbildeten, war die rezidivfreie Überlebenszeit mit 32 Monaten signifikant höher, als

bei Patienten mit negativer ET_BR-Expression und einer durchschnittlichen rezidivfreien Überlebenszeit von 12 Monaten (p=0.03).

Es muss aber hinzugefügt werden, dass die beiden untersuchten Kollektive bezüglich der niedrigmalignen Tumorgrade (T1+T2), und der guten bis mittelmässigen Differenzierungsgrade (G1-G2) mit 34 Patienten bzw. mit 40 Patienten, relativ klein sind, und somit nur bedingt statistische Schlüsse gezogen werden dürfen. Dieser geringe Anteil an niedrigen Tumorstadien bzw. gut differenzierten Tumoren, ist damit zu erklären, dass es sich bei dem untersuchten Kollektiv um zystektomierte Patienten handelt, die in der Mehrzahl fortgeschrittenere T-Stadien mit schlechtem histologischem Differenzierungsgrad aufweisen, weil es bei Patienten mit niedrigem T- und G-Stadium alternative Behandlungsmöglichkeiten gibt (siehe Kapitel 1.1.7 „Therapie“).

Beim Harnblasenkarzinom könnte die vermehrte ET_B-Rezeptorexpression Faktoren wie Sekretion, Funktion und Elimination des ET-1 beeinflussen. So wird beispielsweise bei Ratten zumindest die Elimination des zirkulierenden ET-1 über ET_B-Rezeptoren vermittelt. Durch einen selektiven ET_B-Rezeptorantagonisten lässt sich die Bindung von [¹²⁵J]ET-1 *in vivo* inhibieren und die Infusion eines ET_B-Rezeptorantagonisten führt zu signifikant erhöhten ET-1-Plasmakonzentrationen [48]. Weiterhin könnte durch autokrines Feedback die ET-1-Produktion durch den ET_B-Rezeptor vermindert werden [177]. An humanen Keratinozyten konnte beobachtet werden, dass sie ausschliesslich ET_B-Rezeptoren besitzen und durch exogenes ET-1 in ihrer ET-1-Sekretion inhibiert werden [192]. Erklärt werden können diese Befunde durch eine Hemmung des ECE und dadurch vermittelte ET-1-Synthese [116]. Im Blasenkarzinom könnte in diesem Sinne durch die vermehrte ET_B-Rezeptordichte eine verminderte ECE-Aktivität bestehen, die einen erniedrigten ET-1/Prä-ET-1-Quotienten verursachen würde. Die vermehrten ET_B-Rezeptoren könnten sowohl über die veränderte ET-Regulation als auch über andere Mechanismen die Tumorprogression vermindern.

Die vasodilatatorische Wirkung der Endotheline wurde in Verbindung mit NO gebracht, dessen Produktion durch ET_BR vermittelt wird, und gleichzeitig der ET_AR-induzierten Vasokonstriktion entgegenwirkt [64,178]. NO wurde als Gegenspieler von ET-1 charakterisiert und intensiv erforscht. Man fand heraus, dass NO nicht nur den ET-1

abhängigen Gefäßtonus reguliert, sondern auf verschiedenen Ebenen angreift. NO antagonisiert die ET-Rezeptorbindung und den daraus folgenden Kalziumanstieg, sowie die endotheliale ET-Sekretion [24,52]. Die genaue Rolle des NO ist bis dato unerkannt, obwohl es Hinweise auf wachstumshemmende Wirkungen gibt. Durch NO wird die Zytotoxizität [32] und Apoptose [84] [47] *in vitro* induziert, während *in vivo* sowohl Hemmung von Metastasenwachstum als auch Tumorwachstumsförderung beschrieben wurde [73,187]. Ähnliche Phänomene wären im Harnblasenkarzinom aufgrund vermehrter ET_B-Rezeptor-vermittelter NO-Synthese denkbar. Um weitere Klarheit über die Funktion des ET_B-Rezeptors bei Blasentumoren und seine Rolle als prognostischer Parameter zu erhalten, sollten weiterführende Studien am Urothelkarzinom initiiert werden.

5 Literaturverzeichnis

1. American Cancer Society: Cancer Statistics 2004, www.cancer.org. Edited.
2. Ahmed, S. I.; Thompson, J.; Coulson, J. M.; and Woll, P. J. (2000) Studies on the expression of endothelin, its receptor subtypes, and converting enzymes in lung cancer and in human bronchial epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 22(4): 422-31.
3. Alam, A. S. et al. (1992) Endothelin inhibits osteoclastic bone resorption by a direct effect on cell motility: implications for the vascular control of bone resorption. *Endocrinology*, 130(6): 3617-24.
4. Althausen AF, P. G. J., Daly JJ (1976) Noninvasive papillary carcinoma of the bladder associated with carcinoma in situ. *J Urol* 1976;116:575.
5. Arai, H.; Hori, S.; Aramori, I.; Ohkubo, H.; and Nakanishi, S. (1990) Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature*, 348(6303): 730-2.
6. Augustine, A.; Hebert, J. R.; Kabat, G. C.; and Wynder, E. L. (1988) Bladder cancer in relation to cigarette smoking. *Cancer Res*, 48(15): 4405-8.
7. Bagnato, A.; Cirilli, A.; Salani, D.; Simeone, P.; Muller, A.; Nicotra, M. R.; Natali, P. G.; and Venuti, A. (2002) Growth inhibition of cervix carcinoma cells in vivo by endothelin A receptor blockade. *Cancer Res*, 62(22): 6381-4.
8. Bagnato, A., and Natali, P. G. (2004) Endothelin receptors as novel targets in tumor therapy. *J Transl Med*, 2(1): 16.
9. Bagnato, A., and Natali, P. G. (2004) Targeting endothelin axis in cancer. *Cancer Treat Res*, 119: 293-314.
10. Bagnato, A.; Rosano, L.; Spinella, F.; Di Castro, V.; Tecce, R.; and Natali, P. G. (2004) Endothelin B receptor blockade inhibits dynamics of cell interactions and communications in melanoma cell progression. *Cancer Res*, 64(4): 1436-43.
11. Bagnato, A.; Salani, D.; Di Castro, V.; Wu-Wong, J. R.; Tecce, R.; Nicotra, M. R.; Venuti, A.; and Natali, P. G. (1999) Expression of endothelin 1 and endothelin A receptor in ovarian carcinoma: evidence for an autocrine role in tumor growth. *Cancer Res*, 59(3.): 720-7.

12. Bagnato, A.; Tecce, R.; Di Castro, V.; and Catt, K. J. (1997) Activation of mitogenic signaling by endothelin 1 in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res*, 57(7): 1306-11.
13. Bagnato, A.; Venuti, A.; Di Castro, V.; and Marcante, M. L. (1995) Identification of the ETA receptor subtype that mediates endothelin induced autocrine proliferation of normal human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 209(1): 80-6.
14. Barentsz, J. O.; Jager, G. J.; Witjes, J. A.; and Ruijs, J. H. (1996) Primary staging of urinary bladder carcinoma: the role of MRI and a comparison with CT. *Eur Radiol*, 6(2): 129-33.
15. Battistini, B.; Chailler, P.; D'Orleans-Juste, P.; Briere, N.; and Sirois, P. (1993b) Growth regulatory properties of endothelins. *Peptides*, 14(2): 385-99.
16. Battistini, B.; D'Orleans-Juste, P.; and Sirois, P. (1993a) Endothelins: circulating plasma levels and presence in other biologic fluids. *Lab Invest*, 68(6): 600-28.
17. Bax, W. A., and Saxena, P. R. (1994) The current endothelin receptor classification: time for reconsideration? *Trends Pharmacol Sci*, 15(10): 379-86.
18. Bejany, D. E.; Lockhart, J. L.; and Rhamy, R. K. (1987) Malignant vesical tumors following spinal cord injury. *J Urol*, 138(6): 1390-2.
19. Bek, E. L., and McMillen, M. A. (2000) Endothelins are angiogenic. *J Cardiovasc Pharmacol*, 36(5 Suppl 1): S135-9.
20. Berger, G. L.; Sadlowski, R. W.; Sharpe, J. R.; and Finney, R. P. (1981) Lack of value of routine preoperative bone and liver scans in cystectomy candidates. *J Urol*, 125(5): 637-9.
21. Bichler, K.-H.; Becker, G.; Bokemeyer, C.; Braunwald, H.; and Buck, G. (2000) Harnblasenkarzinom-Empfehlungen zur Diagnose, Therapie und Nachsorge. *Interdisziplinäres Tumorzentrum Klinikum Eberhard-Karls-Universität Tübingen*: 9-20.
22. Bloch, K. D.; Friedrich, S. P.; Lee, M. E.; Eddy, R. L.; Shows, T. B.; and Quertermous, T. (1989b) Structural organization and chromosomal assignment of the gene encoding endothelin. *J Biol Chem*, 264(18): 10851-7.

23. Bobik, A.; Grooms, A.; Millar, J. A.; Mitchell, A.; and Grinpukel, S. (1990) Growth factor activity of endothelin on vascular smooth muscle. *Am J Physiol*, 258(3 Pt 1): C408-15.
24. Boulanger, C., and Luscher, T. F. (1990) Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest*, 85(2): 587-90.
25. Boulanger, C. M.; Tanner, F. C.; Bea, M. L.; Hahn, A. W.; Werner, A.; and Luscher, T. F. (1992) Oxidized low density lipoproteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium. *Circ Res*, 70(6): 1191-7.
26. Boyce, B. F.; Yoneda, T.; and Guise, T. A. (1999) Factors regulating the growth of metastatic cancer in bone. *Endocr Relat Cancer*, 6(3): 333-47.
27. Burch, J. D.; Rohan, T. E.; Howe, G. R.; Risch, H. A.; Hill, G. B.; Steele, R.; and Miller, A. B. (1989) Risk of bladder cancer by source and type of tobacco exposure: a case-control study. *Int J Cancer*, 44(4): 622-8.
28. Buy, J. N.; Moss, A. A.; Guinet, C.; Ghossain, M. A.; Malbec, L.; Arrive, L.; and Vadrot, D. (1988) MR staging of bladder carcinoma: correlation with pathologic findings. *Radiology*, 169(3): 695-700.
29. Carducci, M. A. et al. (2002) Atrasentan, an endothelin-receptor antagonist for refractory adenocarcinomas: safety and pharmacokinetics. *J Clin Oncol*, 20(8): 2171-80.
30. Carducci, M. A. et al. (2003) Effect of endothelin-A receptor blockade with atrasentan on tumor progression in men with hormone-refractory prostate cancer: a randomized, phase II, placebo-controlled trial. *J Clin Oncol*, 21(4): 679-89.
31. Clozel, M. et al. (1994) Pharmacological characterization of bosentan, a new potent orally active nonpeptide endothelin receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*, 270(1): 228-35.
32. Corasaniti, M. T.; Melino, G.; Tartaglia, R. L.; Finazzi-Agro, A.; and Nistico, G. (1994) N-methyl-D-aspartate-induced excessive formation of nitric oxide in CHP100 neuroblastoma cells produces death of BMEL melanoma cells in co-culture. *Neuropharmacology*, 33(9): 1071-7.

33. Costello, A. J.; Tiptaft, R. C.; England, H. R.; and Blandy, J. P. (1984) Squamous cell carcinoma of bladder. *Urology*, 23(3): 234-6.
34. Davey, P.; Merrick, M. V.; Duncan, W.; and Redpath, A. T. (1985) Bladder cancer: the value of routine bone scintigraphy. *Clin Radiol*, 36(1): 77-9.
35. Demunter, A.; De Wolf-Peeters, C.; Degreef, H.; Stas, M.; and van den Oord, J. (2001) Expression of the endothelin-B receptor in pigment cell lesions of the skin. Evidence for its role as tumor progression marker in malignant melanoma. *Virchows Arch*, 438(5): 485-91.
36. DEUTSCHE-KREBSGESELLSCHAFT: Kurzgefasste interdisziplinäre Leitlinien (2004) 3. Aufl. sowie <http://www.leitlinien.net>. Edited, 2004.
37. Dupuis, J.; Stewart, D. J.; Cernacek, P.; and Gosselin, G. (1996) Human pulmonary circulation is an important site for both clearance and production of endothelin-1. *Circulation*, 94(7): 1578-84.
38. Eberl, L. P.; Egidy, G.; Pinet, F.; and Juillerat-Jeanneret, L. (2000) Endothelin receptor blockade potentiates FasL-induced apoptosis in colon carcinoma cells via the protein kinase C-pathway. *J Cardiovasc Pharmacol*, 36(5 Suppl 1): S354-6.
39. Eberl, L. P.; Valdenaire, O.; Saintgiorgio, V.; Jeannin, J. F.; and Juillerat-Jeanneret, L. (2000) Endothelin receptor blockade potentiates FasL-induced apoptosis in rat colon carcinoma cells. *Int J Cancer*, 86(2): 182-7.
40. Edwards, P. D.; Hurm, R. A.; and Jaeschke, W. H. (1972) Conversion of cystitis glandularis to adenocarcinoma. *J Urol*, 108(4): 568-70.
41. Egidy, G. et al. (2000) The endothelin system in human glioblastoma. Production and secretion of endothelin-1 by cultured choroid plexus carcinoma cells. Correlation of endothelin-1 and transforming growth factor beta 1 with malignancy and vascularity in human gliomas. *Lab Invest*, 80(11): 1681-9.
42. El-Bolkainy, M. N.; Mokhtar, N. M.; Ghoneim, M. A.; and Hussein, M. H. (1981) The impact of schistosomiasis on the pathology of bladder carcinoma. *Cancer*, 48(12): 2643-8.
43. Endo, S.; Inooka, H.; Ishibashi, Y.; Kitada, C.; Mizuta, E.; and Fujino, M. (1989) Solution conformation of endothelin determined by nuclear magnetic resonance and distance geometry. *FEBS Lett*, 257(1): 149-54.

44. Filibeck, T.; Roessler, W.; Knuechel, R.; Straub, M.; Kiel, H. J.; and Wieland, W. F. (1999) Clinical results of the transurethral resection and evaluation of superficial bladder carcinomas by means of fluorescence diagnosis after intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid. *J Endourol*, 13(2): 117-21.
45. Filippatos, G. S.; Gangopadhyay, N.; Lalude, O.; Parameswaran, N.; Said, S. I.; Spielman, W.; and Uhal, B. D. (2001) Regulation of apoptosis by vasoactive peptides. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 281(4): L749-61.
46. Friedell, G. H.; Parija, G. C.; Nagy, G. K.; and Soto, E. A. (1980) The pathology of human bladder cancer. *Cancer*, 45(7 Suppl): 1823-31.
47. Fukuo, K.; Hata, S.; Suhara, T.; Nakahashi, T.; Shinto, Y.; Tsujimoto, Y.; Morimoto, S.; and Ogihara, T. (1996) Nitric oxide induces upregulation of Fas and apoptosis in vascular smooth muscle. *Hypertension*, 27(3 Pt 2): 823-6.
48. Fukuroda, T.; Fujikawa, T.; Ozaki, S.; Ishikawa, K.; Yano, M.; and Nishikibe, M. (1994) Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 199(3): 1461-5.
49. Giaid, A. et al. (1990) Detection of endothelin immunoreactivity and mRNA in pulmonary tumours. *J Pathol*, 162(1): 15-22.
50. Gohji, K.; Kitazawa, S.; Tamada, H.; Katsuoka, Y.; and Nakajima, M. (2001) Expression of endothelin receptor a associated with prostate cancer progression. *J Urol*, 165(3): 1033-6.
51. Goldie, R. G. (1999) Endothelins in health and disease: an overview. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 26(2): 145-8.
52. Goligorsky, M. S.; Tsukahara, H.; Magazine, H.; Andersen, T. T.; Malik, A. B.; and Bahou, W. F. (1994) Termination of endothelin signaling: role of nitric oxide. *J Cell Physiol*, 158(3): 485-94.
53. Gray, G. A., and Webb, D. J. (1996) The endothelin system and its potential as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Pharmacol Ther*, 72(2): 109-48.
54. Greene, L. F.; Hanash, K. A.; and Farrow, G. M. (1973) Benign papilloma or papillary carcinoma of the bladder? *J Urol*, 110(2): 205-7.
55. Greenlee, R. T.; Murray, T.; Bolden, S.; and Wingo, P. A. (2000) Cancer statistics, 2000. *CA Cancer J Clin*, 50(1): 7-33.

56. Griendling, K. K.; Tsuda, T.; and Alexander, R. W. (1989) Endothelin stimulates diacylglycerol accumulation and activates protein kinase C in cultured vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 264(14): 8237-40.
57. Hartmann, A.; Moser, K.; Kriegmair, M.; Hofstetter, A.; Hofstaedter, F.; and Knuechel, R. (1999) Frequent genetic alterations in simple urothelial hyperplasias of the bladder in patients with papillary urothelial carcinoma. *Am J Pathol*, 154(3): 721-7.
58. Helpap, B. (2002) [New WHO classification of urothelial carcinoma of the urinary bladder]. *Verh Dtsch Ges Pathol*, 86: 57-66.
59. Helpap, B. (1989) Pathologie der ableitenden Harnwege und der Prostata. *Springer, Berlin*.
60. Heney, N. M.; Ahmed, S.; Flanagan, M. J.; Frable, W.; Corder, M. P.; Hafermann, M. D.; and Hawkins, I. R. (1983) Superficial bladder cancer: progression and recurrence. *J Urol*, 130(6): 1083-6.
61. Herr, H. W. (1999) The value of a second transurethral resection in evaluating patients with bladder tumors. *J Urol*, 162(1): 74-6.
62. Herr, H. W.; Laudone, V. P.; and Whitmore, W. F., Jr. (1987) An overview of intravesical therapy for superficial bladder tumors. *J Urol*, 138(6): 1363-8.
63. Hicks, R. M.; Walters, C. L.; Elsebai, I.; Aasser, A. B.; Merzabani, M. E.; and Gough, T. A. (1977) Demonstration of nitrosamines in human urine: preliminary observations on a possible etiology for bladder cancer in association with chronic urinary tract infections. *Proc R Soc Med*, 70(6): 413-7.
64. Hirata, Y.; Emori, T.; Eguchi, S.; Kanno, K.; Imai, T.; Ohta, K.; and Marumo, F. (1993) Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells. *J Clin Invest*, 91(4): 1367-73.
65. Hoffman, D.; Masuda, Y.; and Wynder, E. L. (1969) Alpha-naphthylamine and beta-naphthylamine in cigarette smoke. *Nature*, 221(177): 255-6.
66. Howard, P. G.; Plumpton, C.; and Davenport, A. P. (1992) Anatomical localization and pharmacological activity of mature endothelins and their precursors in human vascular tissue. *J Hypertens*, 10(11): 1379-86.

67. Hueper, W.; Wiley, F.; and Wolfe, H. (1938) Experimental production of bladder tumours in dogs by administration of beta-naphthylamin. *J Indust Hyg Toxicol*, 20/1: 46.
68. Ihara, M. et al. (1992) Biological profiles of highly potent novel endothelin antagonists selective for the ETA receptor. *Life Sci*, 50(4): 247-55.
69. Inoue, A.; Yanagisawa, M.; Kimura, S.; Kasuya, Y.; Miyachi, T.; Goto, K.; and Masaki, T. (1989a) The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(8): 2863-7.
70. Inoue, A.; Yanagisawa, M.; Takuwa, Y.; Mitsui, Y.; Kobayashi, M.; and Masaki, T. (1989b) The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression. *J Biol Chem*, 264(25): 14954-9.
71. Itoh, Y. et al. (1988) Cloning and sequence analysis of cDNA encoding the precursor of a human endothelium-derived vasoconstrictor peptide, endothelin: identity of human and porcine endothelin. *FEBS Lett*, 231(2): 440-4.
72. Jakse, G.; Putz, A.; and Feichtinger, J. (1989) Cystectomy: the treatment of choice in patients with carcinoma in situ of the urinary bladder? *Eur J Surg Oncol*, 15(3): 211-6.
73. Jenkins, D. C. et al. (1995) Roles of nitric oxide in tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(10): 4392-6.
74. Jichlinski, P. et al. (1997) Clinical evaluation of a method for detecting superficial surgical transitional cell carcinoma of the bladder by light-induced fluorescence of protoporphyrin IX following the topical application of 5-aminolevulinic acid: preliminary results. *Lasers Surg Med*, 20(4): 402-8.
75. Kantor, A. F.; Hartge, P.; Hoover, R. N.; and Fraumeni, J. F., Jr. (1988) Epidemiological characteristics of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the bladder. *Cancer Res*, 48(13): 3853-5.
76. Kantor, A. F.; Hartge, P.; Hoover, R. N.; Narayana, A. S.; Sullivan, J. W.; and Fraumeni, J. F., Jr. (1984) Urinary tract infection and risk of bladder cancer. *Am J Epidemiol*, 119(4): 510-5.

77. Karne, S.; Jayawickreme, C. K.; and Lerner, M. R. (1993) Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ETC receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J Biol Chem*, 268(25): 19126-33.
78. Kasuya, Y.; Kobayashi, H.; and Uemura, H. (1991) Endothelin-like immunoreactivity in the nervous system of invertebrates and fish. *J Cardiovasc Pharmacol*, 17 Suppl 7: S463-6.
79. Kasuya, Y.; Takuwa, Y.; Yanagisawa, M.; Kimura, S.; Goto, K.; and Masaki, T. (1989) Endothelin-1 induces vasoconstriction through two functionally distinct pathways in porcine coronary artery: contribution of phosphoinositide turnover. *Biochem Biophys Res Commun*, 161(3): 1049-55.
80. Kikuchi, K.; Nakagawa, H.; Kadono, T.; Etoh, T.; Byers, H. R.; Mihm, M. C.; and Tamaki, K. (1996) Decreased ET(B) receptor expression in human metastatic melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 219(3): 734-9.
81. Kimura, S.; Kasuya, Y.; Sawamura, T.; Shinimi, O.; Sugita, Y.; Yanagisawa, M.; Goto, K.; and Masaki, T. (1989) Conversion of big endothelin-1 to 21-residue endothelin-1 is essential for expression of full vasoconstrictor activity: structure-activity relationships of big endothelin-1. *J Cardiovasc Pharmacol*, 13 Suppl 5: S5-7; discussion S18.
82. Kimura, S.; Kasuya, Y.; Sawamura, T.; Shinmi, O.; Sugita, Y.; Yanagisawa, M.; Goto, K.; and Masaki, T. (1988) Structure-activity relationships of endothelin: importance of the C-terminal moiety. *Biochem Biophys Res Commun*, 156(3): 1182-6.
83. Kiowski, W.; Sutsch, G.; Hunziker, P.; Muller, P.; Kim, J.; Oechslin, E.; Schmitt, R.; Jones, R.; and Bertel, O. (1995) Evidence for endothelin-1-mediated vasoconstriction in severe chronic heart failure. *Lancet*, 346(8977): 732-6.
84. Kitajima, I.; Kawahara, K.; Nakajima, T.; Soejima, Y.; Matsuyama, T.; and Maruyama, I. (1994) Nitric oxide-mediated apoptosis in murine mastocytoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 204(1): 244-51.
85. Kloog, Y.; Ambar, I.; Sokolovsky, M.; Kochva, E.; Wollberg, Z.; and Bdolah, A. (1988) Sarafotoxin, a novel vasoconstrictor peptide: phosphoinositide hydrolysis in rat heart and brain. *Science*, 242(4876): 268-70.

86. Kon, V., and Fogo, A. (1993) Endothelin: potential role in development and disease. *Pediatr Nephrol*, 7(6): 876-80.
87. Koss, J. C.; Arger, P. H.; Coleman, B. G.; Mulhern, C. B., Jr.; Pollack, H. M.; and Wein, A. J. (1981) CT staging of bladder carcinoma. *AJR Am J Roentgenol*, 137(2): 359-62.
88. Koss, L. G.: Tumors of the urinary bladder. In *Atlas of Tumor Pathology*, pp. 1. Edited, 1, Washington, DC, Armed Forces Institute of Pathology, 1975.
89. Koss LG, E. M., Robbins MA (1974) Mapping cancerous and precancerous bladder changes: A study of the urothelium in ten surgically removed bladders. *JAMA* 1974;227:281.
90. Kramer, B. K.; Nishida, M.; Kelly, R. A.; and Smith, T. W. (1992) Endothelins. Myocardial actions of a new class of cytokines. *Circulation*, 85(1): 350-6.
91. Kriegmair, M.; Waidelich, R.; Lumper, W.; Ehsan, A.; Baumgartner, R.; and Hofstetter, A. (1995) Integral photodynamic treatment of refractory superficial bladder cancer. *J Urol*, 154(4): 1339-41.
92. Kriegmair, M.; Zaak, D.; Knuechel, R.; Baumgartner, R.; and Hofstetter, A. (1999) 5-Aminolevulinic acid-induced fluorescence endoscopy for the detection of lower urinary tract tumors. *Urol Int*, 63(1): 27-31.
93. Kriegmair, M.; Zaak, D.; Rothenberger, K. H.; Rassweiler, J.; Jocham, D.; Eisenberger, F.; Tauber, R.; Stenzl, A.; and Hofstetter, A. (2002) Transurethral resection for bladder cancer using 5-aminolevulinic acid induced fluorescence endoscopy versus white light endoscopy. *J Urol*, 168(2): 475-8.
94. Kriegmair, M.; Zaak, D.; Stepp, H.; Baumgartner, R.; Knuechel, R.; and Hofstetter, A. (1999) Transurethral resection and surveillance of bladder cancer supported by 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence endoscopy. *Eur Urol*, 36(5): 386-92.
95. Kuchan, M. J., and Frangos, J. A. (1993) Shear stress regulates endothelin-1 release via protein kinase C and cGMP in cultured endothelial cells. *Am J Physiol*, 264(1 Pt 2): H150-6.
96. Kunze, E. (1998) Formale Pathogenese des Harnblasenkarzinoms. *Bichler, K-H, Wilbert D, Wechsel H W, Strohmeier, WL, Einhorn-Pressse Verlag, Reinbeck.*

97. Kurihara, Y.; Kurihara, H.; Maemura, K.; Kuwaki, T.; Kumada, M.; and Yazaki, Y. (1995) Impaired development of the thyroid and thymus in endothelin-1 knockout mice. *J Cardiovasc Pharmacol*, 26 Suppl 3: S13-6.
98. Kurihara, Y.; Kurihara, H.; Oda, H.; Maemura, K.; Nagai, R.; Ishikawa, T.; and Yazaki, Y. (1995) Aortic arch malformations and ventricular septal defect in mice deficient in endothelin-1. *J Clin Invest*, 96(1): 293-300.
99. Kurihara, Y. et al. (1994) Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. *Nature*, 368(6473): 703-10.
100. La, M., and Reid, J. (1995) Endothelin-1 and the regulation of vascular tone. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 22: 315-323.
101. Lahav, R.; Heffner, G.; and Patterson, P. H. (1999) An endothelin receptor B antagonist inhibits growth and induces cell death in human melanoma cells in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(20): 11496-500.
102. Landan, G.; Bdolah, A.; Wollberg, Z.; Kochva, E.; and Graur, D. (1991) Evolution of the sarafotoxin/endothelin superfamily of proteins. *Toxicon*, 29(2): 237-44.
103. Levin, E. R. (1995) Endothelins. *N Engl J Med*, 333(6): 356-63.
104. Liedl, B.; Zaak, D.; Schwaibold, H.; Hungerhuber, E.; Zimmermann, F.; Treiber, U.; and Weiss, M.: MANUAL Urogenitale Tumoren. pp. 1-49. Edited, 1-49, München, 2003.
105. Linn, J. F.; Sesterhenn, I.; Mostofi, F. K.; and Schoenberg, M. (1998) The molecular characteristics of bladder cancer in young patients. *J Urol*, 159(5): 1493-6.
106. Locke, J. R.; Hill, D. E.; and Walzer, Y. (1985) Incidence of squamous cell carcinoma in patients with long-term catheter drainage. *J Urol*, 133(6): 1034-5.
107. Lynch, C. F., and Cohen, M. B. (1995) Urinary system. *Cancer*, 75(1 Suppl): 316-29.
108. MacCumber, M. W.; Ross, C. A.; and Snyder, S. H. (1990) Endothelin in brain: receptors, mitogenesis, and biosynthesis in glial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(6): 2359-63.

109. Masaki, T.; Kimura, S.; Yanagisawa, M.; and Goto, K. (1991) Molecular and cellular mechanism of endothelin regulation. Implications for vascular function. *Circulation*, 84(4): 1457-68.
110. Matsumoto, H.; Suzuki, N.; Onda, H.; and Fujino, M. (1989) Abundance of endothelin-3 in rat intestine, pituitary gland and brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 164(1): 74-80.
111. Miller, V. M., and Burnett, J. C., Jr. (1992) Modulation of NO and endothelin by chronic increases in blood flow in canine femoral arteries. *Am J Physiol*, 263(1 Pt 2): H103-8.
112. Moraitis, S.; Langdon, S. P.; and Miller, W. R. (1997) Endothelin expression and responsiveness in human ovarian carcinoma cell lines. *Eur J Cancer*, 33(4): 661-8.
113. Morrison, A. S. (1984) Advances in the etiology of urothelial cancer. *Urol Clin North Am*, 11(4): 557-66.
114. Mostofi, F.; Davis, C. J.; and Sesterhenn, I.: Histological typing of urinary bladder tumours: World Health Organisation International histological classification of tumours. Edited, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, Springer, 1999.
115. Mundy, G. R. (2002) Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*, 2(8): 584-93.
116. Naomi, S.; Iwaoka, T.; Disashi, T.; Inoue, A.; Kanesaka, Y.; Tokunaga, H.; and Tomita, K. (1998) Endothelin-1 inhibits endothelin-converting enzyme-1 expression in cultured rat pulmonary endothelial cells. *Circulation* 97: 234-236.
117. Nelson, J.; Bagnato, A.; Battistini, B.; and Nisen, P. (2003) The endothelin axis: emerging role in cancer. *Nat Rev Cancer*, 3(2): 110-6.
118. Nelson, J.; Bagnato, A.; Battistini, B.; and Nisen, P. (2003) The endothelin axis: emerging role in cancer. *Nat Rev Cancer*, 3(2): 110-6.
119. Nelson, J. B. (2003) Endothelin inhibition: novel therapy for prostate cancer. *J Urol*, 170(6 Pt 2): S65-7; discussion S67-8.
120. Nelson, J. B. (2001) Endothelin receptor antagonists in the treatment of prostate cancer. *Prostate*, 49(2): 91-2.

121. Nelson, J. B.; Chan-Tack, K.; Hedican, S. P.; Magnuson, S. R.; Opgenorth, T. J.; Bova, G. S.; and Simons, J. W. (1996) Endothelin-1 production and decreased endothelin B receptor expression in advanced prostate cancer. *Cancer Res*, 56(4): 663-8.
122. Nelson, J. B.; Hedican, S. P.; George, D. J.; Reddi, A. H.; Piantadosi, S.; Eisenberger, M. A.; and Simons, J. W. (1995) Identification of endothelin-1 in the pathophysiology of metastatic adenocarcinoma of the prostate. *Nat Med*, 1(9): 944-9.
123. Nelson, J. B.; Hedican, S. P.; George, D. J.; Reddi, A. H.; Piantadosi, S.; Eisenberger, M. A.; and Simons, J. W. (1995) Identification of endothelin-1 in the pathophysiology of metastatic adenocarcinoma of the prostate. *Nat Med*, 1(9): 944-9.
124. Nelson, J. B.; Nabulsi, A. A.; Vogelzang, N. J.; Breul, J.; Zonnenberg, B. A.; Daliani, D. D.; Schulman, C. C.; and Carducci, M. A. (2003) Suppression of prostate cancer induced bone remodeling by the endothelin receptor A antagonist atrasentan. *J Urol*, 169(3): 1143-9.
125. Nelson, J. B.; Nguyen, S. H.; Wu-Wong, J. R.; Opgenorth, T. J.; Dixon, D. B.; Chung, L. W.; and Inoue, N. (1999) New bone formation in an osteoblastic tumor model is increased by endothelin-1 overexpression and decreased by endothelin A receptor blockade. *Urology*, 53(5): 1063-9.
126. Ong, A. C. (1996) Surprising new roles for endothelins. *Bmj*, 312(7025): 195-6.
127. Oosterlinck, W.; Lobel, B.; Jackse, G.; Malmstrom, P. U.; Stockle, M.; and Strenberg, C. (2002) [EAU Recommendations 2001. "Guidelines on bladder cancer"]. *Prog Urol*, 12(5): 1161-3.
128. Otto, T., and Rubben, H. (2004) [Prevention of bladder cancer]. *Urologe A*, 43(5): 562-4.
129. Ozen, H. (1998) Bladder cancer. *Curr Opin Oncol*, 10(3): 273-8.
130. Pagotto, U.; Arzberger, T.; Hopfner, U.; Weindl, A.; and Stalla, G. K. (1995) Cellular localization of endothelin receptor mRNAs (ETA and ETB) in brain tumors and normal human brain. *J Cardiovasc Pharmacol*, 26 Suppl 3: S104-6.
131. Panettieri, R. A., Jr.; Goldie, R. G.; Rigby, P. J.; Eszterhas, A. J.; and Hay, D. W. (1996) Endothelin-1-induced potentiation of human airway smooth muscle

- proliferation: an ETA receptor-mediated phenomenon. *Br J Pharmacol*, 118(1): 191-7.
132. Pao, M. M.; Tsutsumi, M.; Liang, G.; Uzvolgyi, E.; Gonzales, F. A.; and Jones, P. A. (2001) The endothelin receptor B (EDNRB) promoter displays heterogeneous, site specific methylation patterns in normal and tumor cells. *Hum Mol Genet*, 10(9): 903-10.
133. Patel, K. V., and Schrey, M. P. (1996) Endothelins in breast cancer. *Cancer Treat Res*, 83: 369-94.
134. Pectasides, D.; Pectasides, M.; and Nikolaou, M. (2005) Adjuvant and neoadjuvant chemotherapy in muscle invasive bladder cancer: literature review. *Eur Urol*, 48(1): 60-7; discussion 67-8.
135. Pedram, A.; Razandi, M.; Hu, R. M.; and Levin, E. R. (1997) Vasoactive peptides modulate vascular endothelial cell growth factor production and endothelial cell proliferation and invasion. *J Biol Chem*, 272(27): 17097-103.
136. Peduto Eberl, L.; Bovey, R.; and Juillerat-Jeanneret, L. (2003) Endothelin-receptor antagonists are proapoptotic and antiproliferative in human colon cancer cells. *Br J Cancer*, 88(5): 788-95.
137. Peduto Eberl, L.; Guillou, L.; Saraga, E.; Schroter, M.; French, L. E.; Tschopp, J.; and Juillerat-Jeanneret, L. (1999) Fas and Fas ligand expression in tumor cells and in vascular smooth-muscle cells of colonic and renal carcinomas. *Int J Cancer*, 81(5): 772-8.
138. Pirtskhalaishvili, G., and Nelson, J. B. (2000) Endothelium-derived factors as paracrine mediators of prostate cancer progression. *Prostate*, 44(1): 77-87.
139. Plumpton, C.; Ashby, M. J.; Kuc, R. E.; O'Reilly, G.; and Davenport, A. P. (1996) Expression of endothelin peptides and mRNA in the human heart. *Clin Sci (Lond)*, 90(1): 37-46.
140. Ponicke, K.; Vogelsang, M.; Heinroth, M.; Becker, K.; Zolk, O.; Bohm, M.; Zerkowski, H. R.; and Brodde, O. E. (1998) Endothelin receptors in the failing and nonfailing human heart. *Circulation*, 97(8): 744-51.
141. Prout, G. R., and Marshall, V. F. (1956) The prognosis with untreated bladder tumors. *Cancer*, 9(3): 551-8.

142. Randall, M. D.; Edwards, D. H.; and Griffith, T. M. (1990) Activities of endothelin-1 in the vascular network of the rabbit ear: a microangiographic study. *Br J Pharmacol*, 101(4): 781-8.
143. Rehn, L. (1895) Über Blasentumoren bei Fuchsinarbeitern. *Arch Kind Chir*, (50): 588.
144. Richie, J.; Shipley, W.; and Yagoda, A.: Cancer of the bladder. In *Cancer principles and practice of oncology*, pp. 1008-1020. Edited, 1008-1020, Lippincott Philadelphia, De Vita, VT, Hellman, S, Rosenberg, SA, 1989.
145. Riede, U.; Wehner, H.; and Freudenberg, N.: Uropoetisches System. In *Allgemeine und spezielle Pathologie*, pp. 840. Edited by Thieme, 840, Stuttgart, Riede UN Schaefer HE, 1995.
146. Riedl, C. R.; Daniltchenko, D.; Koenig, F.; Simak, R.; Loening, S. A.; and Pflueger, H. (2001) Fluorescence endoscopy with 5-aminolevulinic acid reduces early recurrence rate in superficial bladder cancer. *J Urol*, 165(4): 1121-3.
147. Rosenberg, J. E.; Carroll, P. R.; and Small, E. J. (2005) Update on chemotherapy for advanced bladder cancer. *J Urol*, 174(1): 14-20.
148. Rubanyi, G. M., and Polokoff, M. A. (1994) Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev*, 46(3): 325-415.
149. Rübben, H., and Otto, T.: Harnblasenkarzinom. In *Uroonkologie*, pp. 88-99. Edited, 88-99, 1998.
150. Saida, K.; Mitsui, Y.; and Ishida, N. (1989) A novel peptide, vasoactive intestinal contractor, of a new (endothelin) peptide family. Molecular cloning, expression, and biological activity. *J Biol Chem*, 264(25): 14613-6.
151. Sakurai, T.; Yanagisawa, M.; Takuwa, Y.; Miyazaki, H.; Kimura, S.; Goto, K.; and Masaki, T. (1990) Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature*, 348(6303): 732-5.
152. Salani, D.; Di Castro, V.; Nicotra, M. R.; Rosano, L.; Tecce, R.; Venuti, A.; Natali, P. G.; and Bagnato, A. (2000) Role of endothelin-1 in neovascularization of ovarian carcinoma. *Am J Pathol*, 157(5): 1537-47.
153. Salani, D.; Taraboletti, G.; Rosano, L.; Di Castro, V.; Borsotti, P.; Giavazzi, R.; and Bagnato, A. (2000) Endothelin-1 induces an angiogenic phenotype in

- cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Am J Pathol*, 157(5): 1703-11.
154. Saudek, V.; Hoflack, J.; and Pelton, J. T. (1991) Solution conformation of endothelin-1 by ¹H NMR, CD, and molecular modeling. *Int J Pept Protein Res*, 37(3): 174-9.
 155. Schiffrin, E. L.; Intengan, H. D.; Thibault, G.; and Touyz, R. M. (1997) Clinical significance of endothelin in cardiovascular disease. *Curr Opin Cardiol*, 12(4): 354-67.
 156. Shichiri, M.; Kato, H.; Marumo, F.; and Hirata, Y. (1997) Endothelin-1 as an autocrine/paracrine apoptosis survival factor for endothelial cells. *Hypertension*, 30(5): 1198-203.
 157. Shinmi, O. et al. (1989) Endothelin-3 is a novel neuropeptide: isolation and sequence determination of endothelin-1 and endothelin-3 in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 164(1): 587-93.
 158. Shioide, M., and Noda, M. (1993) Endothelin modulates osteopontin and osteocalcin messenger ribonucleic acid expression in rat osteoblastic osteosarcoma cells. *J Cell Biochem*, 53(2): 176-80.
 159. Simonson, M. S., and Herman, W. H. (1993) Protein kinase C and protein tyrosine kinase activity contribute to mitogenic signaling by endothelin-1. Cross-talk between G protein-coupled receptors and pp60c-src. *J Biol Chem*, 268(13): 9347-57.
 160. Simonson, M. S.; Wann, S.; Mene, P.; Dubyak, G. R.; Kester, M.; Nakazato, Y.; Sedor, J. R.; and Dunn, M. J. (1989) Endothelin stimulates phospholipase C, Na⁺/H⁺ exchange, c-fos expression, and mitogenesis in rat mesangial cells. *J Clin Invest*, 83(2): 708-12.
 161. Sobin, L. H. (2003) TNM, sixth edition: new developments in general concepts and rules. *Semin Surg Oncol*, 21(1): 19-22.
 162. Streeter, E. H., and Harris, A. L. (2002) Angiogenesis in bladder cancer-- prognostic marker and target for future therapy. *Surg Oncol*, 11(1-2): 85-100.
 163. Suzuki, N.; Matsumoto, H.; Kitada, C.; Masaki, T.; and Fujino, M. (1989) A sensitive sandwich-enzyme immunoassay for human endothelin. *J Immunol Methods*, 118(2): 245-50.

164. Takagi, Y.; Fukase, M.; Takata, S.; Yoshimi, H.; Tokunaga, O.; and Fujita, T. (1990) Autocrine effect of endothelin on DNA synthesis in human vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 168(2): 537-43.
165. Takigawa, M.; Sakurai, T.; Kasuya, Y.; Abe, Y.; Masaki, T.; and Goto, K. (1995) Molecular identification of guanine-nucleotide-binding regulatory proteins which couple to endothelin receptors. *Eur J Biochem*, 228(1): 102-8.
166. Takuwa, N.; Takuwa, Y.; Yanagisawa, M.; Yamashita, K.; and Masaki, T. (1989) A novel vasoactive peptide endothelin stimulates mitogenesis through inositol lipid turnover in Swiss 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem*, 264(14): 7856-61.
167. Trump, D. L. (2003) Effect of endothelin-A receptor blockade with atrasentan on tumor progression in men with hormone-refractory prostate cancer: a randomized, phase II, placebo-controlled trial. Carducci MA, Padley RJ, Breul J, Vogelzang NJ, Zonnenberg BA, Daliani DD, Schulman CC, Nabulsi AA, Humerickhouse RA, Weinberg MA, Schmitt JL, Nelson JB, Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center, The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD. *J Clin Oncol* 2003;21:679-689. *Urol Oncol*, 21(5): 410-1.
168. Urade, Y.; Fujitani, Y.; Oda, K.; Watakabe, T.; Umemura, I.; Takai, M.; Okada, T.; Sakata, K.; and Karaki, H. (1992) An endothelin B receptor-selective antagonist: IRL 1038, [Cys11-Cys15]-endothelin-1(11-21). *FEBS Lett*, 311(1): 12-6.
169. Vacca, F.; Bagnato, A.; Catt, K. J.; and Tecce, R. (2000) Transactivation of the epidermal growth factor receptor in endothelin-1-induced mitogenic signaling in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res*, 60(18): 5310-7.
170. Vacca, F.; Bagnato, A.; Catt, K. J.; and Tecce, R. (2000) Transactivation of the epidermal growth factor receptor in endothelin-1-induced mitogenic signaling in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res*, 60(18): 5310-7.
171. Valdenaire, O.; Rohrbacher, E.; and Mattei, M. G. (1995) Organization of the gene encoding the human endothelin-converting enzyme (ECE-1). *J Biol Chem*, 270(50): 29794-8.
172. Varkarakis, M. J.; Gaeta, J.; Moore, R. H.; and Murphy, G. P. (1974) Superficial bladder tumor. Aspects of clinical progression. *Urology*, 4(4): 414-20.

173. Venuti, A.; Salani, D.; Manni, V.; Poggiali, F.; and Bagnato, A. (2000) Expression of endothelin 1 and endothelin A receptor in HPV-associated cervical carcinoma: new potential targets for anticancer therapy. *FASEB J*, 14(14): 2277-83.
174. Vlaovic, P., and Jewett, M. A. (1999) Cyclophosphamide-induced bladder cancer. *Can J Urol*, 6(2): 745-748.
175. Wagner, O. F.; Christ, G.; Wojta, J.; Vierhapper, H.; Parzer, S.; Nowotny, P. J.; Schneider, B.; Waldhausl, W.; and Binder, B. R. (1992) Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *J Biol Chem*, 267(23): 16066-8.
176. Wan, J., and Grossman, H. B. (1989) Bladder carcinoma in patients age 40 years or younger. *Cancer*, 64(1): 178-81.
177. Warner, T. D.; Allcock, G. H.; Mickley, E. J.; Corder, R.; and Vane, J. R. (1993) Comparative studies with the endothelin receptor antagonists BQ-123 and PD 142893 indicate at least three endothelin receptors. *J Cardiovasc Pharmacol*, 22 Suppl 8: S117-20.
178. Warner, T. D.; de Nucci, G.; and Vane, J. R. (1989) Rat endothelin is a vasodilator in the isolated perfused mesentery of the rat. *Eur J Pharmacol*, 159(3): 325-6.
179. Weitzberg, E.; Lundberg, J. M.; and Rudehill, A. (1991) Elevated plasma levels of endothelin in patients with sepsis syndrome. *Circ Shock*, 33(4): 222-7.
180. Whelchel, A.; Evans, J.; and Posada, J. (1997) Inhibition of ERK activation attenuates endothelin-stimulated airway smooth muscle cell proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 16(5): 589-96.
181. Wollberg, Z.; Shabo-Shina, R.; Intrator, N.; Bdolah, A.; Kochva, E.; Shavit, G.; Oron, Y.; Vidne, B. A.; and Gitter, S. (1988) A novel cardiotoxic polypeptide from the venom of *Atractaspis engaddensis* (burrowing asp): cardiac effects in mice and isolated rat and human heart preparations. *Toxicon*, 26(6): 525-34.
182. Wu-Wong, J. R.; Chiou, W. J.; Dickinson, R.; and Opgenorth, T. J. (1997) Endothelin attenuates apoptosis in human smooth muscle cells. *Biochem J*, 328 (Pt 3): 733-7.

183. Wu-Wong, J. R.; Chiou, W. J.; and Wang, J. (2000) Extracellular signal-regulated kinases are involved in the antiapoptotic effect of endothelin-1. *J Pharmacol Exp Ther*, 293(2): 514-21.
184. Wülfing, C.; Eltze, E.; Yamini, J.; and Piechota, H.: EXPRESSION OF ENDOTHELIN-1 AND ENDOTHELIN-A AND -B RECEPTORS IN INVASIVE BLADDER CANCER. *Oncol Rep*. 2005 Feb;13(2):223-8.
185. Wülfing, C.; Eltze, E.; Yamini, J.; Wulfing, P.; Bierer, S.; Bocker, W.; Hertle, L.; Semjonow, A.; and Sievert, K. D. (2005) Expression of the endothelin axis in bladder cancer: relationship to clinicopathologic parameters and long-term survival. *Eur Urol*, 47(5): 593-600.
186. Wülfing, P.; Kersting, C.; Tio, J.; Fischer, R. J.; Wulfing, C.; Poremba, C.; Diallo, R.; Bocker, W.; and Kiesel, L. (2004) Endothelin-1-, endothelin-A-, and endothelin-B-receptor expression is correlated with vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in breast cancer. *Clin Cancer Res*, 10(7): 2393-400.
187. Xie, K.; Huang, S.; Dong, Z.; Juang, S. H.; Gutman, M.; Xie, Q. W.; Nathan, C.; and Fidler, I. J. (1995) Transfection with the inducible nitric oxide synthase gene suppresses tumorigenicity and abrogates metastasis by K-1735 murine melanoma cells. *J Exp Med*, 181(4): 1333-43.
188. Yagoda, A. (1987) Chemotherapy of urothelial tract tumors. *Cancer*, 60(3 Suppl): 574-85.
189. Yanagisawa, M.; Kurihara, H.; Kimura, S.; Tomobe, Y.; Kobayashi, M.; Mitsui, Y.; Yazaki, Y.; Goto, K.; and Masaki, T. (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 332(6163): 411-5.
190. Yanagisawa, M.; Kurihara, H.; Kimura, S.; Tomobe, Y.; Kobayashi, M.; Mitsui, Y.; Yazaki, Y.; Goto, K.; and Masaki, T. (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 332(6163): 411-5.
191. Yin, J. J. et al. (2003) A causal role for endothelin-1 in the pathogenesis of osteoblastic bone metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(19): 10954-9.
192. Yohn, J. et al. (1994) Autoregulation of endothelin-1 secretion by cultured human keratinocytes via the endothelin B receptor. *Biochim. Biophys. Acta*, (1224): 454-458.

193. Zaak, D. et al. (2002) Role of 5-aminolevulinic acid in the detection of urothelial premalignant lesions. *Cancer*, 95(6): 1234-8.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Stadieneinteilung der Harnblasenkarzinome (aus Rübben, Otto: „Uroonkologie“; Springer Verlag 2000)	12
Abbildung 1.2: Primärstruktur von ET-1,ET-2 und ET-3;	26
Abbildung 1.3: Die Endothelin-induzierte Signaltransduktion aus: Nelson et al.: „The endothelin axis: emerging role in cancer“ 2004 [118]	34
Abbildung 2.1: Direkte Methode bei immunhistochemischen Färbungen (modifiziert nach: DakoCytomation, Detektionssysteme 2004).....	41
Abbildung 2.2: Indirekte Methode bei immunhistochemischen Färbungen	42
Abbildung 2.3: Streptavidin-Biotin-Komplex Methode bei immunhistochemischen Färbungen (modifiziert nach: DakoCytomation, Detektionssysteme 2004)	44
Abbildung 2.4: Labeld-Streptavidin-Biotin Methode bei immunhistochemischen Färbungen (modifiziert nach: DakoCytomation, Detektionssysteme 2004)	45
Abbildung 2.5: Labeld-StreptAvidin Färbemethode mit Envision TM -System (modifiziert nach: DakoCytomation, Detektionssysteme 2004).....	46
Abbildung 2.6: katalysierte Detektionsmethode mit Chromogen	55
Abbildung 3.1: Verteilung der ET-1, ET _A R und ET _B R-Expression	68
Abbildung 3.2: Urothel mit ET-1 – Anfärbung	69
Abbildung 3.3: Urothel mit ET _A R -Anfärbung	70
Abbildung 3.4: Urothel mit ET _B R–Anfärbung	71
Abbildung 3.5: normales Urothel mit negativer Färbung	72
Abbildung 3.6: Verteilung von ET-1, ET _A R und ET _B R und dem T-Stadium	74
Abbildung 3.7: Verteilung von ET-1, ET _A R und ET _B R und dem G-Stadium	75
Abbildung 3.8: Verteilung von ET-1, ET _A R und ET _B R und dem Lymphknotenstatus..	76
Abbildung 3.9: Verteilung von ET-1, ET _A R und ET _B R und dem HC- Status	77
Abbildung 3.10: Verteilung von ET-1, ET _A R und ET _B R und den verschiedenen Tumortypen	78
Abbildung 3.11: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse für rezidivfreie Überlebenszeit (DFST) und gesamte Überlebenszeit (OAS) in Abhängigkeit der ET-1 (A), ET _A R (B) und ET _B R (C) Expression	82

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinem Doktorvater und gleichzeitigem Initiator dieser Promotionsschrift Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Christian Wülfing, Oberarzt der Klinik und Poliklinik für Urologie des Universitätsklinikums Münster meinen herzlichen Dank aussprechen.

Ich möchte Ihm insbesondere für seine ausserordentliche Betreuung und stete Hilfsbereitschaft bezüglich aller meiner Fragen und Anliegen danken.

Ebenso möchte ich Prof. Dr. med. L. Hertle, Leiter der Klinik und Poliklinik für Urologie des Universitätsklinikums Münster danken.

Mein Dank geht auch an das Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Münster für die Bereitstellung der technischen Geräte, ohne die der experimentelle Teil der Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

Insbesondere möchte ich mich bei Frau Dr. Eltze für Ihre Betreuung bedanken.

Mein spezieller Dank geht an Frau Hella Stroth-Sievers, MTA des Gerhard-Domagk-Institutes für Pathologie des Universitätsklinikums Münster, für die aussergewöhnliche Hilfe beim Zubereiten der Präparate und für das gewissenhafte Beantworten aller meiner technischen Fragen.

Schließlich möchte ich meinen Eltern danken, und Ihnen diese Dissertationsschrift widmen.