Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Allgemein-,Viszeral- und Gefäßchirurgie
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Direktor: Prof. Dr. med. H. Dralle

elektronisches dokument
ULB Sachsen-Anhalt

Expression von Fas, Fas Ligand und CD97 im Schilddrüsenadenom und Struma nodosa

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Zahnmedizin (Dr. med. dent.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Claudia Düren,
geboren am 03.12.1975 in Köln

Gutachter:
1. Prof. Dr. H. Dralle
2. Prof. Dr. Dr. J. Schubert
3. PD Dr. rer. nat. C. Schmutzler
Tag der Verteidigung 24.04.2002

urn:nbn:de:gbv:3-000003638
[http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000003638]

Referat und bibliographische Beschreibung

Durch den Prozeß der Apoptose werden essentielle physiologische Vorgänge, wie beispielsweise die Gewebeentwicklung und –homeostase reguliert. Der programmierte Zelltod kann durch eine Vielzahl von Stimuli induziert werden, wobei der Fas Ligand (FasL) und dessen Todesrezeptor Fas einen der wichtigsten darstellt. Das Resultat der durch Fas vermittelten und inganggesetzten intrazellulären Signalkaskade ist die Zerstörung der Ultrastruktur der Zelle und somit der unwiderrufliche Zelltod. Andererseits ist die Dysregulation und Fehlfunktion der Apoptose mit einer Vielzahl von Erkrankungen, wie z.B. autoimmunen Erkrankungen (Hashimoto Thyreoiditis, Morbus Basedow) oder mit der unkontrollierten Zellproliferation in malignen Erkrankungen assoziiert.

In dieser Arbeit wurde die mRNA- und Proteinexpression des Fas Rezeptors und des Fas Liganden untersucht. In einem ersten Schritt wurden die Transkriptionslevel von Fas und FasL mittels RT-PCR in jeweils 27 Struma nodosa- und 15 Adenom- Schilddrüsengeweben ermittelt. Dabei wurden die Transkripte von Fas in 77,8% und FasL in 29,6% der Strumen nachgewiesen, wohingegen in den Adenomen Fas mRNA zu 100% und FasL mRNA zu 53,3% exprimiert wurde. Anschließend erfolgte die immunhistochemische Untersuchung nach der Avidin/Biotin Komplex-Methode an Gefrierschnitten von 27 Struma nodosa- (darunter 7 in Regression befindlich) und 23 Schilddrüsenadenomgeweben. In den Struma nodosa-Geweben war auf Proteinebene eine im Vergleich zu apathogenem Gewebe verminderte Fas und eine erhöhte FasL Expression festzustellen. Bei den sich in Regression befindlichen Strumen ergab sich eine Erhöhung der Fas- bzw. der FasL- Expression, verglichen mit der Fas/FasL Expression sich nicht in Regression befindlicher Strumen. Auch bei den Schilddrüsenadenomen kam es, im Vergleich mit apathogenem und Strumagewebe, zu einer Verminderung der Fas- und einer Erhöhung der FasL Expression. Die Ergebnisse zeigen, daß die gesteigerte Expression des Fas Liganden, aber auch die Verminderung der Expression des Fas Rezeptors zur Genese und Progression proliferativer Erkrankungen, wie der Struma oder dem Schilddrüsenadenom beiträgt. Des weiteren wurde in dieser Studie die mRNA Expression von CD97 an 27 Struma nodosa- und 15 Schilddrüsenadenomgeweben mittels RT-PCR untersucht. CD97 ist ein Zelloberflächenantigen, welches die Adhäsion zwischen Leukozytenpopulationen, Zellen nichthämatopoetischen Ursprungs und Tumorzellen vermittelt. CD97 wird als ein sensitiver Marker der Entdifferenzierung in humanen Schilddrüsentumoren postuliert. Es ergab sich in unserer Untersuchung bei den Struma nodosa-Geweben eine CD97 mRNA Expression von 22,2% und bei den Schilddrüsenadenom-Geweben eine Expression von 60%. Das Ergebnis zeigt eine Erhöhung der CD97 mRNA Expression der Adenome im Vergleich zu den Strumen, was ein frühes Ereignis der benignen bzw. malignen Tendenz der Schilddrüsenzellen vermuten läßt.

Claudia Düren: Expression von Fas, Fas Ligand und CD97 im Schilddrüsenadenom und Struma nodosa. Halle, Martin-Luther-Universität, Med. Fak., Diss., 56 Seiten, 2001

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1
1.1 Allgemeine Grundlagen der Apoptose 1
1.1.1 Physiologische Relevanz der Apoptose 1
1.1.2 Signalübertragung der Apoptose 2
1.2 Die Familie der Tumornekrosefaktoren 6
1.2.1 Die Rezeptoren 6
1.2.2 Die Liganden 9
1.3 CD97 11
1.4 Tumorartige benigne Schilddrüsenerkrankungen 13
1.4.1 Adenom 13
1.4.2 Struma 14

2 Zielstellung der Arbeit 16

3 Material und Methoden 16
3.1 Patientenmaterial 16
3.2 Histologische Klassifikation 17
3.3 RT-PCR 19
3.4 Immunhistochemie 20

4 Ergebnisse 22
4.1 RT-PCR 22
4.1.1 Struma nodosa 22
4.1.2 Adenom 28
4.2 Immunhistochemie 33
4.2.1 Struma nodosa 33
4.2.2 Adenom 37
4.3 Gesamtübersicht 41

5 Diskussion 43
5.1 Struma 43
5.2 Adenom 45

6 Zusammenfassung 48

7 Literaturverzeichnis 50

8 Thesen 55

Curriculum vitae 57

Selbständigkeitserklärung 58

Danksagung 59

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
AIF	Apoptosis Inducing Factor
AG	Antigen
AK	Antikörper
cAMP	cyclo-Adenosinmonophosphat
DD	Death Domain
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DAB	3,3-Diaminobenzidin
DED	Death Effector Domain
DISC	Death Inducing Signaling Complex
EGF	Epidermal Growth Factor
FADD	Fas Associated Death Domain
Fas	Fibroblast associated
FasL	Fas Ligand
foll.	follikulär
HIV	Human Immundeficiency Virus
ICE	Interleukin Converting Enzyme
IGF	Insulin-Like Growth Factor
IgG	Immunglobulin G
kDa	kiloDalton
Leu	Leucin
mikrofoll.	mikrofollikulär
mod.	modifiziert
multinod.	multinodulär
NGF	Nerve Growth Factor
PBS	Phosphate-Buffered-Saline
PCD	Programmed Cell Death
Phe	Phenylalanin
resp.	respektive
RGD	Intergrin Recognition Motiv
RNA	Ribonucleic Acid
RT-PCR	Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction
TBE	TRIS-Borsäure-EDTA
TGFβ	Transforming Growth Factor β
TGI	Thyreoid Growth Immunglobulin
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNFSF	Tumor Necrosis Factor Superfamily
TNFR	Tumor Necrosis Factor Receptor
TNFRSF	Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily
TSH	Thyreoid Stimulating Hormon
TSI	Thyreoidea Stimulating Immunglobulin

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Grundlagen der Apoptose

1.1.1 Physiologische Relevanz der Apoptose

Apoptose, respektive der programmierte Zelltod (programmed cell death = PCD), stellt einen wichtigen physiologischen Prozeß hinsichtlich Entwicklung und Homeostase dar und ist in einer Vielzahl von Erkrankungen involviert.

Die Apoptose unterscheidet sich von der Nekrose, welche durch Zell- und Organellenschwellung und -ruptur gekennzeichnet ist, was zum Verlust cytoplasmatischen Inhalts in den extrazellulären Raum führt. Die Nekrose ruft durch die Aktivität phagozytierender Zellen eine Entzündungsreaktion hervor, die zu einer Schädigung benachbarter Zellen führen kann. Die Apoptose hingegen führt zur Schrumpfung und zum Zellkontaktverlust angrenzender Zellen. Der Zellkern unterliegt einer Vielzahl von Veränderungen, die durch Chromatinkondensation und DNA Spaltung gekennzeichnet ist. Die Spaltung vollzieht sich in Form von 180 bp Segmenten, was der Größe eines Nukleosoms entspricht. Die geschrumpften apoptotischen Zellen werden entweder phagozytiert oder in kleinere apoptotische Körper aufgebrochen und von Nachbarzellen absorbiert, wobei es im Gegensatz zur Nekrose zu keinerlei Entzündungsreaktion kommt.

Die Ursachen der Apoptose und Nekrose sind ebenfalls sehr verschieden:

- die Nekrose tritt, in Folge einer Zellschädigung auf, die beispielsweise durch ein physikalisches Trauma oder Sauerstoffentzug bedingt ist.
- Der programmierte Zelltod hingegen ist das Resultat energieabhängiger, regulierter zellulärer Reaktionswege und tritt häufig als Teil physiologischer Aktivität auf, die sich z.B. in Entwicklungsprozessen, wie dem Verlust des Kaulquappenschwanzes in der Froschentwicklung oder in der Eliminierung des interdigitalen Gewebes des menschlichen Feten manifestiert.

Die Entwicklung des Immunsystems und dessen Regulation beruhen ebenfalls auf apoptotischen Prozessen. So kommt es im Thymus zur Destruktion autoreaktiver T-Lymphozyten und am Ende einer Immunreaktion zur Eliminierung aktivierter T-Zellen. Ferner ist der programmierte Zelltod am Zellumsatz im Endometrium, der Haut und dem Darmepithel beteiligt und hat damit Einfluß auf die Aufrechterhaltung der Gewebehomeostase (Borgerson et al., 1999).

Die Apoptose kann jedoch auch als Folge von Wachstumsfaktorentzug, Strahlung, chemischen Mutagenen und Onkogenen (Scaffidi et al., 1989) auftreten.

Eine Dysregulation der Apoptose kann zu Erkrankungen führen: Exzessive Apoptose bedingt das Auftreten neurodegenerativer Erkrankungen wie z.B. dem Morbus Alzheimer und der Destruktion von T-Lymphozyten bei AIDS. Im Gegensatz dazu kann verminderte Apoptose-

aktivität einerseits zu unkontrollierter Zellproliferation in malignen Erkrankungen, andererseits zu autoimmunen Erkrankungen führen (Borgerson et al., 1999).

1.1.2 Signalübertragungsweg der Apoptose

Der programmierte Zelltod wird durch eine Vielzahl von Reaktionswegen vermittelt. Einige von ihnen bedienen sich eines Rezeptors der Zellmembran. Hier interagiert die extrazelluläre Domäne des transmembranen Zelloberflächenrezeptors einer Zielzelle mit einem spezifischen Liganden, der entweder einen löslichen Faktor oder ein der Zellmembran assoziiertes Protein darstellt. Dies führt zur Cluster-Bildung des Rezeptors und zur Assoziation der cytoplasmatischen, carboxylendigen Todesdomäne (DD = death domain) des Rezeptors (death domain receptor). Die Cluster-Bildung ermöglicht es einem oder mehreren Adapterproteinen sich durch deren eigene Todesdomäne an den Rezeptor anzulagern. Die Adapterproteine binden an eine Caspase und induzieren deren Aktivation (Borgerson et al., 1999). Caspasen sind Cystein Proteasen, die die enzymatische und katabolischen Reaktionen, die zum Zelltod führen, katalysieren (Phleps et al., 2000).
Der Zellkern stellt hierbei einen aktiven Teil dar, da einige Stimuli, die die Apoptose hervorrufen, von aktiver Gen-Transkription und –Translation abhängig sind, des weiteren kommt es zum aktiven Transport aktivierter Caspasen in den Zellkern (Scaffidi et al., 1998).
Der am besten untersuchte Reaktionsweg ist jener, der durch den Todesrezeptor Fas (= fibroblast associated; syn.: Apo1 (for apoptosis1), CD95) vermittelt wird. Fas ist ein transmembranes Protein vom Typ I und verfügt über eine Cystein-reiche extrazelluläre Rezeptordomäne und eine cytoplasmatische Todesdomäne (DD). Der Rezeptor ist Teil der Tumor Nekrose Faktor Rezeptoren Familie (TNFR = tumor necrosis factor receptor family).
Sein Ligand (FasL) ist ein transmembranes Protein vom Typ II und ein Mitglied der Tumor Nekrose Faktoren Familie (TNFSF = tumor necrosis factor superfamily).
FasL ist ein Homotrimer und ist befähigt, drei Fas Moleküle zu binden. Infolgedessen kommt es zur Cluster-Bildung des Rezeptormoleküls Fas und, wie oben beschrieben, zur Assoziation der Todesdomäne (DD). Dies erlaubt einem Adaptermolekül (FADD, syn.: Mort 1) an den Fas Rezeptor durch Protein-Protein Interaktion mittels seiner eigenen Todesdomäne zu binden.
Dadurch wird die Todes Effektor Domäne DED (= death effector domain) des FADD aktiviert und bindet an die DED des FLICE 1 (syn.: Caspase 8, MACH 1) (Borgerson et al., 1999).

Infolgedessen kommt es in den sogenannten Typ I Zellen (z.B. Thymozyten, periphere T-Zellen) (Scaffidi et al., 1998) zur Formation des Tod-induzierenden Signal-Komplexes DISC (= death inducing signal complex), welcher die enzymatische Selbstspaltung und –aktivation der Caspase 8 nach sich zieht. Die aktivierte Caspase 8 spaltet und aktiviert andere Caspasen und „verdaut" Proteine (death substrates). Dies führt zur Zerstörung der Ultrastruktur der Zelle und somit zum Zelltod (Borgerson et al., 1999).
Eine vereinfachte Übersicht des beschriebenen Reaktionswegs gewährt folgende Darstellung (Abb. 1).

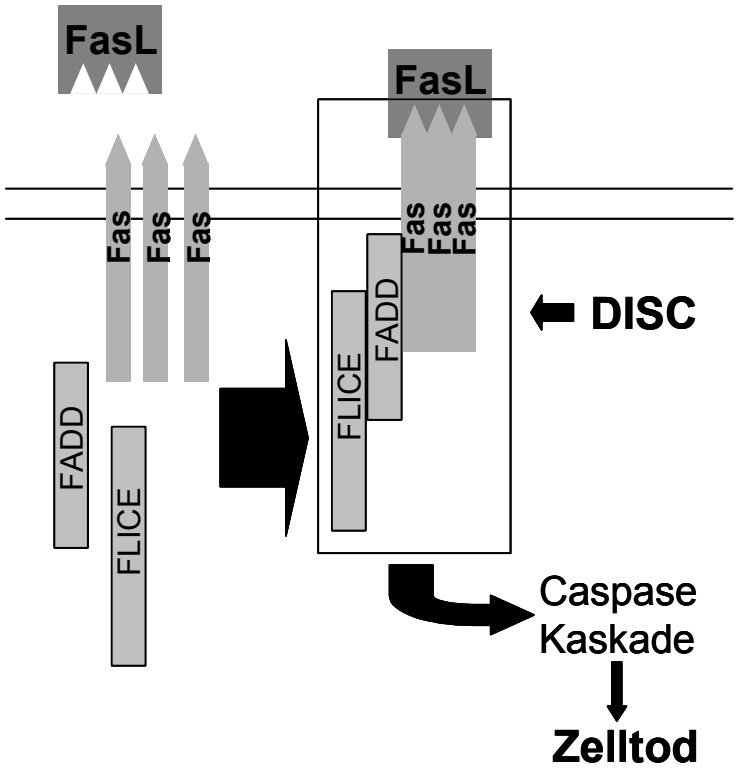


Abb. 1: *Schematische Darstellung der Fas/FasL Reaktionskaskade (mod. nach Arscott et al., 1998)*

Es existieren insgesamt 10 verschiedene Caspasen (Cystein Proteasen), die mit dem interleukin-1ß-converting enzyme (ICE) verwandt sind. Sie werden in drei Gruppen unterteilt:

- ICE ähnliche- ,
- CPP32 ähnliche- und
- ICH-1 ähnliche- Caspasen.

Die Aktivation der Caspasen kann durch Rezeptoroligomerisation, durch Autokatalyse, durch gegenseitige Aktivation oder durch eine Granzyme B (Serin-Esterase) hervorgerufene Spaltung eines Caspase-Precursors (Zymogenspaltung) herbeigeführt werden.

Die Caspasen enthalten eine, die katalytische Aktivität determinierende Sequenz (QAC(R/Q)G) und erkennen ihr Substrat an einem Aspartat-Aminosäurerest (D) (Scaffidi et al., 1998).

Abzugrenzen hiervon sind die phylogenetisch älteren, sogenannten Typ II Zellen (z.B. Jurkat Zellen, CEM Zellen (T-Zellinie), Hepatozyten), deren Mitochondrien durch die FADD vermittelte Aktivation der Cystein-Protease Caspase 8 aktiviert werden. Infolgedessen kommt es zur Störung des transmembranen Potentials ($\Delta\psi m$) des Mitochondriums und zur Formation von Poren in der Membran, wodurch es zur Freisetzung von Cytochrom C kommt. Dies bewirkt die Aktivation der Caspase 3, die wiederum imstande ist, die Caspase 9 zu aktivieren. Ferner können aktivierte Mitochondrien einen Faktor namens AIF (Apoptose induzierender Faktor) freisetzen, der ebenfalls die Caspase 3 aktiviert. Es kommt auch hier zur Ingangsetzung der apoptotischen Kaskade, die zur Auflösung der Kernhülle, Störung der Transkription und Translation, Chromatinkondensation und zur DNA Spaltung durch erhöhte Nukleaseaktivität führt (Scaffidi et al., 1998).

Dieser Reaktionsweg wird mittels verschiedener Moleküle reguliert (siehe Abb. 2). Inhibitoren des programmierten Zelltods sind häufig im Zuge viraler Infektion involviert und bieten den Viren durch die Verhinderung der Wirtzellapoptose einen Replikationsvorteil. Deren Expression ist ebenfalls an der Genese und Progression einiger nicht-viraler Erkrankungen beteiligt (z.B. bcl-2 Überexpression beim Morbus Basedow und beim follikulären Lymphadenom).

Folgende Inhibitoren sind von Bedeutung:

- FAP-1: labiler Inhibitor des Fas Rezeptors
- bcl-2: verhindert die Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium
- Decoy: bindet den Liganden und verhindert so die Induktion des Todessignals
- FLIP: hemmt die Aktivation der Caspase 8 und 10
- Y/ZVAD-fmk: inhibiert die Caspase 1 und 3
- DEVD-fmk: inhibiert die Caspase 3
- VEID-fmk: inhibiert die Caspase 6
- CrmA: blockiert Granzyme B und Caspase 1 und 3 ähnliche Proteasen
- p35: hemmt Caspase 1 und 3
- XIAP: inhibiert die durch Cytochrom C vermittelte Kerndestruktion und inhibiert die Caspase 3 und 7

Es existieren ebenso proapoptotische Substanzen:

- Apaf-1bis3: aktiviert die Caspase 3
- bax: gehört zur bcl-2 Familie, bildet Heterodimere mit bcl-2 und wirkt, Caspase unabhängig, PCD induzierend
- bik, bad, bcl-xs: gehören zur bcl-2 Familie, können Homo- und Heterodimere untereinander bilden

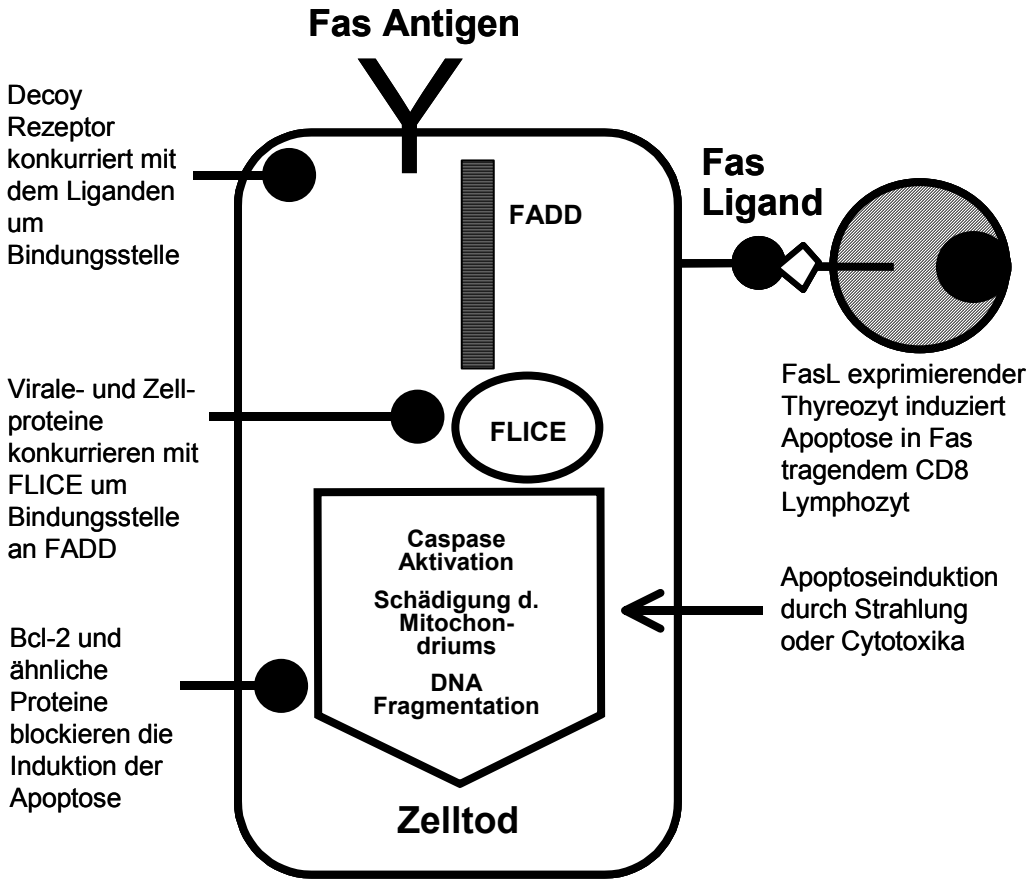


Abb. 2: *Regulation der Apoptose in der Schilddrüse (mod. nach Arscott und Baker)*

Abgesehen von Fas gibt es noch weitere Todesrezeptoren (death receptors), die ähnliche oder dieselben intrazellulären Signalstoffe und Reaktionswege benutzen, z.B. TNF-R1, der an TRADD bindet, etc. (Borgerson et al., 1999), welche jedoch in dieser Arbeit nicht näher betrachtet werden.

1.2 Die Familie der Tumornekrosefaktoren

Erste Vermutungen über die Existenz eines den Tumor nekrotisierenden Moleküls wurden laut, als beobachtet wurde, daß Krebspatienten eine spontane Regression ihrer Tumoren infolge bakterieller Infektion zeigten.
Weitere Studien in den 60er Jahren zeigten, daß wirtassoziierte (oder endogene) Mediatoren, die als Antwort auf Bakterienprodukte synthetisiert wurden, wahrscheinlich für diesen Effekt verantwortlich sind.
Im Jahre 1975 wurde gezeigt, daß ein bakteriell induzierter, zirkulierender Faktor eine starke antitumoröse Aktivität gegen Tumoren aufwies, die in die Haut von Mäusen implantiert wurden. Dieser Faktor wurde als Tumornekrosefaktor (tumor necrosis factor = TNF) bezeichnet und des weiteren isoliert und kloniert.
TNF ist der Prototyp einer Familie von Molekülen, die in Immunregulation und Entzündungsreaktionen involviert sind. Den Untersuchungen über die biochemischen Zusammenhänge der Apoptosereaktionskaskade dienten die Organismen Caenorhabditis elegans (Nematode) und Drosophila melanogaster (Fruchtfliege), die den Vorteil boten, leicht genetisch manipuliert werden zu können (Scaffidi et al., 1998).

1.2.1 Die Rezeptoren

TNF Rezeptoren (TNF receptor superfamily = TNFRSF) sind transmembrane Glykoproteine vom Typ I (N-Terminus extrazellulär), die 1 bis 6 Ligand bindende-, 40 Aminosäurerest-cysteinreiche Motive in der extrazellulären Domäne enthalten. Es existieren 10 der Tabelle 1 zu entnehmende Mitglieder. NGFR p75, CD40, CD95, CD120a und CD120b werden in vielen Geweben exprimiert, wohingegen CD27, CD30, 4-1BB und OX40 fast ganz auf das hämatopoetische System beschränkt sind (Gruss et al., 1996). TNFRSF Mitglieder sind trimere oder multimere Komplexe, die durch intracysteine Disulfidbrücken stabilisiert sind.
Die TNFRSF Mitglieder verfügen über eine extrazelluläre cysteinreiche Domäne, die den Liganden bindet, und über eine cytoplasmatische Domäne (Todesdomäne), die der Signalweitergabe und der Aktivation von Kinasen und Phosphatasen dient. Eine eigene Todesdomäne (death domain) besitzen CD95, CD120a und NGFR p75. Es wurden Proteine isoliert, z.B. FADD/MORT 1, TRADD, RIP und CAPs), die an die „death domain“ von CD95 und CD120a binden (Gruss et al.,1996).
Einige Mitglieder der TNFRSF existieren in membrangebundener und in löslicher Form (siehe Tab.1). Sie werden entweder durch proteolytische Spaltung (z.B. CD27, CD30, CD40, CD95, CD120a, CD120b) oder durch alternatives Spleißen (z.B. 4-1BB, CD95) freigegeben. Diese lösliche Form bindet ihren Liganden und blockiert dessen Wirkung im Sinne eines Negativregulators (Gruss et al.,1996).

Protein	Molekular-Gewicht (Kilodalton)	Länge (Amino-säuren)	Chromo-somen-lokalisation	Lösliche Form
TNF/NGF Rezeptoren				
CD 27	45-55	242	12p13	+
CD30	120	578	1p36	+
CD40	50	258	20q11-13	+
CD95	45	320	10q24.1	+
CD120a	60	435	12p13	+
CD120b	80	440	1p36	+
TNFR-RP	75	414	12p13	?
4-IBB	35	234	1p36	+
OX40	50	250	1p36	?
NGFR p75	75	414	17q21-22	+
TNF-ähnliche Liganden				
CD27L	50	193	19p13.3	?
CD30L	26-40	234	9q33	+
CD40L	33-39	261	Xq26-27	+
CD95L	40	281	1q25	+
TNF	26	233	6p21	+
LT-α		205	6p21	25
LT-β	33	244	6p21	?
4-IBBL	50	309	19p13.3	?
OX40L	26-28	183	1q25	?
TRAIL	40	281	3q26	?

Tab. 1: *Molekulare, biochemische und genetische Charakteristika der TNF/NGF (nerve growth factor/ tumor necrosis factor) Rezeptoren und der korrespondierenden Zytokine (mod. nach Gruss, 1996)*

Fas/CD95/APO-1

Der Fas (fibroblast associated) Rezeptor (syn.: Apo-1 (for apoptosis-1), CD95) wurde mit Hilfe von Antikörpern entdeckt, die in der Lage waren, bestimmte Tumorzellinien zu zerstören. Nach Fas Ligand Interaktion vermittelt Fas in einigen Tumorzellinien apoptotischen Zelltod *in vitro* und rapide Tumorregression *in vivo* (Gruss et al.,1996). Der menschliche Fas Rezeptor besteht aus einem 355 Aminosäuren langen und 43 kDa schweren transmembranen Glykoprotein. Er setzt sich aus einer aus 156 Aminosäuren bestehenden extrazellulären Region, einem 20 Aminosäurerest langen transmembranen Segment und einer 144 Aminosäuren beinhaltenden cytoplasmatischen Domäne zusammen. In der extrazellulären Region befinden sich drei cysteinreiche Motive, des weiteren findet sich in der cytoplasmatischen Region eine 68 Aminosäurereste umfassende Todesdomäne (death domain), die befähigt ist, das Adapterprotein FADD zu binden und so die Signalübertragung zu gewährleisten. Eine einzige Punktmutation in der cytoplasmatischen Todesdomäne kann bei Kindern zum lymphoproliferativen Syndrom und zur Autoimmunität führen (Gruss et al.,1996). Auf Fibroblasten (auch bei frisch isolierten T-Zellen, Thymozyten

und einigen malignen B-Zellen) exprimiertes Fas kann nach Fas Ligand Bindung, abhängig von der relativen Anzahl der exprimierten Fas Moleküle, entweder Proliferation oder Apoptose vermitteln (duale Rolle des Fas (Gruss et al.,1996)). Die meisten Fas+ Zellen sind resistent gegenüber Fas vermittelter Zytotoxizität, jedoch induziert zelluläre Aktivation die Sensitivität zu Fas vermittelter Apoptose. Im Gegensatz hierzu sind Hepatozyten empfindlicher gegenüber Fas vermittelter Apoptose, dies kann jedoch durch Überexpression des bcl-2 Proteins verhindert werden (Gruss et al.,1996).

Die lösliche Form des Fas Rezeptors stellt ein Resultat alternativen Splißens dar und ist im Stande, die Bindung des Fas Liganden und somit die Fas vermittelte Apoptose zu verhindern, was das Auftreten autoimmuner Erkrankungen, wie z.B. Leukämie, systemischer Lupus erythematodes (SLE) oder Lymphome nach sich ziehen kann (Gruss et al.,1996). Im Blut zirkulierendes, lösliches Fas (sFas) liegt in geringen Mengen als Dimer und Trimer vor.

Folgende Zellen exprimieren den Fas Rezeptor:

- CD34+ Stammzellen,
- Fibroblasten,
- natürliche Killerzellen (NK Zellen),
- Keratinozyten,
- Hepatozyten,
- B-Zellen und B-Zell Vorläufer,
- Monozyten plus CD4+ und CD8+ T-Zellen,
- CD45RO+ $\gamma\delta$ T-Zellen,
- Eosinophile,
- Thymozyten,
- CD4-CD8- Vorläuferzellen in geringem Maße,
- CD4+CD8+ Vorläuferzellen in hohem Maße,
- Endothelzellen,
- intestinale Epithelzellen,
- maligne Zellen: Lymphomzellen, Leukämiezellen, Myelomzellen.

Fas wird stark in virusinfizierten Zellen exprimiert und ist somit beteiligt an der Elimination infizierter Zellen und an der Reduktion der Virenproduktion. Erhöhte Oberflächenexpression von Fas und gesteigerte Fas vermittelte Apoptose von CD4+ T-Zellen steht im Zusammenhang mit der klinischen Progression der HIV Erkrankung. Ferner existiert eine Verbindung zwischen der abnormen Aktivation des Fas Rezeptors und Gewebedestruktionen, wie z.B. der AIDS assoziierten Muskeldystrophie, Diabetes mellitus und Neurodegenerationen wie Morbus Alzheimer (Gruss et al., 1996).

1.2.2 Die Liganden

Mit Ausnahme des „nerve growth factor“ NGF und dem TNF-ß sind alle Liganden transmembrane Glykoproteine vom Typ II (extrazellulärer C-Terminus), die ein kurzes cytoplasmatisches Segment (10 bis 80 Aminosäurereste) und eine relativ lange extrazelluläre Region enthalten. Die TNF Ligand Familienmitglieder besitzen kein Signalpeptid, jedoch eine hydrophobe transmembrane Domäne, wobei LT-alpha (TNF-ß) eine Ausnahme darstellt, da es in den Zellinnenraum sezerniert wird (Gruss et al.,1996). TNFSF Mitglieder haben eine trimere Struktur und ihre Monomere setzen sich aus ß-Strängen zusammen, die sich in eine zweiblättrige Struktur orientieren. Eine Konsequenz dieser trimeren Struktur ist, daß es während der Signalübertragung bei den Rezeptoren und Liganden zur Cluster-Bildung kommt.
Die TNF Ligand Familie umfaßt, den Rezeptoren entsprechend, 10 Mitglieder, die in Tabelle 1 zusammengefaßt sind. Einige Mitglieder der TNF Ligand Familie, einschließlich TNF und FasL, existieren auch in einer biologisch aktiven, löslichen, jedoch abgeschwächten Form (Gruss et al.,1996).

Fas Ligand

Der Fas Ligand (syn.: CD95L) ist ein 40 kDa schweres und 281 Aminosäuren langes transmembranes Glykoprotein und besteht aus einer 80 Aminosäuren umfassenden cytoplasmatischen Region, einem 22 Aminosäuren langen transmembranen Segment und einer aus 179 Aminosäuren zusammengesetzten extrazellulären Domäne. Mit Substitution lediglich einer Aminosäure an Position 273 (Leu anstatt Phe) kann es bereits zur lymphoproliferativen Erkrankung kommen. Fas Ligand tritt entweder als ein membrangebundenes Protein oder als ein zirkulierendes Homotrimer auf, welches durch proteolytische Spaltung entsteht und aus 26 kDa schweren Monomeren aufgebaut ist.
Die physiologische Bedeutung des FasL bei T-Zell vermittelter Immunreaktion besteht in der Elimination syngener Lymphozyten während der Immunantwort. Des weiteren ist FasL an der Eliminierung fehlerhaft antigenrepräsentierender Zellen beteiligt. Fas/FasL Interaktion (siehe Abb. 3) reguliert ferner die antigenspezifische T- und B-Zell -Apoptose, die mit der Herabregulation zellulärer und humuraler Immunreaktionen verbunden ist. Bestimmte T- und B-Zell Subpopulationen sind jedoch FasL unempfindlich und führen daher zu einem immunologischen Gedächtnis. FasL ist jedoch auch an apoptotischen Prozessen nicht-hämatopoetischen Ursprungs beteiligt.

Folgende Zellen exprimieren FasL:

- Typ II Pneumozyten,
- Bronchialepithelzellen,
- Splenozyten,
- Thymozyten,
- Monozyten,
- LAK Zellen, natürliche Killerzellen,
- dentritische Zellen,
- B-Zellen,
- Makrophagen,
- CD4+ T-Zellen,
- CD8+ T-Zellen,
- maligne Zellen: Kolon Ca Zellen, Lungen Ca Zellen

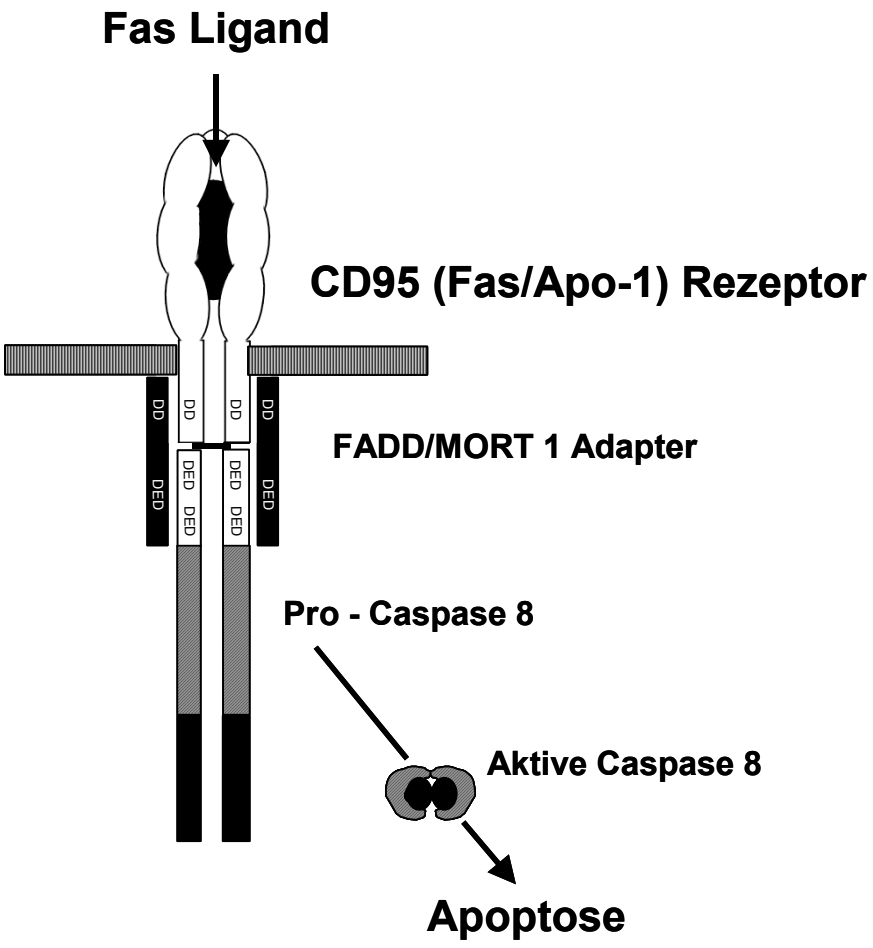


Abb. 3: *Modell der Fas/Fas Ligand-, nachfolgender Adapterprotein -bindung und Caspasenaktivation (mod. nach D. Rasper et al., 1998)*

1.3 CD97

CD97 (struktureller Aufbau siehe Abb. 4) gehört zur Sekretin Rezeptor Familie, welche ca. 2000 Mitglieder beinhaltet (Eischler et al., 1997).

CD97 besteht aus 722 Aminosäuren mit 8 potentiellen Glykolysationsstellen. CD97 Polypeptid ist ein 78-85 kDa schweres Zelloberflächenantigen und setzt sich aus einem 7-spannigen Transmembranprotein und einer großen extrazellulären Region zusammen, die über ein RGD Motiv (integrin recognition motiv) verfügt, welches ein Integrin-Erkennungsmotiv enthält und wahrscheinlich im Dienste der Adhäsionsvermittlung steht (Hamann et al., 2000). Die extrazelluläre Domäne enthält ferner drei bis fünf N-terminale „epidermal growth factor" (EGF) ähnliche Domänen, wobei zwei von ihnen eine Ca 2+ bindende Stelle aufweisen (Eichler et al., 1997). Die EGF Domänen ermöglichen Proteininteraktionen, wobei gebundenes Ca als stabilisierender Faktor wirkt (Gray et al.,1996). Die extrazelluläre Domäne vermittelt die Adhäsion zwischen verschiedenen Leukozytenpopulationen und zwischen Leukozyten und Zellen nichthämatopoetischen Ursprungs, wohingegen die 7-spannige transmembrane Domäne G-Protein vermittelte Signalübertragungen bewirkt (Eichler et al., 1997). Dies führt zum Anstieg von cAMP und/oder zur Mobilisation intrazellulären Kalziums (Hamann et al., 1995), wodurch die Funktion von Ionenkanälen und Transportern beeinflußt wird (Gray et al., 1996). CD97 ist fähig spezifisch CD55/DAF(decay accelerating factor) zu binden.

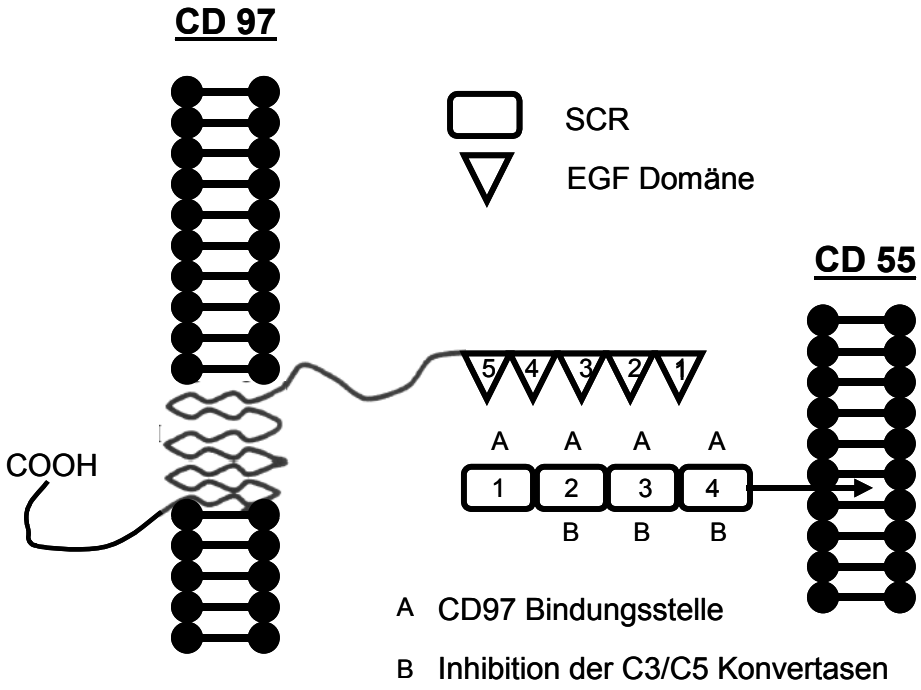


Abb. 4**:** *Darstellung des Strukturaufbaus von CD97, resp. CD55 (mod. nach van Lier et al., 1996)*

CD55 (struktureller Aufbau siehe Abb. 4) ist ein Glykosylphosphatidyl-Inositol -haltiges Molekül, was an der Regulation der Komplementkaskade beteiligt ist, indem es die Zelle durch die Inhibition der C3/C5 Konvertasen vor der komplementvermittelten Schädigung schützt (van Lier et al., 1996). Bei Überexpression in einigen Tumoren kommt es daher zum Fehlschlagen der antikörpervermittelten Lyse des Tumors (Spendlove et al., 1999). Die Bindung des CD55 wird durch die EGF-Domänen des CD97 vermittelt (Hamann et al., 2000) und bewirkt so die Adhäsion extrazellulärer Matrixkomponenten oder anderer Zelloberflächenmoleküle.

CD97 kann auch als Hormonrezeptor wirken, dessen Funktion durch die 7-spannige Transmembranregion vermittelt wird. CD97 Antigen wird auf der Zellmembran, im Cytoplasma, und auf Strukturen im und um den Zellkern detektiert (Aust et al., 1997). Die Expression des CD97 wird in einem Proteinkinase C (PKC)-, Protein Thyrosin Kinase- und Ca- abhängigen Prozeß hochreguliert, infolge der frühen Lymphozytenaktivation durch Stimulation antigenspezifischer Rezeptoren und durch die Wirkung einiger Mitogene (Eichler et al., 1997). Ferner wird die Expression durch EGF stimuliert und kann durch Retinsäureapplikation gemindert werden (Hoang-Vu et al.,1999). Eine erhöhte CD97 Expression findet sich auf Lymphozyten des peripheren Blutes (PBL) und bei Zellen myelo-monozytären Ursprungs (Eichler et al., 1997), wie es z.B. in Makrophagen, Monozyten, Granulozyten, dentritischen Zellen und aktivierten Lymphozyten nachgewiesen wurde (Hamann et al., 2000). CD97 dient daher als signalübertragender Rezeptor bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von Entzündungen (Gray et al., 1996). Ferner werden hohe Werte an CD97 im Entzündungsexsudat (Eichler et al., 1997), aber auch auf den meisten nicht-hämatopoetischen Zellen, wie z.B. in Mäusezellen von Herz, Gehirn, Milz, Lunge, Leber, Muskel, Niere, Testis (Hamann et al., 2000), vorgefunden.

Des weiteren besteht eine gesteigerte Expression im undifferenzierten anaplastischen Schilddrüsenkarzinom.

In diesem Sinne ist die Expression des CD97 ein Marker der Dedifferenzierung und Lymphknotenbeteiligung in humanen Schilddrüsentumoren (Aust et al., 1997).

1.4 Tumorartige benigne Schilddrüsenerkrankungen

1.4.1 Adenom

Das follikuläre Adenom ist ein gutartiger epithelialer Tumor mit follikulärer Differenzierung (Heitz et al., 2000).
Wird ein solitärer Tumorknoten in der Schilddrüse diagnostiziert, so handelt es sich zu 80% um Adenome und zu 20% um Karzinome, wobei die Tumoren in vorbestehenden Strumen häufiger auftreten als in nichtvergrößerten Schilddrüsen. Auch gilt es als gesichert, daß follikuläre Adenome in Jodmangelgebieten gehäuft auftreten. Vorrangig betroffen sind Frauen (2 bis 3 mal häufiger als Männer) ab dem 50. Lebensjahr.
Adenome können histopathologisch trabekulär, follikulär oder tubulär gebaut sein; sie werden jedoch alle als follikuläre Adenome bezeichnet, die der Größe ihrer Follikel nach in kolloidale oder makrofollikuläre, fetale oder mikrofollikuläre, sowie embryonale Varianten unterteilt werden.
Adenome unterliegen einer autonomen Wachstumstendenz, sind in aller Regel gekapselt und liegen in sonst unverändertem Schilddrüsengewebe.

Das follikuläre Adenom läßt sich funktionell in vier Gruppen unterteilen:
a) *kaltes Adenom (syn.: kalter Knoten)*
Es ist funktionell nicht aktiv und läßt sich daher nach Radiojodgabe szintigraphisch nicht darstellen. Es produziert jedoch stets Thyreoglobulin (Hedinger, 1986).

b) *warmes Adenom (syn.: warmer Knoten)*
Es unterscheidet sich vom normalem Schilddrüsengewebe dadurch, daß seine Grundaktivität von der TSH-Stimulation unabhängig ist, d.h. das Adenom produziert selbständig und autonom abnorme Hormonmengen. Im Szintigramm imponieren sie als Bezirke höherer Dichte, resp. höherer Radiojodakkumulation. Das hormonelle Gleichgewicht wird durch die Geschwulst jedoch nicht beeinflußt.

c) *heißes Adenom (syn.: heißer Knoten)*
Schreitet der Prozeß weiter fort, so ist das Adenom in der Lage durch die übermäßige eigene Hormonproduktion die TSH-Sekretion zu supprimieren.
Das umliegende Schilddrüsengewebe verliert infolgedessen seine Funktion und wird atrophisch, so daß sich im Szintigramm ausschließlich im Bereich des Knotens Radiojod ansammelt (Wartofsky, 1995).

***d**) toxisches (dekompensiertes) Adenom*

Es stellt eine Sonderform des heißen Knotens dar. Hier erfolgt eine TSH-Stimulierung des durch Punktmutation veränderten Rezeptors des Thyreozyten. Dies bewirkt einen Proliferationsreiz der Geschwulst und eine Erhöhung der T3 und T4 Hormonproduktion, was klinisch das Bild einer Hyperthyreose zeigt.

Follikuläre Adenome können in follikuläre Karzinome entarten, jedoch erst nach langem Verlauf (Heitz et al., 2000).

1.4.2 Struma

Jede (nichtneoplastische, nichtentzündliche) Vergrößerung der Schilddrüse über die obere Normgrenze des Gewichts (20-25g) wird als Struma bezeichnet. Die Struma ist ein wichtiges Syndrom von Funktionsstörungen der Schilddrüse. Die endemische Struma ist die häufigste endokrine Erkrankung. Etwa 5-15% der deutschen Bevölkerung sind daran erkrankt, mit geographisch nach Süden zunehmender Tendenz. Frauen sind 3-5 mal häufiger davon betroffen als Männer (Heitz et al., 2000).
Die Struma läßt sich in drei verschiedene Formen klassifizieren:

***a)** euthyreote Struma*

Die Struma aufgrund eines Jodmangels ist die häufigste Ursache einer Struma. Von einem endemischen Struma wird gesprochen, wenn mindestens 10% der Bevölkerung eine Struma aufweist. Besonders häufig manifestiert sich eine Struma während der Pubertät, Schwangerschaft und im Klimakterium.
Sporadisch vorkommende Strumen werden oft durch strumige Substanzen, wie z.B. Zyanogene, Glykoside, Vinylthiooxazolidon, Phyrazolonderivate, Phenylbutazan, Lithium, Jodexzeß oder Thyreostatika hervorgerufen (Reinwein, 1992). Ebenfalls führt der Epidermal growth factor (EGF) und der Insulin-like growth factor (IGF1) zu einer Hyperplasie der Schilddrüse, die im Gegensatz zur Hypertrophie der Schilddrüse (Jannsen et al., 2000) durch Jodmangel TSH unabhängig ist.

***b**) hypothyreote Struma*

Sie entsteht durch Störungen der Hormonsynthese in der Schilddrüse. Dies geschieht durch genetische Defekte in der T3/T4 –Synthese (z.B. Defekte des Jodid Transportes, Defekte der Peroxidase, der Dehalogenase und durch Defekte der Jod-Thyrosin-Bindung) (Heitz et al., 2000).

Das Hormon ist dadurch quantitativ ungenügend oder qualitativ unwirksam und die Hemmwirkung auf die hypothalamischen Zentren und indirekt auch auf die Hypophyse fällt weg und das infolgedessen vermehrt ausgeschiedene Hormon regt die Schilddrüse zur Proliferation an.

c) *hyperthyreote Struma*

Als wichtigstes Beispiel sei hier der Morbus Basedow angeführt. Hier handelt es sich um eine autonome Hyperthyreose. Der Defekt liegt in einer fehlerhaften Funktion der T-Suppressor-Lymphozyten, welche B-Lymphozyten aktivieren, die wiederum Immunglobuline freisetzen. Dadurch werden die TSH Rezeptoren der Follikelepithelzellmembran stimuliert. TSI (Thyreoidea-stimulierende Immunglobuline) stimulieren die T3/T4 –Synthese und –Sekretion, TGI (thyroid-growth-immunglobulin) stimuliert die Synthese von Strukturproteinen. Dies bewirkt eine Hypertrophie und Hyperplasie des Follikelepithels.

Histologisch lassen sich sechs verschiedene stadienbedingte Formen der Struma unterscheiden:

a*) Struma diffusa*

Sie stellt eine durch Proliferation des Schilddrüsengewebes bedingte Veränderung dar.
Die Follikelepithelzellen sind abgeflacht und es besteht eine vermehrte Kolloidbildung.

b*) Struma diffusa mit knotiger Hyperplasie*

Durch die ungleichmäßige Proliferation des Schilddrüsengewebes kommt es innerhalb der Struma zur Knotenbildung (Heitz et al., 2000).

c*) Struma nodosa*

Diese Form entsteht durch Abkapselung dieser Knoten.

d) *Struma diffusa et nodosa*

Sie ist die häufig vorkommende Kombination der oben genannten Proliferationsformen.

e) *Struma colloides (syn.: Struma makrofollicularis)*

Sie entsteht aus der Struma diffusa infolge positiver Hormonbilanz, resp. verminderter thyreotroper Stimulierung und/oder herabgesetzter TSH–Empfindlichkeit. Hier kommt es zur Abflachung des Epithels mit vermehrter Bildung von Kolloid (Altenähr et al., 1981; Schmid und Böker et al., 1997). Es treten häufig makropapilläre Formationen auf.

f) *regressive Veränderungen*

Sie stellen degenerative Veränderungen dar, die sich in Fibrosen, Hyalinosen, Verkalkungen, Blutungen und Zysten manifestieren.

„Derartige regressive Veränderungen sind für langandauernde Strumen gerade in Endemiegebieten außerordentlich typisch“ (Hedinger, 1986).

2 Zielstellung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist der Nachweis von Fas, FasL und CD97 und die Ermittlung deren Expressionsgrades mittels RT–PCR und Immunhistochemie beim Schilddrüsenadenom und Struma nodosa. Es sollen folgende Aspekte näher betrachtet werden:

- in welchem Maße wird Fas, FasL bzw. CD97 in den Struma nodosa-, respektive Schilddrüsenadenom-Geweben exprimiert ?
- Gibt es Unterschiede im Grad der Expression von Fas, FasL, CD97 der Strumen und Adenome ?
- Läßt sich anhand der Daten eine allgemeine Aussage über den Zusammenhang der Fas/FasL Expression und der Progression der Struma zum Adenom treffen ?
- Gibt es einen Unterschied im Expressionsgrad von CD97 der Adenome im Vergleich zu den Strumen, woraufhin auf eine stärkere maligne Tendenz der Schilddrüsenadenome geschlossen werden kann ?

3 Material und Methoden

3.1 Patientenmaterial

Die Untersuchungen wurden durch die Ethik-Kommission der medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg genehmigt.
Die untersuchten Schilddrüsengewebe stammen von Patienten, die zur Operation ihres Tumors aus klinischer Indikation in die Klinik für Allgemeinchirurgie der MLU Halle kamen. Alle Patienten gaben ihr Einverständnis zur Verwendung ihres Gewebes für wissenschaftliche Untersuchungen.
Das Gewebe wurde im Rahmen der Operation entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C gelagert.
Es wurden folgende Gewebe untersucht:

Struma nodosa	(28 Patienten)
Adenom	(24 Patienten)

3.2 Histologische Klassifikation

Anhand histopathologischer Befunde des Pathologischen Instituts der Universität Halle (Direktor: Prof. Dr. Rath) wurde eine histologische Klassifikation vorgenommen (siehe Tab. 2 und 3):

Struma nodosa

Fall	Histologie
1	Struma nodosa
2	Struma nodosa
3	Struma nodosa Rezidiv
4	Struma nodosa Rezidiv
5	Struma nodosa bei prim. HPT
6	Struma nodosa mit Begleitthyroiditis
7	Struma nodosa coll.
8	Struma nodosa coll.
9	Struma nodosa coll.
10	Struma nodosa coll.
11	Struma nodosa coll.
12	Struma nodosa coll.
13	Struma nodosa coll.
14	Struma nodosa et coll. u. perithyroidale Fremdkörperreaktion
15	Struma multinodosa, knotig hyperplastisches Schilddrüsengewebe
16	Struma nodosa, adenomat. Hyperplasie
17	Struma nodosa, adenomat. Hyperplasie
18	Struma nodosa et coll., adenomat. Hyperplasie
19	Struma nodosa coll., mehrere adenomat. hyperplastische Knoten
20	Struma nodosa, knotig adenomat. Hyperplasie mit ausgeprägter regressiver Veränderung
21	Struma nodosa mit adenomat. hyperplastischen Knoten, Zyste mit regressiver Veränderung
22	Struma nodosa mit regressiven Veränderungen
23	Struma nodosa mit regressiven Veränderungen
24	Struma nodosa mit regressiven Veränderungen
25	Struma nodosa coll. mit Regressionszeichen
26	Struma nodosa coll. mit Regressionsveränderungen
27	Struma nodosa coll. mit schwachen Regressionsveränderungen
28	Struma multinodosa, Struma coll. nod. mit regressiven Veränderungen

Tab. 2: *histopathologische Befunde der Strumen*

Adenom

Fall	Histologie
29	Adenom
30	Adenom
31	Adenom
32	foll. Adenom
33	foll. Adenom
34	foll. Adenom
35	foll. Adenom
36	foll. Adenom
37	foll. Adenom
38	foll. Adenom mit adenomat. Hyperplasie
39	foll., atypisches Adenom
40	foll. Adenom mit Autoimmunthyroiditis
41	mikrofoll. Adenom
42	foll. Adenom mit starken regressiven Veränderungen
43	foll. Adenom, stark regressiv verändert, adenomat. Hyperplasie
44	multinod. foll. Adenom mit starken regressiven Veränderungen
45	multifoll. Adenom mit regressiven Veränderungen
46	autonom. Adenom, fokal regressiv verändert, adenomat. Hyperplasie mit mikrofoll. Adenom
47	Adenom mit adenomat. Hyperplasie
48	Adenom mit adenomat. Hyperplasie
49	Adenom, adenomat. Hyperplasie, Struma nodosa
50	Adenom, adenomat. Hyperplasie, Struma nodosa et coll.
51	Adenom, adenomat. Hyperplasie, Struma multinod. et coll.
52	Adenom, adenomat. Hyperplasie, multilokale Autonomie, Struma multinod. et coll.

Tab. 3**:** *histopathologische Befunde der Schilddrüsenadenome*

3.3 RT-PCR

Insgesamt wurden 3 Primer für die zu untersuchenden Gene angewendet und 2 Primer (18 S und ß-Actin) als interne Kontrolle genutzt.

Primer	Amplifikatgröße	Annealing Temperatur	Zyklenzahl
18S (für Fas und CD97)	346bp	62°	28
ß-Actin (für FasL)	615bp	60°	40
Fas	819bp	56°	32
FasL	344bp	60°	40
CD97	331bp	64°	30

Tab. 4: *Größe der Amplifikate, Annealing Temperatur und Anzahl der Zyklen der verwendeten Primer*

Die für PCR benötigte cDNA wurde mittels Superscript II-Kit (Gibco, München) hergestellt. Für die PCR wurden 16,3 µl Aqua bidest, 2,5 µl 10x PCR-Puffer, 3,0 µl dNTP-Mix (inritec), jeweils 0,25 µl 10 pM Primer sense und antisense (metabion) (siehe Tab. 5), 0,2 µl Taq-DNA-Polymerase (Perkin Elmer) und 2,0 µl cDNA in ein PCR Tube pipettiert. Die PCR wurde mittels eines Thermozyklers (TRIO, Biometra, Göttingen) durchgeführt. Größe der Amplifikate, Annealing Temperatur sowie optimale Zyklenzahl sind in der Tabelle 4 dargestellt. Die elektrophoretische Trennung erfolgte auf einem 1%igen Universalagarosegel (Peqlab) bei 50 mA in TBE-Puffer und dauerte etwa 1-2 Stunden. mRNA von Kolonfibroblasten wurde als Positivkontrolle für Fas Rezeptor- und die Zellinie SW480 für die Fas Ligand- und CD97-Transkripte genutzt.

Primer		Sequenz
18S	S	5‘ GTT GGT GGA GCG ATT TGT CTG G 3‘
	AS	5‘ AGG GCA GGG ACT TAA TCA ACG C 3‘
ß-Actin	S	5 ' GGC ATC GTG ATG GAC TCC G 3‘
	AS	5 ' GCT GGA AGG TGG ACA GCG A 3‘
Fas	S	5 ' ATG CTG GGC ATC TGG ACC 3‘
	AS	5‘ CTG TTC TGC TGT GTC CTT GG 3‘
FasL	S	5 ' GGA TTG GGC CTG GGG ATG TTT CA 3‘
	AS	5 ' TTG TGG CTC AGG GGC AGG TTG TTG 3‘
CD97	S	5 ' CAG CAT CAG TGT GAC AGC TC 3‘
	AS	5 ' CTA TGA GGT GCC GGA CAG GT 3‘

Tab. 5: *Liste der verwendeten Primer und deren Sequenzen. S: Sense, AS: Antisense*

Auswertung

Als Bezugsgröße für die Auswertung der mRNA-Expression auf den Gelen diente die Bande der Kolonfibroblasten bzw. der Zellinie SW480.

- **-** schwache Expression, entspricht < 30% des Schwärzungsgrads der Vergleichsbande
- **(+)** mäßige Expression, entspricht 30 – 50% des Schwärzungsgrads der Vergleichsbande
- **+** hohe Expression, entspricht 50 –100% des Schwärzungsgrads der Vergleichsbande
- **++** sehr hohe Expression, entspricht >100% des Schwärzungsgrads der Vergleichsbande

Die Auswertung wurde mit Hilfe des Kodak Digital Science 1D 3.0.2 vorgenommen.

3.4 Immunhistochemie

Aus den tiefgefrorenen Geweben wurden mittels eines Cryostat-Mikrotoms 6-7 µm Schnitte angefertigt. Die Schnitte trockneten bei Raumtemperatur und wurden bis zur immunhistochemischen Färbung bei -80 °C gelagert.

Die immunhistochemische Färbung wurde mit LSAB-Kit (Peroxidase) und Chromogen-Substrat-Kit, d.h. mit der Avidin-Biotin-Komplex-Methode vorgenommen.

Die Gefrierschnitte wurden auf Raumtemperatur gebracht und zur Inaktivation der endogenen Peroxidase (enthalten in Erythrozyten und Granulozyten) in ein Gefäß mit 4 Teilen absolutem Methanol und einem Teil 3%igem Wasserstoffperoxid für 20 Minuten eingelegt. Nach anschließendem Spülen der Schnitte mit PBS-Lösung (Phosphate-buffered-Saline-Puffer) wurde pro Schnitt 100 µl Blockserum (normales Schweineserum 1:5 mit PBS+1%BSA (Rinderserumalbumin)–Lösung verdünnt) aufgebracht, für 5 Minuten inkubiert und abgetupft. Das Blockserum verhindert, daß die nicht zu detektierenden Proteine zu keinem falsch positiven Ergebnis führen.

Hiernach wurden die Schnitte mit dem jeweiligen monoklonalen Primärantikörper (anti-Apo-1/ Fas oder Fas Ligand, 1:100 mit PBS+1% BSA verdünnt) für ca.18 Std. bei 4 °C inkubiert (nähere Spezifikation der verwendeten Primärantikörper siehe Tabelle 6). Nach zweimaligem Waschen der Schnitte mit PBS-Lösung wurde der biotinylierte Brückenantikörper (Anti-Kaninchen, Anti-Maus, Anti-Ziege Immunglobulin DAKO, USA) aufgetragen und für 30 Minuten inkubiert. Nach zweimaligem Spülen der Schnitte mit PBS-Lösung wurde die Substrat-Chromogen Lösung (DAKO, USA) aufgetragen und 5 Minuten inkubiert. Die Antigen-Antikörper Bindungsstellen wurden nun sichtbar, indem sich markierte Stellen im Präparat rotbraun darstellten. Die Präparate wurden mit Aqua bidest gespült und mit Hämalaun (1:1 mit Aqua bidest verdünnt) gegengefärbt. Nach nochmaligem Spülen mit Aqua bidest wurden die Schnitte mit Aquatex eingedeckt.

Die Spezifität der Immunhistochemie wurde durch Auslassen einzelner Schritte im Protokoll, bzw. durch Ersetzen des Antikörpers durch ein nicht immunes Serum überprüft (Van Noorden et al., 1990).
Als Positivkontrolle diente ein Kolonkarzinom.

Antikörper

Für den immunhistochemischen Nachweis von Fas Rezeptor-Antigenen und Fas Ligand wurden folgende Antikörper verwandt:

Anti-körper	Ursprung	Ig – Subklasse	Verdünnung	Firma	Referenzen
anti-Apo-1 /Fas	Maus-monoklonaler Antikörper Clone SM 1/1 oder Clone APO-1-3	IgG 2a oder IgG3	1:100	Bender Med Systems	Yonehara, et al., 1994
Fas L	Maus-monoklonaler Antikörper Clone 33	IgG1	1:100	Transduction Laboratories	Mita, et al. 1994 Tanaka, et al. 1995

Tab. 6: *Verzeichnis der verwendeten Fas- und Fas Ligand Antikörper*

Auswertung

Die histologischen Schnitte wurden lichtmikroskopisch von zwei unabhängigen Untersuchern ausgewertet, die die klinische und histologische Diagnose nicht kannten.
Die Färbungen wurden subjektiv semiquantitativ und semiqualitativ bewertet:
quantitativ - Prozentsatz der Tumorzellen oder des Stromas mit Immunreaktivität
qualitativ - Qualitative Intensität der Färbung (-negativ, -schwach, -stark)

Die Immunreaktivität wurde in folgende vier Gruppen klassifiziert:

- **-** negativ
- **+** fokal schwache Färbung (< 50% positive Zellen)
- **++** fokal starke Färbung (< 50% positive Zellen) oder diffus schwache Färbung (> 50% positive Zellen)
- **+++** diffus starke Färbung (> 50% stark positive Zellen)

4 Ergebnisse

4.1 RT-PCR

Die RT-PCR Untersuchungen wurden anhand 27 Struma nodosa- (siehe Tab. 7) und 15 Adenom- (siehe Tab. 11) Präparaten durchgeführt.

4.1.1 Struma nodosa

Fall	Histologie	Fas	Fas Ligand	CD 97
2	Struma nodosa	(+)	-	-
3	Struma nodosa Rezidiv	-	-	-
4	Struma nodosa Rezidiv	(+)	-	(+)
5	Struma nodosa bei prim. HPT	(+)	-	-
6	Struma nodosa, Begleitthyreoditis	(+)	+	(+)
7	Struma nodosa coll.	-	(+)	-
8	Struma nodosa coll.	(+)	(+)	-
9	Struma nodosa coll.	+	+	-
10	Struma nodosa coll.	+	-	-
11	Struma nodosa coll.	(+)	(+)	-
12	Struma nodosa coll.	-	-	-
13	Struma nodosa coll.	+	-	(+)
14	Struma nodosa coll., perithyroidale Fremdkörperreaktion	(+)	-	-
15	Struma multinodosa, knotig hyperplast.Gewebe	-	-	(+)
16	Struma nodosa, adenomat. Hyperplasie	+	-	-
17	Struma nodosa, adenomat. Hyperplasie	+	-	-
18	Struma nodosa et coll., adenomat. Hyperplasie	++	+	-
19	Struma nodosa coll., mehrere adenomat. hyperplast. Knoten	++	-	-
20	Struma nodosa, knotig adenomat. Hyperplasie mit ausgeprägter regressiver Veränderung	++	-	-
21	Struma nodosa, adenomat. hyperplast. Knoten, Zyste mit regressiver Veränderung	++	(+)	-
22	Struma nodosa, regressiv verändert	+	-	-
23	Struma nodosa, regressiv verändert	-	-	-
24	Struma nodosa, regressiv verändert	(+)	-	(+)
25	Struma nodosa coll., regressiv verändert	(+)	-	(+)
26	Struma nodosa coll., regressiv verändert	(+)	-	-
27	Struma nodosa coll., schwach regressiv verändert	-	+	-
28	Struma multinodosa, Struma coll. nod., regressiv verändert	+	-	-

Tab. 7: *mRNA-Expression von Fas, Fas Ligand und CD97 im Struma nodosa. Als Bezugsgröße für die Auswertung der mRNA-Expression diente die Bande der Kolonfibroblasten, bzw. der Zellinie SW480. Diese Bande wurde als hohe Expression (100%) definiert.* ***–*** *schwache Expression, entspricht < 30% des Schwärzungsgrads der Vergleichsbande;* ***(+)*** *mäßige Expression, entspricht 30-50% des Schwärzungsgrads der Vergleichsbande;* ***+*** *hohe Expression, entspricht 50-100% des Schwärzungsgrads der Vergleichsbande;* ***++*** *sehr hohe Expression, entspricht >100% des Schwärzungsgrads der Vergleichsbande.*

Fas

12 von 20 Struma nodosa Geweben ohne regessive Veränderungen exprimierten in mäßigem bis hohem Maße Fas-mRNA, wobei 4 Fälle (Fall: 18, 19, 20, 21) eine sehr hohe und 4 Fälle (Fall: 3, 7, 12, 15) eine schwach nachweisbare mRNA Expression zeigten. 5 von 7 regressiv veränderte Strumen wiesen eine mäßige bis hohe Fas-mRNA Expression auf (siehe Abb. 5 und Tab. 8).

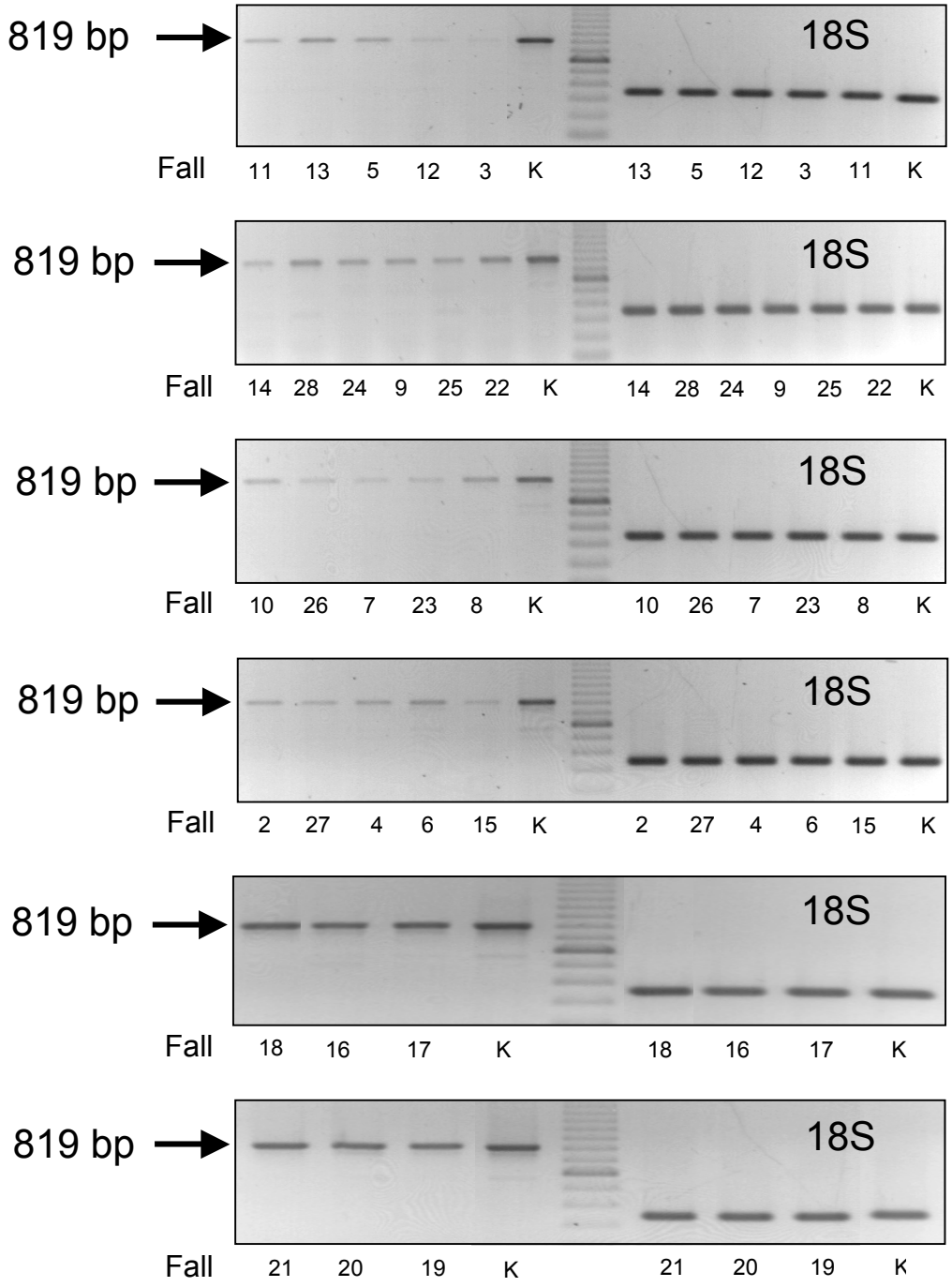


Abb. 5: *mRNA-Expression von Fas und 18S bei Struma nodosa Geweben. Die Bande von 18S zeigt, daß die Probe gleichmäßig aufgetragen wurde. Als Bezugsgröße für die Auswertung der mRNA-Expression auf den Gelen diente die Bande der Kolonfibroblasten (=K). Diese Bande wurde als hohe Expression (100%) definiert. Demgegenüber wurden schwächere Banden als – (schwache Expression), (+) (mäßige Expression), bzw. + (hohe Expression) und ++ (sehr hohe Expression) bewertet.*

Fall	11	13	5	12	3	14	28	24	9	25
Expressions-grad	45%	67%	42%	14%	4%	42%	84%	49%	51%	44%

Fall	22	10	26	7	23	8	2	27	4
Expressions-grad	60%	52%	31%	19%	19%	44%	47%	29%	38%

Fall	6	15	18	16	17	21	20	19	K
Expressions-grad	46%	19%	117%	91%	92%	108%	103%	101%	100%

Tab. 8: *Errechnete Fas mRNA Expressionsgrade der Struma nodosa Gewebe*

Fas Ligand

In 4 von 20 Struma nodosa Geweben ohne regressive Veränderungen konnte eine mäßig positive Fas Ligand mRNA Expression detektiert werden, des weiteren wiesen 3 von 20 Geweben (Fall: 6, 9, 18) eine hohe Expression auf. Der überwiegende Teil verhielt sich schwach positiv.

Bei den 7 regressiv veränderten Strumen wies lediglich ein Gewebe (Fall: 27) eine hohe FasL mRNA Expression auf, alle übrigen Gewebe waren durch eine schwache Expression gekennzeichnet (siehe Abb. 6 und Tab. 9).

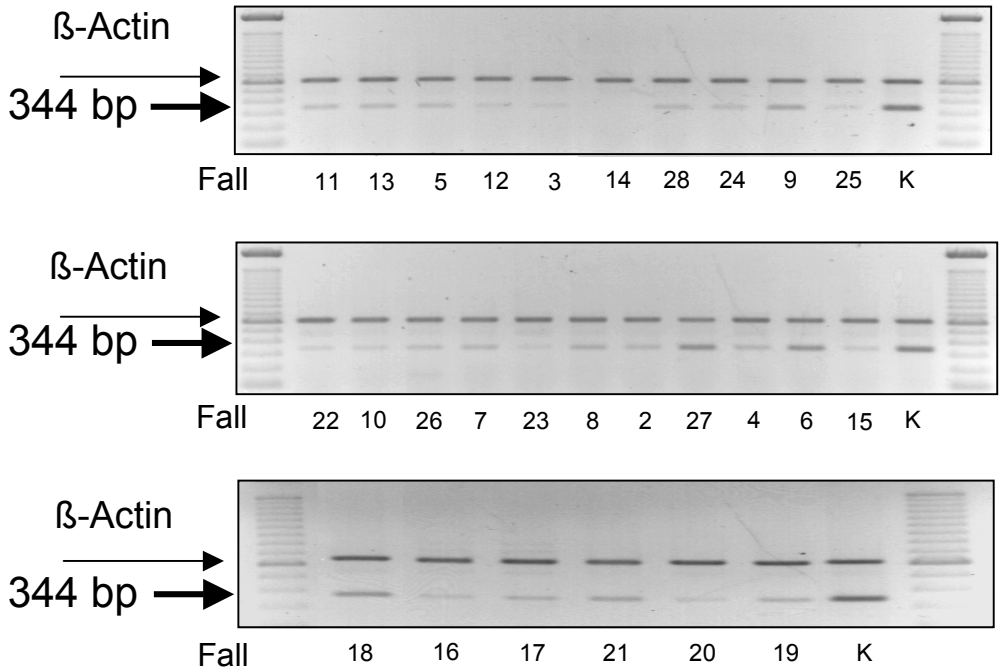


Abb. 6: *mRNA-Expression von Fas Ligand und ß-Actin bei Struma nodosa Geweben. Die Bande von ß-Actin zeigt, daß die Probe gleichmäßig aufgetragen wurde. Als Bezugsgröße für die Auswertung der mRNA-Expression auf den Gelen diente die Bande der Zellinie SW480 (=K). Diese Bande wurde als hohe Expression (100%) definiert. Demgegenüber wurden schwächere Banden als – (schwache Expression), (+) (mäßige Expression), bzw. + (hohe Expression) und ++ (sehr hohe Expression) bewertet.*

Fall	11	13	5	12	3	14	28	24	9	25
Expressions-grad	31%	29%	29%	16%	13%	0%	21%	21%	57%	15%

Fall	22	10	26	7	23	8	2	27	4
Expressions-grad	18%	15%	28%	37%	11%	35%	29%	100%	28%

Fall	6	15	18	16	17	21	20	19	K
Expressions-grad	84%	25%	51%	14%	21%	37%	9%	26%	100%

Tab. 9: *Errechnete Fas Ligand mRNA Expressionsgrade der Struma nodosa Gewebe*

CD97

Hier wurde in nur 4 (Fall: 4, 6, 13, 15) von 20 Struma nodosa Geweben ohne regressive Veränderung eine mäßige CD97 mRNA Expression beobachtet. In den übrigen16 Geweben konnte lediglich eine schwache Expression nachgewiesen werden. Der Hauptanteil der 7 untersuchten regressiv veränderten Strumen exprimierte CD97 mRNA nur schwach, lediglich in 2 Fällen (Fall: 24, 25) konnte eine mäßige Expression beobachtet werden (siehe Abb. 7 und Tab. 10).

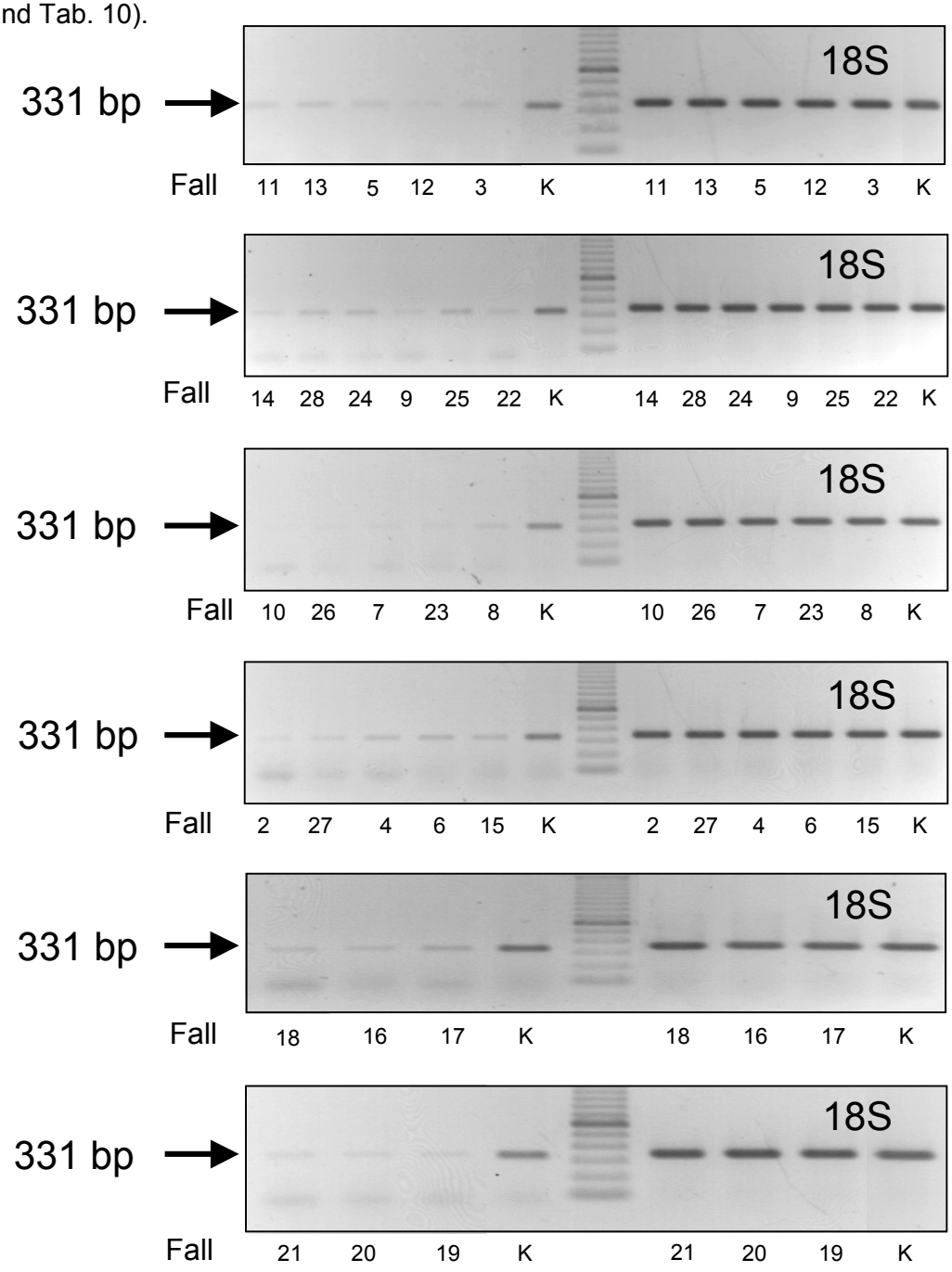


Abb. 7: *mRNA-Expression von CD97 und 18S bei Struma nodosa Geweben. Die Bande von 18S zeigt, daß die Probe gleichmäßig aufgetragen wurde. Als Bezugsgröße für die Auswertung der mRNA-Expression auf den Gelen diente die Bande der Zellinie SW480 (=K). Diese Bande wurde als hohe Expression (100%) definiert. Demgegenüber wurden schwächere Banden als – (schwache Expression), (+) (mäßige Expression), bzw. + (hohe Expression) und ++ (sehr hohe Expression) bewertet.*

Fall	11	13	5	12	3	14	28	24	9	25
Expressions-grad	26%	36%	23%	9%	16%	20%	29%	34%	11%	37%

Fall	22	10	26	7	23	8	2	27	4
Expressions-grad	16%	1%	9%	9%	6%	21%	12%	21%	31%

Fall	6	15	18	16	17	21	20	19	K
Expressions-grad	39%	30%	20%	19%	29%	16%	18%	18%	100%

Tab. 10: *Errechnete CD97 mRNA Expressionsgrade der Struma nodosa Gewebe*

4.1.2 Adenom

Fall	Histologie	Fas	Fas Ligand	CD 97
30	Adenom	+	+	-
31	Adenom	+	(+)	-
32	foll. Adenom	+	-	-
33	foll. Adenom	+	-	(+)
37	foll. Adenom	++	-	(+)
41	mikrofoll. Adenom	++	-	-
42	foll. Adenom, stark regressiv verändert	+	+	(+)
43	foll. Adenom, stark regressiv verändert, adenomat. Hyperplasie	+	(+)	+
44	multinod. foll. Adenom, stark regressiv verändert	++	-	(+)
45	multifoll. Adenom, regressiv verändert	++	+	(+)
46	autonom. Adenom, fokal regressiv verändert, adenomat. Hyperplasie mit mikrofoll. Adenom	++	-	-
47	Adenom mit adenomat. Hyperplasie	+	+	(+)
49	Adenom, adenomat. Hyperplasie, Struma nodosa	+	(+)	(+)
50	Adenom, adenomat. Hyperplasie, Struma nodosa et coll.	++	(+)	(+)
51	Adenom, adenomat. Hyperplasie, Struma multinod. et coll.	+	-	-

Tab. 11: *mRNA-Expression von Fas, Fas Ligand und CD97 im Struma nodosa. Als Bezugsgröße für die Auswertung der mRNA-Expression diente die Bande der Kolonfibroblasten, bzw. die Zellinie SW480. Diese Bande wurde als hohe Expression (100%) definiert.* ***–*** *schwache Expression, entspricht < 30% des Schwärzungsgrads der Vergleichsbande;* ***(+)*** *mäßige Expression, entspricht 30-50% des Schwärzungsgrads der Vergleichsbande;* ***+*** *hohe Expression, entspricht 50-100% des Schwärzungsgrads der Vergleichsbande;* ***++*** *sehr hohe Expression, entspricht >100% des Schwärzungsgrads der Vergleichsbande.*

Fas

Der Fas Rezeptor wurde in allen 15 untersuchten Adenomgeweben exprimiert, wobei sich 6 Gewebe (Fall: 37, 41, 44, 45, 46, 50) durch eine sehr hohe mRNA Expression auszeichneten. Alle anderen Gewebe wiesen eine hohe Expression auf (siehe Abb. 8 und Tab. 12).

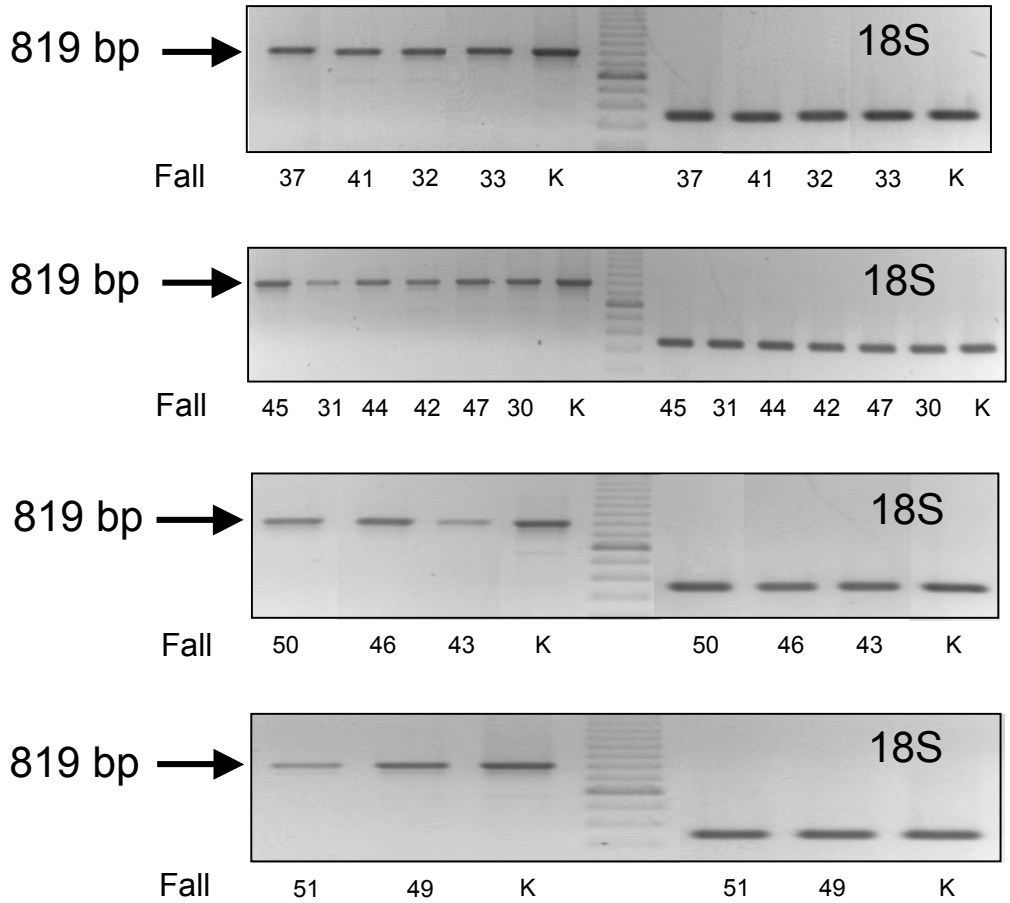


Abb. 8: *mRNA-Expression von Fas und 18S der Schilddrüsenadenomgewebe. Die Bande von 18S zeigt, daß die Probe gleichmäßig aufgetragen wurde. Als Bezugsgröße für die Auswertung der mRNA-Expression auf den Gelen diente die Bande der Zellinie SW480, bzw. der Kolonfibroblasten (=K). Diese Bande wurde als hohe Expression (100%) definiert. Demgegenüber wurden schwächere Banden als – (schwache Expression), (+) (mäßige Expression), bzw. + (hohe Expression) und ++ (sehr hohe Expression) bewertet.*

Fall	37	41	32	33	45	31	44	42
Expressions-grad	112%	108%	95%	94%	112%	65%	103%	83%

Fall	47	30	50	46	43	51	49	K
Expressions-grad	100%	96%	106%	113%	56%	59%	91%	100%

Tab. 12: *Errechnete Fas mRNA Expressionsgrade der Schilddrüsenadenomgewebe*

Fas Ligand

7 der 15 untersuchten Gewebe ließen eine schwache FasL Expression erkennen, wobei bei 4 Geweben (Fall: 31, 43, 49, 50) eine mäßige Expression und bei weiteren 4 Geweben (Fall: 30, 42, 45, 47) eine hohe FasL mRNA Expression zu verzeichnen war (siehe Abb. 9 und Tab. 13).

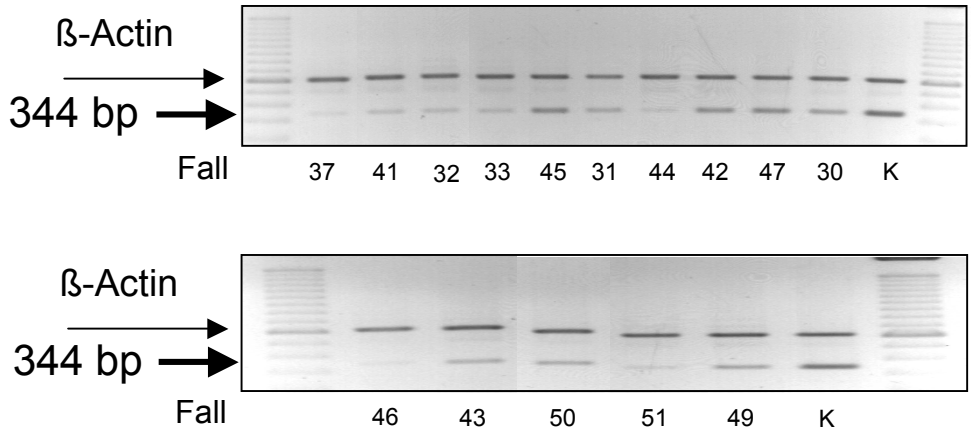


Abb. 9: *mRNA-Expression von Fas Ligand und ß-Actin der Schilddrüsenadenomgewebe. Die Bande von ß-Actin zeigt, daß die Probe gleichmäßig aufgetragen wurde. Als Bezugsgröße für die Auswertung der mRNA-Expression auf den Gelen diente die Bande der Zellinie SW480 (=K). Diese Bande wurde als hohe Expression (100%) definiert. Demgegenüber wurden schwächere Banden als – (schwache Expression), (+) (mäßige Expression), bzw. + (hohe Expression) und ++ (sehr hohe Expression) bewertet.*

Fall	37	41	32	33	45	31	44	42
Schwärzungs-grad	10%	19%	20%	22%	67%	44%	13%	54%

Fall	47	30	46	43	50	51	49	K
Schwärzungs-grad	65%	51%	6%	31%	39%	14%	41%	100%

Tab. 13: *Errechnete Fas Ligand mRNA Expressionsgrade der Schilddrüsenadenomgewebe*

CD97

In 6 von 15 Geweben konnte nur eine schwache CD97 mRNA Expression detektiert werden. Die verbleibenden 9 Gewebe wiesen ein mäßiges bis hohes Maß der Expression auf (siehe Abb. 10 und Tab. 14).

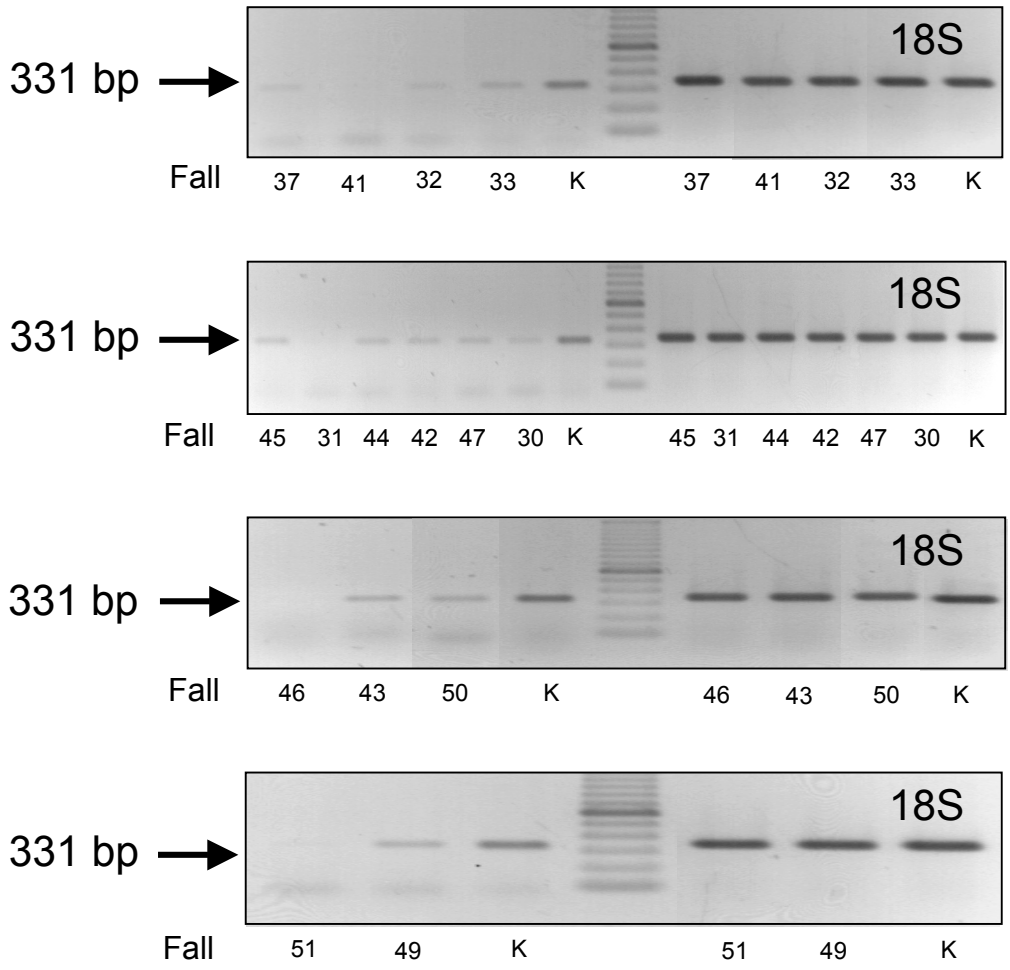


Abb. 10: *mRNA-Expression von CD97 und 18S der Schilddrüsenadenomgewebe. Die Bande von 18S zeigt, daß die Probe gleichmäßig aufgetragen wurde. Als Bezugsgröße für die Auswertung der mRNA-Expression auf den Gelen diente die Bande der Zellinie SW480 (=K). Diese Bande wurde als hohe Expression (100%) definiert. Demgegenüber wurden schwächere Banden als – (schwache Expression), (+) (mäßige Expression), bzw. + (hohe Expression) und ++ (sehr hohe Expression) bewertet.*

Fall	37	41	32	33	45	31	44	42
Expressions-grad	30%	5%	18%	31%	44%	5%	38%	32%

Fall	47	30	46	43	50	51	49	K
Expressions-grad	34%	20%	0%	51%	39%	7%	48%	100%

Tab. 14: *Errechnete CD97 mRNA Expressionsgrade der Schilddrüsenadenomgewebe*

Das folgende Diagramm (Abb. 11) veranschaulicht die oben dargestellten Ergebnisse der Fas/FasL/CD97 mRNA-Expression:

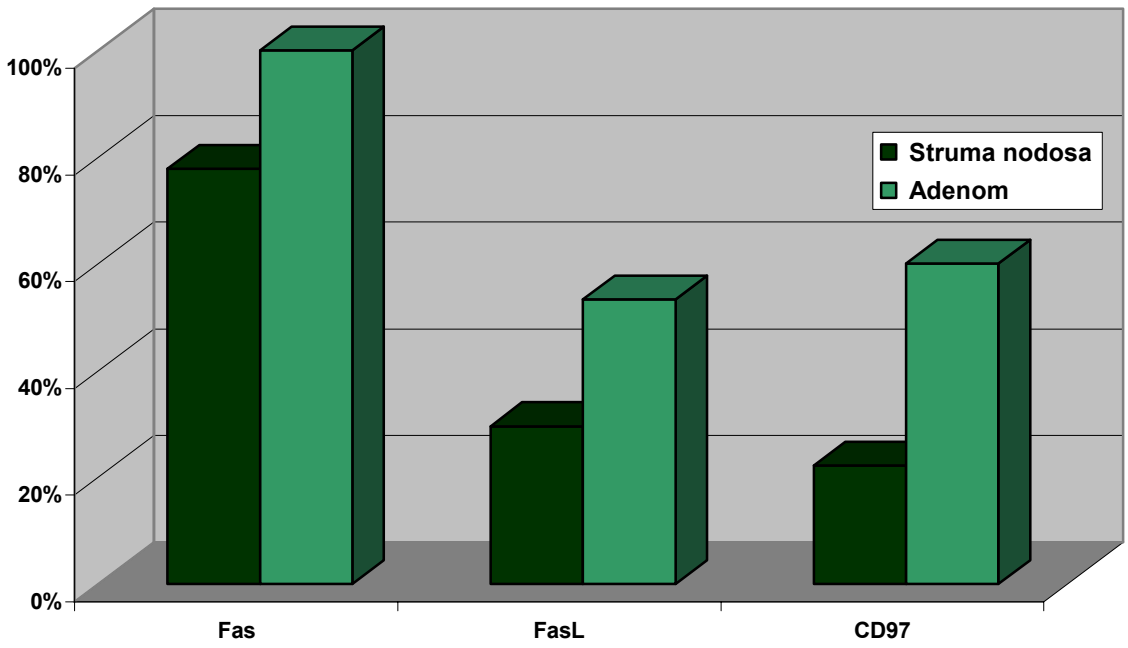


Abb. 11: *Prozentuale Anteile der Fas, FasL und CD97 mRNA positiven Schilddrüsengewebe in Struma nodosa- und Adenom– Geweben.*
Die Höhe des Balkens entspricht der Anzahl der Gewebe mit positiver mRNA Expression.

4.2 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie wurde mit 27 Struma nodosa- (siehe Tab. 15) und 23 Adenom-Geweben (siehe Tab. 16) durchgeführt.

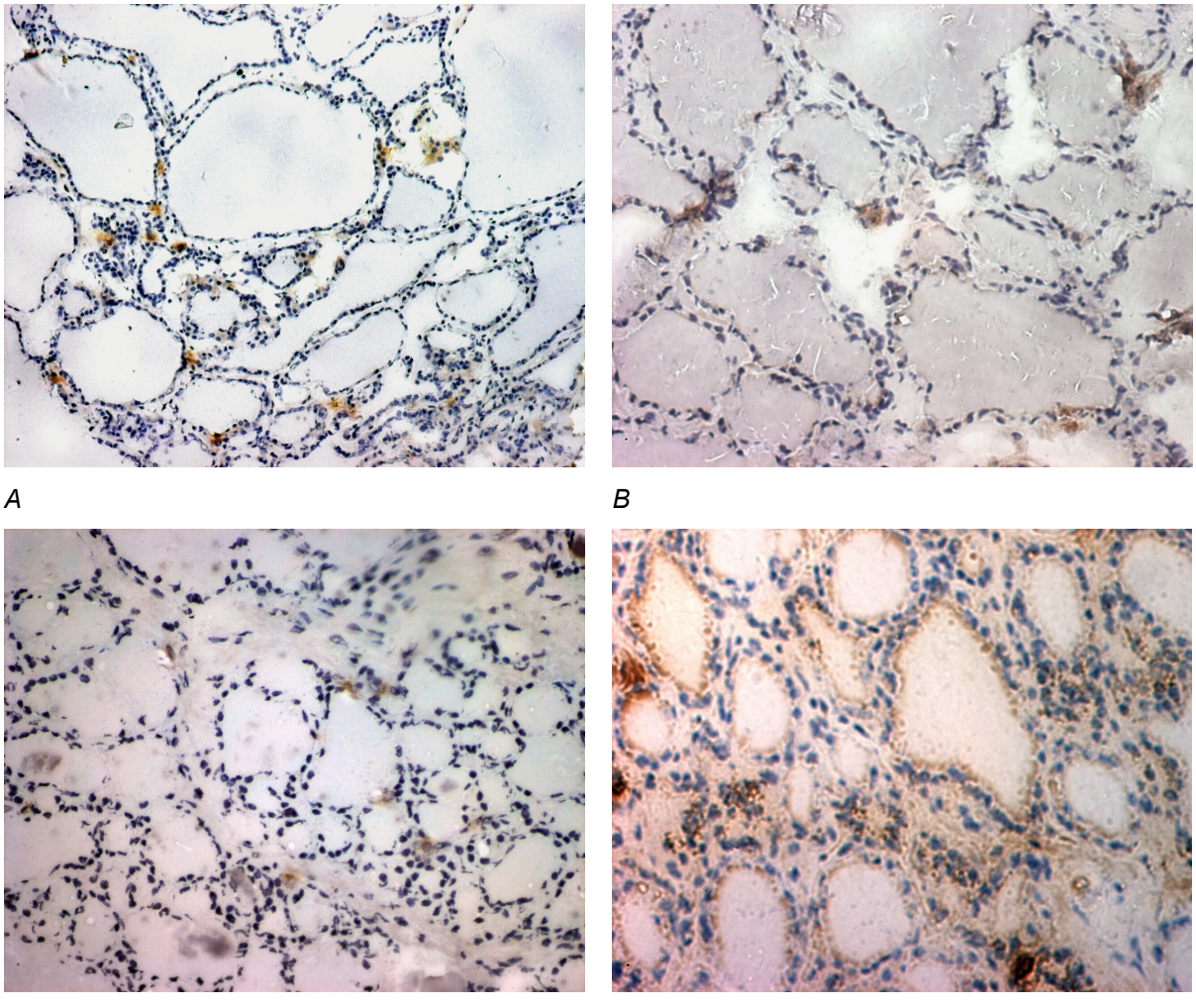
4.2.1 Struma nodosa

Fall	Histologie	Fas	Fas Ligand
1	Struma nodosa	++	++
2	Struma nodosa	+	+
3	Struma nodosa Rezidiv	++	+++
4	Struma nodosa Rezidiv	+	+
5	Struma nodosa bei prim. HPT	+	+
6	Struma nodosa, Begleitthyreoditis	+	++
7	Struma nodosa coll.	+	+
8	Struma nodosa coll.	+	+
9	Struma nodosa coll.	+	+
10	Struma nodosa coll.	+	+
11	Struma nodosa coll.	+	+
13	Struma nodosa coll.	+	+
14	Struma nodosa coll., perithyroidale Fremdkörper-reaktion	+	+
15	Struma multinodosa, knotig hyperplastisches Schilddrüsengewebe	–	–
16	Struma nodosa, adenomat. Hyperplasie	++	+++
17	Struma nodosa, adenomat. Hyperplasie	+	+
18	Struma nodosa et coll., adenomat. Hyperplasie	+	+
19	Struma nodosa coll., mehrere adenomat. hyperplast. Knoten	+	+
20	Struma nodosa, knotig adenomat. Hyperplasie mit ausgeprägter regressiver Veränderung	++	++
21	Struma nodosa mit adenomat. hyperplastischen Knoten, Zyste mit regressiver Veränderung	++	++
22	Struma nodosa, regressiv verändert	+	+++
23	Struma nodosa, regressiv verändert	+	++
24	Struma nodosa, regressiv verändert	++	++
25	Struma nodosa coll., regressiv verändert	+	+
26	Struma nodosa coll., regressiv verändert	+	+
27	Struma nodosa coll., schwach regressiv verändert	+++	+
28	Struma multinodosa, Struma coll. nod., regressiv verändert	+	++

Tab. 15 : *Immunreaktivität von Fas und Fas Ligand im Struma nodosa.* ***-*** *negativ;* ***+*** *fokal schwache Färbung (< 50% positive Zellen);* ***++*** *fokal starke Färbung (< 50% positive Zellen) oder diffus schwache Färbung (> 50% positive Zellen);* ***+++*** *diffus starke Färbung (> 50% stark positive Zellen)*

Fas

Abgesehen von einer Ausnahme (Fall: 15) wurde der Fas Rezeptor von allen 27 untersuchten Strumen exprimiert. Vorrangig konnte in 14 von 20 nicht regressiv veränderten Strumen eine fokal schwache Färbung detektiert werden (siehe Abb. 12 A, 12 B, 12 C), 5 Gewebe (Fall: 1, 3, 16, 20, 21) wiesen jedoch eine fokal starke Färbung auf. Eines der regressiv veränderten Strumen (Fall: 24) wies ebenfalls eine fokal starke Färbung auf, Fall 27 zeigte sogar eine diffus starke Färbung (siehe Abb. 12 C, 12 D).



A *B*

C *D*

Abb. 12: *Immunhistochemischer Nachweis von Fas im Struma nodosa Gewebe*

A: Fas Immunreaktivität einer Struma nodosa mit Begleitthyroiditis, fokal schwache Färbung einzelner Thyreozyten, (Fall: 6; 10 -fache Vergrößerung).

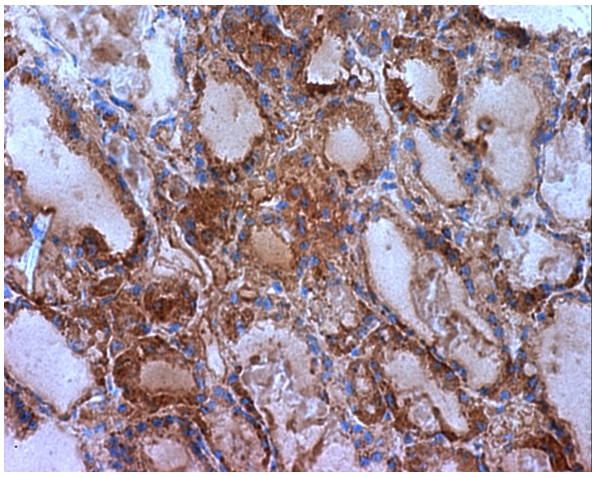
B: Fas Immunreaktivität einer Struma nodosa colloides, fokal schwache Färbung einzelner Thyreozyten, (Fall: 8; 20 -fache Vergrößerung).

C: Fas Immunreaktivität einer Struma nodosa, fokal schwache Färbung einzelner Thyreozyten, (Fall: 17; 20 -fache Vergrößerung).

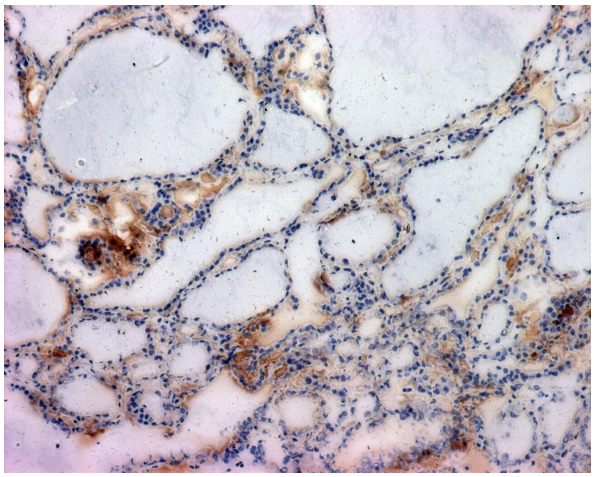
D: Fas Immunreaktivität einer regessiv veränderten Struma nodosa colloides, diffus starke Färbung der Thyreozyten, (Fall: 27; 20 -fache Vergrößerung).

Fas Ligand

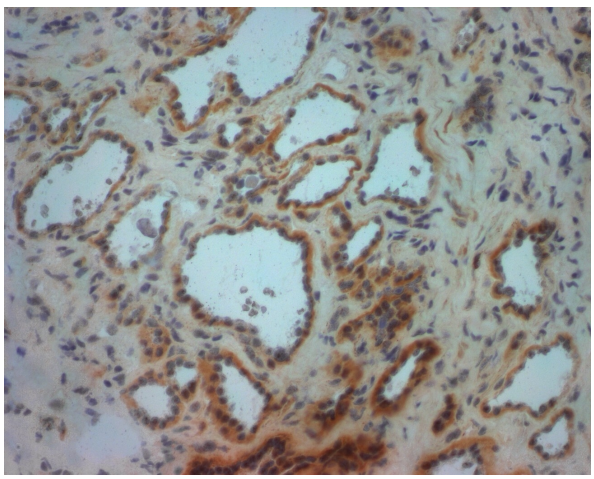
Auch hier konnte, mit Ausnahme eines Gewebes (Fall: 15), eine positive Expression aller 27 immunhistochemisch untersuchter Gewebe beobachtet werden. Der überwiegende Teil (in 13 von 20 Fällen) der Strumen ohne regressive Veränderungen ließ eine fokal schwache Färbung der Thyreozyten erkennen, wobei in 4 der Strumen (Fall: 1, 6, 20, 21) eine fokal starke Färbung (siehe Abb. 13 B) und in 2 Strumen (Fall: 3, 16) sogar eine diffus starke Immunreaktion hervorgerufen wurde (siehe Abb. 13 A, 13 C). Bei den 7 regressiv veränderten Strumen ließen sich in 3 Fällen (Fall: 23, 24, 28) eine fokal starke bis diffus schwache Reaktion (siehe Abb. 14 B, 14 C) und im Fall 22 sogar eine diffus starke Färbung detektieren (siehe Abb. 14 A).



A



B



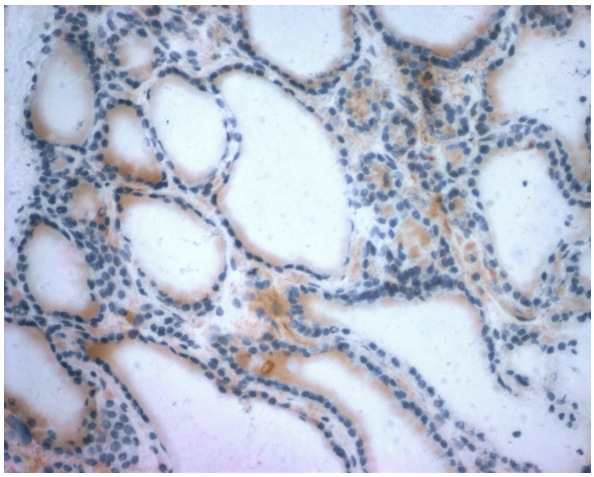
C

Abb. 13: *Immunhistochemischer Nachweis von Fas Ligand im Struma nodosa Gewebe*

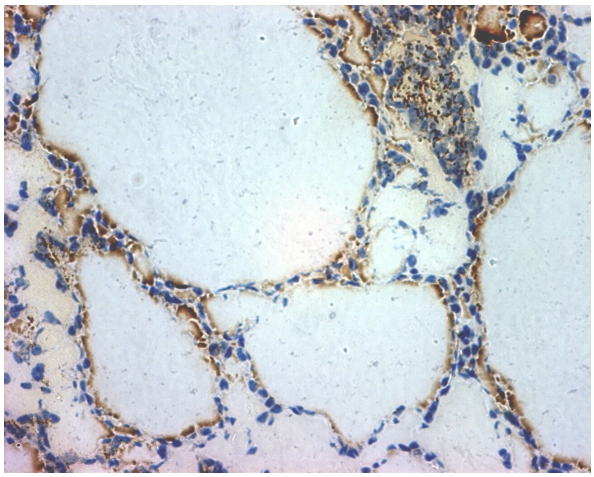
A: Fas Ligand Immunreaktivität eines Struma nodosa Rezidivs, diffus starke Färbung vieler Thyreozyten, (Fall: 3; 10 –fache Vergrößerung).

B: Fas Ligand Immunreaktivität einer Struma nodosa mit Begleitthyroiditis, fokal starke Färbung einzelner Thyreozyten, (Fall: 6; 10 -fache Vergrößerung).

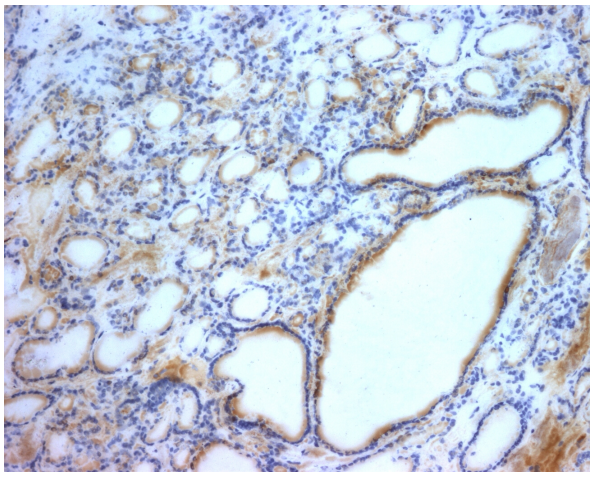
C: Fas Ligand Immunreaktivität einer Struma nodosa, diffus starke Färbung vieler Thyreozyten, (Fall: 16; 20 –fache Vergrößerung).



A



B



C

Abb. 14: *Immunhistochemischer Nachweis von Fas Ligand in regressiv verändertertem Struma nodosa Gewebe*

A: Fas Ligand Immunreaktivität einer regressiv veränderten Struma nodosa, diffus starke Färbung der Thyreozyten, (Fall: 22; 20 -fache Vergrößerung).

B: Fas Ligand Immunreaktivität einer regressiv veränderten Struma nodosa, fokal starke Färbung der Thyreozyten, (Fall: 23; 20 -fache Vergrößerung).

C: Fas Ligand Immunreaktivität einer regressiv veränderten Struma nodosa colloides, fokal starke Färbung der Thyreozyten, (Fall: 28; 10 -fache Vergrößerung).

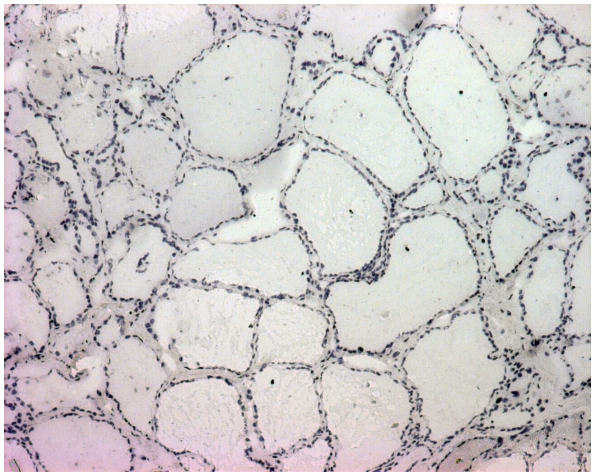
4.2.2 Adenom

Fall	Histologie	Fas	Fas Ligand
29	Adenom	–	–
31	Adenom	+	++
32	foll. Adenom	+	+
33	foll. Adenom	+	+
34	foll. Adenom	+	+
35	foll. Adenom	+	+
36	foll. Adenom	++	+++
37	foll. Adenom	+	+++
38	foll. Adenom mit adenomat. Hyperplasie	+++	+++
39	foll. Adenom (atypisch)	+	++
40	foll. Adenom, Autoimmunthyreoditis	+	+
41	mikrofoll. Adenom	+	+
42	foll. Adenom, stark regessiv verändert	–	+++
43	foll. Adenom, stark regressiv verändert, adenomat. Hyperplasie	+	++
44	multinod. foll. Adenom, stark regressiv verändert	+	+++
45	multifoll. Adenom, regressiv verändert	+	+
46	autonom. Adenom, fokal regressiv verändert, adenomat. Hyperplasie mit mikrofoll. Adenom	++	+++
47	Adenom mit adenomat. Hyperplasie	++	++
48	Adenom mit adenomat. Hyperplasie	+	++
49	Adenom, adenomat. Hyperplasie, Struma nodosa	+	+
50	Adenom, adenomat. Hyperplasie, Struma nodosa et coll.	++	+++
51	Adenom, adenomat. Hyperplasie, Struma multinod. et coll.	+	+
52	Adenom, adenomat. Hyperplasie, multilokale Autonomie, Struma multinod. et coll.	+	+

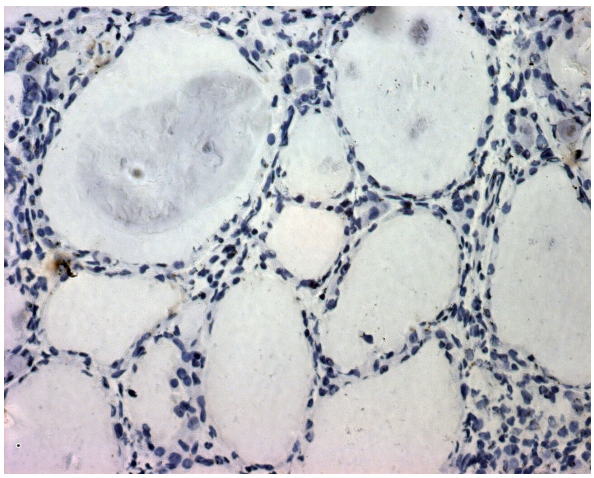
Tab. 16: *Immunreaktivität von Fas und Fas Ligand im Adenom.* **-** *negativ;* **+** *fokal schwache Färbung (< 50% positive Zellen);* **++** *fokal starke Färbung (< 50% positive Zellen) oder diffus schwache Färbung (> 50% positive Zellen);* **+++** *diffus starke Färbung (> 50% stark positive Zellen)*

Fas

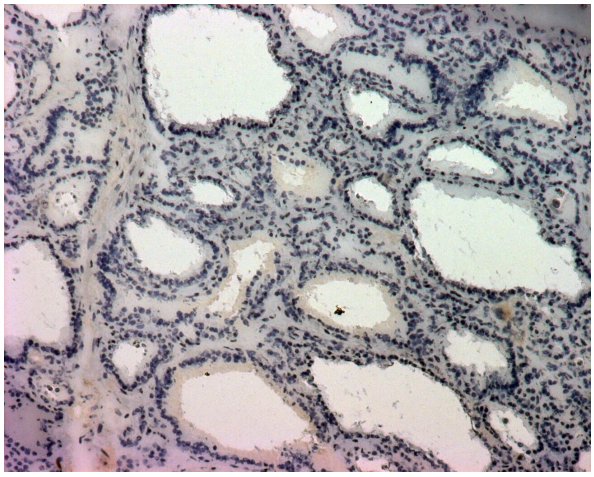
Die Adenomgewebe wiesen bezüglich der Fas Proteinexpression überwiegend (in 16 von 23 Fällen) eine schwache Expression auf (siehe Abb. 15 B, 15 C), wobei 2 Gewebe (Fall: 29, 42) keinerlei Fas Expression zeigten (siehe Abb. 15 A). Eine Ausnahme bildeten die Fälle 36, 46, 47 und 50 mit einer fokal starken, resp. der Fall 38 mit einer diffus starken Färbung.



A



B



C

Abb. 15: *Immunhistochemischer Nachweis von Fas im Schilddrüsenadenom*

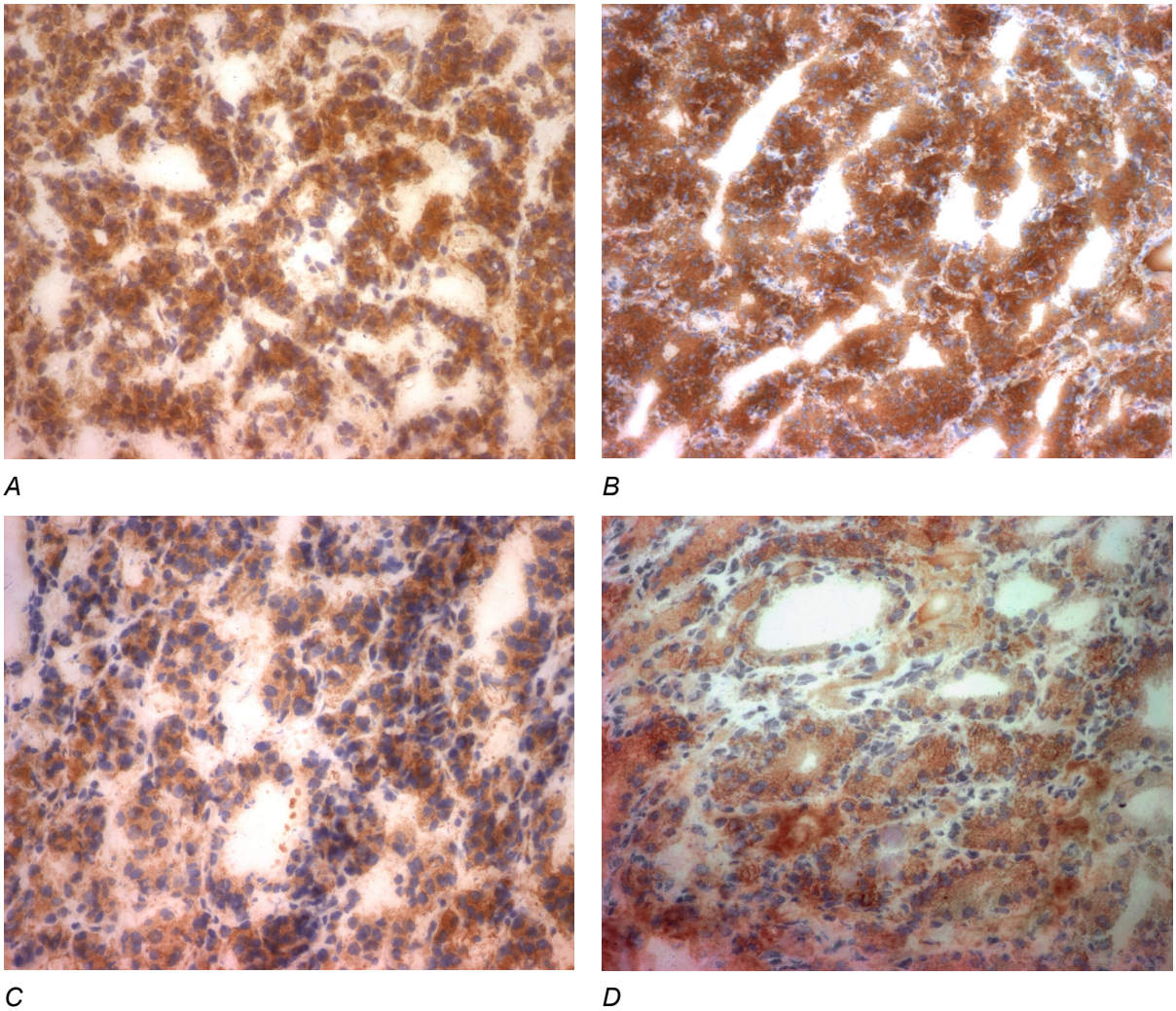
A: Fas Immunreaktivität eines Schilddrüsenadenoms, keine Färbung, (Fall: 29; 10 -fache Vergrößerung).

B: Fas Immunreaktivität eines follikulären Schilddrüsenadenoms, fokal schwache Färbung einiger Thyreozyten, (Fall: 40; 20 -fache Vergrößerung).

C: Fas Immunreaktivität eines follikulären Schilddrüsenadenoms, fokal schwache Färbung einiger Thyreozyten, (Fall: 33; 10 -fache Vergrößerung).

Fas Ligand

Besonders auffällig war hier die diffus starke FasL Immunreaktivität, welche 7 (Fall: 36, 37, 38, 42, 44, 46, 50) der 23 untersuchten Gewebe aufwiesen (siehe Abb. 16 A, 16 B, 16 C, 16 D). Ferner konnte bei 5 Geweben (Fall: 31, 39, 43, 47, 48) eine fokal starke -, bei 10 Geweben eine fokal schwache- und lediglich bei einem Gewebe (Fall: 29) keinerlei FasL Proteinexpression detektiert werden.



A *B*

C *D*

Abb. 16: *Immunhistochemischer Nachweis von Fas Ligand im Schilddrüsenadenom*

A: Fas Ligand Immunreaktivität eines multinodulären follikulären Schilddrüsenadenoms mit starken regressiven Veränderungen,
diffus starke Färbung der Thyreozyten, (Fall: 44; 20 -fache Vergrößerung).

B: Fas Ligand Immunreaktivität eines follikulären Schilddrüsenadenoms mit starken regressiven Veränderungen,
diffus starke Färbung der Thyreozyten, (Fall: 42; 20 -fache Vergrößerung).

C: Fas Ligand Immunreaktivität eines follikulären Schilddrüsenadenoms,
diffus starke Färbung der Thyreozyten, (Fall: 36; 20 -fache Vergrößerung).

D: Fas Ligand Immunreaktivität eines autonomen Schilddrüsenadenoms mit fokal regressiven Veränderungen und adenomat. Hyperplasie mit mikrofoll. Adenom,
diffus starke Färbung der Thyreozyten, (Fall 46; 20 -fache Vergrößerung)

Das folgende Diagramm (Abb. 17) veranschaulicht die oben dargestellten Ergebnisse der Fas/FasL Proteinexpression:

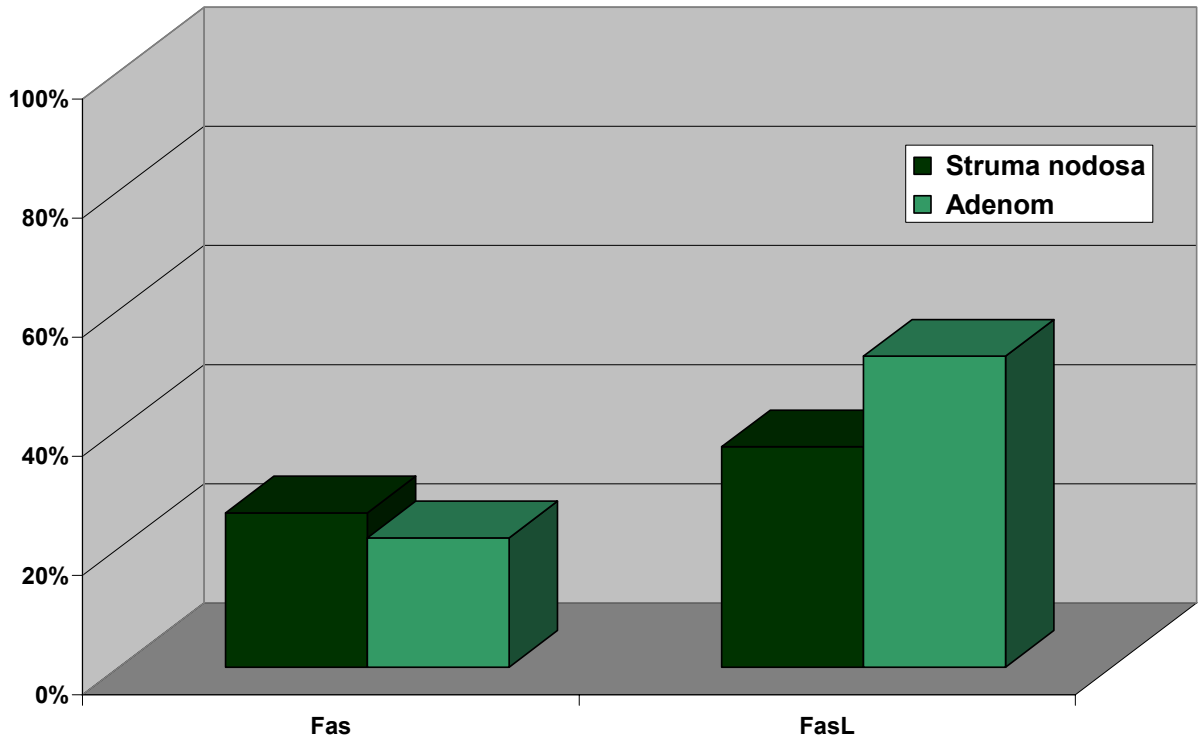


Abb. 17: *Prozentuale Anteile der Fas und FasL immunhistochemisch positiven Schilddrüsengewebe in Struma nodosa- und Adenom- Geweben. Die Höhe des Balkens entspricht der Anzahl der Gewebe mit* ***++*** *positiver Antigenexpression (fokal starke Färbung (< 50% positive Zellen) oder diffus schwache Färbung (> 50% positive Zellen), resp.* ***+++*** *positiver Antigenexpression (diffus starke Färbung (> 50% stark positive Zellen))*

4.3 Gesamtübersicht

Histologie	Fas				FasL				CD97	
	mRNA		Protein		mRNA		Protein		mRNA	
	–	(+) +/ ++	–/+	++/+++	–	(+) +/++	–/+	++/+++	–	(+) +/++
Struma nodosa	22,2%	77,8%	74,1%	25,9%	70,4%	29,6%	63%	37%	77,8%	22,2%
Adenom	0%	100%	78,3%	21,7%	46,7%	53,3%	47,8%	52,2%	40%	60%

Tab. 17: *Gesamtübersicht der mRNA- und Proteinexpression von Fas, Fas Ligand und CD97 im Struma nodosa und Adenom.*

Fas

In den Strumen konnte zu 77,8% eine mäßige bis sehr hohe mRNA Expression beobachtet werden und 25,9% der Gewebe besaßen eine überdurchschnittliche Proteinexpression.
Fas Rezeptor mRNA wurde in allen Adenomen hoch bis sehr hoch exprimiert, jedoch verfügten nur 21,7% über eine hohe Proteinexpression.

Fas Ligand

29,6% der untersuchten Struma nodosa Gewebe besaßen in mäßigem bis sehr hohem Maße mRNA des Fas Liganden, wobei 37% eine mittlere bis starke Proteinexpression aufwiesen.
Der Anteil der Adenome mit mäßiger bis sehr hoher FasL mRNA Expression betrug 53,3%, deren Immunreaktivität war zu 52,2% stärker ausgeprägt.

CD97

Eine mäßige bis sehr hohe mRNA Expression konnte im Struma nodosa zu 22,2% und im Adenom zu 60% beobachtet werden.

Die folgende Darstellung (Abb. 18) illustriert die in Tab. 17 aufgeführten Ergebnisse:

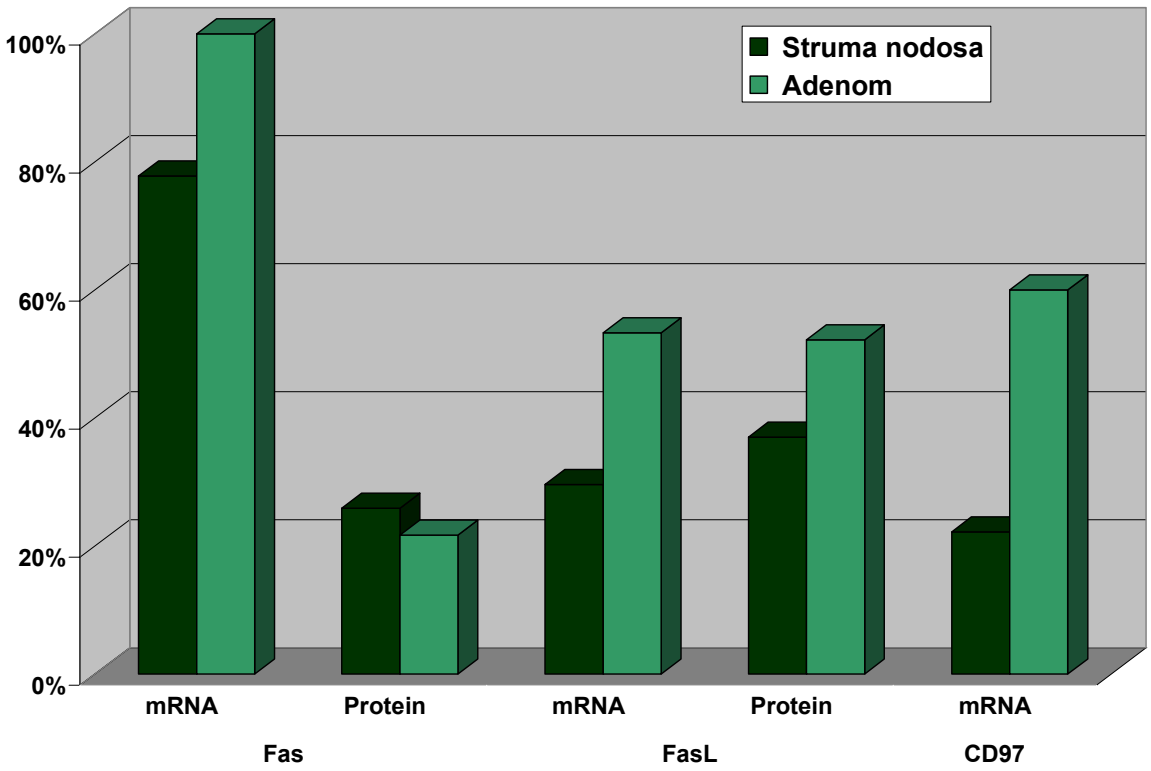


Abb. 18: *Prozentuale Anteile der Fas, FasL und CD97 mRNA positiven, bzw. Fas, FasL immunhistochemisch positiven Schilddrüsengewebe in Struma nodosa- und Adenom- Geweben. Die Höhe des Balkens entspricht der Anzahl der Gewebe mit positiver mRNA Expression, bzw.* **++** *positiver Antigenexpression (fokal starke Färbung (< 50% positive Zellen), diffus schwacher Färbung (> 50% positive Zellen) und* **+++** *positiver Antigenexpression (diffus starke Färbung (> 50% stark positive Zellen))*

5 Diskussion

5.1 Struma

Die Struma ist eine nichtentzündliche Vergrößerung der Schilddrüse, die keine Lymphozyteninfiltration aufweist (Hammond et al., 1997). Ursache der hier untersuchten euthyreoten Struma ist häufig ein Jodmangel, welcher zur verminderten Produktion der Schilddrüsenhormone T3 und T4 führt. Infolgedessen wird der Hypophysenvorderlappen durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus zur TSH- (Thyreoidea–stimulierendes Hormon) Produktion angeregt. Dadurch kommt es zur Proliferation des Schilddrüsengewebes und der Hormonmangelzustand kann ausgeglichen werden. Da der durch Fas/FasL vermittelte programmierte Zelltod starken Einfluß auf die Gewebehomeostase und den Ab- und Anbau von Gewebe nimmt, so ist eine Veränderung der Expression von Fas und FasL, im Vergleich zum gesunden Schilddrüsengewebe, an der Strumaentwicklung beteiligt.

In unserer Studie ergab sich bei den Strumen eine Fas mRNA Expression von 77,8% und eine Proteinexpression von 25,9%. Demgegenüber wurde laut einer Untersuchung von Arscott et al. im nichttoxischen Strumagewebe keinerlei Fas Expression beobachtet, jedoch konnte in ruhendem Schilddrüsengewebe eine hohe Fas Antigenexpression detektiert werden (Arscott et al., 1998). Korrespondierend hierzu wurde in einer weiteren Studie eine Fas Expression von 40% der unstimulierten Schilddrüsenzellen festgestellt (Kawakami et al., 1996). Ursache der Herabregulation des Fas Proteins und der damit verbundenen Apoptoseverminderung ist die erhöhte TSH Ausschüttung durch den Hypophysenvorderlappen im Zuge der oben erwähnten Gegenregulation, wobei Thyrotropin auch einen direkten wachstumsstimulierenden Einfluß hat. (Wiley & Sons et al., 1997). Die Behandlung mit 8 bromo cAMP stimuliert den TSH Effekt, der durch die Aktivation der Proteinkinase A vermittelt wird (Kawakami et al., 1996). Umgekehrt kommt es bei Hormonmangel, der z.B. durch Testosteronentzug bei Orchidektomie entsteht, zur Stimulation der Apoptose und zur Atrophie der Prostata (Arscott et al., 1998). Die hohe mRNA Expression von 77,8% stellt keinen Widerspruch dar, da der Grad der mRNA Expression nicht zwangsläufig mit der Proteinexpression zusammenfällt (Baker et al., 1999).

Ferner kommt es im Struma multinodosa zu einer erhöhten Expression des antiapoptotisch wirksamen Onkoproteins bcl-2 (Hammond et al., 1997).

In humanen Schilddrüsenzellen wurde sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene die Expression des Inhibitors FAP-1 gefunden, der mit der negativ regulierenden Domäne des Fas Proteins assoziiert ist (Myc et al., 1999) und somit die Fas vermittelte Apoptose hemmt.

Die Wirkung des FAP-1 Inhibitors kann jedoch nur durch den Protein Synthese Inhibitor CHX aufgehoben werden (Mitsiades et al., 2000).

Diese genannten Faktoren (Herabregulation von Fas, bcl-2 -, FAP-1 Expression) führen zur Hemmung der Apoptose und somit zur Genese und Progression proliferativer Erkrankungen wie der Struma, dem Morbus Basedow und malignen Erkrankungen (Bretz et al., 1999).
Abzugrenzen hiervon ist die Beobachtung bei Strumen, die sich in Regression befinden. Vergleicht man den Anteil der Strumen mit besonders hoher Fas-Proteinexpression (++/+++) (25%) mit dem Anteil der sich in Regression befindenden Strumen mit besonders hoher Fas Proteinexpression (28,6%), so stellt man eine um 3,6% erhöhte Expression zu Gunsten der sich in Regression befindlichen Strumen fest. Grund hierfür ist die Steigerung der Fas Expression und die damit verbundene Erhöhung der Apoptoserate im frühen Stadium der Involution (Tamura et al., 1998). Resultat ist ein Überwiegen des programmierten Zelltods gegenüber proliferativen Wachstumstendenzen, was zur fibrotischen Involution der Struma führt.
Für die Fas Ligand Expression ergab sich in unseren Untersuchungen eine mRNA Expression von 29,6% und eine Proteinexpression von 37%. Auch in anderen Studien zeigte sich eine Fas Ligand Expression in Geweben mit nichttoxischer Struma (Mitsiades et al., 1998). Dies spricht für eine Hochregulation des FasL, da sich in gesundem Schilddrüsengewebe keine FasL Expression nachweisen läßt (Mitsiades et al., 1998).
Auch beim Morbus Basedow kommt es zu einer erhöhten FasL Expression (Phelps et al., 2000) und diese verursacht die Elimination infiltrierender Lymphozyten (Hiromatsu et al., 1999), welche durch zytotoxische Reaktionen die weitere Proliferation und somit die Progression der Erkrankung verhindern könnten. Ähnliche Auswirkungen könnte die Erhöhung der FasL Expression auch bei der Progression der Struma haben. Bezüglich der sich in Regression befindlichen Strumen ergab sich im Vergleich zu den sich nicht in Regression befindenden Strumen eine 27,1%ige Zunahme derjenigen Strumen mit besonders hoher (++/+++) FasL Proteinexpression. Wahrscheinlich kommt es hier nicht zur Elimination infiltrierender Lymphozyten, da dies wiederum die Proliferation steigert, sondern es liegt hier die Vermutung nahe, daß sich der Fas Ligand bei den sich in Regression befindenden Strumen gegen die Thyreozyten selbst richtet und somit, in Verbindung mit der beobachteten gesteigerten Fas Proteinexpression, die Apoptose induziert und die Involution der Struma verursacht.
Die CD97 Expression betrug in unserer Studie 22,2%. Aust et al. fanden beim Morbus Basedow und in nichttoxischer Struma eine sehr geringe CD97 Expression. Dies deckt sich mit der Feststellung, daß CD97 ein Marker der Entdifferenzierung in humanen Schilddrüsentumoren darstellt und es sich beim Struma um keine maligne Erkrankung handelt (Aust et al., 1997). Da wir in unserer Studie keine Untersuchungen hinsichtlich der Expression des CD97 Proteins vorgenommen haben, läßt sich nur anhand der mRNA Expression keine Aussage über den Funktionszustand des CD97 in der Struma machen.

5.2 Adenom

Das follikuläre Adenom ist ein gutartiger Tumor mit follikulärer Differenzierung, wobei er in ein follikuläres Karzinom entarten kann (Heitz et al., 2000).

In der Tumorgenese benigner und maligner Neoplasien spielt der durch Fas und FasL vermittelte programmierte Zelltod eine entscheidende Rolle. Insbesondere die erhöhte FasL Expression versetzt den Tumor in die Lage eines immunpriviligierten Organs (wie z.B. Auge (Kornealkeratinozyten), Testis (Sertoli-Zellen), Plazenta (Mitsiades et al., 1998), Gehirn (Neuronen) (Phleps et al., 2000), indem Fas exprimierende zytotoxische T-Lymphozyten durch Fas/FasL vermittelte Apoptose vernichtet werden. Somit entkommt der Tumor der Immunattacke und dessen Progression wird gefördert. Im Sinne des oben genannten Immunprivilegs führt z.B. die erhöhte FasL Expression der Sertolizellen zur Eliminierung Fas tragender degenerierter Spermatozyten und somit zur „Qualitätskontrolle“ der produzierten Gameten (Francavilla et al., 2000). Zusätzlich kommt es im Tumor zur Inhibition und/oder Herabregulation des Fas Rezeptors, um die Wirkung des Fas Liganden auf den Tumor selbst zu vermeiden. Ferner können Zytokine (IL-1ß, TNFα, IFN γ), die von T1- und T2-Helferzellen, Makrophagen, Monozyten und aktivierten Endothelzellen (Tamura et al., 1998) produziert werden, einen Einfluß auf die Fas/FasL Expression der Tumorzelle haben (Bretz et al., 1999) (siehe Abb. 19).

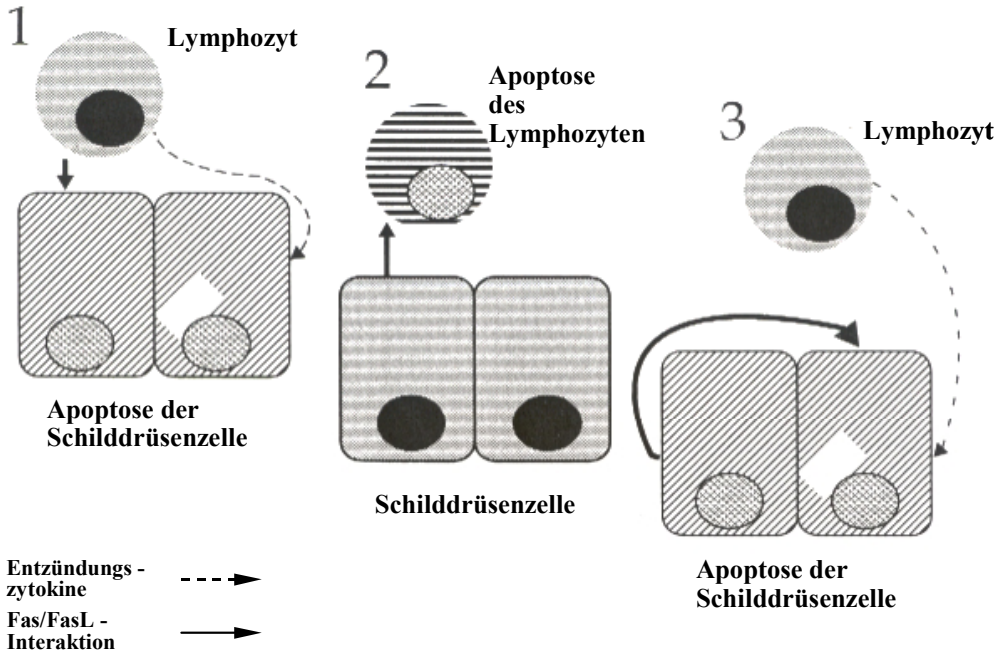


Abb. 19: *Wirkung von Fas/FasL bzw. der Cytokine auf die Schilddrüsenzelle, resp. auf den T-Lymphozyten (mod. nach Borgerson et al., 1999)*

Das 1. und 3. Beispiel der Abbildung 19 beschreibt die durch die Zytokine der T-Lymphozyten hervorgerufene Fas Expression der Schilddrüsenzelle und den Fas Ligand vermittelten Untergang des Thyreozyten entweder durch die Fas Ligand Expression des T-Lymphozyten (Beilspiel 1) oder durch zelleigene Fas Ligand Expression (Beispiel 3). Beispiel 2 zeigt den oben beschriebenen Sachverhalt der Fas/FasL Interaktion in immunpriviligierten Organen, resp. bei benignen und malignen Neoplasien. Hier richtet sich der durch den Thyreozyten exprimierte Fas Ligand gegen den Fas exprimierenden T-Lymphozyten und vermittelt dessen Apoptose, was im Falle einer Neoplasie zur Progression derselben führt, indem der Tumor auf diese Weise dem Angriff des Immunsystems entkommt.

Wie bereits in der Diskussion der Struma erwähnt, wurde eine 40%ige Fas Expression auf unstimulierten apathogenen Schilddrüsenzellen detektiert (Kawakami et al., 1996), wobei keine Fas Ligand Expression festgestellt werden konnte (Baker et al., 1999).

In unserer Studie ergab sich beim Adenom auf Proteinebene eine Fas Expression von 21,7% und eine FasL Expression von 52,2%, wobei die Fas mRNA zu 100%, die FasL mRNA zu 53,3% exprimiert war. Daraus ergibt sich auf Proteinebene eine Reduktion der Fas– und eine Erhöhung der Fas L- Expression, verglichen mit apathogenem- oder Strumagewebe.

Während der Transformation gesunder Gewebe zu benignen Neoplasien, wie es das Schilddrüsenadenom darstellt, über Karzinome und letztlich zu Metastasen kommt es zur Reduktion der Fas Expression. Dies führt zur Verminderung der Apoptose und dadurch zur Progression des Tumors. Grund für die eingeschränkte Fas Expression kann ein Allelverlust des inneren Chromosomenarms 10q sein, der für den Gendefekt in 16% der Karzinome verantwortlich ist. Ebenso kann eine Veränderung essentieller Transkriptionsfaktoren, z.B. SP1/NF-kB, p53 für die verminderte Fas Expression verantwortlich sein (Butler et al., 2000). Da jedoch laut unseren Ergebnissen die Fas mRNA zu 100% exprimiert ist, scheidet dieses Erklärungsmodell einer Genveränderung hier aus. Die Untersuchung von Möller et al. fand heraus, daß der konstitutiv Apo-1 positive Phänotyp im Zuge der malignen Transformation von gesunder Kolonmucosa mit 87% Fas Expression, über das Adenom mit 18% Fas Expression und letztlich zum Kolonkarzinom mit 12,8% Fas Expression, in einen INFγ/TNFα sensitiven, induzierbaren Apo-1 positiven Phänotyp umschlägt oder zu einem Apo-1 verlustigen Phänotyp konvertiert (Möller et al., 1994). Die im Vergleich zum follikulären Adenom höhere Fas Proteinexpression der Struma kennzeichnet somit auch dessen geringeren „Malignitätsgrad“. Dies liegt darin begründet, daß, wie oben beschrieben, die Fas vermittelte Apoptose ein Schlüsselmechanismus der T-Zell Zytotoxizität gegen neoplastische Zellen darstellt (Mitsiades et al., 2000). Im Gegensatz dazu haben die der malignen Transformation näher stehenden follikulären Adenome durch die Herabregulation der Fas Proteinexpression diesen Mechanismus in seiner Effektivität gemindert. Korrespondierend wurde in hochaggressiven Schilddrüsenkarzinomen (PTC, UTC) ein völliger Verlust der Fas

Expression festgestellt (Hoang-Vu et al., 1999), d.h. der unkontrollierten Gewebeproliferation kann nicht mehr durch Fas vermittelte Apoptose Einhalt geboten werden und es kommt zur weiteren Progression der Tumorerkrankung. In unserer Studie kam es jedoch nur zu einer Herabregulation und zu keinem vollständigem Verlust der Fas Expression. Da jedoch der Fas Rezeptor durch den labilen Inhibitor FAP-1 inaktiviert wird, kommt es trotz Fas Expression vermutlich nicht zur Induktion der Apoptose und folglich auch nicht zur Proliferationsminderung.

Ein Zusammenhang zwischen verminderter Fas Expression und erhöhter FasL Expression zeigte sich auch bei Melanomen der Haut. Hier korreliert die Verminderung der Fas Expression mit der Vergrößerung der Breslow Dicke. Die Erhöhung der FasL Expression korreliert sowohl mit einer Erhöhung der Breslow Dicke als auch mit einer Vergrößerung des Clark Levels und kennzeichnet somit die Progression der Erkrankung (Soubrane et al., 2000).

Ferner konnte ein Absinken der Fas Expression im Zuge der Progression vom Plaque Stadium der Mycosis fungoides zum Tumorstadium und letztlich zum kutanen T-Zell Lymphom, in welchem sich keinerlei Fas Expression feststellen ließ, beobachtet werden (Zoi-Toli et al., 2000). T. Shimonishi et al. beobachteten, daß die Hochregulation des FasL ein besonderes Merkmal präneoplastischer Stadien des Cholangiokarzinoms, wie der billären Dysplasie, darstellt. (Shimonishi et al., 2000).

Auch in unserer Studie ergab sich eine Hochregulation des FasL bei den Strumen, besonders aber bei den Adenomen, was den präneoplastischen Charakter des Adenoms und in Ansätzen auch der Struma kennzeichnet. In einer weiteren Studie ließ sich im frühen Stadium der Dysplasie der Barrett Metaplasie und bei der malignen Transformation des Dickdarmkarzinoms ein Anstieg der FasL Expression erkennen.

Ferner kommt es z.B. in Adenomen der Schilddrüse (Hiromatsu et al., 1999) und des Ovars zu einer Erhöhung der bcl-2 Expression, die den programmierten Zelltod der T-Lymphozyten inhibiert und daher zu einer besseren Prognose der Erkrankung führt (Munakata et al., 2000). Erhöhte FasL Expression ist aber auch in therapeutischer Hinsicht bedeutsam. Allogene Transplantation von Langerhans–Inseln mit Kotransplantation FasL tragender syngener Myoblasten führt durch die Induktion der Apoptose in Fas tragenden infiltrierenden T-Lymphozyten zur deutlichen Verminderung der Transplantatabstoßung (Lau et al., 1996). In ähnlicher Art und Weise können Kornealkeratinozyten ohne immunsuppressive Therapie (Cyclosporin A, Fk506) transplantiert werden, da auch sie FasL exprimieren. Durch die Gabe von Retinsäure kann die Fas Expression weiter gesteigert und die Transplantatüberlebenszeit weiter verlängert werden (Saitoh et al., 2000).

In unserer Studie zeigte sich eine 60%ige mRNA Expression des CD97. Andere Forschungen ergaben eine fehlende CD97 Expression in apathogenen Schilddrüsenzellen,

wohingegen undifferenzierte, anaplastische Schilddrüsenkarzinome eine sehr hohe CD97 Expression aufwiesen (Aust et al., 1997).
Dies impliziert eine positive Korrelation zwischen Malignitätsgrad der Neoplasie und der CD97 Expression. Die recht hohe mRNA Expression der Adenome in unserer Untersuchung läßt infolgedessen auf eine maligne Tendenz der Adenome schließen.
Ein Grund für den Zusammenhang zwischen der erhöhten CD97 Expression und dem steigenden Malignitätsgrad könnte eine durch CD97 vermittelte Interaktion zwischen den Tumorzellen darstellen, welche die Progression der Neoplasie vorantreibt.
Ferner könnte ein Fehler der durch CD97 vermittelten Signaltransduktion einen selektiven Wachstumsvorteil für das Tumorgewebe nach sich ziehen (Aust et al., 1997).

6 Zusammenfassung

Da der durch Fas/FasL vermittelte programmierte Zelltod starken Einfluß auf die Gewebehomeostase und den Ab- und Anbau von Gewebe nimmt, so ist eine Veränderung der Expression von Fas und FasL, im Vergleich zum gesunden Schilddrüsengewebe, an der Genese proliferativer Erkrankungen wie der Struma, dem Adenom und letztlich dem Schlilddrüsenkarzinom beteiligt.
Ziel dieser Arbeit war der Nachweis von Fas, respektive FasL und der Bestimmung ihres Expressionsgrads mittels RT-PCR und Immunhistochemie in Bezug auf Struma nodosa- und Schilddrüsenadenomgewebe. Ferner wurde in dieser Studie der Expressionsgrad von CD97 auf mRNA Ebene in den oben genannten Geweben bestimmt. CD97 ist ein Zelloberflächenantigen der Sekretin Rezeptor Familie, welches die Adhäsion zwischen Tumorzellen vermitteln kann. Daher gilt CD97 als ein sensitiver Marker der Entdifferenzierung in humanen Schilddrüsentumoren. Folgende Sachverhalte konnten beobachtet werden:

Struma nodosa

- Herabregulation der Fas Proteinexpression auf 25,9%
- Erhöhung der Fas- und Fas Ligand- Proteinexpression bei regressiven Strumen im Vergleich zu nicht regressiven Strumageweben
- Hochregulation der FasL Proteinexpression auf 37%
- 22,2%ige CD97 mRNA Expression

Adenome

- Herabregulation der Fas Proteinexpression auf 21,7%
- Hochregulation der FasL Proteinexpression auf 52,2%
- Hochregulation der CD97 mRNA Expression auf 60%

1. Vergleicht man die Expression von Fas/FasL der Strumen und Adenome, so läßt sich feststellen:
    - Reduktion der Fas Proteinexpression der Adenome im Vergleich zu den Strumen um 4,2% und eine Erhöhung der FasL Proteinexpression um 15,2%.
    - Steigerung der CD97 mRNA Expression der Adenome im Vergleich zu den Strumen um 37,8%.
2. Aus den gewonnenen Daten läßt sich schlußfolgern:
    - Die Verminderung der Fas Expression und die Erhöhung der FasL Expression führt im Tumorgewebe zur Hemmung der Apoptose und somit zur Progression des Tumors. In diesem Sinne läßt sich eine Amplifikation dieses Expressionsmusters vom Struma nodosa zum Schilddrüsenadenom erkennen. Lediglich bei den sich in Regression befindlichen Strumen kommt es zur gesteigerten Fas-, resp. Fas Ligand- Expression und somit zur Erhöhung der Apoptoserate und letztendlich zur fibrotischen Involution der Struma.
    - Die Erhöhung der CD97 mRNA Expression der Adenome im Vergleich zu den Strumen kennzeichnet möglicherweise deren maligne Tendenz.

7 Literaturverzeichnis

Altenähr E, Böcker W: Schilddrüse. In: Altenähr E, Böcker W, Dhom G, Gusek W, Heitz PH, Klöppel G, Lietz H, Mitschke H, Saeger W, Schäfer HJ, Staub JJ, Steiner H: Pathologie der endokrinen Organe. 1981, 303-354

Arscott P, Baker J jr: Short analytical review – apoptosis and thyroiditis. Immunology and Clinical Immunopathology 87 (1998) 207-217

Aust G, Eichler W, Laue S, Lehmann I, Heldin N, Lotz O, Scherbaum W, Dralle H, **Hoang-Vu C:** CD97: A dedifferentiation marker in human thyroid carcinomas. Cancer research 57 (1997) 1798-1806

Baker J jr: Editorial: Dying (apoptosing?) for a consensus on the Fas death pathway in the thyroid. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 84 (1999) 2593-2595

Basolo F, Fiore L, Baldanzi A, Giannini R, Dell´Omodarme M, Fontanini G, Pacini F, Danesi R, Miccoli P, Toniolo A: Suppression of Fas Expression and down-regulation of Fas ligand in highly aggressive human thyroid carcinoma. Laboratory Investigation 80 (2000) 1413-1419

Boenisch T, Farmilo A, Stead R: Handbuch II immunchemischer Färbemethoden. DAKO Corporation, Carpinteria, Kalifornien, USA, 1989

Borgerson K, Bretz J, Baker J jr.: The role of Fas-mediated apoptosis in thyroid - autoimmune disease. Autoimmunity 30 (1999) 251-264

Bretz J, Arscott P, Myc A, Baker J jr: Inflammatory cytokine regulation of Fas-mediated apoptosis in thyroid follicular cells. The Journal of Biological Chemistry 274 (1999) 25433-25438

Butler LM, Dobrovic A, Bianco T, Cowled PA: Promoter region methylation does not account for the frequent loss of expression of the Fas gene in colorectal carcinoma. British Journal of Cancer 82 (2000) 131-135

Eichler W, Hamann J, Aust G: Expression characteristics of the human CD97 antigen. Tissue Antigens 50 (1997) 429-438

Francavilla S, D`Abrizio P, Rucci N, Silvano G, Properzi G, Straface E, Cordeschi G, Necozione S, Gnessi L, Arizzi M, Ulisse S: Fas and Fas ligand expression in fetal and adult human testis with normal or deranged spermatogenesis.
The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 85 (2000) 2692-2700

Gray J, Haino M, Roth M, Maguire J, Jensen P, Yarme A, Stetler-Stevenson M, Siebenlist U, Kelly K: CD97 is a processed, seven-transmembrane, heterodimeric receptor associated with inflammation.
The Journal of Immunology 157 (1996) 5438-5447

Gruss H-J: Molecular, structural, and biological characteristics of the tumor necrosis factor ligand superfamily.
International Journal of Clinical & Laboratory Reseach 26 (1996) 143-159

Hamann J, Hartmann, van Lier R: Structure of the human CD97 gene. Exon shuffling has generated a new type of seven-span transmembrane molecule related to the secretin receptor superfamily.
Genomics 32 (1996) 144-147

Hamann J, van Zeventer C, Bijl A, Molenaar C, Tesselaar K, van Lier R: Molecular cloning and characterization of mouse CD97.
International Immunology 12 (2000) 439-448

Hammond L, Lowdell M, Gerrano P, Goode A, Bottazzo G, Mirakian R: Analysis of apoptosis in relation to tissue destruction associated with hashimoto`s autoimmune thyroiditis.
Journal of Pathology 182 (1997) 138-144

Hedinger C: Schilddrüse. In E. Grundmann: Spezielle Pathologie. 1986, S.370-379

Heitz U, Klöppel G: Schilddrüse. In Böcker W, Denk H Heitz P: Pathologie. 2000, 379-397

Hiromatsu Y, Tomoaki H, Yagita H, Koga M, Sakisaka S, Honda J, Yang D, Kayagaki N, Okumura K, Nonaka K: Functional Fas ligand expression in thyrocytes from patients with graves`disease.
The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 84 (1999) 2896-2902

Hoang-Vu C, Bull K, Schwarz I, Holtz J, Schmutzler C, Köhrle J, Dralle H: Expression of “death-domain”-receptors and their ligands in benign goitre and thyroid carcinoma.
Langenbeck`s Archives of Surgery 1 (1999) 197-200

Hoang-Vu C, Bull K, Schwarz I, Krause G, Schmutzler C, Aust G, Köhrle J, Dralle H: Regulation of CD97 protein in thyroid carcinoma.
The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 84 (1999) 1104-1109

Jannsen O, Scriba P: Erkrankungen der Schilddrüse. In: Gerok W, Huber C, Meinertz T, Zeidler H: Die innere Medizin. 2000, 963-986

Lau H, Ming Y, Fontana A, Stoeckert Jr. C: Prevention of islet allograft rejection with engineered myoblasts expressing FasL in mice.
Science 273 (1996) 109-111

Ludgate M, Bharat J: Apoptosis in autoimmune and non-autoimmune thyroid disease.
Journal of Pathology 182 (1997) 123-124

Kawakami A, Eguchi K, Matsuoka N, Tsuboi, Kawabe Y, Ishikawa N, Ito K, Nagataki: Thyroid – stimulating hormone inhibits Fas antigen-mediated apoptosis of human thyrocytes *in vitro*.
Endocrinology 137 (1996) 3163-3168

Mitsiades N, Poulaki V, Kotoula V, Mastorakos G, Tseleni-Balafouta S, Koutras D, Tsokos M: Fas/Fas ligand up-regulation and bcl-2 downregulation may be significant in the pathogenesis of hashimoto`s thyroiditis.
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 83 (1998) 2199-2203

Mitsiades N, Poulaki V, Tseleni-Balafouta S, Koutras D, Stamenkovic I: Thyroid carcinoma cells are resistant to Fas-mediated apoptosis but sensitive to tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand.
Cancer research 60 (2000) 4122-4129

Möller P, Koretz K, Leithäuser F, Brüderlein S, Henne C, Quentmeier A, Krammer P: Expression of APO-1 (CD95), a member of the NGF/TNF receptor superfamily, in normal and neoplastic colon epithelium.
International Journal of Cancer 57 (1994) 371-377

Munakata S, Enomoto T, Tsujimoto M, Otsuki Y, Miwa H, Kanno H, Aozasa K: Expressions of Fas ligand and other apoptosis-related genes and their prognostic significance in epithelial ovarian neoplasms.
British Journal of Cancer 82 (2000) 1446-1452

Myc A, Arscott P, Bretz J, Thompson N, Baker J: Characterization of FAP-1 expression and function in thyroid follicular cells.
Endocrinology 140 (1999) 5431-5434

Newton C, Graham A: PCR.
Spektrum akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford, 1994

Phleps E, Wu P, Bretz J, Baker J jr: Thyroid cell apoptosis - a new understanding of thyroid autoimmunity.
Autoimmune thyroid disease 29 (2000) 375-383

Rasper D, Vaillancourt J, Hadano S, Houtzager V, Seiden I, Keen S, Tawa P, Xanthoudakis S, Nasir J, Martindale D, Koop B, Peterson E, Thornberry N, Huang J, MacPherson D, Black S, Hornung F, Lenardo M, Hayden M, Roy S, Nicholson D: Cell death attenuation by 'Ursupin', a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex.
Cell death and differentiation 5 (1998) 271-288

Reinwein D: Schilddrüse. In: Siegenthaler W, Kaufmann W, Waller HD: Lehrbuch der inneren Medizin. 1992, 358-371

Spendlove I, Li L, Carmichael J, Durrant L: Decay accelerating factor (CD55): A target for cancer vaccines ?
Cancer research 59 (1999) 2282-2286

Saitoh A, Kawanabe T, Weidong H, Kayagaki N, Kawamura T, Yagita H, Okumura K, Shimada S: Selective upregulation of fibroblast Fas ligand expression, and prolongation of Fas/Fas ligand-mediated skin allograft survival, by retinoic acid: the skin as a retinoide-inducible immune privilege side.
The journal of. investigative. dermatology. 115 (2000) 154-161

Shimonishi T, Isse K, Shibata F, Aburatani I, Tsuneyama K, Sabit H, Harada K, Miyazaki K, Nakanuma Y: Up-regulation of Fas ligand at early stages and down-regulation of Fas at progressed stages of intrahepatic cholangiocarcinoma reflect evasion from immune surveillance.
Hepatology 32 (2000) 761-769

Soubrane C, Mouawad R, Antoine E, Verola O, Gil-Delgado M, Khayat D:
A comparative study of Fas and Fas ligand expression during melanoma progression.
British Journal of Dermatology 143 (2000) 307-312

Tamura M, Kimura H, Koji T, Tominaga T, Ashizawa K, Kiriyama T, Yokoyama N, Yoshimura T, Eguchi K, Nakane K, Nagataki S: Role of apoptosis of thyrocytes in a rat model of goiter. A possible involvement of Fas system.
Endocrinology 139 (1998) 3646-3653

The tumor necrosis factor superfamily. In: Cytokine mini-reviews & technical information.1998

Tomizuka H, Hatake K, Ikeda M, Gunji Y, Ikeda K, Takizawa T, Saito T, Hoshino Y, Ohtsuki T, Takahashi H, Yonehara S, Miura Y:
CD95 predicts responsiveness to tretinoin in acute promyelocytic leukemia.
International Journal of Molecular Medicine 1 (1998) 207-211

van Lier R, Eichler W, Hamann J: Sevenspan transmembrane molecules: novel receptors involved in leukocyte adhesion.
Immunology Letters 54 (1996) 185-187

Van Noorden S: Principles of immunostaining In: Filipe MI, Lake BD (Hrsg): Histochemistry in Pathology, Churchil Livingstone, Edinburgh, London, Melbourne, (1990), S. 31-58

Wartofsky L: Erkrankungen der Schilddrüse. In: Schmailzl K, Isselbacher K, Braunwald E, Wilson J, Martin J, Fanci A, Kasper D:
Harrisons Innere Medizin 2. 1995, 2366-2391

Zoi-Toli O, Vermeer M, Vries E, Beek P, Meijer C, Willemze: Expression of Fas and Fas ligand in primary cutaneous T-cell lymphoma (CTCL): association between lack of Fas expression and aggressive types of CTCL.
British Journal of Dermatology 143 (2000) 313-319

8 Thesen

Der durch Fas und Fas Ligand vermittelte programmierte Zelltod reguliert u. a. die Gewebeentwicklung und –homeostase. Daher ist eine Veränderung des Expressionsgrades von Fas und Fas Ligand an der Genese proliferativer Erkrankungen wie der Struma nodosa und dem Schilddrüsenadenom beteiligt. Das Zelloberflächenantigen CD97 vermittelt u. a. die Adhäsion zwischen Tumorzellen. Daher gilt CD97 als ein Marker der Entdifferenzierung in humanen Schilddrüsentumoren. Ziel der Studie war der Nachweis von Fas, respektive Fas Ligand und die Bestimmung ihres Expressionsgrades mittels RT-PCR und Immunhistochemie in Bezug auf Struma nodosa- und Schilddrüsenadenomgewebe. Des weiteren wurde der Expressionsgrad von CD97 auf mRNA Ebene der oben genannten Gewebe untersucht.

1. Bei den Struma nodosa Geweben wurde eine Herabregulation der Fas Proteinexpression (25,9%), bzw. eine Hochregulation der Fas Ligand Proteinexpression (37%) beobachtet.

2. In den Schilddrüsenadenomgeweben kam es zu einer Herabregulation der Fas Proteinexpression (21,7%), resp. zu einer Hochregulation der Fas Ligand Proteinexpression (52,2%).

3. In den untersuchten Geweben wurde CD97 mRNA in 22,2% der Struma nodosa Gewebe und in 60% der Adenomgewebe nachgewiesen.

4. Es ließ sich eine Erhöhung der Fas- und Fas Ligand Proteinexpression bei regressiven Struma nodosa-, im Vergleich zu nicht regressiven Struma nodosa- Geweben, erkennen.

5. Im Vergleich zu den Struma nodosa Geweben zeigten die Schilddrüsenadenomgewebe eine Reduktion der Fas Proteinexpression um 4,2% und eine Erhöhung der Fas Ligand Proteinexpression um 15,2%.

6. In den Adenomgeweben kam es, im Vergleich zu den Struma nododa Geweben, zu einer Steigerung der CD97 m RNA Expression um 37,8%.

7. Die Verminderung der Fas Expression und die Erhöhung der FasL Expression führt im Tumorgewebe zur Hemmung der Apoptose und somit zur Progression des Tumors. In diesem Sinne läßt sich eine Amplifikation dieses Expressionsmusters vom Struma nodosa zum Schilddrüsenadenom erkennen. Lediglich bei den sich in Regression befindlichen Strumen kommt es zur gesteigerten Fas-, resp. Fas Ligand- Expression und

somit zur Erhöhung der Apoptoserate und letztendlich zur fibrotischen Involution der Struma.

8. Die Erhöhung der CD97 mRNA Expression der Adenome im Vergleich zu den Strumen kennzeichnet möglicherweise deren maligne Tendenz.

Curriculum vitae

Name	Claudia Trude Düren
Adresse	Roggendorfer Weg 37 D-50769 Köln
Geburtsdatum	03. Dezember 1975
Geburtsort	Köln
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig
Ausbildung	1982-1986 Besuch der Grundschule Lebensbaumweg Köln-Heimersdorf 1986-1995 Besuch des erzbistümlichen Gymnasiums Liebfrauenschule Köln-Lindenthal 1995 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife 1995 Immatrikulation an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg als Studentin der Zahnmedizin 1997 Naturwissenschaftliche Vorprüfung 1998 Zahnärztliche Vorprüfung 2000 Zahnärztliche Prüfung 2000 Approbation als Zahnärztin

Halle/Saale im August 2001

Selbständigkeitserklärung und Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich erkläre hiermit, daß ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.
Frühere Promotionsversuche der Autorin bestehen nicht. Die vorliegende Arbeit wurde weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgestellt.

Claudia Düren

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in der Universitätsklinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg AG Experimentelle & Chirurgische Onkologie.

Für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsumfeldes danke ich Herrn Prof. Dr. H. Dralle, Direktor der Klinik für Allgemeinchirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Besonderen Dank schulde ich meinem Lehrer und Mentor Dr. C. Hoang-Vu, Arbeitsgruppenleiter „Experimentelle und chirurgische Onkologie“ der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, für die wissenschaftliche, methodische und moralische Unterstützung.

Für die Hilfsbereitschaft und die freundliche und sachkundige Einführung in die Laborarbeit möchte ich Frau K. Hammje und Frau C. Sauer danken.