

**Aus dem Klinikum Stuttgart
Katharinenhospital
(Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Tübingen)
Institut für Pathologie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. A. Bosse**

**Prognostische Relevanz der Huntingtin-Interacting-Protein-1
Expression bei kolorektalen Karzinomen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Faraby-Fabian Patrick Al-Shukur
aus
Stuttgart
2009**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Bosse
2. Berichterstatter: Professor Dr. F. Fend

Diese Arbeit ist meinen Eltern und Großeltern gewidmet.

- In Liebe und tiefer Dankbarkeit -

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	<u>Seite:</u>
<u>1 Einleitung</u>	<u>1</u>
1.1 Allgemeines	1
1.2 Prognosefaktoren	2
1.2.1 Definition	2
1.2.2 Klinische und pathomorphologische Prognosefaktoren	2
1.2.3 Molekulare Marker	3
1.3 Etablierung eines Prognosefaktors	4
1.3.1 Etablierung von Huntingtin-Interacting-Protein-1 bei kolorektalen Karzinomen	4
1.4 Das Huntingtin-Interacting-Protein-1 Antigen	4
1.4.1 HIP 1 und seine Interaktionen mit Huntingtin	6
1.4.2 Rezeptorvermittelte Signalwege	9
1.4.3 Funktion endozytotisch aktiver Proteine	12
1.5 Ziel der Arbeit	12
1.6 Fragestellung	14
<u>2 Untersuchungsgut, Material und Methoden</u>	<u>15</u>
2.1 Untersuchungsgut	15
2.2 Material	15
2.3 Histologie	17
2.4 Methoden	17
2.4.1 Immunhistochemie	17
2.4.2 Durchführung des speziellen immunhistochemischen Präzitations- verfahrens zur Darstellung der HIP 1 Expression	18
2.4.3 Durchführung einer Hämatoxylin Eosin Färbung	20
2.4.4 Bestimmung des Score-Index	21
2.5 Statistische Methoden	23
2.5.1 Erläuterungen	23
2.5.2 Fisher-Exakt-Test	23

2.5.3 Kaplan-Meier-Schätzer	24
2.5.4 Log-Rank-Test	24
2.5.5 Cox-Regression	24
3 Ergebnisse	26
3.1 Allgemeines	26
3.2 Alter und Geschlecht	26
3.3 Grunderkrankung	28
3.3.1 T-Primärtumor	31
3.3.2 N-Regionäre Lymphknoten	31
3.3.3 M-Fernmetastasen	31
3.3.4 Beurteilung der T- und N-Stadien und die Fernmetastasierung zum Zeitpunkt der Erstdiagnose	32
3.3.5 Beurteilung des T-Stadiums und der Fernmetastasierung zum Zeitpunkt der Erstdiagnose	32
3.3.6 Beurteilung des N-Stadiums und der Fernmetastasierung zum Zeitpunkt der Erstdiagnose	33
3.3.7 Zusammenfassung der TNM-Stadien des Gesamtkollektivs	35
3.3.8 UICC-Stadieneinteilung	36
3.4 Expressionseigenschaften	37
3.4.1 Blutgefäße	48
3.4.2 Tumorgewebe	49
3.4.3 HIP 1 Expressionsintensität in tumorfreiem Gewebe	51
3.4.4 HIP 1 Expressionsintensität in glatter Muskulatur	52
3.5 Rezidive/Metastasen	53
3.6 Status der letzten Nachuntersuchung	57
4 Auswertung der Daten	59
4.1 Zusammenhang zwischen HIP 1 Expression im Tumorgewebe und T-, N- und M-Stadium	59
4.1.1 Zusammenhang zwischen HIP 1 Expression und T-Stadium	59

4.1.2 Zusammenhang zwischen HIP 1 Expression und N-Stadium	60
4.1.3 Zusammenhang zwischen HIP 1 Expression und M-Stadium	62
4.1.4 Zusammenhang zwischen HIP 1 Expression und UICC-Stadien	64
4.2 Beurteilung der Überlebenszeit	66
4.2.1 Einfluss des Metastasierungsgrades bei Erstdiagnose auf die Überlebenszeit	66
4.2.2 Einfluss des T-Stadiums bei Erstdiagnose auf die Überlebenszeit	67
4.2.3 Einfluss der zusammengefassten T-Stadien bei Erstdiagnose (T1 und T2 versus T3 und T4) auf die Überlebenszeit	68
4.2.4 Einfluss des N-Stadiums bei Erstdiagnose auf die Überlebenszeit	69
4.2.5 Einfluss der zusammengefassten N-Stadien bei Erstdiagnose (N0 versus N1 und N2) auf die Überlebenszeit	70
4.2.6 Einfluss der HIP 1 Expressionsintensität des Tumorgewebes auf die Überlebenszeit	71
4.2.7 Multivariate Auswertung der T-, N- und M-Stadien bei Erstdiagnose auf die Überlebenszeit	72
5 Diskussion	73
5.1 Allgemeines	73
5.2 Prognostische Faktoren bei Krebserkrankungen	74
5.3 Prognostische Faktoren bei kolorektalen Karzinomen	75
5.4 Verwendung von HIP 1 als Prognosefaktor	78
5.5 Diskussion der ermittelten Ergebnisse	79
5.5.1 Beurteilung der Alters- und Geschlechtsverteilung	79
5.5.2 Beurteilung der 5-Jahres-Überlebensrate	80
5.5.3 Beurteilung der eigenen Ergebnisse	80
5.5.4 Interpretation der HIP 1 Expression im Bezug auf die Tumoraggressivität	80
5.5.5 Interpretation der HIP 1 Expression im Endothel kleiner Blutgefäße	81

Inhaltsverzeichnis

5.5.6	Signifikanz der HIP 1 Expression anhand des klinischen Verlaufs bei kolorektalen Karzinomen	81
5.5.7	Signifikanz der HIP 1 Expression beim Prostatakarzinom	82
5.5.8	Korrelierende Parameter der vorliegenden Studie	82
5.6	Schlussfolgerung	83
5.6.1	Differenzierte Betrachtung des kolorektalen Karzinoms	83
5.6.2	Differentialdiagnostische Betrachtung von HIP 1	84
5.6.3	Verschiedene Versuchsansätze und Methoden	84
6	Zusammenfassung	86
7	Literaturverzeichnis	88
8	Danksagung	92
9	Lebenslauf	93

<u>Abbildungsverzeichnis</u>	<u>Seite:</u>
<u>Abb. 1:</u> HIP 1 Protein Domänen (nach Rao et al., 2001)	6
<u>Abb. 2:</u> Vermutetes Modell des Interaktionsmechanismus von htt und HIP 1 Unter Beteiligung von HIPPI, welches zur Apoptose führt (nach Gervais et al., 2002)	7
<u>Abb. 3:</u> Organisation von HIPPI und HIP 1 (nach Gervais 2002)	10
<u>Abb. 4:</u> Mögliche Mechanismen des HIP1- abhängigen Zelltodes (modifiziert nach Chan, 2002)	11
<u>Abb. 5:</u> Darstellung des Score-Index	22
<u>Abb. 6:</u> Alter zum Zeitpunkt der Erstdiagnose (ED)	27
<u>Abb. 7:</u> Lokalisation des Primärtumors	28
<u>Abb. 8:</u> Histopathologische Differenzierung kolorektaler Karzinome	29
<u>Abb. 9:</u> T-Stadium	33
<u>Abb. 10:</u> N-Stadium	34
<u>Abb. 11:</u> Zusammenfassung der TNM-Stadien des Gesamtkollektivs	36
<u>Abb. 12:</u> HE-Schnitt Blutgefäß (200x)	38
<u>Abb. 13:</u> Niedrige HIP 1 Expression in Blutgefäßen + (200x)	39
<u>Abb. 14:</u> HE-Schnitt Blutgefäß (200x)	40
<u>Abb. 15:</u> Mittlere HIP 1 Expression in Blutgefäßen ++ (200x)	41
<u>Abb. 16:</u> HE-Schnitt Blutgefäß (400x)	42
<u>Abb. 17:</u> Hohe HIP 1 Expression in Blutgefäßen +++ (400x)	43
<u>Abb. 18:</u> Hohe HIP 1 Expression eines Darmtumors (400x)	44
<u>Abb. 19:</u> Mittlere HIP 1 Expression eines Darmtumors (400x)	45
<u>Abb. 20:</u> Niedrige HIP 1 Expression eines Darmtumors (200x)	46
<u>Abb. 21:</u> Darmtumor ohne HIP 1 Expression Score-Index 0 (200x)	47
<u>Abb. 22:</u> HIP 1 Expressionsintensität der Blutgefäße	49

<u>Abb. 23:</u> HIP 1 Expressionsintensität in tumorösem Gewebe	51
<u>Abb. 24:</u> HIP 1 Expressionsintensität in tumorfreiem Gewebe	52
<u>Abb. 25:</u> HIP 1 Expressionsintensität in glatter Muskulatur	53
<u>Abb. 26:</u> Auftreten von Metastasen	55
<u>Abb. 27:</u> Auftreten von Rezidiven	56
<u>Abb. 28:</u> Status des Patientengutes nach 5 Jahren	58
<u>Abb. 29:</u> Zusammenhang zwischen HIP 1 Expression und T-Stadium	60
<u>Abb. 30:</u> Zusammenhang zwischen HIP 1 Expression und N-Stadium	61
<u>Abb. 31:</u> Zusammenhang zwischen HIP 1 Expression und M-Stadium	63
<u>Abb. 32:</u> Zusammenhang zwischen HIP 1 Expression und UICC-Stadien	65
<u>Abb. 33:</u> Analyse Maximum-Likelihood-Schätzer	72

<u>Graphik-Verzeichnis</u>	<u>Seite:</u>
<u>Graphik 1:</u> Einfluss des Metastasierungsgrades bei Erstdiagnose auf die Überlebenszeit	66
<u>Graphik 2:</u> Einfluss des T-Stadiums bei Erstdiagnose auf die Überlebenszeit	67
<u>Graphik 3:</u> Einfluss der zusammengefassten T-Stadien bei Erstdiagnose (T1 und T2 versus T3 und T4) auf die Überlebenszeit	68
<u>Graphik 4:</u> Einfluss des N- Stadiums bei Erstdiagnose auf die Überlebenszeit	69
<u>Graphik 5:</u> Einfluss der zusammengefassten N-Stadien bei Erstdiagnose (N0 versus N1 und N2) auf die Überlebenszeit	70
<u>Graphik 6:</u> Einfluss der HIP 1 Expressionsintensität des Tumorgewebes auf die Überlebenszeit	71

<u>Tabellenverzeichnis</u>	<u>Seite:</u>
<u>Tab. 1:</u> HIP 1-Expression in normalem Gewebe	8
<u>Tab. 2:</u> HIP 1-Expression in tumorösem Gewebe	9
<u>Tab. 3:</u> Geschlechtsverteilung des untersuchten Patientengutes	26
<u>Tab. 4:</u> Alter zum Zeitpunkt der Erstdiagnose	27
<u>Tab. 5:</u> Differenzierungsgrade (Gx-G4)	30
<u>Tab. 6:</u> T-Stadium	32
<u>Tab. 7:</u> N-Stadium	34
<u>Tab. 8:</u> Zusammenfassung der TNM-Stadien des Gesamtkollektivs	35
<u>Tab. 9:</u> UICC–Stadieneinteilung	37
<u>Tab. 10:</u> HIP 1 Expressionsintensität der Blutgefäße	48
<u>Tab. 11:</u> HIP 1 Expressionsintensität in tumorösem Gewebe	50
<u>Tab. 12:</u> Auftreten von Metastasen	54
<u>Tab. 13:</u> Auftreten von Rezidiven	56
<u>Tab. 14:</u> Status des Patientengutes nach 5 Jahren	57
<u>Tab. 15:</u> Zusammenhang zwischen HIP 1 Expression und T-Stadium	59
<u>Tab. 16:</u> Zusammenhang zwischen HIP 1 Expression und N-Stadium	61
<u>Tab. 17:</u> Zusammenhang zwischen HIP 1 Expression und M-Stadium	62
<u>Tab. 18:</u> Zusammenhang zwischen HIP 1 Expression und UICC-Stadien	64
<u>Tab. 19:</u> Prognostische Faktoren bei kolorektalen Karzinomen	76

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
° C	Grad Celsius

A

Abb.	Abbildung
AEC	Chromogen
Ak	Antikörper
Alk.	Alkohol
Aufl.	Auflage

B

bcl 2	B-cell lymphoma 2
Bd.	Band
biol.	biologisch
bzw.	beziehungsweise

C

CA 19-9	Carbohydrat Antigen 19-9
CA 72-4	Carbohydrat Antigen 72-4
ca.	circa
canc.	Cancer (Krebs)
CEA	Carcino embryonales Antigen
chem.	chemisch
chir.	chirurgisch
Cox II	Cyclooxygenase II

Abkürzungsverzeichnis

D

Da	Dalton (Maßeinheit)
DD	Differentialdiagnose
DED	Death effector domain
Def.	Definition
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure

E

ED	Erstdiagnose
End 4p	Endozytose 4p Protein
ENTH	Epsin N-Terminal homology
et al.	et alii (und Mitarbeiter)
etc.	et cetera
evtl.	eventuell

F

FAP	familiäre adenomatöse poliposys
Fas	Focal adhesions (Ligand)
ff.	folgende
5-FU	5-Fluoruracil

G

ggf.	gegebenenfalls
------	----------------

H

h	Stunde
HE	Hämatoxylin Eosin
her 2	Human Epidermal growth Factor Receptor

Abkürzungsverzeichnis

Hip 1	Huntingtin-interacting-Protein-1
HLA	Human leucocyte antigen
HNPCC	hereditäres nicht polypöses kolorektales Krebsyndrom
HRP	Horse radish peroxidase
Hrsg.	Herausgeber
htt	Huntingtin

I

i.a.	im allgemeinen
ICD	International classification of diseases
i.d.R.	in der Regel
IgG1	Immunglobulin G1

J

J	Journal
---	---------

K

k	Kilo
kDa	Kilo Dalton
Konz.	Konzentration
k-ras	Ras-Protoonkogen

L

Lj.	Lebensjahr
log	Dekadischer Logarithmus
LSAB2	

Abkürzungsverzeichnis

M

m	männlich
M	Molar
min.	Minute
mind.	mindestens
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA

N

n	Anzahl
ng	Nanogramm
NH ₃	Ammoniak
Nr.	Nummer

O

od.	oder
OSP	Onkologischer Schwerpunkt Stuttgart

P

P 53	Protein P 53
p.a.	per anno
Pat.	Patient
pathol.	pathologisch
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Platteled derived growth factor
pKi-67	Ki-67 Protein
pos.	positiv
PSA	Prostata spezifisches Antigen

Abkürzungsverzeichnis

Q

R

r	related
rel.	Relativ
RNA	Ribonukleinsäure

S

S.	Seite
Sek.	Sekunde
Sla 2p	seal lead acid 2p Protein
s. o.	siehe oben
sog.	so genannt
soz.	so zu sagen

T

Tab.	Tabelle
TALIN	
TBST	Tris gepufferte Kochsalzlösung
Temp.	Temperatur
TGF	Transforming growth Faktor
TNM	Tumor, Nodulus, Metastase

U

u.a.	unter anderem
usw.	und so weiter
UICC	Unio internationalis contra cancrum
u.v.m.	und vieles mehr

Abkürzungsverzeichnis

V

vgl.	vergleiche
Vol.	Volume (Band)

W

w	weiblich
WHO	World Health Organisation

Z

z. B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Allgemeines

Betrachtet man die gängigen Statistiken, so fällt auf, dass die kolorektalen Karzinome bei der weiblichen Bevölkerung in Deutschland inzwischen zu den zweithäufigsten und bei Männern zu den dritthäufigsten bösartigen Krebserkrankungen zählen.

Die Zahl der jährlich auftretenden Neuerkrankungen in Deutschland wird für Männer auf über 24 000, für Frauen auf nahezu 28 000 geschätzt. Männer erkranken im Durchschnitt mit 68,1 Jahren, Frauen mit 72,3 Jahren (Arbeitsgemeinschaft bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2002).

Mit anteilig 9 % ist das kolorektale Karzinom an der Gesamtheit aller malignen Tumorerkrankungen, nach dem Mamma- und Bronchialkarzinom bei Frauen, und dem Prostata- und ebenfalls Bronchialkarzinom bei den Männern, vertreten.

Bei kolorektalen Karzinomen, ist die Anzahl der Neuerkrankungen bei Betrachtung der letzten 20 Jahre von 5 bis 15 auf etwa 15 bis 25 pro 100 000 angestiegen. Jedoch kann eine Abnahme der Mortalitätsrate durch die stetige Verbesserung und Weiterentwicklung der Standards in der Früherkennung dieser Karzinome verzeichnet werden.

Aufgrund der Entstehungsmechanismen maligner Darmtumoren spricht man der „richtigen“ Ernährung hierbei einen hohen Stellenwert zu. Förderlich der Entstehung maligner Darmtumoren wirken eine übermäßige Kalorienzufuhr, die erhöhte Aufnahme von N-Nitrosaminen und ein häufiger Fleischverzehr, hier sind vor allem Schwein, Rind und Lamm mit den dazugehörigen tierischen Fetten zu nennen. Mangelnde körperliche Bewegung, Nikotin, erhöhter Alkoholkonsum und die darausfolgende Hypergastrinämie steigern zusätzlich das Risiko. Ein schützender Effekt wird nicht-steroidalen Antiphlogistika (Cox II-Hemmer) sowie einer vitamin- (Vitamine A, C, E), ballaststoff- und spurenelementreichen (Selen und Calcium) Ernährung zugesprochen.

Der weitaus größte Teil der Karzinomentstehung erfolgt durch Genmutationen im Rahmen der sogenannten Adenom-Karzinom-Sequenz.

Entzündliche Darmerkrankungen, Spätfolgen anderer Karzinome mit entfernter Lokalisation oder eine genetische Disposition, z. B. die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), familiäre juvenile Polyposis, Peutz- Jeghers-, Gardner- und Tourkotsyndrom, hereditäres nicht polypöses kolorektales Krebsyndrom (HNPCC-Syndrom), sind nachgewiesenermaßen prägende Faktoren, die das Risiko der Entstehung eines malignen Tumors um mindestens 10 % erhöhen.

Die operative Resektion ist nach wie vor die Methode der Wahl bei der Behandlung kolorektaler Karzinome, trotzdem entwickeln ca. 40 % der primär kurativ operierten Patienten im Verlauf ein lokales, regionales bzw. fernes Tumorrezidiv (Buglioni et al., 1999).

1.2 Prognosefaktoren

1.2.1 Definition

Ein Prognosefaktor ist jeder zum Zeitpunkt der Primäroperation erhobene Messwert, der mit dem krankheitsfreien Überleben oder dem Gesamtüberleben korreliert, ohne dass eine adjuvante Systemtherapie durchgeführt wurde. Damit korreliert ein Prognosefaktor mit dem natürlichen Verlauf der Erkrankung (Schaller et. al., 2006).

1.2.2 Klinische und pathomorphologische Prognosefaktoren

Das kolorektale Karzinom liegt im Vergleich zu anderen Tumorentitäten im mittleren Prognosebereich. Etwa die Hälfte der Patienten überlebt 5 Jahre.

Die Überlebenschance ist insgesamt streng stadienabhängig. Im fortgeschrittenen metastasierten Stadium (über Lymphknotenmetastasen hinaus) sind Heilungen sehr selten im Gegensatz zum Stadium I, in dem über 95% der Patienten geheilt werden, und im Stadium II, bei dem die Heilungsrate 80% beträgt. Nach wie vor ist das TNM-System das wichtigste und am besten evaluierte Instrument zur Prognoseabschätzung. Die daraus resultierende Stadieneinteilung lässt als Resultat der historischen Studien mit alleiniger Operation (ohne adjuvante Chemotherapie) bzw. spontanem Verlauf der metastasierten Stadien erkennen, dass das 5-Jahres-Überleben für Stadium II mit 62-76%, für Stadium III mit 45-65% anzusetzen ist.

Insbesondere die Anzahl der untersuchten und davon befallenen oder nicht befallenen Lymphknoten ist ein wichtiger Parameter zur Prognoseabschätzung und somit sehr aussagekräftig für die Abschätzung des Überlebens: Unabhängig davon, ob es nodal positive oder nodal negative Stadien sind, ist die Prognose der Patienten mit vielen untersuchten Lymphknoten besser (Schmoll et. al., 2007). In der Intergroup-0089-Studie liegt erst ab 20 tumorfreien Lymphknoten eine maßgeblich verbesserte Prognose vor (Le Voyer et. al., 2003).

Weitere relevante prognostische Faktoren bei kolorektalen Karzinomen für die einzelnen Stadien werden in Tab. 19, Kapitel 5.2 ff. dargestellt.

1.2.3 Molekulare Marker

In zahlreichen Untersuchungen wurden molekulare Marker identifiziert, die prognostische (d.h. Einfluss auf das Outcome unabhängig von der Therapie) oder prädikative (Einfluss auf den Verlauf einer bestimmten Therapie) Bedeutung haben. Die am besten untersuchten in der 5-FU/Folinsäure-Ära sind:

- Verlust der Heterozygotie am Chromosom 18q
- p53 und k-ras-Mutation
- Mikrosatelliteninstabilität
- Polymorphismen des Thymidilinstoffwechsels in den Enzymen
- Thymidilatsynthase
- Thymidilatphosphorylase
- Dihydropyrimidin-Dehydrogenase

Die Kombination verschiedener molekularer Marker kann eine detailliertere Prognoseabschätzung ermöglichen. Exemplarisch hierzu ist die Analyse von Watanabe et al. (Watanabe et. al., 2001) an 460 Patienten mit Stadium III und "High Risk"-Stadium II. Diese Patienten wurden in der Intergroup-0089-Studie behandelt (LeVoyer

et. al., 2003). Die hier berichteten Überlebenswahrscheinlichkeiten sind unabhängig von der Chemotherapie (Schmoll et. al., 2007).

1.3 Etablierung eines Prognosefaktors

Bestimmte Proteine / Stoffwechselprodukte treten nur an bestimmten Geweben auf und einige native Formen nur bei tumorös entarteten Zellstrukturen. Diese Tatsache ist ein wesentlicher Schlüssel zur Etablierung von möglichen immunhistochemischen Prognosefaktoren um durch die reproduzierbare Expressionsintensität eine signifikante Aussage zur Tumorbiologie und zum Langzeitüberleben der Patienten zu erhalten.

1.3.1 Etablierung von Huntingtin-Interacting-Protein-1 bei kolorektalen Karzinomen

Tatsache ist, dass Huntingtin-Interacting-Protein-1 nur beim Prostata- und Kolonkarzinom exprimiert wird, jedoch nicht in den gesunden Epithelien dieser Organe vorkommt (siehe Tab. 1 und 2, ebenfalls Rao et. al., 2002). Beim Prostatakarzinom ist nachgewiesen, dass das Expressionsverhalten mit der Tumorbiologie korreliert (Chan E., 2002). Für das Dickdarmkarzinom wurde bisher kein derartiger Nachweis erbracht. Eine Untersuchung liegt daher nahe.

1.4 Das Huntingtin-Interacting-Protein-1 Antigen

Huntingtin-Interacting-Protein-1 (HIP 1) ist ein 116-kDa schweres im Zytoplasma befindliches Protein, das zu einer evolutionär stabilen Familie gehört, zu der auch Sla2p und HIP 1r (related) zählen. Sla2p, auch bekannt als End4p, ist ein Hefeprotein (*Saccharomyces Cerevisiae*), das an der Clathrin-bindenden Endozytose, sowie der zytoskelettalen Organisation und dem zellulären Überleben essentiell beteiligt ist. HIP 1r wurde als erstes menschliches homologes Protein zu Sla2p gefunden und als

Kofaktor der Clathrin-bindenden Endozytose identifiziert. Im Vergleich zu HIP 1 ist es in der Lage sowohl an Actin als auch an Clathrin zu binden. Jedoch hat seine künstliche Ausschaltung in knockout-Maus-Versuchen keinerlei Auswirkungen auf die Entwicklung und Lebensfähigkeit der Organismen gezeigt, wie das nicht kompensierbare Ausschalten von HIP 1, was in kypholordotischen Fehlbildungen und schließlich dem Tod der Probanden endete (Hyun et al., 2004). Es ist erwiesen, dass HIP 1r nicht mit Huntingtin interagiert (siehe Kapitel 1.4.1), da eine Homologie zur Huntingtin-Bindungsdomäne nicht gegeben ist und somit keine Apoptose-Induktionsaktivität wie bei HIP 1 vorhanden ist (Okano et al., 2003).

Die Hauptstruktur dieser drei Proteine beinhaltet eine N-terminale (ENTH) Domäne, welche bisher nur bei Kofaktoren des Clathrin-bindenden Systems gefunden wurde, sowie ein Leucin-zipper Motiv und ein Carboxyl-terminus homolog zu TALIN (siehe hierzu auch Abb. 1).

Anhand biochemischer Analyseverfahren wurde eine weitere Domäne innerhalb des Antigens entdeckt und beschrieben. Es handelt sich hierbei um eine Sequenz, homolog einer sog. DED (death effector domain). Sie befindet sich im hydrophoben Bereich der Phenylalanin-Bindungsstelle 398, welche eindeutig für die Toxizität des HIP 1-Antigens verantwortlich gemacht werden kann (Hackam et al, 2000).

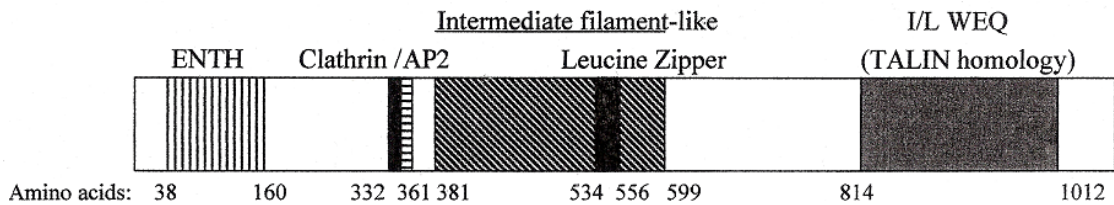


Abb. 1: HIP 1 Protein Domänen (nach Rao et al., 2001)

Betrachtet von links nach rechts: N-terminale (ENTH) Domäne, bisher nur bei Kofaktoren des Clathrin-bindenden Systems nachgewiesen. Dann folgt die Clathrin/AP-2 Bindungsstelle.

HIP 1 verfügt noch über ein Leucin-zipper Motiv und ein Carboxyl-terminus homolog zu TALIN.

1.4.1 HIP 1 und seine Interaktionen mit Huntingtin

Über die Endozytose hinausgehende Funktionen von HIP 1 liegen bis heute größtenteils im Verborgenen. Man weiß jedoch, dass es mit Huntingtin (htt) interagiert, einem 350-kDa schweren Protein, welches essentiell ist für eine normale embryonale Entwicklung.

Des weiteren wird vermutet, dass Huntingtin für eine regelrechte Hämatopoese verantwortlich ist, und zudem als Eisenbindungsprotein fungiert.

HIP 1 bindet an den Aminosäureterminus des natürlichen Wildtyps von htt in der Region abwärts der Polyglutaminsequenz.

Im Fall des Krankheitsbildes der Chorea Huntington ist diese Sequenz jedoch mutiert, was nachweislich zu einer geringeren Bindungsaffinität von HIP 1 zu htt führt (Qin et al., 2004) und somit ein „Überschuss“ an freiem, nicht gebundenen HIP 1-Antigen existiert, welches nun mit anderen zytoplasmatischen Proteinen, die über eine Mediatorfähigkeit den programmierten Zelltod betreffend verfügen, Verbindungen eingehen kann. Zudem ist HIP 1 selbst in der Lage, über direkte Aktivierung der Caspase-3 die Apoptose einzuleiten (Hackam et al., 2000 sowie Abb. 2 und 4).

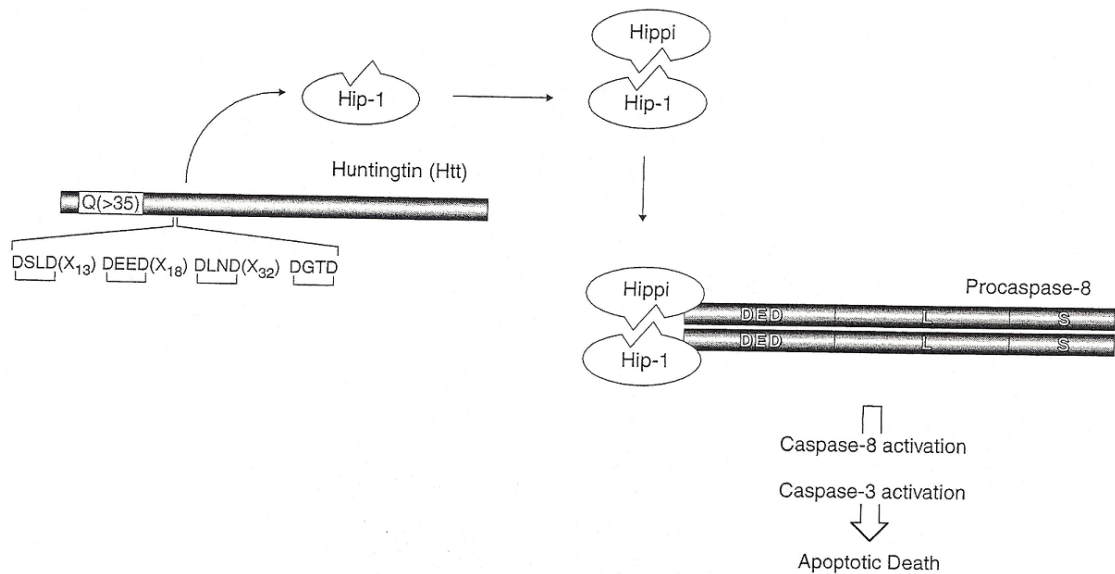


Abb. 2: Vermutetes Modell des Interaktionsmechanismus von htt und HIP 1 unter Beteiligung von HIPPI, welches zur Apoptose führt (nach Gervais et. al., 2002).

HIP 1 verbindet sich mit Huntingtin (htt). Dieser Komplex ist nun in der Lage unter Einbindung seines Partners HIPPI, der die proapoptischen Fähigkeiten von HIP 1 deutlich potenziert, den Procaspase-8-Komplex zu bilden und somit über die Aktivierung von Caspase-8 die Apoptose einzuleiten.

Die Vermutung, dass HIP 1 in beiden Regulationswegen sowie bei weiteren Mechanismen der zellulären Interaktion eine entscheidende Rolle zukommen muss, ist entstanden, indem man herausgefunden hat, dass die mRNA von HIP 1 in verschiedenen Tumorzelllinien im Vergleich zum ursprünglichen Gewebe, in dem keine oder nur geringe Mengen vorhanden sind, erhöht oder sogar stark erhöht ist.

Die dargestellte Tab. 1 zeigt Antigen-Expression in „normalem“ Gewebe sowie Gewebe in denen unter gesunden Bedingungen kein HIP 1 Nachweis erbracht wird.

Tab. 2 hingegen zeigt die HIP 1 Expression in tumorösem Gewebe.

Tab. 1: HIP 1 Expression in normalem Gewebe (nach Rao et al., 2002)

Natürliche Expression von HIP 1	hohe Expression	mittlere Expression	niedrige Expression	Keine Expression
Blutgefäße	Endothelien kleiner Blutgefäße			Kolon Drüsenepithel
Niere	distal tubuläres Gewebe			Prostata Drüsenepithel
Lunge	Alveolarepithel			
Herz	Herzmuskel			
Gehirn	Plexus Choroideus des Gehirns			
PNS	verschiedene periphere Nerven und Ganglien			
Leber	Lebergewebe			
Hoden	postmeiotische Spermatiden im tubulus seminiferus			

Tab. 2: HIP 1 Expression in tumorösem Gewebe (nach Rao et al., 2002)

HIP 1 Expression in tumorösem Gewebe	hohe – mittlere Expression	niedrige (nicht messbare) Expression
	Tumoren des ZNS	Lymphome
	Brustkrebs	
	kolorektale Karzinome	
	Lungenkrebs	
	Melanome	
	Ovarialkarzinome	
	Prostatakrebs	

1.4.2 Rezeptorvermittelte Signalwege

Im Falle von HIP 1 spielen die rezeptorvermittelten Signalwege eine entscheidende Rolle. Anhand der HIP 1/htt Interaktionen wird über Zelltod oder – überleben entschieden. Dies zeigt sich beispielsweise darin, dass Menschen die an Chorea Huntington leiden, ein deutlich niedrigeres Krebsrisiko aufweisen als gesunde Blutsverwandte (Rao et al., 2002 sowie Kapitel 1.4.1).

Diese inverse Korrelation lässt vermuten, dass die HIP 1/ htt Interaktionen einerseits zur neuronalen Apoptose (Chorea Huntington) und andererseits zur Krebszell Apoptose führen. Letztere bedingt vermutlich ein verringertes Risiko der Krebsentstehung (Gervais et al., 2002, Vecchi et al., 2005).

Ein weiterer Partner von HIP 1 ist HIPPI, welches im Golgi-Apparat der Neurone gebildet wird und schon dort vereinzelt Verbindungen mit HIP 1 eingeht. Nachweisorte von HIPPI aufgrund immunhistochemischer Nachweisverfahren sind Cortex, Striatum, Globus pallidus, Hypothalamus und Cerebellum. Es wird gezeigt, dass der Carboxyl-terminus homolog zu TALIN die Domäne ist, an der die Interaktion zwischen HIP 1 und HIPPI stattfindet.

HIPPI ist in der Lage, die proapoptotischen Fähigkeiten von HIP 1 deutlich zu potenzieren. Der so entstandene Procaspase-8-Komplex aktiviert nun den Caspase-8-abhängigen Weg und leitet die Apoptose der Zellen ein (Gervais et al., 2002 sowie Abb. 2).

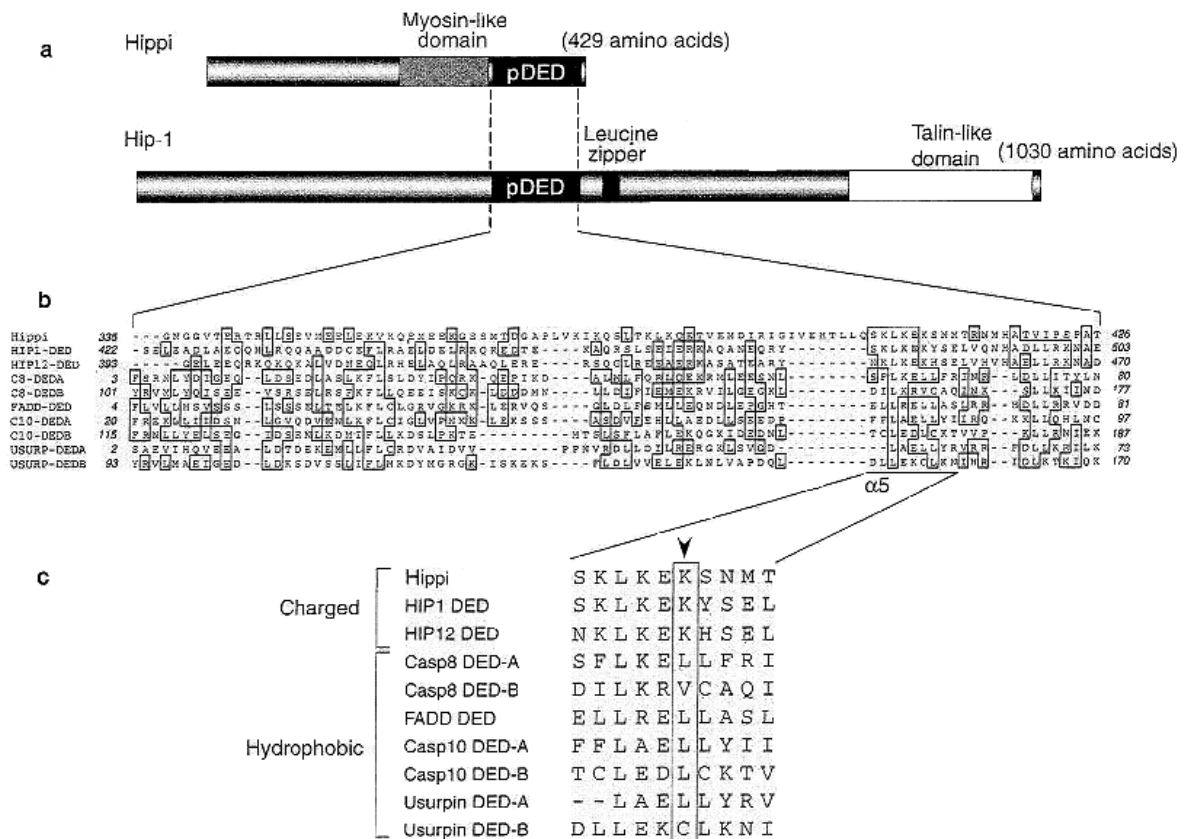


Abb. 3: Organisation von HIPPI und HIP 1 (nach Gervais et. al., 2002)

- a) Die beiden Partner, dargestellt anhand eines schematischen Diagramms.
- b) Darstellung der Homologie der Aminosäure-Sequenz der pDED von HIPPI zu anderen DED's.
- c) Darstellung der Anfangsaminosäure-Sequenz der HIPPI pDED und anderer bekannter DED's. Die erste und die letzte Aminosäure jeder DED mit den jeweilig sie betreffenden Proteinen sind an der rechten und linken Seite jeder Sequenz angezeigt.

Die Region entsprechend der fünften Helix (alpha 5) ist angezeigt. Die Pfeilspitze in c markiert die Position der kritischen Aminosäure, welche die erste Gruppe von DED's mit geladenem Rest (K) von denen mit hydrophobem Rest (L, V) an derselben Stelle unterscheidet.

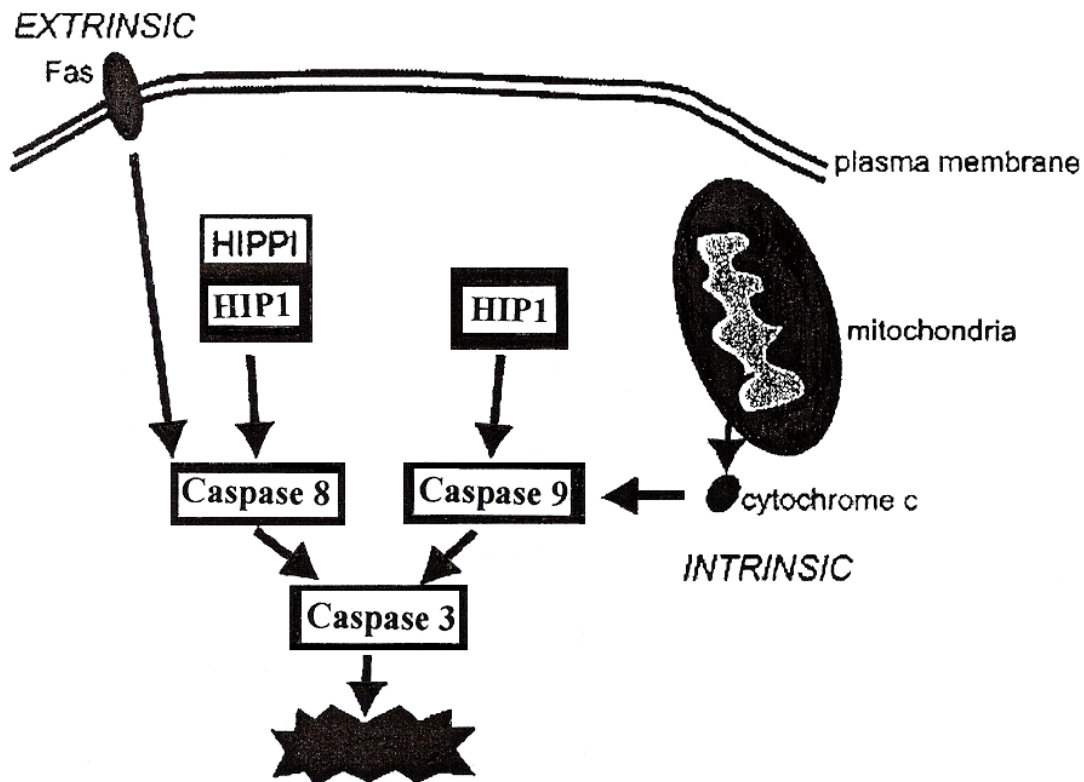


Abb. 4: Mögliche Mechanismen des HIP 1- abhängigen Zelltodes (modifiziert nach Chan, 2002)

Vermuteter Pathomechanismus:

HIP 1 aktiviert durch erhöhtes Vorkommen Caspase-9, diese aktiviert Caspase-3, durch deren Aktivität der Zelltod ausgelöst wird. (sog. intrinsischer Weg, wird im im Normalfall von aus Mitochondrien herausgegebenem Cytochrom c aktiviert). Beim sog. extrinsischen Weg kommt der Zwischenspieler HIPPI noch dazu, nach erfolgter Procaspase-8-Komplexbildung (siehe Abb. 2) wird Caspase-8 aktiviert, welche den Zelltod wieder durch Einwirken auf Caspase-3 einleitet. Caspase-8 wird normalerweise von sog. Zelloberflächentodesrezeptoren (z.B. Fas) aktiviert.

1.4.3 Funktion endozytotisch aktiver Proteine

Es ist schon seit längerem bekannt, dass sich endozytotisch aktive Proteine im Zytoplasma zwischen der Zellmembran und dem Zellkern frei bewegen, nur ihre Funktionen, den Zellkern betreffend, sind noch nicht vollständig geklärt (Vecchi et al., 2005).

Anhand aktueller Erkenntnisse wird HIP 1 die Funktion eines sog. „hub“, eines Shuttles zugeschrieben. In einer Studie wurde bewiesen, dass HIP 1 die transkriptionale Aktivität von im Zellkern befindlichen Hormonrezeptoren (hauptsächlich Androgen- sowie ebenfalls Östrogen- und Glucocorticoidrezeptoren) nachweislich steigert (Mills et al., 2005). Die genauen Auswirkungen und darausfolgenden Effekte und eventuellen Therapieansätze sind noch nicht gänzlich geklärt, jedoch lässt sich hieraus eindeutig die Schlussfolgerung ziehen, dass endozytotisch aktive Proteine ebenfalls in die Regulation der Genexpression involviert sind (Mills et al., 2005).

1.5 Ziel der Arbeit

Es ist erwiesen, dass gesundes Prostata- und Kolonepithel keine HIP 1 Expression aufweisen (Rao et al., 2002).

Unter anderem schließen Rao et al somit aus dem unterschiedlich starken Auftreten von HIP 1 Konzentrationen bei Neoplasien oder Karzinomen dieser Organe auf die Aggressivität und Metastasierungstendenz des Tumors, jedoch ohne dass der Zusammenhang in allen Einzelheiten geklärt ist.

Man kann sagen, dass bei klinisch lokalisiertem Prostatakrebs mit dem Auftreten von HIP 1 eine hohe Malignität verbunden ist. Ein weiterer Faktor der hierfür spricht, ist das Wiederauftreten des PSA (Prostata Spezifisches Antigen). Bei HIP 1 positiven Prostatakarzinomen konnte man mit einem wieder ansteigenden PSA rechnen (als erhöhte PSA-Level wurden alle Konzentrationen über 0,2 ng/ml angesehen) (siehe Rao et al., 2002), während bei HIP 1 negativen Prostatakarzinomen kein Wiederanstieg des PSA zu verzeichnen war und damit kein Rezidiv entstanden ist.

HIP 1 ist in sehr hohem Maße im Zytoplasma des Epithels der Tumorzellen zu finden, wobei der Nachweis anhand monoklonaler Maus- und Kaninchen-Antikörper erbracht wurde (Rao et al., 2002).

Hierbei zeigte sich in 50 von 53 Fällen eine erhöhte HIP 1 Expression vor allem im Gewebe von Tumoren der Brust, Lunge, Leber, Ovarien und Prostata sowie bei Melanomen.

Anhand einer Testreihe bei ausgewählten Patienten mit gesichertem Prostatakarzinom wurde bei einer Anzahl von 135 Tumorgewebeproben von insgesamt 14 Patienten nachgewiesen, dass 95% des gesunden Gewebes keinerlei HIP 1 Expression zeigten, wobei bei den anderen 5% niedrige bis mittlere HIP 1 Expressionen aufgezeigt werden konnten (Rao et al., 2002).

Man kann HIP 1 zwar nicht als spezifischen Marker für Kolon- und Prostata Krebs sowie andere Tumorerkrankungen ansehen, jedoch ist bewiesen, dass HIP 1 in diesen Epithelien normalerweise nicht exprimiert wird (siehe Tab.1).

Offensichtlich ist die HIP 1 Expression ein relativ spätes Ereignis in der Entwicklung des Prostatakarzinoms, wobei eine Hormonabhängigkeit des Prostatakarzinoms unter zunehmender HIP 1 Expression diskutiert wird.

Biologische Funktionen der HIP 1 Expressionswerte sind noch nicht geklärt. Auch gibt es in den Versuchen immer wieder unklare oder sich widersprechende Ergebnisse und auch eine hohe Anzahl von Karzinomen, bei denen keine Expressionserhöhung von HIP 1 zu verzeichnen ist (Chan E., 2002).

Auch wird die bei hoher HIP 1 Expression postulierte Fähigkeit den natürlichen Zelltod (Apoptose) zu initiieren sehr kritisch beurteilt (Hackam et al., 2000).

Als Ergebnis einer weiteren Untersuchung ist die Fusion von HIP 1 mit dem PDGF-beta Rezeptor beschrieben, der Effekt der darauffolgenden Tyrosinkinaseaktivität führt zur Transformation der hämatopoetischen Stammzellen, welche in einer chronischen Myeloischen Leukämie mündet (Ross et. al., 1998).

1.6 Fragestellung

Da beim Prostatakarzinom eine positive Korrelation zwischen der Höhe der HIP 1 Expression und der Tumoraggressivität nachgewiesen wurde, stellte sich die Frage, ob beim kolorektalen Karzinom auch ein derartiger Zusammenhang besteht.

Vor diesem Hintergrund wurde das Expressionsverhalten des HIP 1 im Tumorgewebe kolorektaler Karzinome immunhistochemisch untersucht und seine Korrelation in Bezug auf Aggressivität, Staging, Grading und Überlebenszeit überprüft.

2 Untersuchungsgut, Material und Methoden

2.1 Untersuchungsgut

Das Untersuchungsgut entstammt den Präparateinsendungen der chirurgischen Abteilungen an das Institut für Pathologie des Klinikums Stuttgart der Jahre 1994 bis 2006.

Zum Zeitpunkt der Abfrage lagen anhand der Patientenakten des Institutes sowie der Kontrollbögen des OSP (Onkologischer Schwerpunkt Stuttgart) folgende Daten vor: Alter und Geschlecht des Patienten, Angaben über eventuelle Doppeltumoren, Lokalisation des Tumors, Einteilung nach dem TNM-System, UICC-Stadieneinteilung (6. Auflage Nachdruck 2003), histologische Angaben, Differenzierungsgrad nach WHO, Angabe über mögliche adjuvante oder neoadjuvante Therapien, Angabe über die Zeit bis zum Auftreten eines möglichen Rezidivs eines Zweitkarzinoms oder einer Metastase, Gesamtüberlebenszeit bzw. Follow up über 5 Jahre.

Es wurden im Hinblick auf das Expressionsverhalten von HIP 1, 126 randomisierte Fälle (42 Frauen, 84 Männer, Durchschnittsalter 63,06 Jahre) mit kolorektalen Karzinomen untersucht.

2.2 Material

Nachfolgend werden die im Institut vorhandenen Materialien und Geräte, die zur Durchführung der einzelnen Schritte der Färbungen sowie immunhistochemischen- und Auswertungsverfahren verwendet wurden aufgeführt.

- 1) Monoklonaler Maus Antikörper: Klon 4B10. Isotyp: IgG1 (Firma Signet Laboratories inc. 180 Rustcraft Rd. Dedham, Ma 02026) Monoklonaler Maus Antikörper zugegeben zu 0,01 M (PBS) Puffer, und 0,1 % Salzsäure (NaN₃) und 1% Bovines Serum Albumin welches als Trägerprotein fungiert.
1:40 Antibody Diluent (Firma Dako GmbH, Hamburg, Code-Nr:S2022)

- 2) Objektträger: Super Frost Plus (Firma Menzel, Burgdorf)
- 3) Xylol (Firma Merck GmbH, Darmstadt)
- 4) Absteigende Alkoholreihe (99% Alk., 98% Alk., 70% Alk. Firma Brüggemann Alcohol, Heilbronn)
- 5) Aqua destilata (Entmineralisiertes Wasser, Hauseigene Herstellung Klinikum Stuttgart)
- 6) Target Retrieval Solution Dako (Firma Dako GmbH, Hamburg, Code-Nr: S1699)
- 7) TBST-Puffer (Firma Dako GmbH, Hamburg, Code-Nr: S3306)
- 8) 3% Wasserstoffperoxid (Peroxidase Blocking Reagent; ready to use. Firma Dako GmbH, Hamburg, Code-Nr: S2001)
- 9) Schweineserum (Firma Dako GmbH, Hamburg, Code-Nr: X0901)
- 10) Antibody Diluent (Firma Dako GmbH, Hamburg, Code-Nr: S2022)
- 11) Biotinylated Link-Ziege anti Kaninchen/Maus Immunglobuline (LSAB2 System Firma Dako GmbH, Hamburg, Code-Nr: K0675)
- 12) Streptavidin HRP (LSAB2 System Firma Dako GmbH, Hamburg, Code-Nr: K0675)
- 13) Substrat-Chromogen AEC Plus (Firma Dako GmbH, Hamburg Code-Nr: K3469)
- 14) Hämalalaun nach Mayer (Firma Merck GmbH, Darmstadt)
- 15) Ammoniaklösung 25 % p. a. (Firma Merck GmbH, Darmstadt)
- 16) Eindeckmittel: Aquatex (Firma Merck GmbH, Darmstadt)
- 17) Eosin (Morphisto Evolutionsforschung und Anwendung GmbH, Frankfurt/Main)
- 18) Corbit Balsam (I. Hecht, Kiel-Hassee)
- 19) Wasserbad (Firma GFL, Burgwedel)
- 20) Küvetten (Firma VWR, Darmstadt)
- 21) Reaktionsgefäße: Größe: 1,5 ml (Firma Eppendorf, Hamburg)
- 22) Kühlschränke: Öko Plus (Firma Siemens, München)
- 23) Tisch-Schüttelgerät: Vortex Mixer 7-20 20 (Firma neo Lab, Heidelberg)
- 24) Pipetten: Größen: 20 µl, 100 µl, 200-1000 µl (Firma Eppendorf, Hamburg)

- 25) Spitzen: Größen: 10-100 μ l, 100-1000 μ l (Firma Eppendorf, Hamburg)
- 26) Histosec Pastillen ohne DMSO Erstarrungspunkt 56-58° C (Firma Merck GmbH, Darmstadt)
- 27) Mikroton RM 2165 (Firma Leica, Nussloch)
- 28) Kühlplatte COP 20 (Firma Medite, Burgdorf)
- 29) Wasserbad für Präparatschnitte (Firma Leica, Nussloch)
- 30) Lichtmikroskop DM 3000 (Firma Leica, Nussloch)
- 31) Digitalkamera Typ Evolution MP (Firma Media Cybernetics, Bethesda, MD-USA)

2.3 Histologie

Sämtliche untersuchten kolorektalen Karzinome wurden nach operativer Entfernung für die konventionellen histologischen Untersuchungen nach Präparation 24 Stunden in gepuffertem 4% em Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Es wurden 4 μ m dicke Schnitte angefertigt und mit Hämatoxylin Eosin (HE) angefärbt. Die Untersuchung sowie Differenzierung (Grading) der verwendeten Schnitte, erfolgte nach der Einteilung des TNM-Systems, UICC-Stadieneinteilung (6. Auflage Nachdruck 2003, siehe Kapitel 3.3 ff.).

2.4 Methoden

2.4.1 Immunhistochemie

Zum Nachweis des HIP 1 wurden die repräsentativen Paraffinschnitte der kolorektalen Karzinome und die zugehörigen Lymphknoten und Metastasen mittels indirekter Immunperoxidase Technik untersucht. Dabei bindet ein spezifischer Primärantikörper an das gesuchte Antigen. Zur Lokalisation dieser Bindung wird mit einem peroxidasekonjugierten Sekundärantikörper (spezifisch gegen den Primärantikörper) inkubiert.

Unter Katalyse der Peroxidase wird das Chromogen AEC als farbiges Präzipitat an der Stelle der Enzymaktivität präzipitiert.

Folgende Antikörper wurden verwendet:

Monoklonaler Maus Antikörper Klon 4B10 (Firma Signet Laboratories inc. siehe Kapitel 2.2 Punkt 1).

Der Klon 4B10 (116-kDa) reagiert mit Huntingtin-Interacting-Protein-1 (HIP 1).

Der hier verwendete Klon reagiert nicht mit Maus HIP 1, ist aber in der Lage die Aminosäuren 750-780 des menschlichen HIP 1 zu erkennen.

2.4.2 Durchführung des speziellen immunhistochemischen Präzipitationsverfahrens zur Darstellung der HIP 1-Expression:

- 1) Schnitt mit der Schichtdicke von 4 µm auf Super Frost Plus Objektträger aufziehen
- 2) 3x5 min. entparaffinieren und rehydrieren mit Xylol
- 3) Spülen in absteigender Alkoholreihe (Jeweils 10-20 sec. in 99 %, 98 % und 70 % em Alkohol)
- 4) Spülen: ca. 2 min. mit Aqua destilata.
- 5) 60 min. Inkubation in einer Küvette, gefüllt mit Target Retrieval Solution bei 95°C im Wasserbad

Zusammensetzung:

270 ml Aqua destilata
+ 30 ml Dako Target Retrieval solution (Code: S1699)
300 ml

- 6) Abkühlen der Küvette für 20 min. bei Raumtemperatur
- 7) 2x3 min. inkubieren in TBST-Puffer bei Raumtemperatur

Zusammensetzung:

450 ml Aqua destilata
+ 50 ml TBST-Puffer
500 ml

- 8) Inkubation für 10 min. mit 3% em Wasserstoffperoxid bei Raumtemperatur
- 9) Kurzspülung in Aqua destilata
- 10) 1x5 min. inkubieren in TBST-Puffer bei Raumtemperatur
- 11) Inkubation für 10 min. mit 1:20 Schweineserum bei Raumtemperatur
(100 µl pro Objektträger auftropfen)
- 12) Inkubation für 60 min. mit dem Antikörper bei Raumtemperatur
(100 µl pro Objektträger auftropfen)

Zusammensetzung:

Monoklonaler Maus Antikörper zugegeben zu 0,01 M (PBS) Puffer,
und 0,1 % Salzsäure (NaN₃) und 1% Bovines Serum Albumin,
welches als Trägerprotein fungiert.

Isotyp : IgG1

Verdünnung: 1:40 Antibody Diluent (Firma Dako GmbH,
Hamburg, Code-Nr:S2022)
Inkubationszeit: 60 min.
Inkubationstemperatur: Raumtemperatur

- 13) 2x3 min. inkubieren in TBST-Puffer bei Raumtemperatur

- 14) Immunisierung für 30 min. mit Biotinylated Link-Ziege anti Kaninchen/Maus Immunglobuline bei Raumtemperatur
(3 Tropfen aus der Originalflasche)
- 15) 2x3 min. inkubieren in TBST-Puffer bei Raumtemperatur
- 16) Immunisierung für 30 min. mit Streptavidin HRP bei Raumtemperatur
(3 Tropfen aus der Originalflasche)
- 17) 2x3 min. inkubieren in TBST-Puffer bei Raumtemperatur
- 18) Inkubation für 30 min. bei Raumtemperatur mit 100 µl Substrat-Chromogen AEC Plus
(Nach 15 min. erneutes Aufbringen von 100 µl)
- 19) 2x3 min. inkubieren in TBST-Puffer bei Raumtemperatur
- 20) Kurzspülung in Aqua destilata
- 21) Gegenfärbung für 10 sec. mit Hämalaun nach Mayer
- 22) Kurzspülung in Aqua destilata
- 23) Ammoniaklösung 25 % p.a. zu Aqua destilata zugeben
- 24) Spülen in Aqua destilata
- 25) Eindecken mit Aquatex

2.4.3 Durchführung einer Hämatoxylin Eosin Färbung (HE):

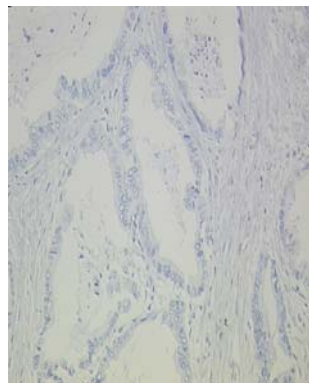
Es wurde von jedem Präparat ein weiterer Nativschnitt erstellt und eine HE-Färbung durchgeführt.

- 1) Schnitt mit der Schichtdicke von 4 µm auf Super Frost Plus Objektträger aufziehen
- 2) 3x5 min entparaffinieren und rehydrieren mit Xylol
- 3) Spülen in absteigender Alkoholreihe (Jeweils 10-20 sec. in 99 %, 98 % und 70 % em Alkohol)
- 4) Spülen für ca. 2 min. in Aqua destilata
- 5) Färbung für 10 min. mit Hämalaun nach Mayer
- 6) Spülen in Aqua destilata

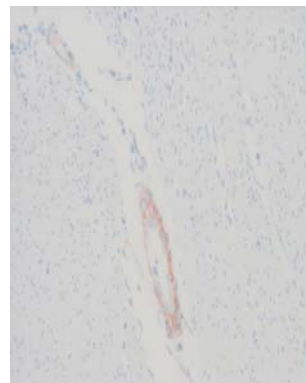
- 7) Färbung für 1-3 min. mit Eosin
- 8) Spülen in aufsteigender Alkoholreihe, beginnend kurz in 70 %, 98 % und 99 % em Alkohol.
- 9) Lagerung der Präparate in Xylol bis zum Eindecken
- 10) Eindecken mit Corbit Balsam.

2.4.4 Bestimmung des Score-Index

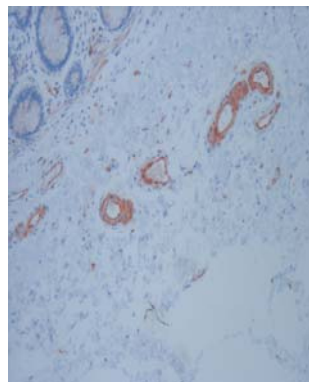
Anhand der bestehenden Versuchsreihen (Rao. et al., 2002) und des beschriebenen Vorkommens von HIP 1, wurde die HIP 1 Expression und damit der Score-Index der erstellten Paraffinschnitte der kolorektalen Karzinome nach durchgeführter Immunhistochemie mit dem Monoklonalen Maus Antikörper (Klon 4B10) korrelierend zur Studie am Prostatakarzinom (Rao et al., 2002) ermittelt. Hierzu erfolgte lichtmikroskopisch anhand der schon vor Beginn der Auswertung bekannten Expressionseigenschaften der Blutgefäße (welche als interne Positivkontrolle eines erfolgreichen immunhistochemischen Verfahrens gewertet werden kann) die Auswertung der festgelegten Bereiche, der hohen-, mittleren-, niedrigen- und der gar keiner HIP 1 Expression des gesamten Paraffinschnittes (Rao et al., 2002). Die Darstellung der einzelnen Expressionen anhand des Score-Index sowie die divergierenden Intensitäten der einzelnen Präparate mit ihren unterschiedlichen Gewebsstrukturen werden in den unten aufgeführten Abbildungen (Abb. 5) sowie in Abb. 12 - 21 (Kapitel 3 ff.) ausführlich dargestellt. Erstellt wurden die Bilder mit Hilfe einer lichtmikroskopischen Kamera in 200 und teilweise 400 facher Vergrößerung.



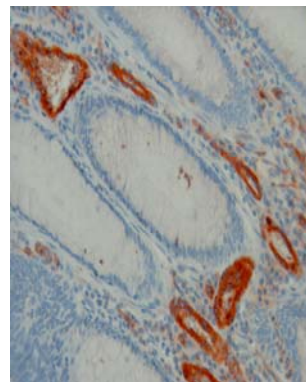
Score-Index : 0 (200 x)



Score-Index: + (200 x)



Score-Index : ++ (200 x)



Score-Index : +++ (400 x)

Abb. 5 : Darstellung des Score-Index

Score-Index	HIP 1 Expression
0	Keine Expression im Paraffinschnitt sichtbar. Tumor negativ, keine Blutgefäße vorhanden.
+	Niedrige Expression im Endothel der Blutgefäße. Rand des Blutgefäßes nicht klar markiert.
++	Mittlere Expression im Endothel der Blutgefäße. Rand des Gefäßes klarer markiert.
+++	Hohe Expression im Endothel der Blutgefäße. Rand des Gefäßes eindeutig markiert.

2.5 Statistische Methoden

2.5.1 Erläuterungen

Die statistischen Berechnungen sowie Auswertungstabellen und Graphiken wurden von Fr. Dipl.-Biol. C. Engel, Biometrikerin in Tübingen, dankenswerter Weise erstellt.

Kategorielle Daten wurden als Häufigkeitstabellen, kontinuierliche Daten als statistische Kenngrößen (Mittelwert, Standardabweichung, Minimum, Median, Maximum), Freitextangaben in Form von Listen dargestellt, jeweils stratifiziert nach Metastasierungsgrad bei Erstdiagnose.

Ergaben sich bei der Auswertung kontinuierliche Merkmale für Subpopulationen, z.B. Patientenzahlen kleiner 10, so wurden die Daten ebenfalls zusätzlich gelistet, da die statistischen Kenngrößen in diesem Fall wenig aussagekräftig sind.

Zusammenhänge zwischen HIP 1 Expression und T- und N- bzw. M-Stadium wurden mittels Fisher-Exakt-Test überprüft.

Bei der Betrachtung möglicher Einflussfaktoren auf die Überlebenszeit wurden Kaplan-Meier-Schätzer berechnet sowie der Log-Rank-Test und die Cox-Regression angewendet. Auf Kolinearität und Wechselwirkungen wurde bei Anwendung multivariater Verfahren geprüft und keine gefunden.

Die p-Werte wurden nicht für die Zahl der durchgeführten Tests adjustiert und sind rein beschreibend, d.h. hypothesengenerierend zu betrachten, was sich auch aus dem Aufbau der gesamten Untersuchung (ungeplant und retrospektiv) ergibt.

Die Tabellierung und Auswertung der Daten erfolgte mit dem Auswertungsprogramm SAS 9.1 für Windows.

2.5.2 Fisher-Exakt-Test

Hiermit wurden die Zusammenhänge der HIP 1 Expression mit den einzelnen T-, N- und M-Stadien geprüft.

2.5.3 Kaplan-Meier-Schätzer

Die sog. Überlebenszeitanalysen der hier vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe der Kaplan-Meier-Schätzer berechnet (Kaplan und Meier, 1958).

Mit Hilfe dieser Schätzung wird der Verlauf der Überlebenszeitkurve durch eine absteigende Treppenfunktion bildlich dargestellt.

Als zeitlicher Nullpunkt wurde der Zeitpunkt der Erstdiagnose festgelegt.

Als sog. Überlebenszeit wurde die Zeit bis zum jeweiligen Follow up (letzter Status) gerechnet.

2.5.4 Log-Rank-Test

Es handelt sich hierbei um ein nicht parametrisches Verfahren, welches als Standardverfahren in der Überlebenszeitanalyse für Gruppenvergleiche seine Anwendung findet. Im hier vorliegenden Fall soll hierdurch die Aussage der Auswirkung der unterschiedlichen HIP 1 Expression auf die Überlebenszeit berechnet werden.

Der Name Log-Rank-Test lässt sich von der Tatsache herleiten, dass er auf dem Logarithmus der Ränge der Daten basiert.

2.5.5 Cox-Regression

Wie bei den meisten Krankheiten oder Tumorleiden hängen die Prognose und der weitere Verlauf nicht allein von einem einzelnen Faktor ab, sondern man erhält ein Gesamtbild, das sich aus vielen einzelnen Faktoren zusammensetzt.

Um die endgültigen Ergebnisse der anfangs der Untersuchung erhobenen Einzelanalysen auf ihre Wertigkeit zu überprüfen, wurde das Cox-Regressionsmodell verwendet (COX, 1972).

Hier wird für die sog. Grundhazardfunktion, die ein stabiles Gerüst darstellt, keine besondere Verteilung vorausgesetzt, sondern eine unspezifische Funktion verwendet,

in die die einzelnen Variaten problemlos einbezogen werden können.

Mit Hilfe des proportionalen Hazardmodells lässt sich das relative Risiko der Erkrankung unter Berücksichtigung einzelner prognostischer Faktoren (Zeit, HIP 1 Expression usw.) gut berechnen.

Somit kann man gleichzeitig mehrere Faktoren hinsichtlich ihres Einflusses auf das Endergebnis analysieren und zudem die gemeinsamen Effekte des jeweils einzelnen in seiner Gesamtauswirkung zusammengefasst beurteilen.

3 Ergebnisse

3.1 Allgemeines

126 Patienten mit vollständigem Follow up wurden randomisiert der Studie zugeführt.

3.2 Alter und Geschlecht

Die Bestimmung des Lebensalters der Patienten erfolgte zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des Karzinoms mit oder ohne vorhandene Metastase unter Einbeziehung der bis dato bereits vollendeten Lebensmonate.

Die 126 Patienten teilten sich auf in 42 weibliche (33,3 %) und 84 männliche (66,7 %) Probanden (Tab. 3), mit einem Alter zwischen 37 und 91 Jahren (MW 63,06 Jahre, STD 11,24 Jahre. Tab. 4 und Abb. 6).

Es zeigte sich, dass bereits zum Zeitpunkt der Erfassung bei 8 der 42 Frauen und bei 16 der 84 Männer eine Streuung (Metastase) des Tumors in ein entlegenes Organsystem vorlag.

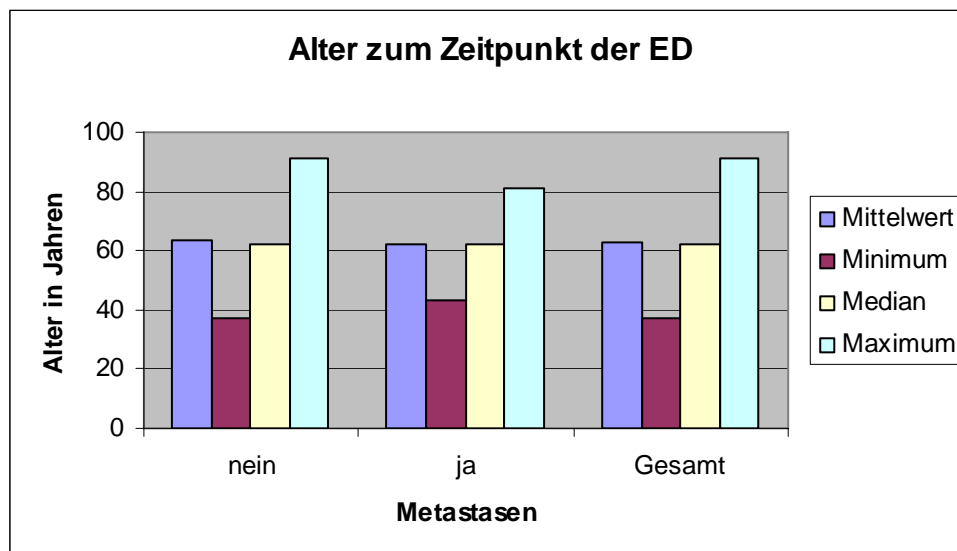
Tab. 3: Geschlechtsverteilung des untersuchten Patientengutes

	Metastasen				gesamt	
	nein		ja			
	N	%	N	%	N	%
Geschlecht						
weiblich	34	33.33	8	33.33	42	33.33
männlich	68	66.67	16	66.67	84	66.67
gesamt	102	100.00	24	100.00	126	100.00

Tab. 4: Alter zum Zeitpunkt der Erstdiagnose (ED)

	Alter bei ED							GESAMT
	ANZAHL	FEHLENDE	MITTEL- WERT	STD	MINIMUM	MEDIAN	MAXIMUM	ANZAHL
Metastasen								
nein	102.00	0.00	63.21	11.68	37.00	62.00	91.00	102.00
ja	24.00	0.00	62.42	9.37	43.00	62.00	81.00	24.00
GESAMT	126.00	0.00	63.06	11.24	37.00	62.00	91.00	126.00

Abb. 6: Alter zum Zeitpunkt der Erstdiagnose (ED)



3.3 Grunderkrankung

Bei den untersuchten Fällen von kolorektalen Karzinomen zeigen sich die typischen Verteilungsmuster der in der Literatur beschriebenen Tumorlokalisationen in den unterschiedlichen Abschnitten des Magen-Darm Traktes, und ebenfalls die damit verbundenen histopathologischen Unterscheidungsmerkmale.

44 Tumore (34,9 %) sind im Kolon, 12 Tumore (9,52 %) im Sigma, und 70 Tumore (55,56 %) im Rektum lokalisiert (siehe Abb. 7).

Abb. 7: Lokalisation des Primärtumors

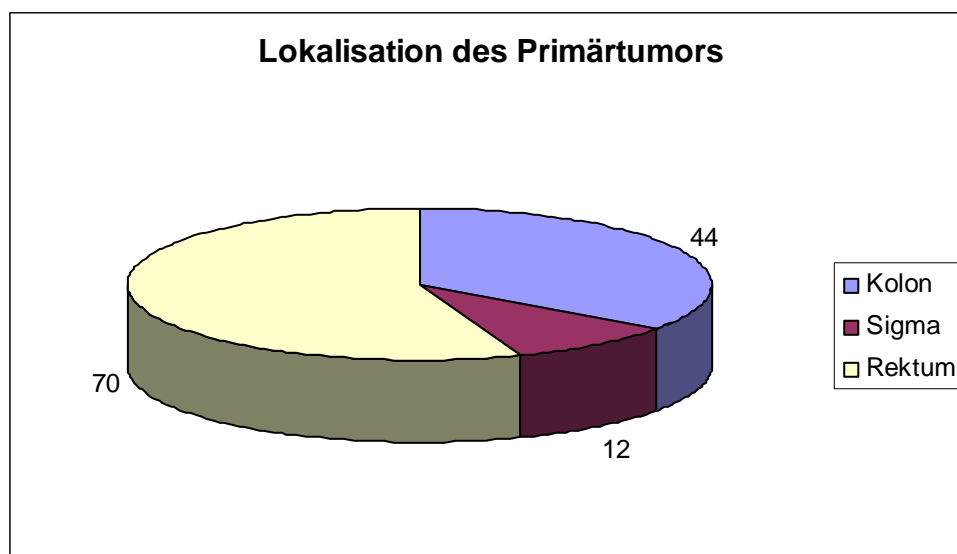
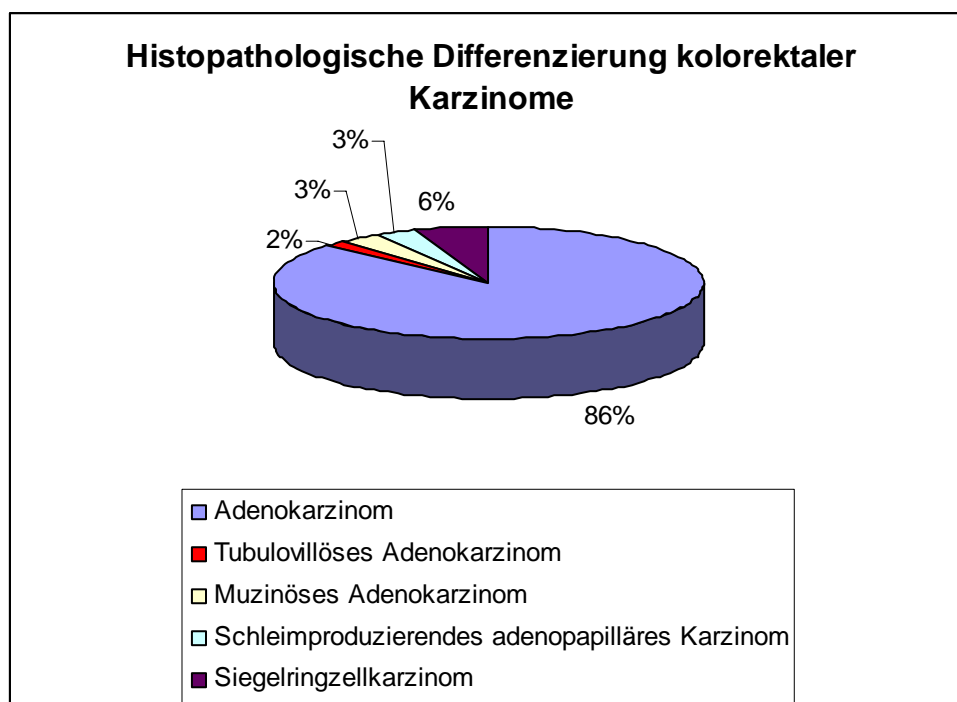


Abb. 8 zeigt folgende histopathologische Verteilungen der Tumore im Magen-Darm-Trakt: 86 % Adenokarzinome, 6 % Siegelringzellkarzinome, jeweils 3 % Muzinöse Adenokarzinome und schleimproduzierende adenopapilläre Karzinome. 2% tubulovillöse Adenokarzinome.

Abb. 8: Histopathologische Differenzierung kolorektaler Karzinome



Die kolorektalen Karzinome werden noch weiteren Unterteilungen unterzogen. Beim Grading handelt es sich um eine histopathologische Differenzierung maligner Tumoren anhand der Richtlinien der UICC.

Der Differenzierungsbereich erstreckt sich von GX - G4 (Tab. 5).

Mit zunehmendem Grading, nimmt die Zelldifferenzierung ab.

Der hier am stärksten vertretene Differenzierungsgrad mit 73,8 % ist die mäßige Differenzierung G2.

Tab. 5: Differenzierungsgrade (Gx - G4)

Grad	Definition	Häufigkeit	Prozent
Gx	Differenzierungsgrad nicht bestimmbar	0	0
G1	Gut differenziert	3	2,4
G2	Mäßig differenziert	93	73,8
G3	Schlecht differenziert	27	21,4
G4	Undifferenziert	3	2,4

Die TNM-Klassifikation maligner Tumore (UICC herausgegeben von: Ch. Wittekind, H.-J. Meyer und F. Bootz. 6. Auflage, Nachdruck 2003), beschreibt die anatomische Ausdehnung der malignen Prozesse, wobei T die Ausdehnung des Primärtumors und N das Vorhandensein von regionären Lymphknotenmetastasen beschreibt. M stellt die entfernt gelegenen, jedoch histologisch klar dem Primärtumor zuordenbaren Fernmetastasen dar.

Die Zahlen X – 4, werden dem jeweiligen Buchstaben gezielt anhand der lokalen Ausbreitung bzw. der Anzahl der Lymphknoten- oder Fernmetastasen zugeordnet.

3.3.1 T-Primärtumor:

TX- Primärtumor kann nicht beurteilt werden

T0- Kein Anhalt für Primärtumor

Tis- Carcinoma in situ (intraepithelial oder Infiltration der Lamina propria)

T1- Tumor infiltriert Submukosa

T2- Tumor infiltriert Muscularis propria

T3- Tumor infiltriert durch die Muscularis propria in die Subserosa oder in nicht peritonealisiertes perikolisches oder perirektales Gewebe.

T4- Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen und/oder perforiert das viszerale Peritoneum.

3.3.2 N-Regionäre Lymphknoten:

NX- Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden

N0- Keine regionären Lymphknotenmetastasen

N1- Metastasen in 1-3 regionären Lymphknoten

N2- Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten

3.3.3 M-Fernmetastasen:

MX- Fernmetastasen können nicht beurteilt werden

M0- Keine Fernmetastasen

M1- Fernmetastasen

(Entnommen aus TNM-System UICC 6. Auflage, Nachdruck 2003)

3.3.4 Beurteilung der T- und N-Stadien und die Fernmetastasierung zum Zeitpunkt der Erstdiagnose

In der Studie werden die T- (Tab. 6) und in dem darauffolgenden Absatz die N-Stadien (Tab. 7) und die Fernmetastasierung zum Zeitpunkt der Erstdiagnose beurteilt.

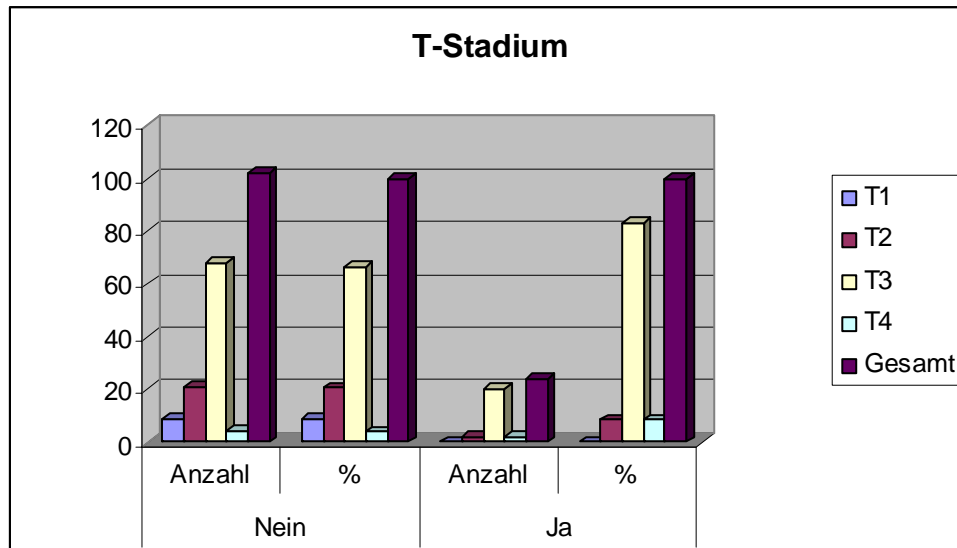
3.3.5 Beurteilung des T-Stadiums und der Fernmetastasierung zum Zeitpunkt der Erstdiagnose

Tab. 6 zeigt bei 9 Probanden im Stadium T1 noch keine Fernmetastasierung, wobei sich im Stadium T2, 23 Patienten befanden von denen 2 eine Fernmetastase aufwiesen. T3 zeigt mit 88 Patienten, das häufigste Tumorstadium an, hier wurde bei 20 Personen eine Fernmetastasierung festgestellt. Im Stadium T4 wiesen 2 von 6 Probanden Metastasen bei der Erstdiagnose auf (siehe ebenfalls Abb. 9).

Tab. 6: T-Stadium

	Metastasen				gesamt	
	nein		ja			
	N	%	N	%	N	%
T-Stadium						
T1	9	8.82	.	.	9	7.14
T2	21	20.59	2	8.33	23	18.25
T3	68	66.67	20	83.33	88	69.84
T4	4	3.92	2	8.33	6	4.76
gesamt	102	100.00	24	100.00	126	100.00

Abb. 9: T-Stadium



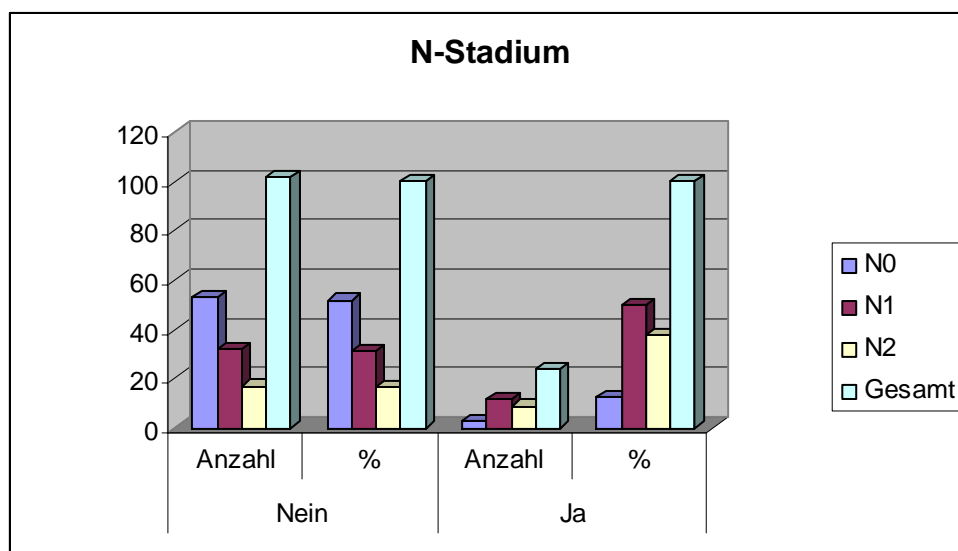
3.3.6 Beurteilung des N-Stadiums und der Fernmetastasierung zum Zeitpunkt der Erstdiagnose

Tab. 7 zeigt zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bei 56 Personen noch keine regionären Lymphknotenmetastasen (Stadium N0), allerdings wiesen davon 3 Probanden eine Fernmetastasierung auf. Von den 44 Personen mit N1 Stadium hatten 12 und von den 26 Personen mit N2 Stadium hatten 9 Fernmetastasen. Mit fortschreitender Tumorausbreitung nimmt die Metastasierung zu (siehe hierzu Abb. 10).

Tab. 7: N-Stadium

	Metastasen				gesamt	
	nein		ja			
	N	%	N	%	N	%
N-Stadium						
N0	53	51.96	3	12.50	56	44.44
N1	32	31.37	12	50.00	44	34.92
N2	17	16.67	9	37.50	26	20.63
gesamt	102	100.00	24	100.00	126	100.00

Abb. 10: N-Stadium



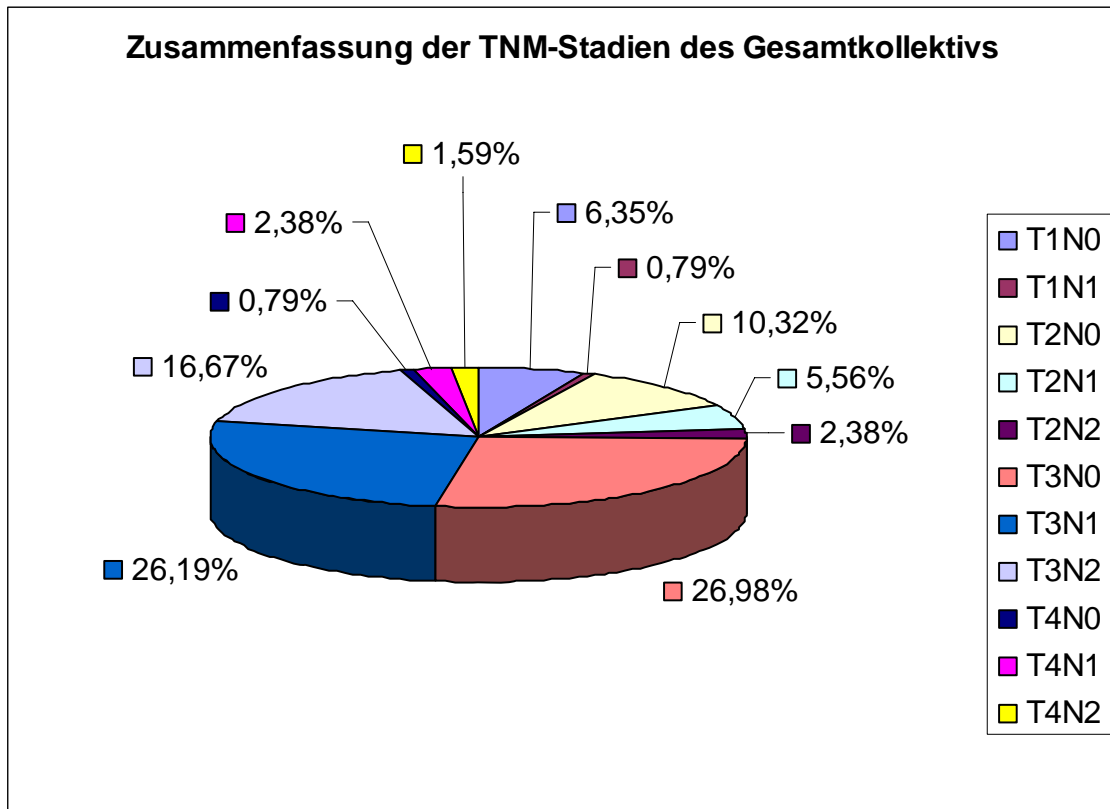
3.3.7 Zusammenfassung der TNM-Stadien des Gesamtkollektivs

Tab. 8 beschreibt auf der Grundlage des TNM-Systems den Tumorstatus zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (graphische Darstellung Abb. 11).

Tab. 8: Zusammenfassung der TNM-Stadien des Gesamtkollektivs

	Metastasen				gesamt	
	nein		ja			
	N	%	N	%	N	%
TN-Stadium						
T1N0	8	7.84	.	.	8	6.35
T1N1	1	0.98	.	.	1	0.79
T2N0	12	11.76	1	4.17	13	10.32
T2N1	6	5.88	1	4.17	7	5.56
T2N2	3	2.94	.	.	3	2.38
T3N0	33	32.35	1	4.17	34	26.98
T3N1	22	21.57	11	45.83	33	26.19
T3N2	13	12.75	8	33.33	21	16.67
T4N0	.	.	1	4.17	1	0.79
T4N1	3	2.94	.	.	3	2.38
T4N2	1	0.98	1	4.17	2	1.59
gesamt	102	100.00	24	100.00	126	100.00

Abb. 11: Zusammenfassung der TNM-Stadien des Gesamtkollektivs



3.3.8 UICC-Stadieneinteilung

Tab. 9 zeigt die Stadieneinteilung der einzelnen Tumorerkrankungen und die damit verbundene Verteilung im Hinblick auf die Metastasierung in jeglichem T- oder N-Stadium in der UICC Einteilung für Kolorektale Karzinome (Wittekind und Wagner, 2003).

Tab. 9: UICC-Stadieneinteilung

Stadium	Definition			Häufigkeit	Prozent
	T	N	M	N	%
0	Tis	N0	M0	0	0
I	T1	N0	M0	8	7,8
	T2	N0	M0	12	11,7
II	T3	N0	M0	33	32,4
	T4	N0	M0	0	0
III	Jedes T	N1	M0	32	31,4
	Jedes T	N2	M0	17	16,7
IV	Jedes T	Jedes N	M1	24	19,1

3.4 Expressionseigenschaften

Anhand der Studienergebnisse verschiedener Forschungsgruppen zeigte sich, dass HIP 1 lediglich im Zytoplasma des Drüsenepithels kolorektaler Karzinome exprimiert wird. Es existieren jedoch Gewebe in denen HIP 1 natürlicherweise vorkommt (siehe Tab. 1), ohne dass dies Indiz einer malignen Entartung darstellt.

Die Einteilung der Expression in die Grade: hoch, mittel und niedrig erfolgte anhand einiger Vorgaben und des daraus entwickelten und festgelegten Score-Index (Rao et al., 2002. Siehe Kapitel 2.4.4).

Es folgt nun anhand ausgewählter HE-Präparate und der mittels immunhistochemischen Verfahren behandelten Folgeschnitte von Blutgefäßen der Tunica muscularis des Dickdarmes die exemplarische Darstellung der unterschiedlichen Expression sowie der damit verbundene Score-Index der einzelnen Strukturen.

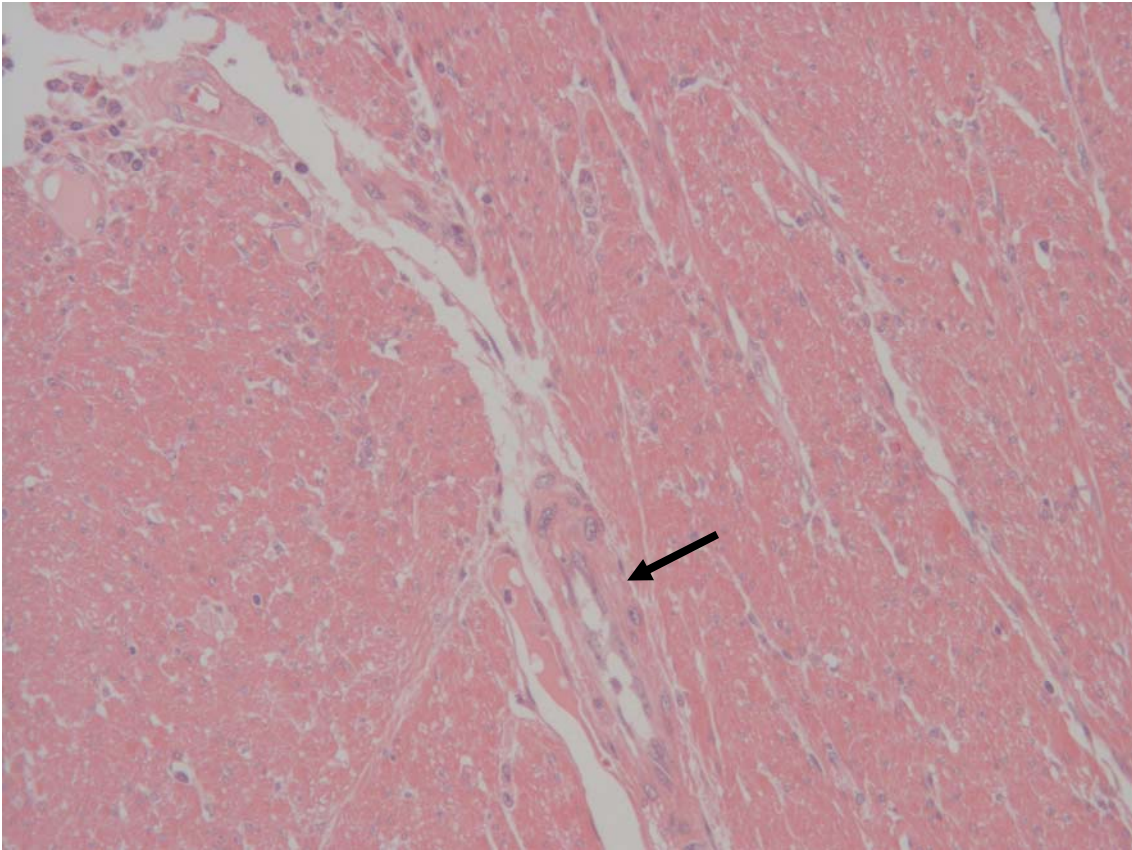


Abb. 12

Tunica muscularis des Dickdarmes mit Darstellung eines zentral markierten Blutgefäßes (HE, 200x).

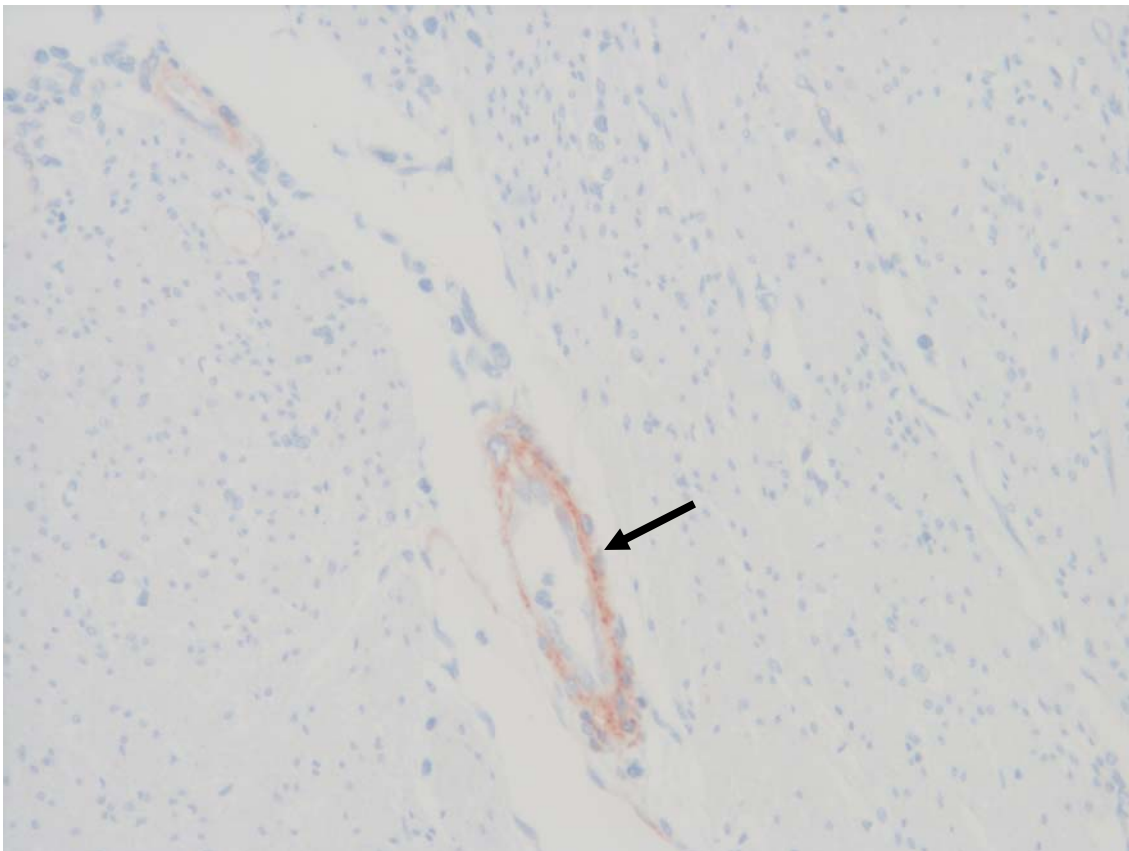


Abb.13

Niedrige HIP 1 Expression im Endothel des dargestellten Blutgefäßes (+).

(Immunhistochemie, 200x)

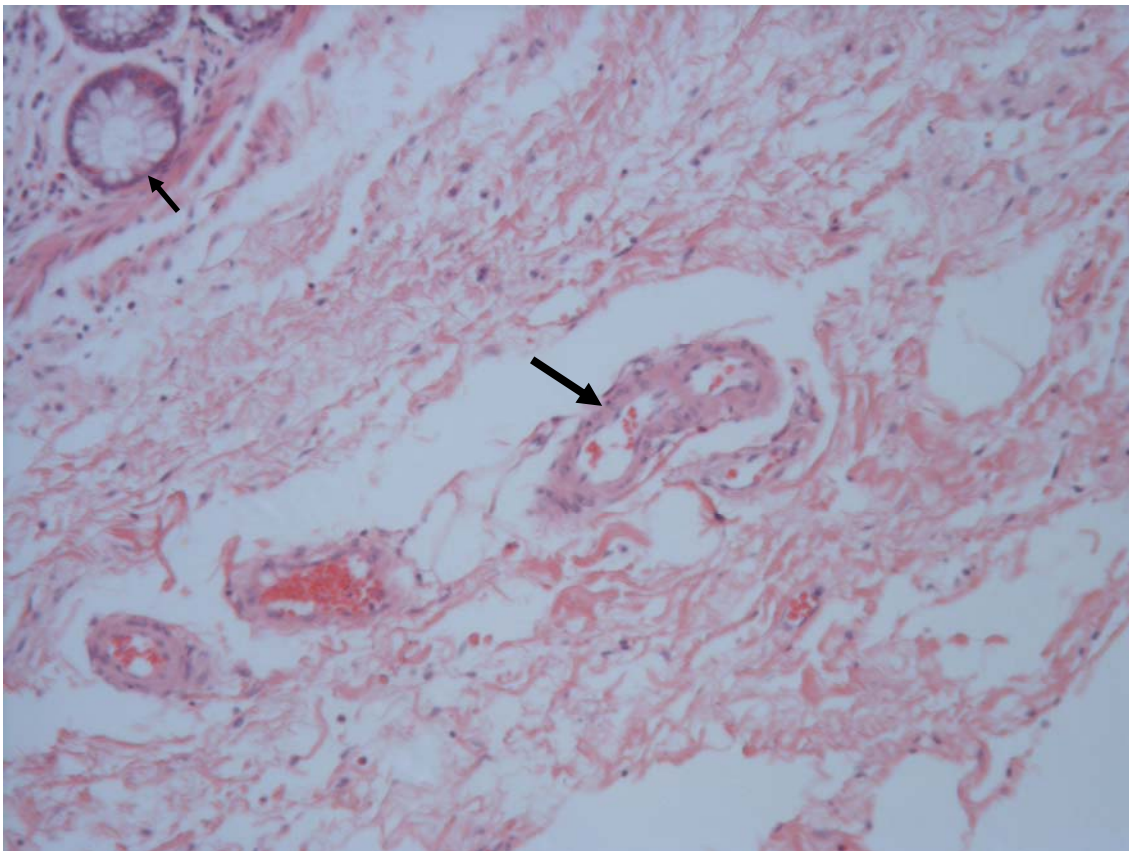


Abb. 14

Tunica muscularis des Dickdarmes. Identifikationshilfe eines bestimmten Blutgefäßes
Mitte.

Links oben, tangential angeschnittene Drüsen der Darmmukosa (HE, 200x).

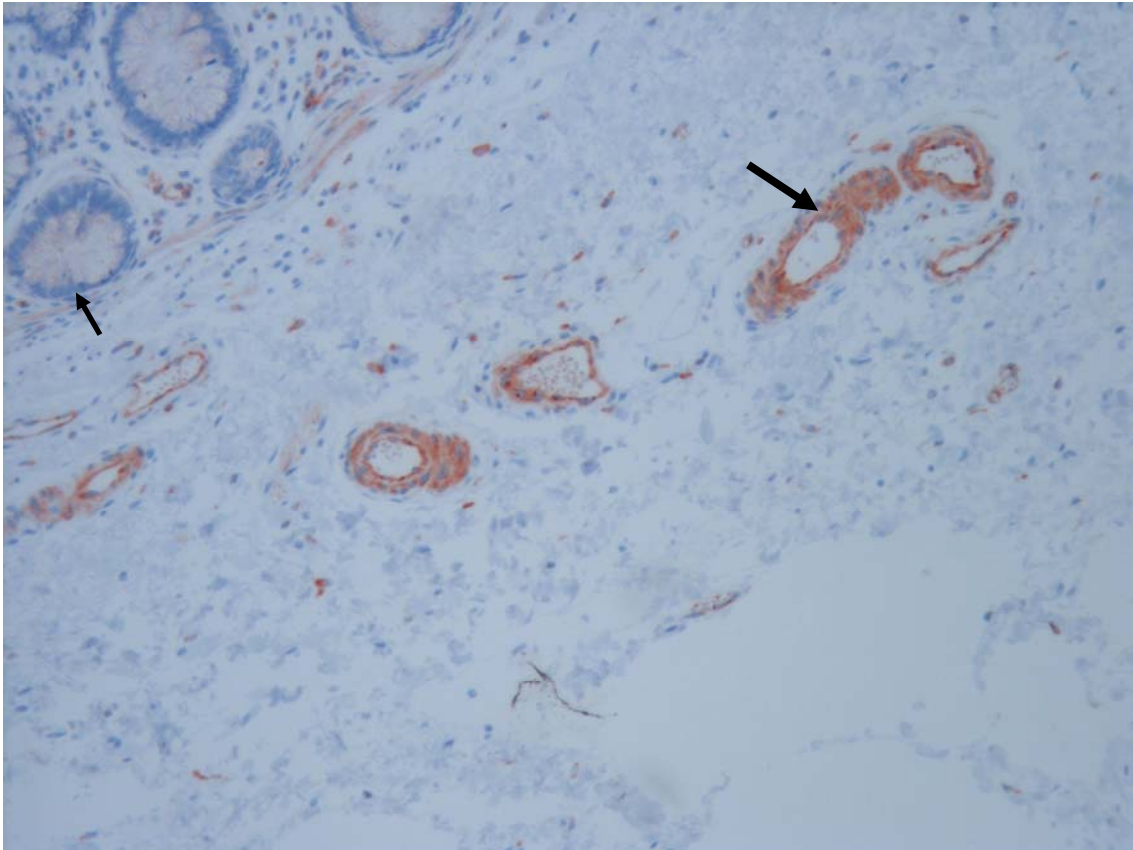


Abb. 15

Mittlere HIP 1 Expression im Endothel der Blutgefäße (++).

Die tangential angeschnittenen Drüsen der tumorösen Darmmukosa zeigen niedrige HIP 1 Expression im Zytoplasma (Immunhistochemie, 200x).

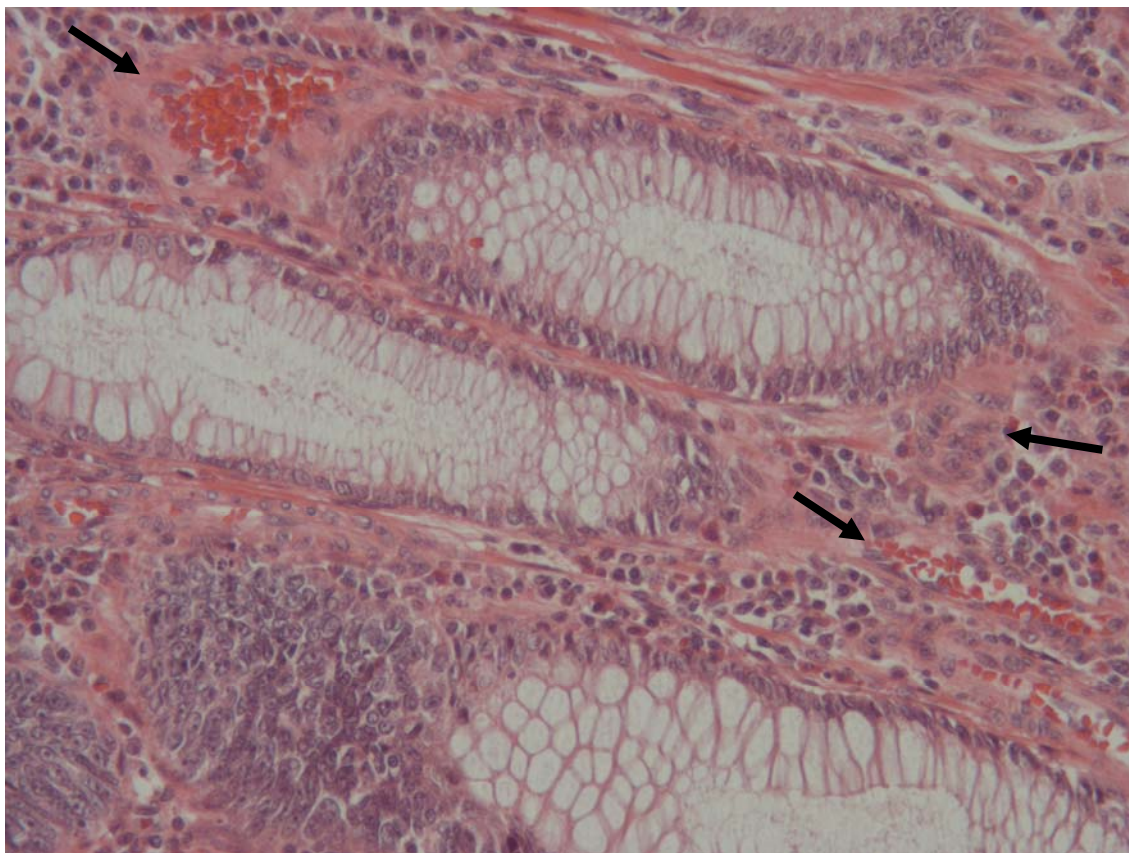


Abb.16

Darmmukosa mit deutlich sichtbaren, tangential angeschnittenen Drüsen sowie markierten randständigen Blutgefäßen (HE, 400x).

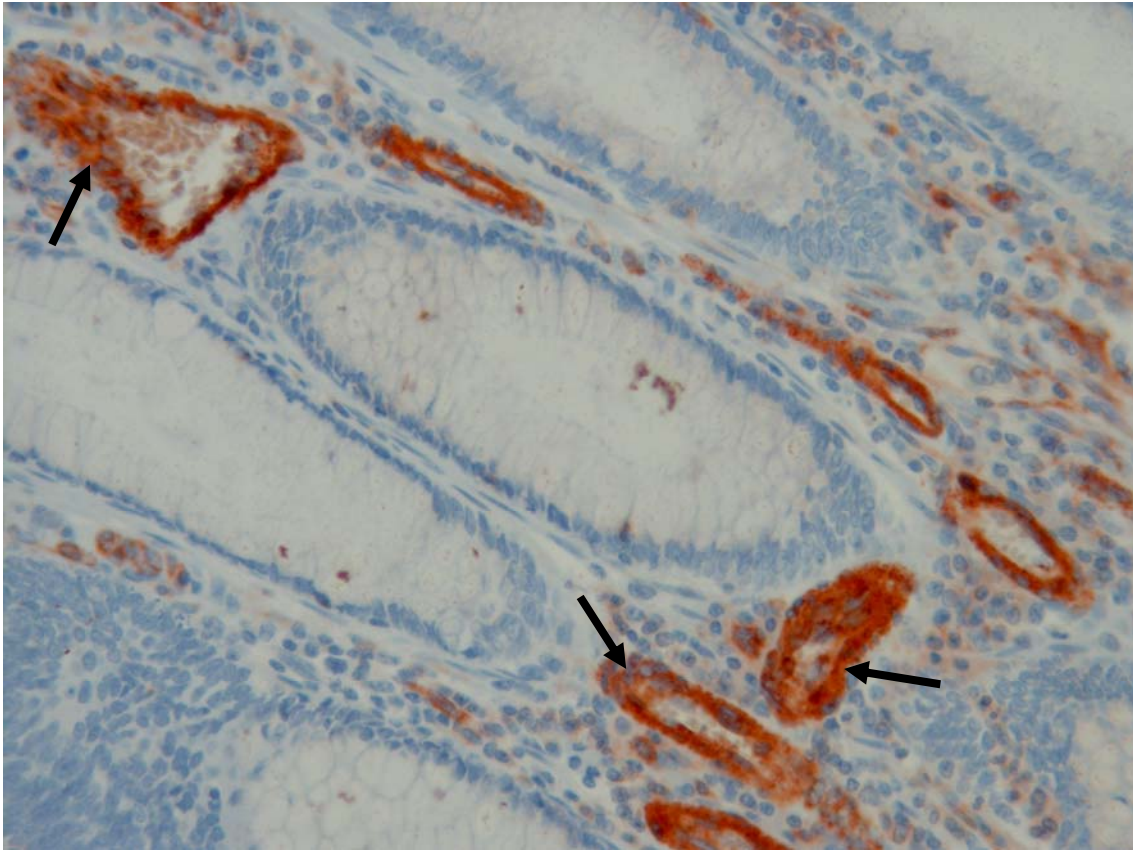


Abb.17

Hohe HIP 1 Expression im Endothel der Blutgefäße (+++).

In den Drüsen der dargestellten Darmmukosa zeigt sich, bis auf einige zu vernachlässigende Artefakte keine Färbung (Immunhistochemie, 400x).

Exemplarische Darstellung der Expressionsbereiche des tumorösen Gewebes nach erfolgtem immunhistochemischem Verfahren.

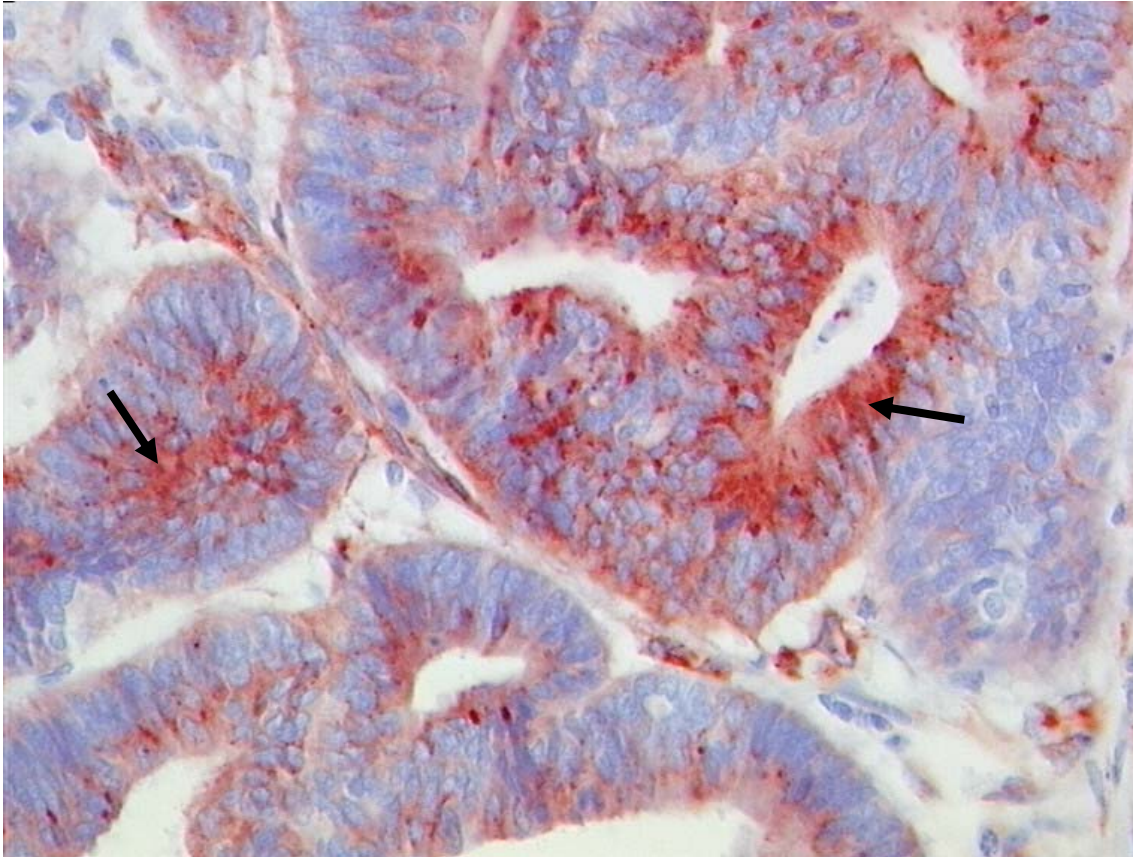


Abb. 18

Hohe HIP 1 Expression im Zytoplasma der Drüsen der tumorösen Darmmukosa (Immunhistochemie, 400x).

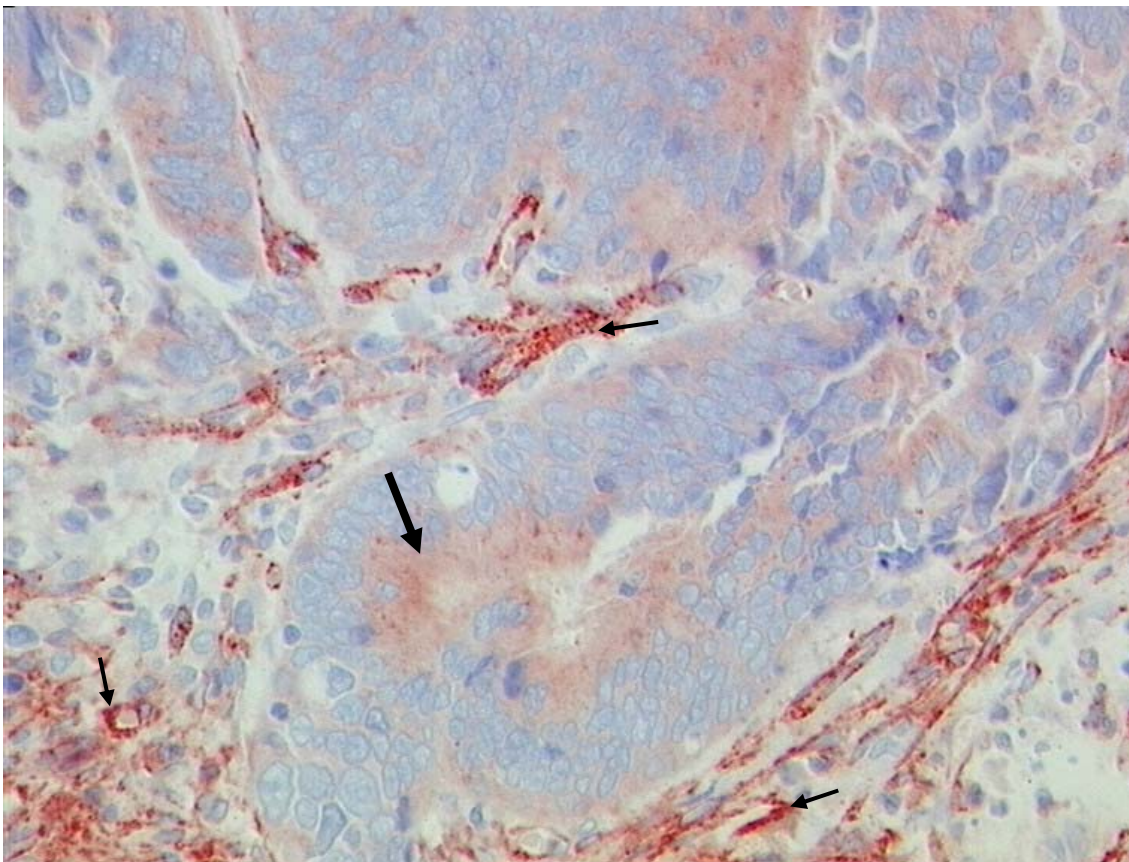


Abb. 19

Mittlere HIP 1 Expression im Zytoplasma der Drüsen der tumorösen Darmmukosa. Die die Darmmukosa umgebenden Blutgefäße zeigen hohe HIP 1 Expression im Endothel (Immunhistochemie, 400x).

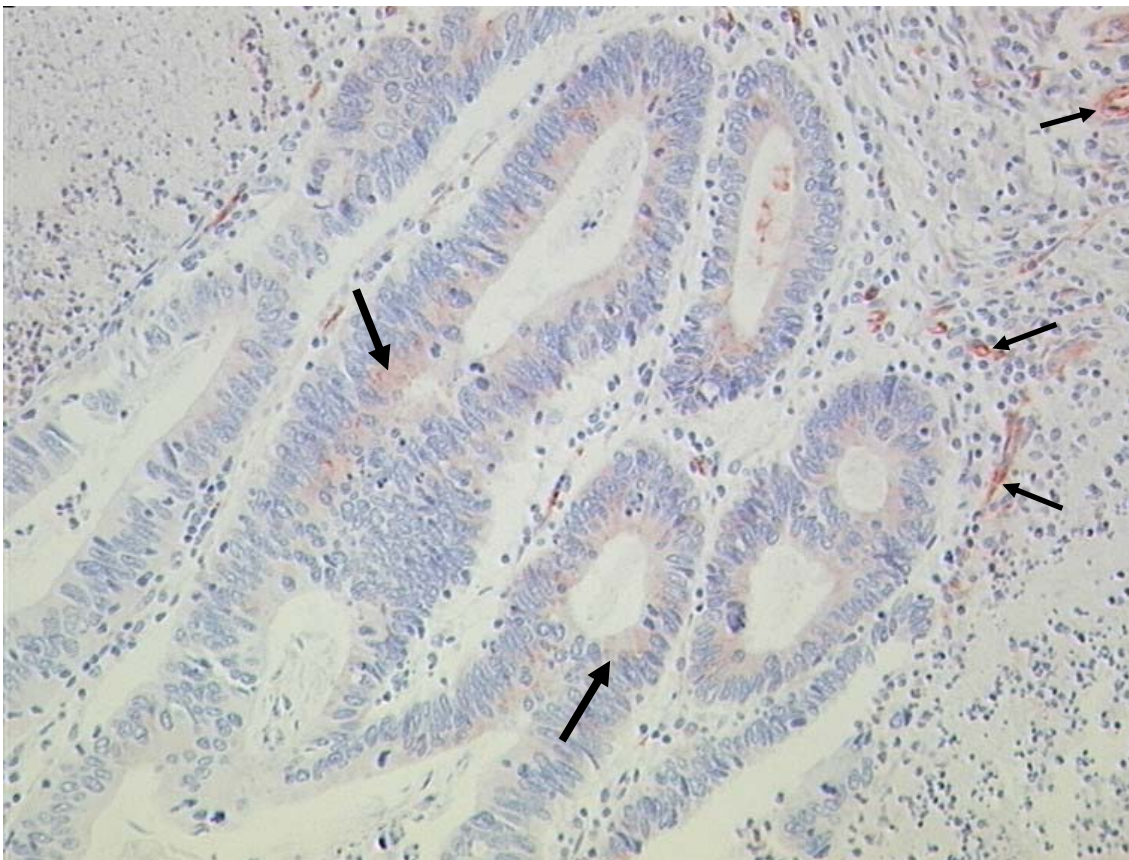


Abb. 20

Niedrige HIP 1 Expression im Zytoplasma der Drüsen der tumorösen Darmmukosa.
Rechts, Mitte oben: Vereinzelt angeschnittene Blutgefäße mit mittlerer HIP 1
Expression im Endothel (Immunhistochemie, 200x).

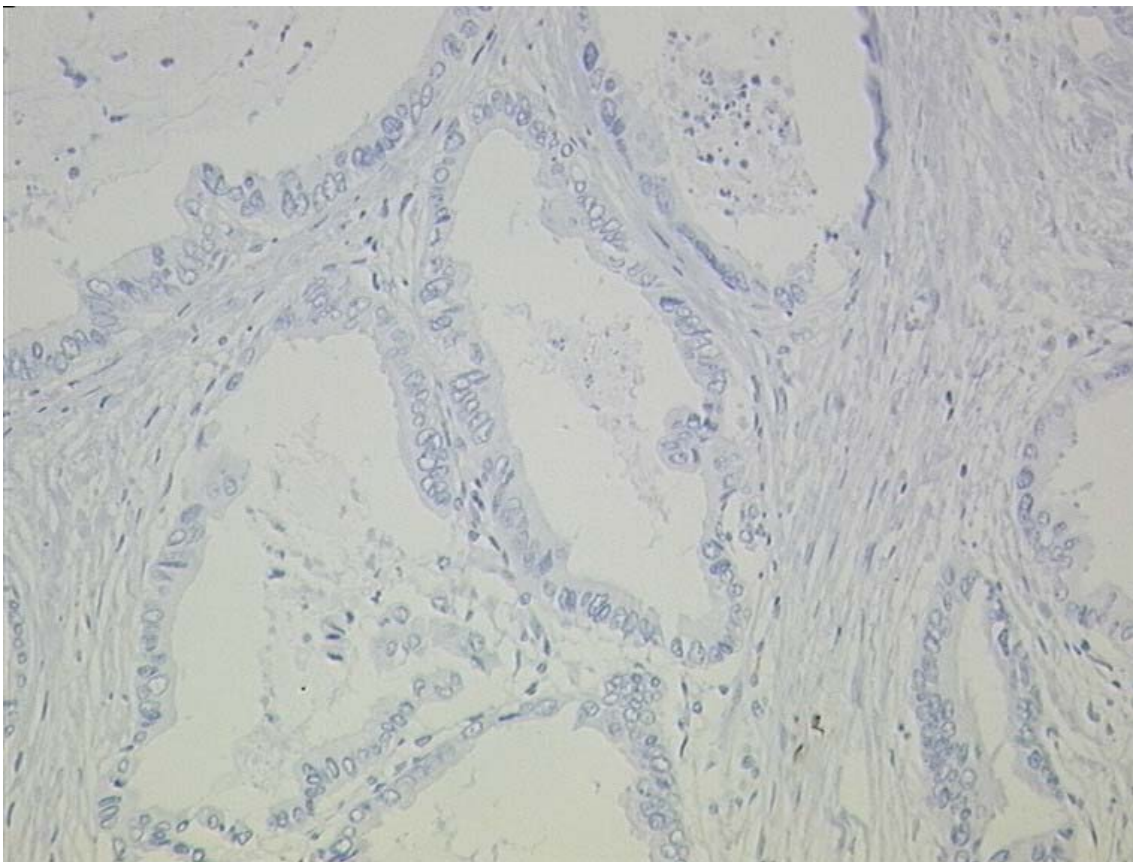


Abb. 21

Keine HIP 1 Expression im Zytoplasma der tumorösen Darmmukosa.

Score-Index 0 (Immunhistochemie, 200x).

3.4.1 Blutgefäße

Aufgrund des in Tab. 1 beschriebenen natürlichen Vorkommens von HIP 1 im Endothel der Blutgefäße konnte anhand der mikroskopisch darstellbaren Expression der Erfolg des immunhistochemischen Verfahrens sofort beurteilt werden. (Interne Positivkontrolle).

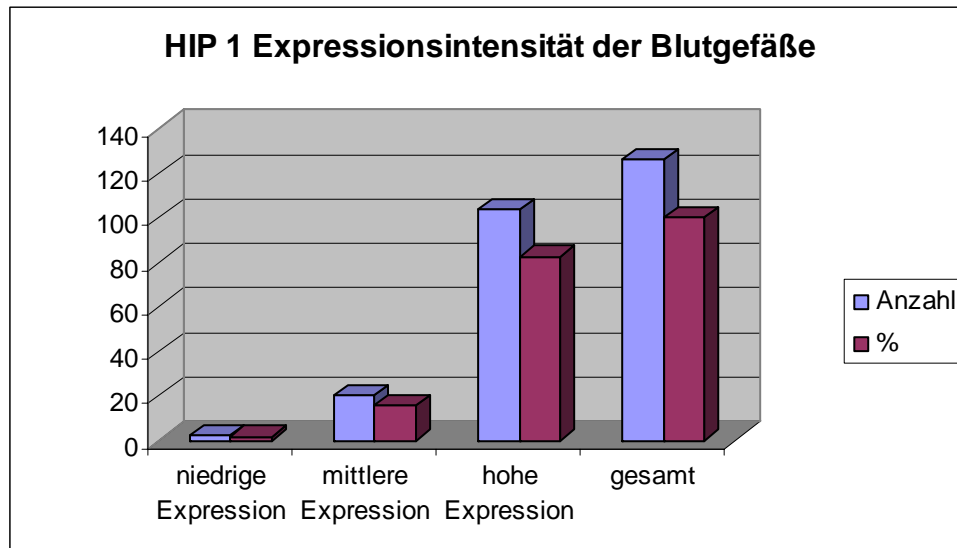
Tab. 10 beschreibt die Expressionsintensität der Blutgefäße bei tumorfreiem sowie tumorösem Gewebe (siehe ebenfalls Abb. 22).

Tab. 10: HIP 1 Expressionsintensität der Blutgefäße

	Metastasen				gesamt	
	nein		ja			
	N	%	N	%	N	%
Immunhistochemie Blutgefäße						
niedrige Expression	2	1.96	.	.	2	1.59
mittlere Expression	14	13.73	6	25.00	20	15.87
hohe Expression	86	84.31	18	75.00	104	82.54
gesamt	102	100.00	24	100.00	126	100.00

Tab. 10 zeigt bei 104 Probanden (82,54 %) eine hohe HIP 1 Expression im Endothel der Blutgefäße. 20 (15,87 %) weisen eine mittlere HIP 1 Expression und 2 (1,59 %) lediglich eine niedrige HIP 1 Expression auf.

Abb. 22: HIP 1 Expressionsintensität der Blutgefäße



Die erfasste HIP 1 Expressionsintensität der Blutgefäße dient als Grundlage des entwickelten Score-Index zur Klassifizierung des kompletten histopathologischen Schnittes (siehe Abb. 5 und 12-21).

3.4.2 Tumorgewebe

Tab. 11 sowie Abb. 23 zeigen, dass von 9 Probanden mit Score-Index 0, 6 keine und 3 eine Metastasierung aufweisen.

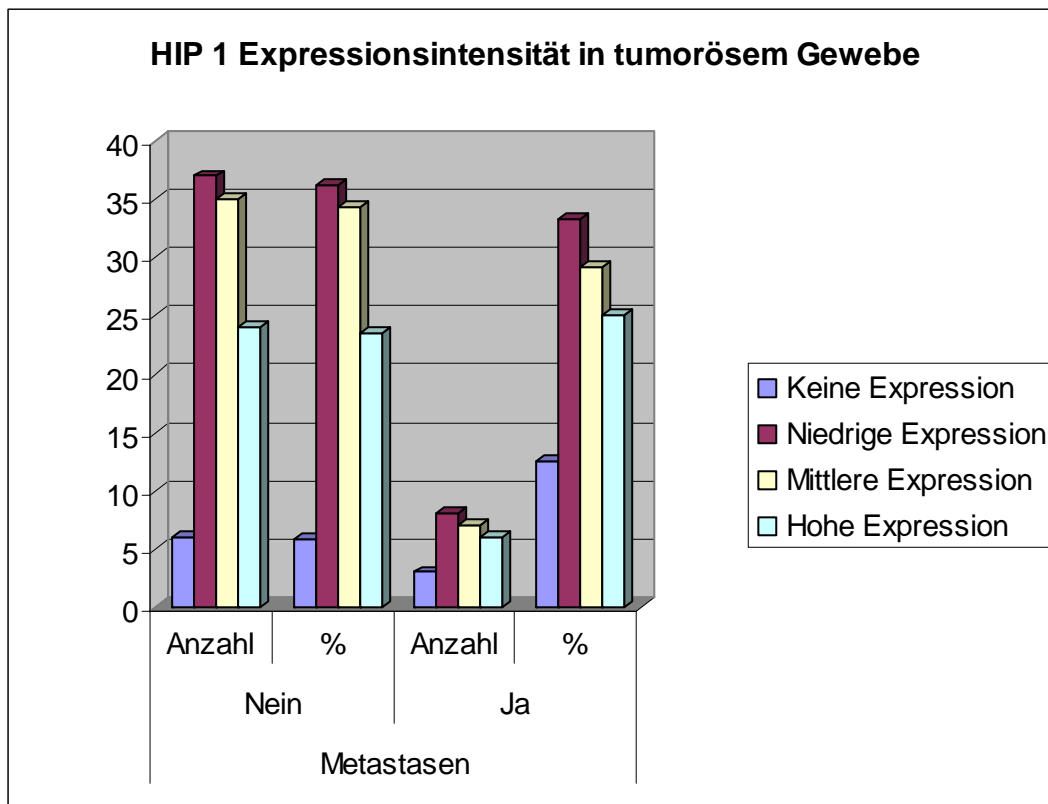
Im Bereich der niedrigen HIP 1 Expression mit 45 Probanden, weisen 37 keine und 8 eine Metastasierung auf.

Der mittlere Bereich umfasst 42 Probanden, von denen 35 keine und 7 eine Streuung aufweisen. Bei der hohen HIP 1 Expression mit 30 Patienten weisen 24 keine und 6 eine Fernmetastasierung auf.

Tab. 11: HIP 1 Expressionsintensität in tumorösem Gewebe

	Metastasen				gesamt	
	nein		ja			
	N	%	N	%	N	%
immunhistochem. Präzipitation Tumorgewebe						
keine Expression	6	5.89	3	12.50	9	7.15
niedrige Expression	37	36.27	8	33.33	45	35.71
mittlere Expression	35	34.31	7	29.17	42	33.33
hohe Expression	24	23.53	6	25.00	30	23.81
gesamt	102	100.00	24	100.00	126	100.00

Abb. 23: HIP 1 Expressionsintensität in tumorösem Gewebe

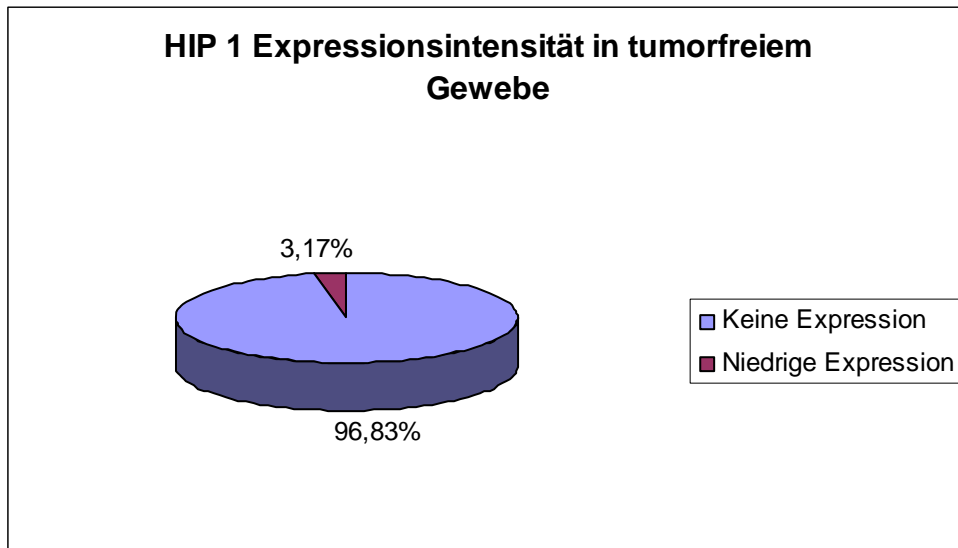


3.4.3 HIP 1 Expressionsintensität in tumorfreiem Gewebe

Abb. 24 zeigt, dass bei 122 der 126 Probanden (96,8 %) keine HIP 1 Expression nachweisbar ist.

Bei insgesamt 4 Probanden war eine niedrige HIP 1 Expression im tumorfreien Gewebe nachweisbar.

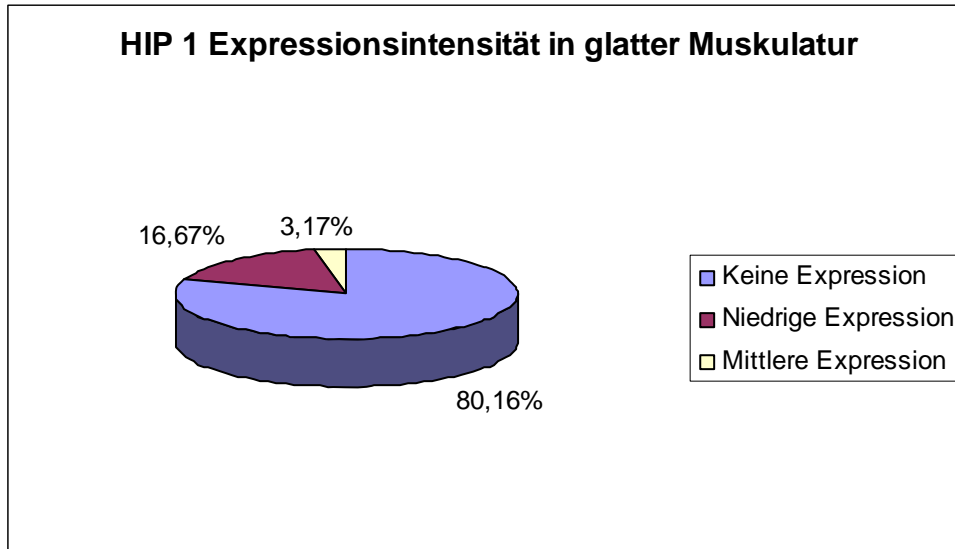
Abb. 24: HIP 1 Expressionsintensität in tumorfreiem Gewebe



3.4.4 HIP 1 Expressionsintensität in glatter Muskulatur

Abb. 25 zeigt bei 101 Probanden (80,16 %) keine HIP 1 Expression. Der Bereich der niedrigen HIP 1 Expression umfasst 21 Patienten (16,67%), die mittlere HIP 1 Expression 1 Probanden (3,17 %).

Abb. 25: HIP 1 Expressionsintensität in glatter Muskulatur



3.5 Rezidive/Metastasen

In der Studie wurden nicht nur der Zeitpunkt der Erstdiagnose und der damit zu diesem Zeitpunkt vorhandene Metastasierungsgrad als endgültig festgehalten, sondern auch das Auftreten von Rezidiven und weiteren Metastasen in einem Zeitraum von mindestens 5 Jahren betrachtet. Das Augenmerk wurde dabei auf die Entwicklung der Tumorerkrankung (Rezidive/Metastasen) und die damit verbundene eventuelle Veränderung der HIP 1 Expression in den Geweben und die dadurch vermutete Zunahme der Aggressivität und auch Letalität der Tumorerkrankung gelegt.

Tab. 12 und 13 zeigen die Verteilung der Entstehung von weiteren Metastasen und/oder Rezidiven der 126 Probanden innerhalb des Betrachtungszeitraums.

Der Zeitpunkt des Auftretens von Rezidiven/Metastasen und die damit verbundene Überlebenszeit oder Mortalität werden in Kapitel 4.2 ff. betrachtet (graphische Darstellung Abb. 26 und 27).

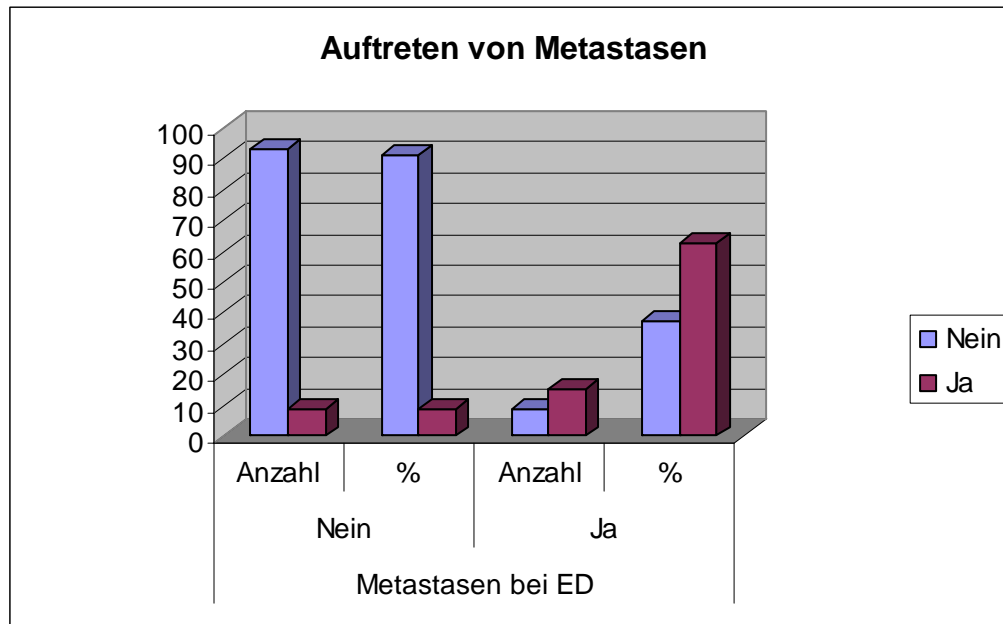
Tab. 12: Auftreten von Metastasen

	Metastasen				gesamt	
	nein		ja			
	N	%	N	%	N	%
Folgemetastase (n)						
nein	93	91.18	9	37.50	102	80.95
ja	9	8.82	15	62.50	24	19.05
gesamt	102	100.00	24	100.00	126	100.00

Tab. 12 zeigt keine weitere Metastasierung bei insgesamt 102 der 126 Probanden, von denen bereits zum Zeitpunkt der Erstdiagnose 93 keine, bei 9 mindestens eine Metastase nachgewiesen wurde.

Bei 24 Probanden mit weiterer Metastasierung lagen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bei 9 keine und bei 15 mindestens eine Metastase in einem entfernten Organ vor (siehe Abb. 26).

Abb. 26: Auftreten von Metastasen



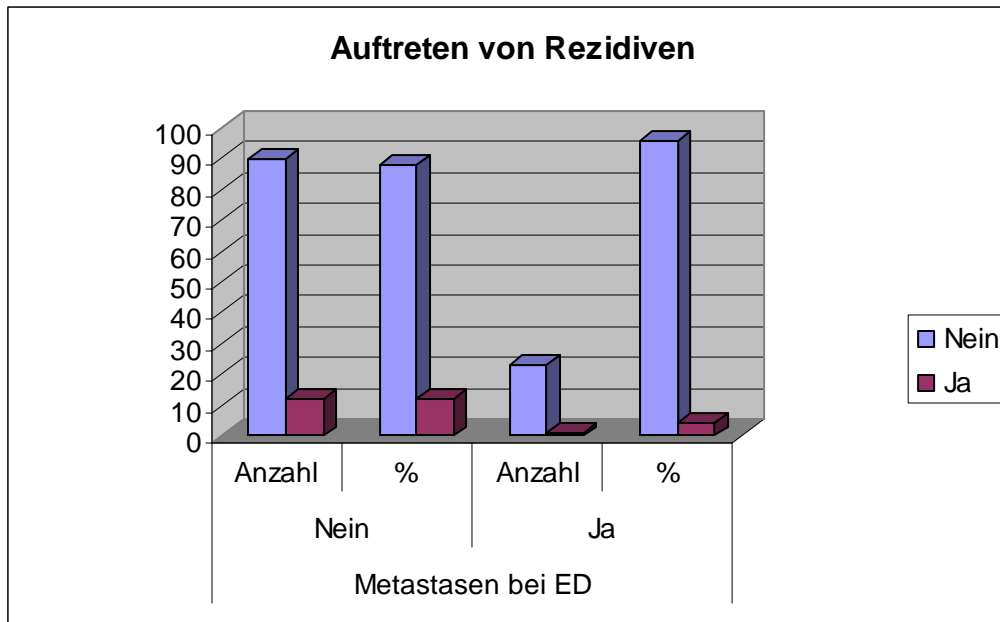
Tab. 13 zeigt, dass bei 113 der 126 Probanden kein Rezidiv entstanden war. In dieser Gruppe zeigte sich bereits zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bei 23 Probanden eine Metastasierung. 90 wiesen keine auf.

Bei 13 Probanden, von denen 12 zum Zeitpunkt der Erstdiagnose keine und lediglich einer eine Metastase aufwies, bildete sich ein Tumorrezidiv (siehe Abb. 27).

Tab. 13: Auftreten von Rezidiven

	Metastasen				gesamt	
	nein		ja			
	N	%	N	%	N	%
Rezidiv (e)						
nein	90	88.24	23	95.83	113	89.68
ja	12	11.76	1	4.17	13	10.32
gesamt	102	100.00	24	100.00	126	100.00

Abb. 27: Auftreten von Rezidiven



3.6 Status der letzten Nachuntersuchung:

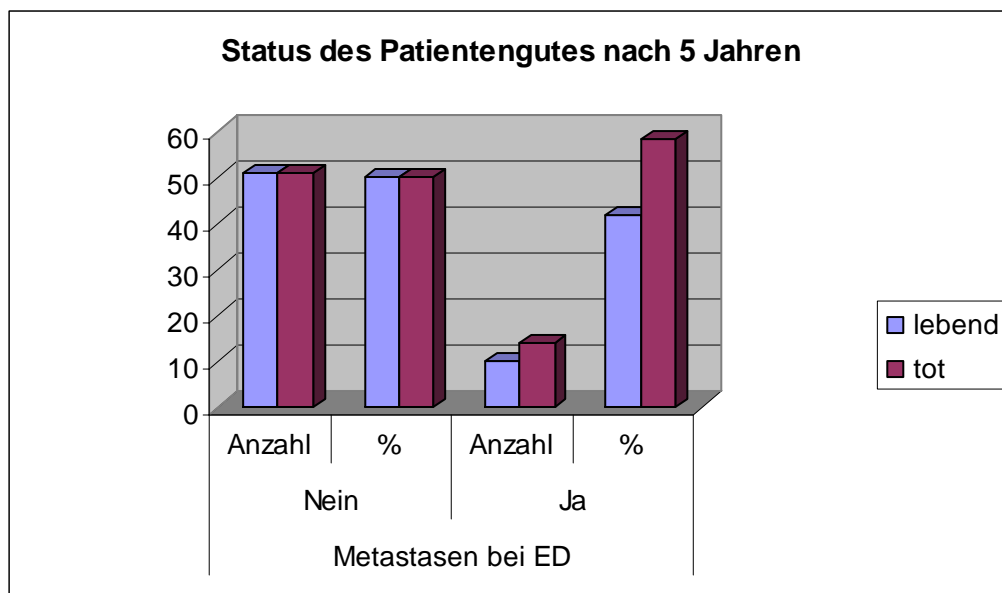
Der Beobachtungszeitraum der 126 untersuchten Fälle erstreckt sich über mind. 5 Jahre. Ein sehr wichtiges Kriterium in der Beurteilung der Tumorbiologie ist, den Status Tod/Leben des Probanden zu kennen und mit den Daten seines Tumorleidens zu korrelieren.

Tab. 14: Status des Patientengutes nach 5 Jahren

	Metastasen				gesamt	
	nein		ja			
	N	%	N	%	N	%
Status						
lebt	51	50.00	10	41.67	61	48.41
tot	51	50.00	14	58.33	65	51.59
gesamt	102	100.00	24	100.00	126	100.00

Tab. 14 zeigt, dass 65 der 126 Patienten zum Zeitpunkt der Auswertung bereits verstorben sind, dies entspricht 51,59 %. 61 Probanden (48,41 %) sind noch am Leben. Von 65 Verstorbenen wiesen 14 zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits eine Streuung in ein entlegenes Organsystem auf. Von 61 heute noch lebenden zeigten 10 Probanden bei der Erstdiagnose eine Fernmetastasierung (siehe Abb. 28).

Abb. 28: Status des Patientengutes nach 5 Jahren



4 Auswertung der Daten

4.1 Zusammenhang zwischen HIP 1 Expression im Tumorgewebe und T-, N- und M-Stadium.

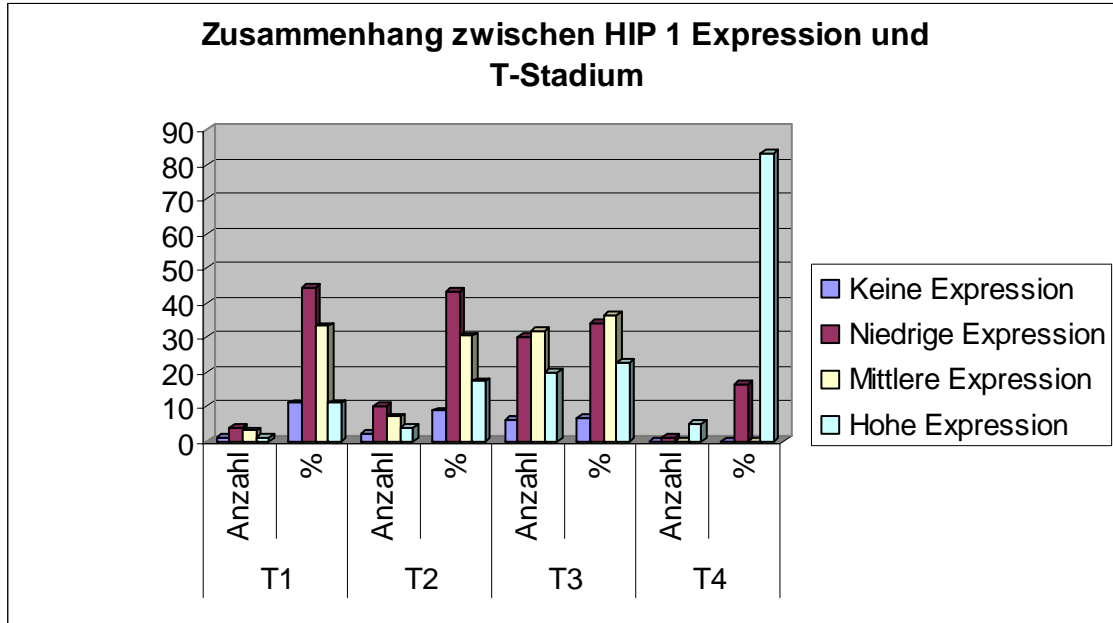
4.1.1 Zusammenhang zwischen HIP 1 Expression und T-Stadium

Die unterschiedlichen Tumorstadien werden anhand der schon zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bestehenden Metastasierung auf dem Hintergrund der HIP 1 Expression und der damit vermeintlich verbundenen höheren Aggressivität beurteilt. Es zeigt sich in Tab. 15, kein Zusammenhang zwischen der HIP 1 Expression und dem T-Stadium (siehe ebenfalls Abb. 29).

Tab. 15: Zusammenhang zwischen HIP 1 Expression und T-Stadium

	T-Stadium								gesamt	
	T1		T2		T3		T4			
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
HIP 1 Expression im Tumorgewebe										
keine Expression	1	11.12	2	8.70	6	6.82	.	.	9	7.15
niedrige Expression	4	44.44	10	43.48	30	34.09	1	16.67	45	35.71
mittlere Expression	3	33.33	7	30.43	32	36.36	.	.	42	33.33
hohe Expression	1	11.11	4	17.39	20	22.73	5	83.33	30	23.81
gesamt	9	100.00	23	100.00	88	100.00	6	100.00	126	100.00

Abb. 29: Zusammenhang zwischen HIP 1 Expression und T-Stadium



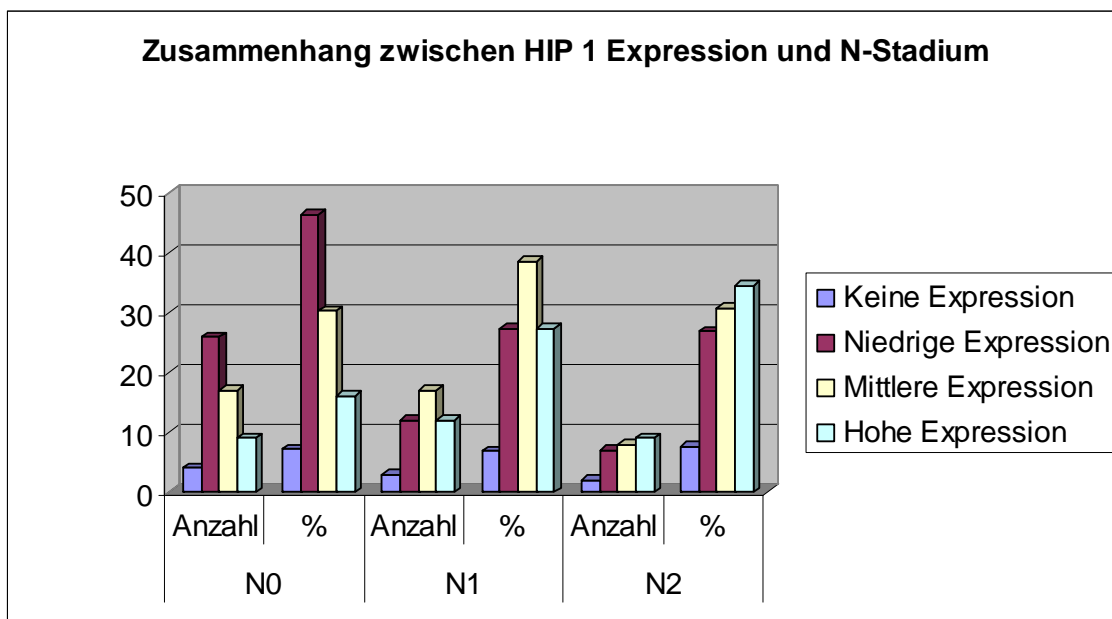
4.1.2 Zusammenhang zwischen HIP 1 Expression und N-Stadium

Tab. 16 zeigt, dass es trotz des unterschiedlich ausgeprägten Befalls der regionären Lymphknoten und der in Tab. 17 beschriebenen Metastasierung zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und/oder späteren Verlaufsdiagnose keinen Zusammenhang zwischen HIP 1 Expression und N- und M-Stadium gibt (siehe auch Abb. 30 und 31).

Tab. 16: Zusammenhang zwischen HIP 1 Expression und N-Stadium

HIP 1 Expression im Tumorgewebe	N-Stadium						gesamt	
	N0		N1		N2			
	N	%	N	%	N	%	N	%
keine Expression	4	7.14	3	6.82	2	7.69	9	7.14
niedrige Expression	26	46.43	12	27.27	7	26.92	45	35.71
mittlere Expression	17	30.36	17	38.64	8	30.77	42	33.33
hohe Expression	9	16.07	12	27.27	9	34.62	30	23.81
gesamt	56	100.00	44	100.00	26	100.00	126	100.00

Abb. 30: Zusammenhang zwischen HIP 1 Expression und N-Stadium

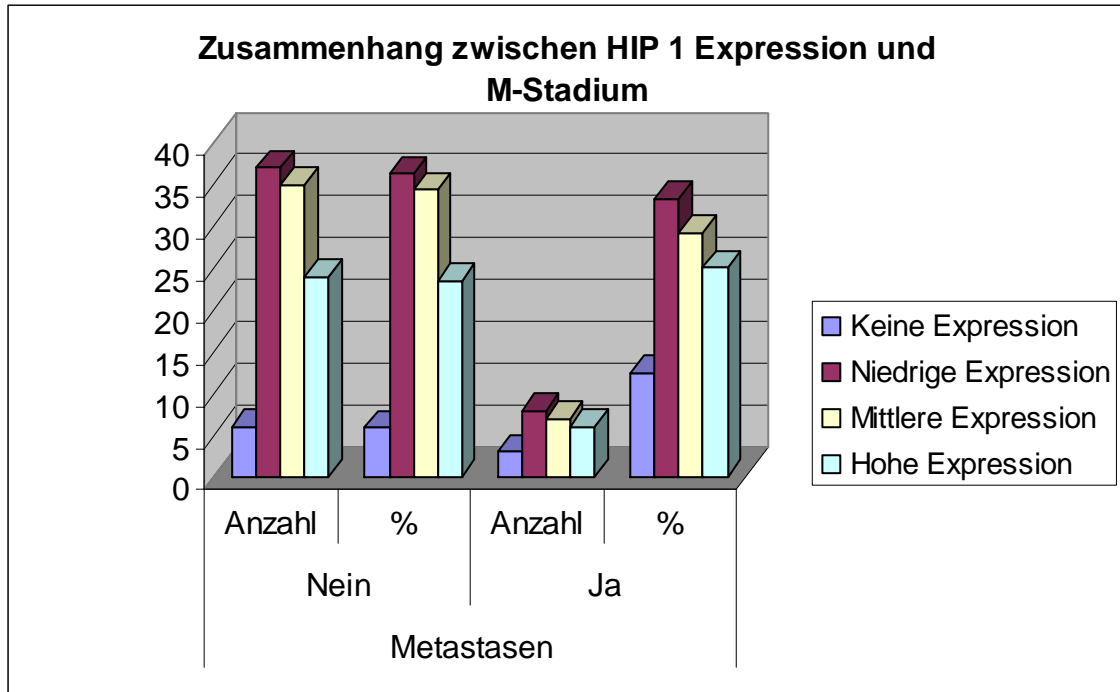


4.1.3 Zusammenhang zwischen HIP 1 Expression und M-Stadium

Tab. 17: Zusammenhang zwischen HIP 1 Expression und M-Stadium

	Metastasen				gesamt	
	nein		ja			
	N	%	N	%	N	%
HIP 1 Expression im Tumorgewebe						
keine Expression	6	5.89	3	12.50	9	7.14
niedrige Expression	37	36.27	8	33.33	45	35.71
mittlere Expression	35	34.31	7	29.17	42	33.33
hohe Expression	24	23.53	6	25.00	30	23.81
gesamt	102	100.00	24	100.00	126	100.00

Abb. 31: Zusammenhang zwischen HIP 1 Expression und M-Stadium



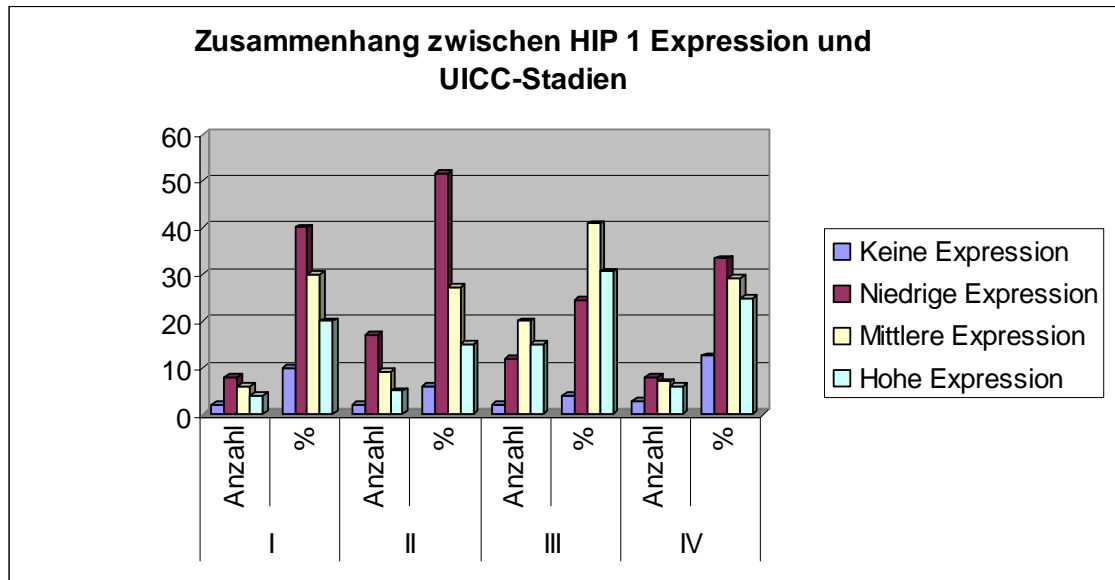
4.1.4 Zusammenhang zwischen HIP 1 Expression und UICC-Stadien

Tab. 18 zeigt die Berechnung der einzelnen UICC-Stadien des Patientenkollektives, um mögliche Zusammenhänge zwischen der HIP 1 Expression und eventuell einem oder mehrerer UICC-Stadien beurteilen zu können. Es lässt sich kein aussagekräftiger Zusammenhang darstellen (siehe Abb. 32).

Tab. 18: Zusammenhang zwischen HIP 1 Expression und UICC-Stadien

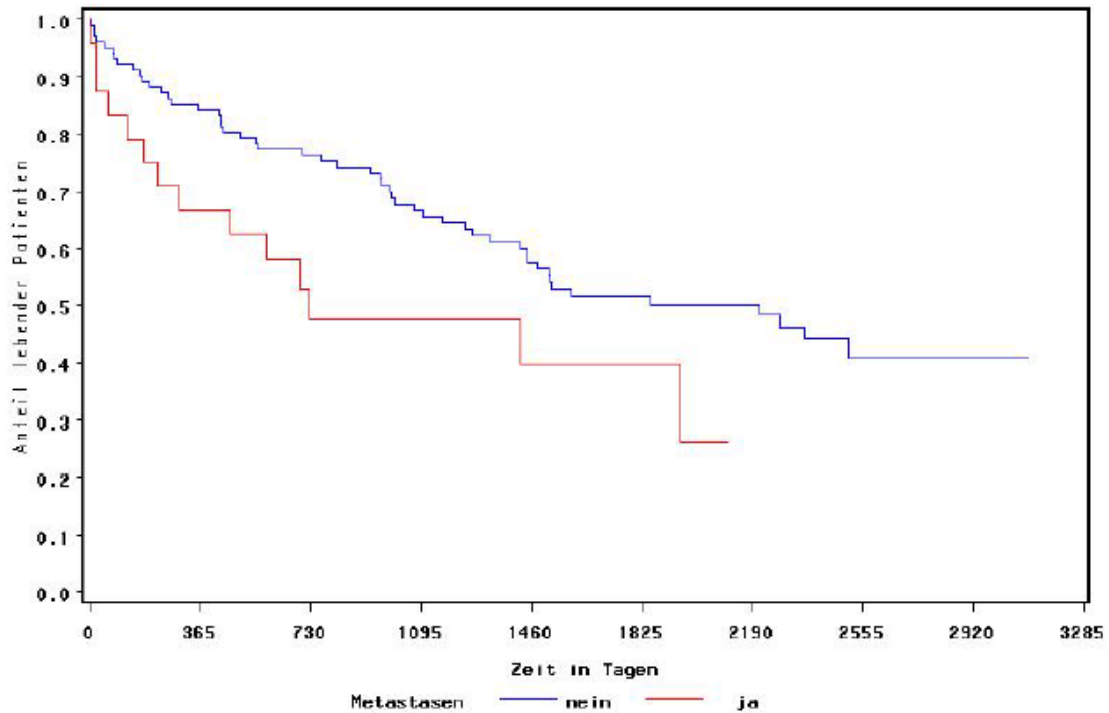
	UICC-Stadium								gesamt	
	I		II		III		IV			
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
HIP 1 Expression im Tumorgewebe										
keine Expression	2	10.00	2	6.06	2	4.08	3	12.50	9	7.14
niedrige Expression	8	40.00	17	51.52	12	24.49	8	33.33	45	35.71
mittlere Expression	6	30.00	9	27.27	20	40.82	7	29.17	42	33.33
hohe Expression	4	20.00	5	15.15	15	30.61	6	25.00	30	23.81
gesamt	20	100.00	33	100.00	49	100.00	24	100.00	126	100.00

Abb. 32: Zusammenhang zwischen HIP 1 Expression und UICC-Stadien



4.2 Beurteilung der Überlebenszeit

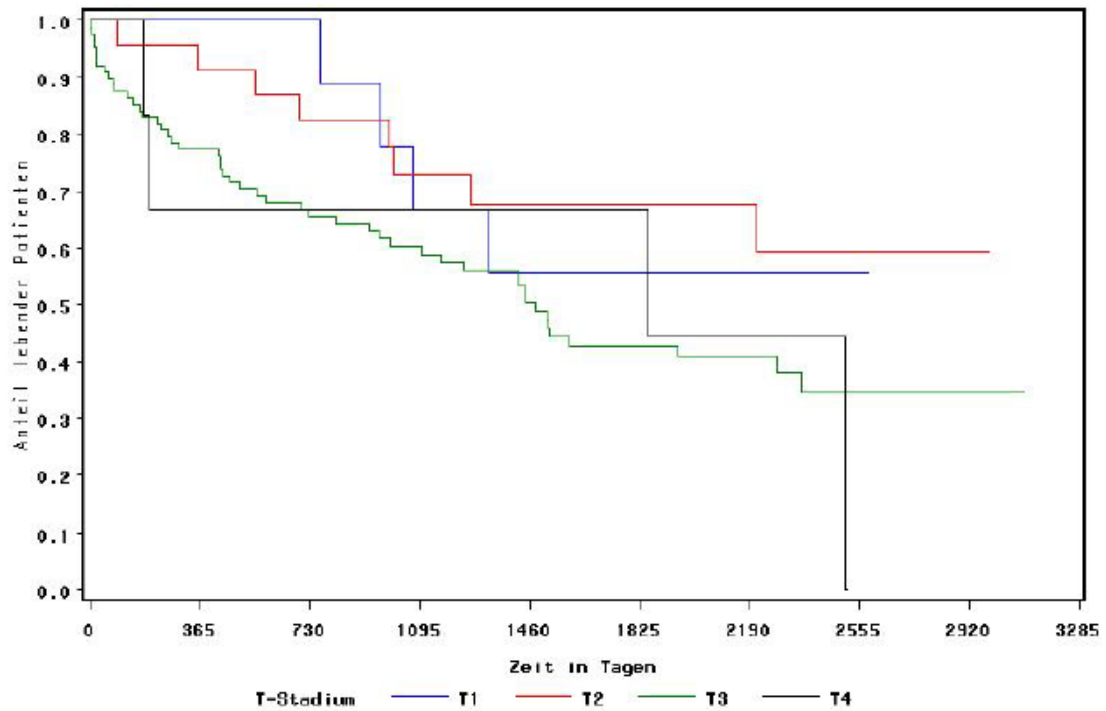
4.2.1 Einfluss des Metastasierungsgrades bei Erstdiagnose auf die Überlebenszeit



Graphik 1: Einfluss des Metastasierungsgrades bei Erstdiagnose auf die Überlebenszeit

Interpretation: Patienten mit Metastasen bei Erstdiagnose haben zu jedem Zeitpunkt ein 1,9-fach höheres Risiko zu versterben als Patienten ohne Metastasen bei Erstdiagnose. Bester Schätzer für den Hazard-Quotient (= risk ratio) ist 1,9. Mit 95%-iger Sicherheit liegt der wahre Schätzer für den Hazard-Quotient in der Grundgesamtheit zwischen 1,0 (kein Unterschied zwischen beiden Gruppen) und 3,4 (3,4-fach erhöhtes Risiko der Patienten mit Metastasen bei Erstdiagnose zu jedem Zeitpunkt zu versterben gegenüber Patienten ohne Metastasen bei Erstdiagnose).

4.2.2 Einfluss des T-Stadiums bei Erstdiagnose auf die Überlebenszeit



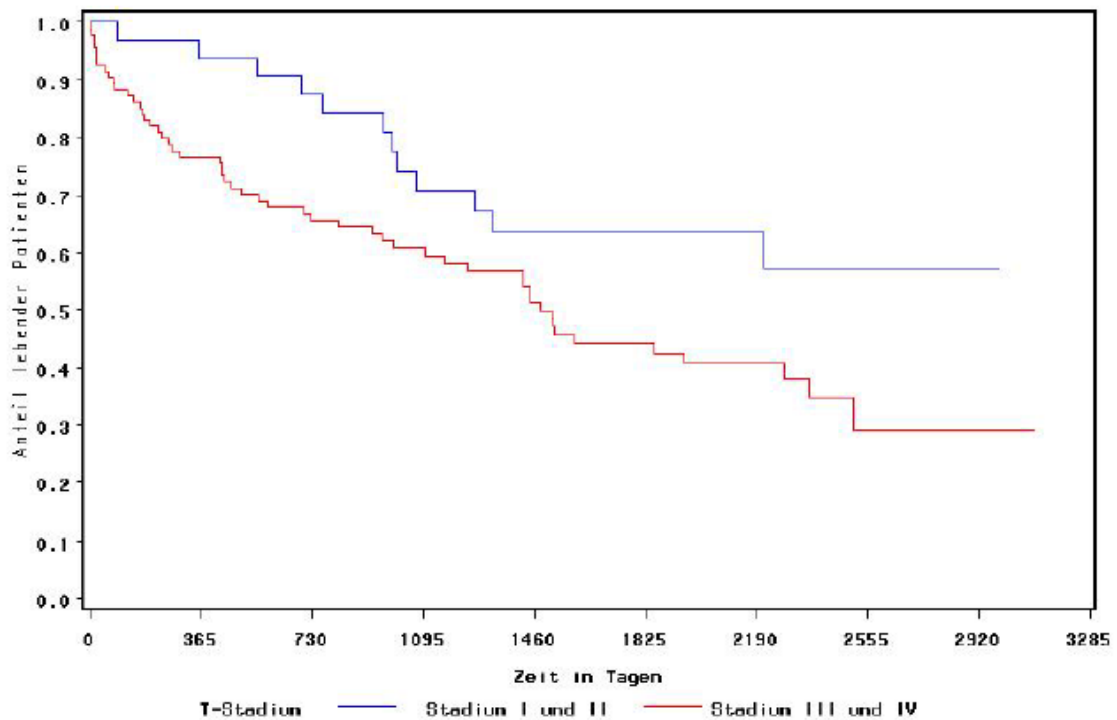
Graphik 2: Einfluss des T-Stadiums bei Erstdiagnose auf die Überlebenszeit

Interpretation: Auswertung nicht aussagekräftig, da Ausprägung T-Stadium = 4 bei weniger als 5% der Patienten auftritt und kein Proportional Hazard vorliegt (Kurvenkreuzung).

Daher erneute Auswertung mit Zusammenfassung der Stadien T1 und T2 sowie T3 und T4.

Keine Cox-Regression möglich, da die Proportional Hazard-Bedingung nicht erfüllt ist.

4.2.3 Einfluss der zusammengefassten T-Stadien bei Erstdiagnose (T1 und T2 versus T3 und T4) auf die Überlebenszeit

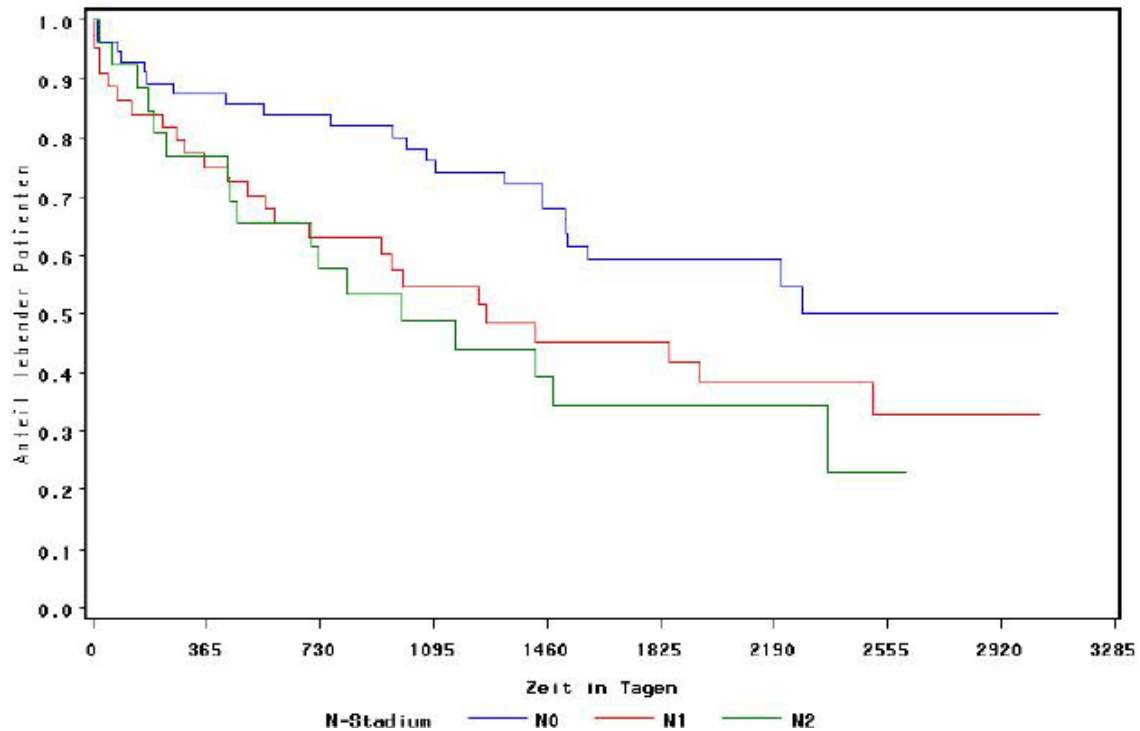


Graphik 3: Einfluss der zusammengefassten T-Stadien bei Erstdiagnose (T1 und T2 versus T3 und T4) auf die Überlebenszeit

Interpretation: Patienten mit T-Stadium III oder IV bei Erstdiagnose haben zu jedem Zeitpunkt ein 2-fach höheres Risiko zu versterben als Patienten mit T-Stadium I und II bei Erstdiagnose.

Bester Schätzer für den Hazard-Quotient (= risk ratio) ist 2,0. Mit 95%-iger Sicherheit liegt der wahre Schätzer für den Hazard-Quotient in der Grundgesamtheit zwischen 1,1 (praktisch kein Unterschied zwischen beiden Gruppen) und 3,7 (3,7-fach erhöhtes Risiko der Patienten mit T-Stadium III und IV bei Erstdiagnose zu jedem Zeitpunkt zu versterben gegenüber Patienten mit T-Stadium I und II bei Erstdiagnose).

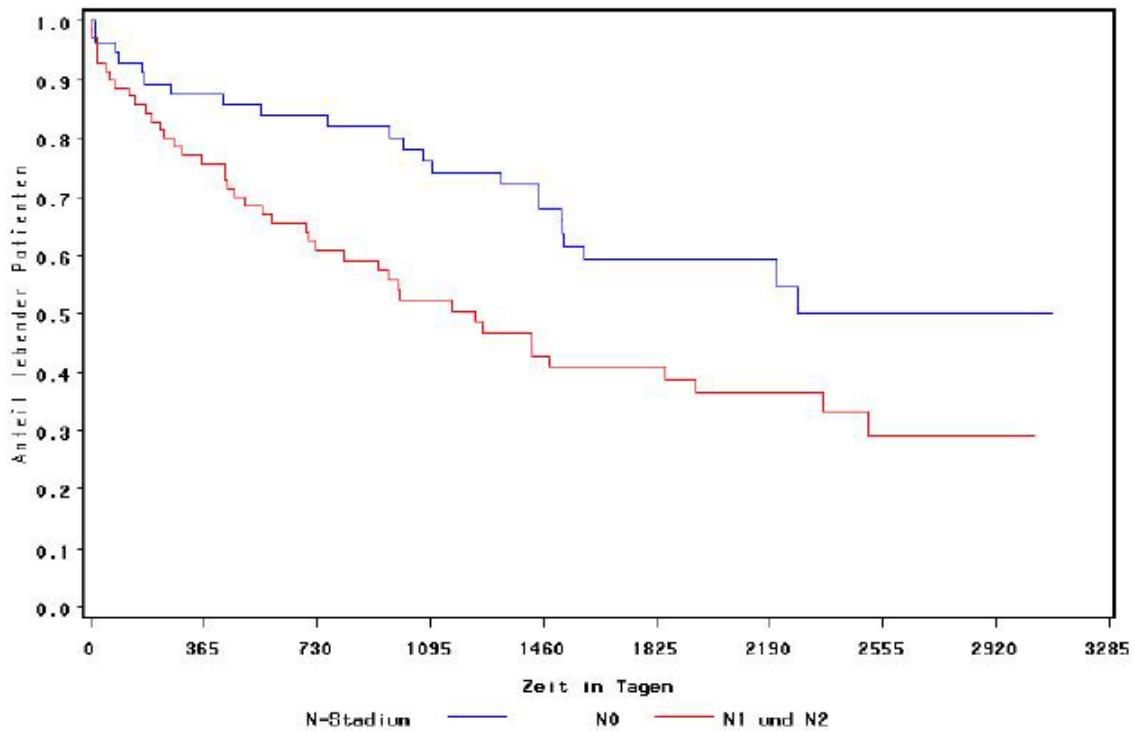
4.2.4 Einfluss des N-Stadiums bei Erstdiagnose auf die Überlebenszeit



Graphik 4: Einfluss des N-Stadiums bei Erstdiagnose auf die Überlebenszeit

Interpretation: Ergebnis nicht aussagekräftig, da kein Proportional Hazard vorliegt (Kurvenkreuzung). Daher auch keine Cox-Regression möglich.

4.2.5 Einfluss der zusammengefassten N-Stadien bei Erstdiagnose (N0 versus N1 und N2) auf die Überlebenszeit

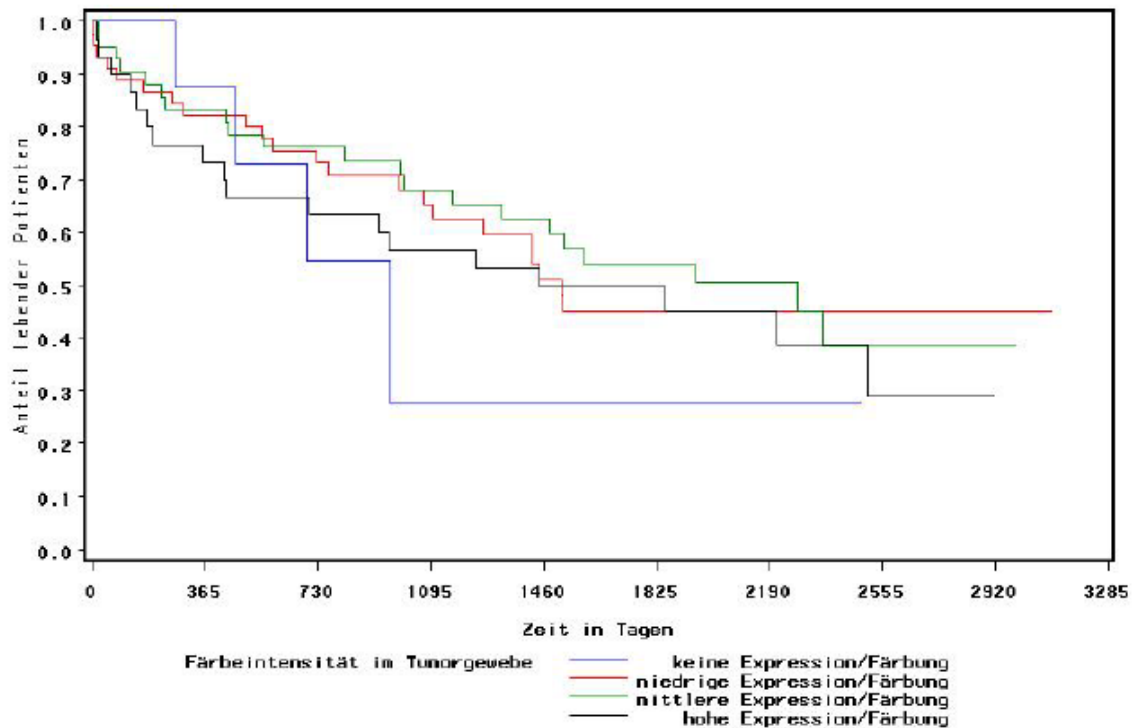


Graphik 5: Einfluss der zusammengefassten N-Stadien bei Erstdiagnose (N0 versus N1 und N2) auf die Überlebenszeit

Interpretation: Patienten mit N-Stadium 1 oder 2 bei Erstdiagnose haben zu jedem Zeitpunkt ein 2-fach höheres Risiko zu versterben als Patienten mit N-Stadium 0 bei Erstdiagnose.

Bester Schätzer für den Hazard-Quotient (= risk ratio) ist 2,0. Mit 95%-iger Sicherheit liegt der wahre Schätzer für den Hazard-Quotient in der Grundgesamtheit zwischen 1,2 (praktisch kein Unterschied zwischen beiden Gruppen) und 3,2 (3,2-fach erhöhtes Risiko der Patienten mit N-Stadium 1 und 2 bei Erstdiagnose zu jedem Zeitpunkt zu versterben gegenüber Patienten mit N-Stadium 0 bei Erstdiagnose).

4.2.6 Einfluss der HIP 1 Expressionsintensität des Tumorgewebes auf die Überlebenszeit



Graphik 6: Einfluss der HIP 1 Expressionsintensität des Tumorgewebes auf die Überlebenszeit

Interpretation: Ergebnis nicht aussagekräftig, da kein Proportional Hazard vorliegt (Kurvenkreuzung). Daher auch keine Cox-Regression möglich.

Da die Kurven einander alle kreuzen ist keine Zusammenfassung zu größeren Gruppen wie bei T-Stadium und N-Stadium möglich.

4.2.7 Multivariate Auswertung der T-, N- und M-Stadien bei Erstdiagnose auf die Überlebenszeit

Analyse Maximum-Likelihood-Schätzer

Variable	Freiheits- grade	Parameter- schätzer	Standard- fehler	Chi-Quadrat	Pr >	Hazard- Quotient	95% Hazard-Quotient Konfidenzgrenzen	
T1	1	0.52427	0.32955	2.5309	0.1116	1.689	0.885	3.223
N1	1	0.49706	0.27365	3.2993	0.0693	1.644	0.961	2.811
M1	1	0.38495	0.31908	1.4555	0.2277	1.470	0.786	2.746

Abb. 33: Analyse Maximum-Likelihood-Schätzer

Die Variablen T1 (T-Stadium) und N1 (N-Stadium) wurden in der zusammengefaßten Form in das Modell eingebracht (T1 und T2 versus T3 und T4 sowie N0 versus N1 und N2), da bezüglich der ursprünglichen Einteilung in 4 bzw. 3 verschiedene Ausprägungen die Proportional Hazard Bedingung nicht erfüllt ist.

Interpretation: Patienten mit T-Stadium T3 und T4 haben ein 1,7-fach größeres Risiko zu versterben als Patienten mit T-Stadium T1 und T2 (95%-Konfidenzintervall 0,9 bis 3,2, $p=0,11$).

Patienten mit N-Stadium N1 und N2 haben ein 1,6-fach größeres Risiko zu versterben als Patienten mit N-Stadium N0 (95%-Konfidenzintervall 1,0 bis 2,8, $p=0,07$).

Patienten mit M-Stadium M1 haben ein 1,5-fach größeres Risiko zu versterben als Patienten mit M-Stadium M0 (95%-Konfidenzintervall 0,8 bis 2,7, $p=0,23$).

Jeweils bezogen auf diese Population und adjustiert für die jeweils anderen beiden Variablen.

5 Diskussion

5.1 Allgemeines

Nicht immer wird realisiert, dass eine zeitgemäße klinische Onkologie eine exakte standardisierte Tumorklassifikation erfordert. Dies begründet sich zunächst im Streben der modernen Onkologie nach einem differenziertem und individualisiertem Vorgehen, das der speziellen Situation des Patienten und seines Tumors angepasst ist. Das Ziel ist eine „Therapie nach Maß“, eine „histologie- und stadiengerechte Therapie“ und mit zunehmenden Kenntnissen über die Tumorbiologie in Zukunft eine „biologiegerechte Therapie“, die sowohl ein Zuwenig als auch ein Zuviel vermeidet (Junginger et. al., 2002).

Die ersten Bestrebungen, die diese Richtung einschlugen und ein einheitliches internationales System als sinnvoll erachteten, wurden 1943 ins Leben gerufen. Mit Hilfe des TNM-Systems begann eine einheitliche Beschreibung der anatomischen Tumorausbreitung auf internationaler Ebene.

Die WHO befasst sich seit den Sechzigerjahren mit einer international einheitlichen histologischen Klassifikation der Tumoren und bedient sich seit 1976 der hierzu entwickelten Verschlüsselungssysteme (ICD-0) für Lokalisation und Histomorphologie der Tumoren.

Die exaktere Tumorklassifikation ist ein sich ständig weiterentwickelnder Prozess, der durch die zunehmend hohen technischen Möglichkeiten, neues über einzelne Tumorbiologien herauszufinden, als Momentaufnahme gesehen werden muss. Viele internationale Bestrebungen sind bemüht, von unterschiedlichen Sichtweisen aus auf der Grundlage der heutigen Standards, das Verständnis, die Tumorbiologie betreffend, und die daraus folgende Therapie anhand einer exakteren Klassifikation zu optimieren.

5.2 Prognostische Faktoren bei Krebserkrankungen

Es existieren für maligne Tumorformen sog. konventionelle prognostische Faktoren, wie z. B. die Einteilung des TNM-Systems, histologische Differenzierungen, die Angaben zur Radikalität der Operation u.v.m. (siehe Kapitel 3.3 ff. sowie Tab. 19).

Anhand dieser Faktoren können die Patienten in Gruppen und Subgruppen eingeteilt werden. In bestehenden Studien und erstellten Registern (z.B. OSP) können die Verläufe und die damit verbundenen Überlebenszeiten dargestellt werden.

Aussagen über das individuelle Risiko des einzelnen Patienten, was sich für ihn persönlich als die existentiell wichtigste und immer gestellte Frage darstellt, sind nach wie vor sehr vage und unsicher.

Aufgrund dieser Tatsache gibt es eine Fülle unterschiedlicher Ansätze in der Forschung, neue oder schon vorhandene Parameter zu finden und weiter zu entwickeln, mit deren Hilfe eine exaktere Risikoeinschätzung möglich wird. Diese wiederum soll einen klaren Schritt in der Therapieplanung und Durchführung einzelner Heilverfahren zur Folge haben.

Fortschritte in diesem Bereich werden durch neue, unter anderem durch molekularbiologische Erkenntnisse auf dem Gebiet der Onkogenese vorangetrieben (Kimura et al., 2000).

Die Ansprüche an einen zuverlässigen prognostischen Parameter (sog. Markersubstanz) sind deshalb: Nachweis einer stabilen Form sowie einfache Reproduzierbarkeit.

Ebenfalls sollte die Möglichkeit der Objektivität und der bedenkenlosen Übertragbarkeit auf andere Labore gewährleistet sein. Die Verwendung eines prognostischen Markers muss für jede Art einer Tumorerkrankung getestet werden (Hall und Going, 1999).

Es werden zwei Formen von Faktoren unterschieden: die prädiktiven und die prognostischen. Erstere sind faktisch Indikatoren für das relative Ansprechen bzw. Nichtansprechen der Erkrankung auf eine angewandte Behandlungsform.

Prognostische Faktoren stellen lediglich objektive Eigenschaften der Erkrankung dar, anhand derer der Verlauf vorausgesagt werden kann (Hall und Going, 1999).

5.3 Prognostische Faktoren bei kolorektalen Karzinomen

Es existieren bei bösartigen Krebserkrankungen unterschiedliche prognostische Faktoren (siehe Kapitel 5.2 sowie Tab. 19), die wie hier im Falle des kolorektalen Karzinoms den individuellen klinischen Verlauf der Erkrankung jedoch nur ansatzweise beschreiben können. Sie bieten dennoch aufgrund der unterschiedlichen Ausprägung einzelner Parameter die Möglichkeit der Eingrenzung und eventuell besser differenzierten Einteilung des Patientengutes.

Dies wiederum führt nun aufgrund langjähriger klinischer Erfahrungen sowie aktuell gewonnener Forschungserkenntnisse dazu, die einzelnen Gruppen intensiveren Kontrollen sowie Nachsorgeprogrammen und somit optimaleren Therapieformen zuführen zu können.

Tab. 19 fasst die Wertigkeit prognostischer Faktoren zusammen: etablierte Faktoren und Parameter, diverse prognostische Faktoren, die weiter validiert werden müssen sowie einige mit lediglich wahrscheinlichem prognostischem Wert. Ebenfalls existieren Parameter mit unklarem oder sogar keinem prognostischem Wert.

Tab. 19: Prognostische Faktoren bei kolorektalen Karzinomen, College of American Pathologists (nach Compton et al., 2000)

Kategorie I Faktoren mit etabliertem prognostischem Wert:

Tumorausbreitung, z.B. nach TNM-, Dukes-, Astler-Coller-Klassifikation
Einbruch in Lymph- oder Blutgefäße
Radikalität der Operation
Präoperative CEA Spiegel
Operateur/behandelnde Klinik

Kategorie IIA Faktoren mit prognostischem Wert, die in weiteren Studien validiert werden müssen:

Histologisches Grading
Radialer Tumorrandsstatus
Tumorklassifikation nach neoadjuvanter Therapie

Kategorie IIB Faktoren mit wahrscheinlich prognostischem Wert:

Histologische Typisierung
Lymphatische Reaktion auf Tumor
Mikrosatelliteninstabilität (hMLH1, hMSH2)
Deletion bzw. Homozygotität des Tumor-Supressor-Gens DCC
Tumorrandskonfiguration

Kategorie III Faktoren mit unklarem prognostischem Wert:

DNA Gehalt
Molekulare Marker
-Tumorsuppressorgene (LOH 1p/p53, LOH 8p, LOH 1p, LOH 5q)

- Onkogene (K-ras, c-myc), Apoptosegene (bcl-2, BAX)
- DNA Synthesegene (Thymidylatsynthase, Thymidinphosphatase)
- Transforming growth Faktor (TGF) und Epidermal growth Faktorrezeptor (EGF-R) Gene (TGF-, TGF-, c-erb-b/her2/neu, EGF-R), Cyclin-dependent Kinase-Inhibitorgene (p27, p21)
- Angiogenese-Gene (vascular endothelial growth Factor)
- Adhäsionsmoleküle und Glykoproteine (CD44, E-cadherin, sialo-Tn Antigen)
- Matrixmetallproteasen und Inhibitoren (Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator)
- Metastasen Supressorgen (nm23-H1)

Perineurale Invasion

Mikrogefäß-Dichte

Zellproteine und Carbohydrate

- Klasse I + II HLA Moleküle, CA 19-9, CA 72-4, Sialyl Lex, Sialosyl-Tn, Urokinase Plasminogenaktivator, Plasminogenaktivatorinhibitor 2, Glykoprotein 72, MUC-1, P-Glykoprotein, E-Cadherin, Integrine, Typ IV Kollagen, Laminin, Tenascin, Cytokeratin 20, Phospholipase C, Sekretorische Komponente von Immunglobulin A, Metallothionein, EGF-R, Gastrinrezeptor, Somatostatinrezeptoren, Sucraseisomaltase, Cathepsin B, L, und D, Ferritin, CD44, Vitamin D Rezeptorprotein

Peritumorale Fibrose

Peritumorale inflammatorische Reaktion

Neuroendokrine Differenzierung

Proliferationsindizes (pKi-67, PCNA)

Kategorie IV Faktoren ohne prognostischen Wert:

Tumorgröße

Tumorkonfiguration

5.4 Verwendung von HIP 1 als Prognosefaktor

Aufgrund der Tatsache, dass HIP 1 nur beim Prostata- und Kolonkarzinom exprimiert wird, jedoch nicht in den gesunden Epithelien dieser Organe (siehe Tab. 1 und 2, ebenfalls Rao et. al., 2002) sowie einer nachweislich deutlich höheren Aggressivität HIP 1 positiver Prostatakarzinome (Chan E., 2002), sollte mit dieser Studie die Relevanz von HIP 1 als Prognosefaktor für kolorektale Karzinome untersucht werden. Es ist erwiesen, dass HIP 1 in anderen Geweben sowohl unter natürlichen Bedingungen als auch im tumorösen Gewebe exprimiert wird (siehe hierzu Tab.1 und 2). Das beschriebene Verhalten von HIP 1 als Kofaktor im Clathrin bindenden Rezeptorverkehr der Zellen (Metzler et al., 2001) sowie die Tatsache des erstmaligen Auftretens von HIP 1 in der Krebsbiologie als ein entscheidender Teil der chromosomalen Translokation bei der chronisch myeloischen Leukämie (Ross et al., 1998) waren und sind wie das offensichtlich verminderte Krebsrisiko bei Patienten mit Chorea Huntington (siehe Kapitel 1.3.2, Rao et al., 2001, Okano et al., 2003) Ansatzpunkte für unterschiedliche Forschungsgruppen, die die Qualitäten von HIP 1 in einzelnen Studien untersucht und beschrieben haben. So hat HIP 1 einerseits die Aufgabe eines zellulären Überlebensfaktors und andererseits die eines Wegbereiters der Tumorgenese präkanzeröser oder kanzeröser Zellen (Rao et al., 2002).

5.5 Diskussion der ermittelten Ergebnisse

5.5.1 Beurteilung der Alters- und Geschlechtsverteilung

Mit einem Durchschnittsalter von 63,06 Jahren des untersuchten Patientengutes, wird ein nahezu identischer Wert wie in der veröffentlichten Abfassung der Arbeitsgemeinschaft bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland (2002) angegeben. Allerdings ist bei den Vergleichen des durchschnittlichen Alters der Erkrankten die Geschlechtsverteilung zu berücksichtigen.

In der Studie beträgt das ermittelte Erkrankungsdurchschnittsalter bei Frauen 64,83 Jahre, bei Männern sind es 62,24 Jahre. Dies bedingt einen geschlechtsspezifischen Altersunterschied von 2,59 Jahren. In der herangezogenen Literatur werden ähnliche Werte angegeben z.B. 4,2 Jahre (Boland et al., 2000).

Es zeigt sich, dass Patienten mit kolorektalen Karzinomen im Mittel ein höheres Durchschnittsalter aufweisen als Patienten mit anderen malignen Tumorerkrankungen (Arbeitsgemeinschaft bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2002).

Die Gesamtheit der 126 untersuchten Fälle setzte sich aus 33,3 % Frauen und 66,7 % Männern zusammen. Es handelt sich hierbei um eine signifikantere Verschiebung zur männlichen Bevölkerung als die angegebenen Verhältnisse anderer Studien zum Beispiel 46 % Frauen zu 54 % Männern (Boland et al., 2000).

Anhand der ermittelten Werte und der nahezu vergleichbaren Alters- jedoch leicht divergierenden Geschlechtsverteilungen kann das untersuchte Patientengut als repräsentativ angesehen werden.

5.5.2 Beurteilung der 5-Jahres-Überlebensrate

Anhand der Abfassung der Arbeitsgemeinschaft bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland (2002) liegt die relative 5-Jahres-Überlebensrate bei kolorektalen Karzinomen im Jahre 1999 für Frauen bei 51 % und für Männer bei nahezu 48 %. Beim untersuchten Patientenkollektiv lag die 5-Jahres-Überlebensrate der Gesamtheit bei 48,41 %, was den ermittelten und veröffentlichten Werten entspricht.

5.5.3 Beurteilung der eigenen Ergebnisse

Die in der Studie durchschnittlich erreichte Intensität der HIP 1 Expression im Epithel des Tumorgewebes der Dickdarmkarzinome ist mit nahezu gleichwertigen Anteilen der niedrige und mittlere Expressionsbereich (siehe Tab. 11 sowie Abb. 23).

Bei den kolorektalen Karzinomen kann jedoch nicht analog der beim Prostatakarzinom gewonnenen Untersuchungserkenntnisse von der Höhe der HIP 1 Expression auf die Tumoraggressivität geschlossen werden (Rao et al., 2002).

Es zeigt sich, dass die Höhe der HIP 1 Expression bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen und auch bei Patienten mit Prostatakarzinomen durchschnittlich im mittleren Bereich liegt (Chan E., 2002).

5.5.4 Interpretation der HIP 1 Expression im Bezug auf die Tumoraggressivität

Tab. 11 sowie Abb. 23 zeigen, dass nicht alle tumorösen Strukturen HIP 1 Expression aufweisen. Im Gegensatz dazu zeigen tumorfreie Gewebe und Bereiche der glatten Muskulatur niedrige bis mittlere HIP 1 Expression (Abb. 24 u. 25 sowie Chan E., 2002). Hieraus wurde der Ansatz entwickelt, die Verläufe unterschiedlicher Tumorentitäten auf molekularer Basis zu interpretieren. Anhand der Ergebnisse konnte lediglich eine vage Vermutung die Tumorbiologie betreffend geäußert werden. Die ermittelten Daten zeigen keine signifikante Korrelation zwischen der Aggressivität eines bereits bei Erstdiagnose metastasierten Tumors, der Rezidivrate oder dem Fortschreiten der

Tumorerkrankung und der Zunahme der HIP 1 Expression (siehe Graphiken 1- 6, Kapitel 4.2 ff. Ebenfalls Rao et al., 2002).

Der beim Prostatakarzinom nachgewiesene, bei kolorektalen Karzinomen nicht nachweisbare Zusammenhang zwischen der Höhe der HIP 1 Expression und der Tumoraggressivität wird in der Literatur erklärt, dass HIP 1 in die unterschiedlichsten Aufgabenbereiche auf zellulärer Ebene involviert ist (Rao et al., 2002, Hackam et al., 2000, Metzler et al., 2001).

Nicht jede Form des HIP 1 Antigens ist in der Lage, den Zelltod auszulösen, oder hat die Malignitätszunahme einer Zellstruktur zu verantworten. An bestimmten Stellen gespaltene HIP 1 Antigen-Formen können vorwiegend die Apoptose einleiten (siehe Chan E., 2002, Hackam et al., 2000).

5.5.5 Interpretation der HIP 1 Expression im Endothel kleiner Blutgefäße

Die hohe HIP 1 Expression im Endothel der kleinen Blutgefäße der untersuchten Dickdarmabschnitte ist identisch mit der hohen HIP 1 Expression bei Untersuchungen am Prostatakarzinom (siehe Tab. 10, vergleichend Rao et al., 2002).

Eine positive HIP 1 Expression im Endothel der Blutgefäße bei Kolorektalen Karzinomen mit Score-Index 0 ist als interne Positivkontrolle des immunhistochemischen Verfahrens zu werten (siehe Abb. 17).

5.5.6 Signifikanz der HIP 1 Expression anhand des klinischen Verlaufs bei kolorektalen Karzinomen

Die untersuchte Gruppe von 126 randomisierten Fällen mit kolorektalem Karzinom, ist im Vergleich mit Patientenzahlen anderer Forschungsgruppen repräsentativ (Chan E., 2002, Metzler et. al., 2001).

Insgesamt ließ sich anhand der ausgewerteten HIP 1 Expression der kolorektalen Karzinome keine eindeutig signifikante Aussage im Hinblick auf die Tumorbiologie und den klinischen Verlauf bei kolorektalen Karzinomen machen.

Ursache hierfür sind vermutlich die unterschiedlichen regulatorischen Eigenschaften des HIP 1 Antigens im Hinblick auf zelluläre Interaktionen (siehe Abschnitt 1.3.1 und 1.3.2 sowie Qin et al., 2004, Ross et al., 1998).

Ein weiterer Punkt ist das insgesamt höhere Durchschnittsalter der an kolorektalen Karzinomen erkrankten Patienten und damit der verkürzte Nachbeobachtungszeitraum.

5.5.7 Signifikanz der HIP 1 Expression beim Prostatakarzinom

Im Falle des untersuchten Prostatakarzinoms wurde nach radikaler Prostatektomie von HIP 1 positiven sowie negativen Karzinomen ein Follow up von mindestens 5 Jahren durchgeführt. Es zeigte sich, dass lediglich die bei Diagnose bereits HIP 1 positiven Prostatakarzinome nach einer gewissen Zeit einen erneuten PSA Anstieg und somit ein Rezidiv entwickelten, die anderen ehemals negativen dagegen nicht (Rao et al., 2002).

5.5.8 Korrelierende Parameter der vorliegenden Studie

Bei der Untersuchung des Patientenkollektivs korrelierten lediglich einige Parameter: Die UICC-Stadieneinteilung (univariat) (siehe Tab. 9), die Einteilung in das TNM-System (uni- und multivariat) (siehe Kapitel 3.3.1 ff, zusätzlich Tab. 6-8) sowie die nicht immer eindeutig möglichen Angaben über die Radikalität der Operation (uni- und multivariat) oder über eine bereits erfolgte adjuvante- oder neoadjuvante Chemotherapie (uni- und multivariat). Diese Parameter waren signifikant für die Prognose.

Eindeutig nachvollziehbar ist, dass die unterschiedlichen, die Ausbreitung des einzelnen Tumors beschreibenden Parameter mit der individuellen Überlebenszeit des Patienten im Verhältnis stehen.

Eine komplette Tumorexstirpation kann nie garantiert werden. Im Organismus verbleibende Krebszellen bergen jederzeit die Möglichkeit der Streuung und oder Rezidiventwicklung.

Als prognostische Faktoren des kolorektalen Karzinoms werden die Lokalisation des Tumors sowie die dementsprechende Infiltration der Darmwandschichten und evtl. Ausdehnung in benachbarte Strukturen gewertet. Zusätzlich wird immer der

Lymphknotenstatus erhoben und eine Metastasierung in entlegene Organstrukturen nach Möglichkeit ausgeschlossen (siehe Kapitel 3.3 ff).

5.6 Schlussfolgerung

Das Ziel HIP 1 als Prognosefaktor bei kolorektalen Karzinomen zu etablieren konnten wir nicht erreichen, da sich beim gewählten Versuchsansatz weder eine uni- noch eine multivariate Signifikanz zeigte.

Es bestand kein relevanter Unterschied im Verhalten des klinischen Verlaufes der Tumorerkrankung bei Patienten mit besonders hoher HIP 1 Expression im Bereich des Primärtumors und eventuell schon bei Erstdiagnose vorhandener Metastasierung zu Patienten mit niedriger oder lediglich mittlerer HIP 1 Expression (siehe Graphiken 1-3). Unbestritten ist bis auf geringe Ausnahmen mittels klinischer Verläufe belegt, dass im metastasierten Zustand befindliche Krebsformen wesentlich aggressiver sind und schneller zum Tod eines Patienten führen als beispielsweise intraepitheliale Neoplasien oder in toto resezierte Tumoren (Chan E., 2002).

5.6.1 Differenzierte Betrachtung des kolorektalen Karzinoms

Bei den kolorektalen Karzinomen muss ein vermeintlicher Zusammenhang zwischen Zellproliferation und Prognose in Betracht gezogen werden, der eine Beurteilung der Tumorbiologie sehr viel schwieriger macht (Palmqvist et al., 1999).

Die in der Studie des Dickdarmkarzinoms erhaltenen Ergebnisse sind widersprüchlicher als die Daten bei der Untersuchung des Prostatakarzinoms. In einigen Fällen korreliert die vermutete erhöhte Aggressivität mit hoher HIP 1 Expression. Allerdings lässt sich hieraus keine eindeutige prognostische Relevanz der Huntingtin-Interacting-Protein-1 Expression bei kolorektalen Karzinomen formulieren.

Die unterschiedlichen Ergebnisse beim Dickdarmkarzinom sind durch die variierenden zellulären Interaktionen von HIP 1 zu erklären. Chan E. beschreibt aus diesem Grund schon 2002 unter Berufung auf Rao et al: „HIP 1 appears to be a multifaceted beast“ (Chan, E. 2002).

Hohe HIP 1 Expression führt nicht automatisch zu einer höheren Aggressivität des tumorösen Gewebes, sondern kann zugleich die Apoptose in dem Zellverband erhöhen und somit auch zu einer Reduktion des Tumors führen (Hackam et al., 2000).

Der ständige Wechsel zwischen pro- und antiapoptotischen Signalen führt bei Geweben mit hoher Proliferationsrate schneller dazu, die Apoptose einzuleiten (Palmqvist et al., 1999).

5.6.2 Differentialdiagnostische Betrachtung von HIP 1

Nachgewiesenermaßen haben Menschen die an Chorea Huntington leiden oder das Gen der Erkrankung in sich tragen ein geringeres Risiko an Krebs zu erkranken als Verwandte die nicht betroffen sind (Chan E., 2002).

Aufgrund dieser Erkenntnisse und der Diskrepanz der erwarteten Ergebnisse wurden Versuche mit gesplittenen Formen des HIP 1 Antigens initiiert. So fand man heraus, dass die verkürzten Formen in ihrer Wirkung wesentlich stärker sind als die natürliche Form und hierin wahrscheinlich die unterschiedlichen Auswirkungen der Aggressivität von HIP 1 bedingt sind (Rao et al., 2002, Chan E., 2002).

5.6.3 Verschiedene Versuchsansätze und Methoden

Es liegt ein hohes Interesse vor die Bedeutung der HIP 1 Expression, die Tumorbiologie betreffend, im Einzelnen zu ergründen und exakt formulieren zu können. Die Hoffnung liegt darin, einen die derzeitige Tumorbehandlung beeinflussenden, stabilen Prognosefaktor zu etablieren. Man bedient sich aufgrund der hohen technischen Standards und der auf diesem Gebiet zusätzlich bereits erfolgten Untersuchungen auch komplett anderer Methoden als in der hier vorliegenden Studie.

Mittels Genmanipulationen und unter Ausschaltung einiger Aminosäuresequenzen im Bereich des HIP 1 Antigens sowie einiger seiner Partner (Proteine, htt) wurde die unterschiedliche Bindungsaktivität und die darausfolgenden Effekte in knockout-Maus-Versuchen getestet (Hyun et al., 2004). Mit Hilfe von PCR und Immunoblottechniken werden weitergehende Untersuchungen durchgeführt.

Hierbei wurden die DED's und andere Domänen entdeckt. Zahlreiche Versuchsansätze werden diskutiert und anhand der Arbeit einiger Gruppen die genauen Bindungs- und Mediatorfähigkeiten der Domänen untersucht und beschrieben (Hackam et al., 2000, Guillemin-Legendre et al., 2004).

Aufgrund der ermittelten Erkenntnisse behelf man sich enzymatischer Spaltungen in bestimmten Sequenzbereichen des HIP 1 Antigens, um die unterschiedlichen Formen auf ihre Toxizität zu testen (Rao et al., 2002, Hackam et al., 2000).

In diesen Ansätzen liegt vermutlich der Schlüssel zur exakten Identifikation, welcher Sequenz oder welcher beschriebenen Domäne des HIP 1 Antigens die entscheidende Mediatorrolle zukommt, dem tumorösem Wachstum seine Aggressivität zu verleihen. Nach neuesten Erkenntnissen spricht man den endozytotisch aktiven Proteinen, die sich zwischen Zellmembran und Zellkern im Zytoplasma shuttleartig bewegen, einen Transskriptionseffekt zu. Somit ist auch HIP 1 in der Lage Genexpressionen zu steuern (Vecchi und Di Fiore, 2005, Mills et al., 2005. Siehe ebenfalls Abschnitt 1.3.3).

6 Zusammenfassung

In der hier vorliegenden Studie wurden für das kolorektale Karzinom Daten gewonnen, die einen Zusammenhang zwischen der unterschiedlich stark auftretenden Expression von HIP 1 im Tumorgewebe und dessen eventueller Aggressivität aufzeigen sollten. Ziel war es das Huntingtin-Interacting-Protein-1 als Prognosefaktor bei kolorektalen Karzinomen zu verwenden.

Die 126 randomisierten (42 Frauen und 84 Männer, Durchschnittsalter 63,06 Jahre) kolorektalen Karzinome der Studie entstammen den Präparateinsendungen der chirurgischen Abteilungen an das Pathologische Institut des Klinikums Stuttgart der Jahre 1994 bis 2006.

Von allen Präparaten wurde ein HE-Schnitt erstellt. Nach Lokalisierung der entscheidenden Bereiche erfolgte mit Hilfe des immunhistochemischen Verfahrens die Darstellung der HIP 1 Expression. Anhand des festgelegten Score-Index (Rao et al., 2002) wurde die Auswertung und im Anschluss die statistische Aufarbeitung durchgeführt. Anders wie bei den Prostatakarzinomen ließ sich nach erfolgter Datenauswertung keine signifikante Korrelation zwischen der nachgewiesenen HIP 1 Expression und der vermuteten Aggressivität der Dickdarmkarzinome darstellen.

Die ermittelten Überlebenszeiten wurden nicht durch den Grad der HIP 1 Expression beeinflusst.

Signifikante Parameter, auf die zurückgegriffen wurde, waren die UICC–Stadieneinteilung und die Gliederung in das TNM-System mit dem Nachweis von evtl. Lymphknotenmetastasen und einer Metastasierung in entlegene Organsysteme.

Als Nachweis der erfolgreichen Immunpräzipitation kann die HIP 1 Expression des Endothels der kleinen Blutgefäße gewertet werden (interner Test des erfolgreichen immunhistochemischen Verfahrens).

Die Bedeutung des HIP 1 Antigens aufgrund seiner zahlreichen Zellinteraktionen in Geweben ist unbestritten. Wie vereinzelt schon begonnen, sollte das Antigen selbst genauer betrachtet und spezifiziert werden.

Mittels PCR und Immunoblottechniken sowie enzymatischer Spaltungen erhielt man unterschiedlich lange Versionen und stellte unterschiedliche Toxizitäten fest.

Diese Ansätze sind vermutlich der Schlüssel zur exakten Identifikation, welcher Sequenz oder welcher Domäne des HIP 1 Antigens die entscheidende Mediatorrolle zukommt dem tumorösem Wachstum seine Aggressivität zu verleihen.

7 Literaturverzeichnis

Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland

Krebs in Deutschland – Häufigkeit und Trends, 3. Auflage, Riegelsberg, Braun Druck, 2002

Bhattacharyya N., Nitai P., Banerjee D., Manisha S., Majunder P., Pritha K.

Huntington's disease: roles of huntingtin-interacting-protein 1 (HIP-1) and his molecular Partner HIPPI in the regulation of apoptosis and transcription.
(FEBS Journal, Vol. 275, Number 17, 4271-4279, 2008)

Boland C., Sinicrope F., Brenner D., Carethers J.,

Colorectal cancer prevention and treatment.
(Gastroenterology 118, 115-128, 2000)

Bradley S. V., Oravec-Wilson K. I., Bougeard G., Mizukami I., Li L., Munaco A. J., Sreekumar A., Corradetti M. N., Chinnaiyan A. M., Sanda M. G., Ross T. S.

Serum Antibodies to Huntingtin-interacting-protein-1: A New Blood Test for Prostate Cancer
(Cancer Research, Vol. 65, 4126-4133, 2005)

Buglioni S., D'Agnano I., Cosimelli M., Vasselli S., D'Angelo C., Tedesco M., Zupi G., Mottolese M.

Evaluation of multiple bio-pathological factors in colorectal adenocarcinomas: Independent prognostic role of p53 and bcl-2.
(Int. Journal of Cancer 84, 545-552, 1999)

Chan E.

HIP 1 as a marker of aggressive prostate cancer
(Clin. Genet., 372-375, 2002)

Compton C. C., Greene F.L.

The staging of colorectal cancer. 2004 and beyond
(CA Cancer J. Clin. 54, 295-308, 2004)

Compton C. C., Fielding L. P., Burgart L. J., Conley B., Cooper H. S., Hamilton S. R., Hammond M. E., Henson D. E., Hutter R. V., Nagle R. B., Nielsen M. L., Sargent D. J., Taylor C., Welton M., Willet C.

Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999.
(Arch Path. Lab Med 124, 979-994, 2000)

Gervais G. F., Singaraja R., Xanthoudakis S., Gutekunst C.-A., Leavitt B. R., Metzler M., Hckam S. A., Tam J., Vaillantcourt J. P., Houtzager V., Rasper D. M., Roy S., Hayden M. R., Nicholson D. W.

Recruitment and activation of caspase-8 by the Huntingtin-interacting protein HIP-1 and a novel partner Hippi.
(Natural Cell Biology Vol. 4, 95-105, 2002)

Hackam A. S., Yassa A. S., Singaraja R., Metzler M., Gutekunst C.-A., Gan L., Warby S., Wellington C. L., Vaillantcourt J. P., Chen N., Gervais G. F., Raymond L., Nicholson D. W., Hayden M. R.

Huntingtin Interacting Protein 1 induces Apoptosis via a Novel Caspase-dependent Death Effector Domain.

(Journal of Biological Chemistry Vol. 275, 41299-41308, 2000)

Hall P. A., Going J. J.

Predicting the future: a critical appraisal of cancer prognosis studies.

(Histopathology 35, 489-494, 1999)

Hyun T. S., Li L., Oravec-Wilson K. I., Bradley S. V., Provot M. M., Monaco A. J., Mizukami I. F., Sun H., Ross T. S.

HIP 1- related Mice Grow and Develop Normally but have Accelerated Spinal abnormalities and Dwarfism in the Absence of HIP1.

(Molecular and Cellular Biology Vol. 24, 4329-4340, 2004)

International Union Against Cancer

UICC TNM Classification of Malignant Tumours.

(6th ed. New York: Wiley-Liss; 2002)

Junginger T., Klimpfinger M., Hermanek P.

Klassifikation maligner Tumoren

(Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York 2002)

Kimura T., Tanaka S., Haruma K., Sumii K., Kajiyama G., Shimamoto F., Kohno N.

Clinical significance of MUC 1 and E-cadherin expression, cellular proliferation, and angiogenesis at the deepest invasive portion of colorectal cancer.

(Journal of Oncology 16, 55-64, 2000)

Legendre-Guillemain V., Metzler M., Lemaire J.-F., Philie J., Gan L., Hayden M. R., McPherson P. S.

Huntingtin Interacting Protein 1 (HIP 1) Regulates Clathrin Assembly through Direct Binding to the Regulatory Region of the Clathrin Light Chain.

(Journal of Biological Chemistry Vol. 280, 6101-6108, 2005)

Le Voyer T.E., Sigurdson E.R., Hanlon L.

Colon cancer survival is associated with increasing number of lymph nodes analyzed: A secondary survey of intergroup trial INT-0089.

(Journal of Clinical Oncology 21, 2912-2919, 2003)

Metzler M., Legendre-Guillemain V., Gan L., Chopra V., Kwok A., McPherson P. S., Hayden M. R.

HIP 1 Functions in Clathrin-mediated Endocytosis through Binding to Clathrin and Adaptor Protein 2.

(Journal of Biological Chemistry Vol. 276, 39271-39276, 2001).

Mills I. G., Gaughan L., Robson C., Ross T., Mc Cracken S., Kelly J., Neal D. E.
Huntingtin-interacting-protein-1 modulates the transcriptional activity of nuclear hormone receptors.
(JCB, Vol. 170, 191-200, 2005)

Mishra S. K., Agostinelli N. R., Brett T. J., Mizukami I., Ross T. S., Traub L. M.
Clathrin- and AP-2-binding Sites in HIP 1 Uncover a General Assembly Role for Endocytotic Accessory Proteins.
(Journal of Biological Chemistry Vol. 276, 46230-46236, 2001).

Okano A., Usuda N., Furihata K., Nakayama K., Tian Q. B., Okamoto T., Suzuki T.
Huntingtin-interacting protein-1-related protein of rat (rHIP1R) is localized in the postsynaptic regions.
(Brain Research 967, 210-225, 2003)

Palmqvist R., Sellberg P., Oberg A., Tavelin B., Rutegard J. N., Stenling R.
Low tumor cell proliferation at the invasive margin is associated with a poor prognosis in Duke's stage B colorectal cancers.
(Cancer 79, 577-581, 1999)

Qin Z. H., Wang Y., Sapp E., Cuiffo B., Wanker E., Hayden M. R., Kegel K. B., Aronin N., Di Figlia M.
Huntingtin Bodies Sequester Vesicle-Associated Proteins by a Polyproline- Dependent Interaction.
(Journal of Neuroscience 24(1), 269-281, 2004)

Rangone H., Pardo R., Colin E., Girault J.-A., Saudou F., Humbert S.
Phosphorylation of Arfaptin 2 at Ser 260 by Akt Inhibits PolyQ-huntingtin-induced Toxicity by Rescuing Proteasome Impairment.
(Journal of Biological Chemistry Vol. 280, 22021-22028, 2005)

Rao D. S., Chang J. C., Kumar P. D., Mizukami I., Smithson G. M., Bradley S., Parlow A. F., Ross T. S.
Huntingtin Interacting Protein 1 Is a Clathrin Coat Binding Protein Required for Differentiation of late Spermatogenic Progenitors.
(Molecular and Cellular Biology Vol. 21, 7796-7806, 2001)

Rao D. S., Hyun T. S., Kumar P. D., Mizukami I., Rubin M. A., Lucas P. C., Sanda M. G., Ross T. S.
Huntingtin-interacting protein 1 is overexpressed in prostate and colon cancer and its critical for cellular survival.
(Journal of Clinical Investigation Vol. 110, 351-360, 2002)

Rao D. S., Bradley S. V., Kumar P. D., Hyun T. S., Saint-Dic D., Oravec-Wilson K., Klier C. G., Ross T. S.
Altered receptor trafficking in Huntingtin Interacting Protein 1-transformed cells.
(Cancer Cell Vol. 3, 471-482, 2003)

Ross T. S., Bernard O. A., Berger R., Gilliland D. G.

Fusion of Huntingtin Interacting Protein 1 to Platelet-Derived Growth Factor β Receptor (PDGF β R) in chronic Myelomonocytic Leukemia with t (5;7)(q33;q11.2) (Blood, Vol. 91, 4419-4426, 1998)

Ross T. S., Gilliland D. G.

Transforming Properties of Huntingtin Interacting Protein 1/Platelet-derived Growth Factor β Receptor Fusion Protein. (Journal of biological Chemistry, Vol. 274, 22328-22336, 1999)

Saint-Dic D., Chang S. C., Taylor G. S., Provot M. M., Ross T. S.

Regulation of the Src Homology 2 containing Inositol 5-Phosphatase SHIP1 in HIP1/PDGF β R-transformed Cells. (Journal of biological Chemistry, Vol. 276, 21192-21198, 2001)

Schmoll H.-J., Arnold D., Lang A., Graeven U.

Prognose des kolorektalen Karzinoms Letzte Änderung: 22.05.2007
(www.onkodin.de/zms/content/e2/e22972/e47994/e48115/index_ger.html - 81k -)

Vecchi M., Di Fiore P. P.

It's HIP to be a hub: new trends for old-fashioned proteins (Journal of Cell Biology, Vol. 170, 169-171, 2005)

Watanabe T., Wu T. T., Catalano P. J.

Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. (New England Journal of Medicine, 344, 1196-1206, 2001)

Wilbur J. D., Chen C.-Y., Manalo V., Hwang P. K., Fletterick R. J., Brodsky F. M.

Actin Binding by Hip1 (Huntingtin-interacting Protein 1) and Hip1R (Hip1-related Protein) Is Regulated by Clathrin Light Chain (Journal of biological Chemistry, Vol. 283, Issue 47, 32870-32879, 2008)

Wittekind C., Meyer H. -J., Bootz F.

TNM Klassifikation maligner Tumoren (Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Honkong, London, Mailand, Paris, Tokio 6. Auflage Nachdruck 2003)

Ybe J. A., Mishra S., Helms S., Nix J.

Crystal Structure at 2.8 Å of the DLLRKN-containing Coiled-coil Domain of Huntingtin-interacting-protein-1 (HIP 1) Reveals a surface Suitable for Clathrin Light Chain Binding. (Journal of Molecular Biology, Vol. 367, 8-15, 2007)

8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. A. Bosse

danke ich für die Möglichkeit, am Institut für Pathologie des Klinikums Stuttgart meine Promotionsarbeit zu schreiben, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie für die zur Verfügungstellung der Klinik- und Materialressourcen.

Herrn Oberarzt Dr. med. K. Wiedorn

danke ich für die Überlassung des Promotionsthemas.

Frau Oberärztin Dr. med. A. Wenz

Tausend Dank für ihren selbstlosen Einsatz und ihre Geduld bei der Korrektur und redaktionellen Überarbeitung.

Frau Dr. med. R. Kaupp

möchte ich herzlich für die prompte und hilfreiche Korrektur in sprachlicher Hinsicht danken.

Frau M. Esparza

danke ich für die freundliche und geduldige Einarbeitung in die molekularbiologischen Arbeitsmethoden sowie die Tipps und Anregungen für die Arbeit im Labor.

Herrn A. Baun

danke ich sehr herzlich für die geopfert Zeit um mir bei computertechnischen Fragen stets mit Rat und Tat beiseite zu stehen.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, für die fortwährende Unterstützung und das mir entgegengebrachte Vertrauen zur erfolgreichen Beendigung des Studiums und der Fertigstellung dieser Arbeit.

9 Lebenslauf

Name: Al-Shukur

Vorname: Faraby-Fabian Patrick

Geburtsdatum / -ort: 13.09.1976 / Stuttgart

Anschrift: Haußmannstr. 148 b, 70188 Stuttgart

Familienstand: ledig

1983 - 1996 Freie Waldorfschule Uhlandshöhe

1996 - 1998 ev. ABG Michelbach an der Bilz
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

1998 - 1999 Zivildienst im Rettungsdienst und Krankentransport
bei der Johanniter-Unfall-Hilfe e. V. in Stuttgart

1999 - 2001 Aufnahme des Studiums der Medizin an der
Semmelweis Universität in Budapest
Abschluss: Ärztliche Vorprüfung

2001 Fortführung des Studiums an der Eberhard-Karls
Universität in Tübingen

2002 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2004 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2004 - 2005 Praktisches Jahr im Marienhospital Stuttgart

25.11.2005 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Seit 01.01.2006

Assistenzarzt: Anstellung in der Klinik für Orthopädie,
Unfallchirurgie und Wiederherstellungschirurgie
Zentrum für Schwerbrandverletzte des
Marienhospital in Stuttgart

Seit 08 / 2003

Doktorand am Institut für Pathologie des
Klinikums Stuttgart