

Aus dem Institut für Immunologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Thomas Brocker

**Expression des Apoptose-assoziierten Moleküls
PHLDA1 in kolorektaler Schleimhaut und kolorektalen
Karzinomen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Kai Christian Breuling
aus
Stuttgart

2009

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. Judith P. Johnson

Mitberichterstatter:

Priv. Doz. Dr. Doris Mayr

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan:

Prof. Dr. med. Dr. h.c. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung:

12.03.2009

Inhaltsverzeichnis:

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Einleitung: | 1 |
| 1.1 | Zielsetzung der Arbeit: | 12 |
| 2 | Material und Bezugsquellen: | 13 |
| 2.1 | Gewebe: | 13 |
| 2.1.1 | Normale kolorektale Schleimhaut: | 13 |
| 2.1.2 | Kolorektale Karzinome: | 14 |
| 2.2 | Sekundärantikörper/Antikörperkonjugate: | 15 |
| 2.3 | Monoklonale Antikörper: | 16 |
| 2.3.1 | Isotypkontrollen | 16 |
| 2.3.2 | Infiltratmarker | 16 |
| 2.3.3 | Epithelzellmarker | 16 |
| 2.3.4 | Testantikörper | 16 |
| 2.4 | Chemikalien: | 17 |
| 2.5 | Kommerzielle Analysesysteme und vorgefertigte Lösungen: | 17 |
| 2.6 | Allgemeine Puffer und Lösungen: | 17 |
| 2.7 | Verbrauchsmaterial: | 18 |
| 2.8 | Geräte: | 18 |
| 3 | Methoden: | 19 |
| 3.1 | Herstellen von Gewebeschnitten: | 19 |
| 3.2 | Immunhistochemie: | 19 |
| 3.3 | Auswertung | 21 |
| 4 | Ergebnisse: | 23 |
| 4.1 | PHLDA1 und Fas Expression in normaler kolorektaler Schleimhaut: | 23 |
| 4.1.1 | Vergleich zwischen PHLDA1 und Ki-67 Expression: | 28 |
| 4.1.2 | PHLDA1 und Fas Expression in normaler kolorektaler Schleimhaut: | 33 |
| 4.1.3 | Vergleich der PHLDA1- bzw. Fas-Expression in Abhängigkeit von der Lokalisation: | 38 |
| 4.2 | PHLDA1 und Fas Expression in kolorektalen Karzinomen: | 39 |
| 4.2.1 | Verhältnis zwischen PHLDA1- und Fas-Expression in kolorektalen Karzinomen: | 43 |
| 4.2.2 | Vergleich der PHLDA1-/Fas-Expression in Abhängigkeit von der Lokalisation: | 49 |
| 4.3 | Vergleich der PHLDA1- bzw. Fas-Expression in normaler kolorektaler Schleimhaut und kolorektalen Karzinomen: | 50 |
| 5 | Diskussion: | 55 |
| 6 | Zusammenfassung: | 66 |
| 7 | Abkürzungsverzeichnis: | 68 |
| 8 | Literaturverzeichnis: | 69 |
| 9 | Danksagung: | 78 |
| 10 | Lebenslauf: | 79 |

1 Einleitung:

Krebs stellt in den westlichen Industrieländern, trotz erheblicher Fortschritte in Diagnostik und Therapie, nach wie vor hinter den kardiovaskulären Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache dar (Jemal et al., 2003). Die Ursachen bösartiger Neoplasien sind deshalb unverändert Gegenstand intensiver Forschung. Wenn auch noch viele der Prozesse, die letztlich zur Bildung eines Tumors führen, im Dunkeln liegen, so ist es doch gelungen, einige zu beschreiben und ihre Bedeutung für die Tumorgenese aufzuzeigen. Grundlage für die maligne Entartung einer Zelle und damit für die Entstehung eines Tumors, ist die Veränderung (Mutation) ihres Erbguts, der DNA. Mittlerweile sind, neben ionisierender Strahlung und bestimmten Viren, eine Vielzahl von chemischen und pflanzlichen Stoffen bekannt, die in der Lage sind Mutationen auszulösen. Darüber hinaus können auch nicht direkt am Erbgut angreifende Stoffe, über den Umweg einer chronischen Entzündung und dem damit verbundenen Stimulus zur fortwährenden Zellteilung, Mutationen in der DNA begünstigen (Ames und Gold, 1990). Dabei sind jedoch mehrere unabhängige Mutationsereignisse innerhalb der Zelle nötig, damit sich die Transformation zu einem malignen Phänotyp vollziehen kann (Bishop, 1991). Hanahan und Weinberg postulierten deshalb unabhängig von der Art des Tumors sechs grundsätzliche Veränderungen der normalen Zellphysiologie als Voraussetzung für malignes Wachstum: Die Selbstversorgung mit Wachstumssignalen, das Nicht-Ansprechen auf wachstumshemmende Signale, die Umgehung des programmierten Zelltods (Apoptose), das Aufrechterhalten der Gefäßneubildung, die unbegrenzte Teilungsfähigkeit und die Fähigkeit, in umliegende Gewebe einzuwandern mit folgender Metastasierung (Hanahan und Weinberg, 2000). Die Reihenfolge, in der diese Veränderungen auftreten, kann dabei sehr unterschiedlich sein.

Ein prominentes Beispiel für diesen Prozess, bei dem das Auftreten umschriebener Mutationen mit dem schrittweisen Erwerb maligner Eigenschaften einhergeht, ist das kolorektale Karzinom (Vogelstein et al., 1988).

Hierbei handelt es sich um einen Tumor, der sich von den Epithelzellen des Dickdarms ableitet. 98% aller Tumoren des Dickdarms sind dieser Entität zuzuordnen. Während die meisten Tumoren sporadisch auftreten, sind für 1-5% der Fälle vererbte Syndrome bekannt, unter ihnen die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) und das hereditäre, nichtpolypöse Kolonkarzinomsyndrom (HNPCC) als die häufigsten Vertreter (Tomlinson et al., 1997).

Darüber hinaus gehen auch chronisch entzündliche Darmerkrankungen wie die Kolitis ulzerosa und der Morbus Crohn mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung eines Kolonkarzinoms einher (Connel et al., 1994). Die Inzidenz des kolorektalen Karzinoms beträgt in Deutschland für Männer 70/100000 Einwohner/Jahr, für Frauen 43/100000 Einwohner/Jahr, Tendenz steigend. Es stellt sowohl bei Männern (nach dem Prostatakarzinom), als auch bei Frauen (nach dem Mammakarzinom) die zweithäufigste Tumorerkrankung dar (Tumorregister München, 2005). Die Stadieneinteilung, d.h. die Beurteilung der Ausbreitung des kolorektalen Karzinoms erfolgt mittels der TNM (für Tumor, Nodes, Metastases)-Einteilung kolorektaler Karzinome der UICC (Union internationale contre le cancer), die früher übliche Dukes-Klassifikation (Dukes et al., 1958) sollte nicht mehr Verwendung finden. Für die histopathologische Beurteilung, das sogenannte Grading, steht das System von Jass zur Verfügung (Jass et al., 1987). Stadieneinteilung und histopathologische Beurteilung sind zur Therapieplanung und Einschätzung der individuellen Prognose unerlässlich.

Wie bereits erwähnt entstehen nach heutigem Wissensstand ein Großteil aller kolorektalen Karzinome über Jahre aus Adenomen, d.h. aus primär gutartigen Vorstufen. Der Begriff Adenom-Karzinom-Sequenz beschreibt diesen Prozess (Vogelstein et al., 1988).

Am Beginn dieser Entwicklung scheinen der Verlust oder die Mutation des auf dem langen Arm von Chromosom 5 lokalisierten APC-(für adenomatous polyposis coli) Gens zu stehen (Powell et al., 1992). Keimbahn-APC-Mutationen konnten als Auslöser der multiplen Adenome beim FAP-Syndrom identifiziert werden, sie können aber auch beim sporadisch auftretenden kolorektalen Karzinom in zwei Drittel der Fälle nachgewiesen werden, wobei die Mehrzahl der APC-Mutationen in einem vorzeitigen Stopcodon und somit einem verkürzten Protein resultieren (Miyaki et al., 1994). Wie APC seine Wirkung als Tumorsuppressor entfaltet ist weiterhin Gegenstand intensiver Forschung. Am längsten ist die Bedeutung von APC als Teil des Wnt (für Wingless und Int1)-Signalweges bekannt. Hierbei reguliert in physiologischem Zustand das APC-Protein als Teil eines Destruktionskomplexes den β -Catenin-Spiegel innerhalb der Zelle durch Bindung an zytoplasmatisches β -Catenin und konsekutiven Abbau desselben (Rubinfeld et al., 1993).

An diesem Komplex sind neben APC und β -Catenin auch Axin und GSK-3 β beteiligt, der Abbau des Destruktionskomplexes erfolgt durch Ubiquitylation, d.h. posttranslationale, reversibel Bindung an Ubiquitin (Behrens et al., 1998). Die genaue Rolle von APC innerhalb dieses Destruktionskomplexes ist jedoch bisher noch unklar.

Wenn APC inaktiviert wird, wandert das sich ansammelnde β -Catenin in den Zellkern, wo es die Transkription von multiplen Genen, die an Tumorwachstum und Invasion beteiligt sind, vorantreibt. Dem APC- β -Catenin Signalweg wird somit eine wesentliche Rolle bei der Entstehung kolorektaler Karzinome zugeschrieben (Takayama et al., 2006).

Über diese Rolle bei der β -Cateninregulation hinaus mehren sich die Hinweise darauf, dass APC auch an anderen zellulären Prozessen beteiligt ist, es sich somit um ein multifunktionelles Protein handelt (Liu et al., 2006). So konnte über die Funktion von APC bei der β -Cateninregulation hinaus gezeigt werden, dass APC-Verlust mit einer Abnahme der Zellmigration und verminderter Stabilität der Mikrotubuli einherging (Kroboth et al., 2007).

Einschränkend muss erwähnt werden, dass, entgegen früherer Annahme, die ersten genetischen Veränderungen beim kolorektalen Karzinom nicht notwendigerweise im APC/ β -Catenin Signalweg liegen müssen. So ergab die Untersuchung von Adenomen als bekannte Vorläufer des kolorektalen Karzinoms für flache tubuläre Adenome nur bei 7% APC-Mutationen, bei polypoiden tubulären Adenomen waren bei 36% der untersuchten Proben APC-Mutationen nachweisbar (Umetani et al., 2000).

In welchem Maße Karzinogene bei der Entstehung o.g. Mutationen von Bedeutung sind, oder ob es sich im Wesentlichen um Spontanmutationen handelt, ist Gegenstand kontroverser Diskussionen. Bisher gibt es keine klaren Hinweise darauf, dass APC-Mutationen an karzinogensensitiven „Hotspots“ entstehen (Tomlinson et al., 1997). Dem gegenüber steht die Beobachtung, dass das Risiko am kolorektalen Karzinom zu erkranken, in Abhängigkeit von der Ernährung unterschiedlich ausfällt (Howe et al., 1992).

Ob neben APC noch weitere Gene die Entstehung eines Kolonkarzinoms auslösen können, ist noch nicht abschließend geklärt. So sind bei Patienten mit HNPCC- (hereditärem Non-Polyposis-Coli) Syndrom typischerweise erbliche Mutationen an der DNA-Reparatur beteiligter Gene, sogenannter mismatch-repair-Gene (MMR) nachweisbar (Fishel et al., 1993). Ob diese Mutationen jedoch selbst Auslöser für die Tumorentstehung sind (Aaltonen et al., 1993), oder nur über die bereits beschriebene Erhöhung der Mutationsrate die Wahrscheinlichkeit der Entstehung weiterer Mutationen (wie APC-Mutationen) begünstigen, ist bisher noch offen.

Zur Ausbildung eines Adenoms sind weitere Schritte erforderlich. So wird Mutationen bei K-ras Onkogenen, die vermehrt in Vorstufen adenomatöser Polypen nachweisbar sind (Smith et al., 1994), eine wesentliche Rolle bei der Progression früher Adenome zugeschrieben,

möglicherweise über einen die Replikation steigernden Effekt (Bos, 1988). Darüber hinaus scheint, neben der Tatsache, dass diese Mutationen typischerweise bei Tumoren auftreten, die einen Durchmesser vom 1 cm überschritten haben (Vogelstein et al., 1988), beim kolorektalen Karzinom eine bestimmte Kombination von K-ras Mutationen typisch zu sein, so dass vermutet wird, dass diese Mutationen spezifisch an der Tumorprogression beteiligt sind (Burmer et al., 1990).

Die daraus geschlossene Annahme, dass es sich bei K-ras Mutationen um den APC Mutationen folgende, die weitere Tumorprogression einleitende Veränderungen handelt, steht die Beobachtung gegenüber, dass K-ras Mutationen auch in normalem Dickdarmepithel nachgewiesen werden konnten (Minamoto et al., 1995).

Dem gegenüber besteht an der Bedeutung von Mutationen des p53 Gens bei der Progression kolorektaler Tumoren wenig Zweifel. P53 Mutationen treten bevorzugt am Übergang von noch benignen Adenomen zu bösartigen Formen auf (Baker et al., 1990). P53 wird eine Vielzahl unterschiedlicher Funktionen zugeschrieben, deren Ausfall neben der verminderten Fähigkeit, Schäden an der DNA zu beheben, Störungen des Zellzyklus, karyotypische Instabilität sowie eine verminderte Apoptoserate zur Folge haben (Donehower et al., 1993).

Auch für die bereits bei der Tumorentstehung erwähnten MMR-Gene wurde eine Rolle bei der Tumorprogression postuliert. So konnte gezeigt werden, dass MMR-Mutationen analog zu p53 Mutationen gehäuft bei beginnenden Karzinomen, d.h. bei Tumoren am Übergang von lokal proliferativem zu invasivem Wachstum auftreten (Young et al., 1993). Hierbei konnte eine negative Assoziation zu p53 Mutationen festgesellt werden, so dass vermutet wird, dass MMR Mutationen ähnliche Veränderungen wie die für p53 bereits beschriebenen Effekte hervorrufen können (Ilyas et al., 1996).

Mit zunehmender Tumormasse kommt es im Vergleich zum bisher beschriebenen Stadium der Progression zu einer Verschiebung des Selektionsdrucks, weg von klonaler Expansion, hin zu Veränderungen, die eine Anpassung an ein lokales Milieu und Interaktion zwischen den Tumorzellen ermöglichen. Möglicherweise führen diese veränderten Bedingungen in größeren Tumoren zu einem zunehmenden Konkurrenzkampf zwischen den Tumorzellen (Tomlinson et al., 1997). So stellt z.B. die Fähigkeit, die Neubildung von Gefäßen (Angiogenese) zu induzieren, für Zellen im Zentrum eines Tumors durch die dadurch verbesserte Versorgung mit Nährstoffen, einen erheblichen Selektionsvorteil dar (Leek et al., 1994). Ebenso kann es unter dem Einfluss medikamentöser Behandlung oder Strahlentherapie

zur Selektion von Klonen innerhalb eines Tumors kommen, die über Resistenzmechanismen gegenüber diesen Maßnahmen verfügen (Linn und Giaccone, 1995), wodurch ein Tumor bestehend aus einer Vielzahl verschiedener Klone mit unterschiedlichem Genotyp entsteht (Tomlinson et al., 1997). Dies könnte erklären, warum bisher so wenige für reife kolorektale Karzinome spezifische Mutationen identifiziert werden konnten, da lokale Unterschiede im Expressionsmuster sowohl bei der Untersuchung ganzer Tumoren, als auch bei der Analyse kleiner Portionen nicht erkannt werden (Tomlinson et al. 1997). Erschwerend kommt hinzu, dass unter der o.g. Annahme konkurrierender Klone innerhalb eines Tumors von einem nicht unerheblichen Anteil an Klonen auszugehen ist, bei denen sich Mutationen bzw. Gene als hochreguliert identifizieren lassen, die langfristig keinen Selektionsvorteil bieten und deshalb für das Verständnis der Tumorgenese nicht von Bedeutung sind (Tomlinson et al., 1996).

In letzter Zeit sind bei der Betrachtung von Tumoren Stammzellen zunehmend in das Zentrum des Interesses gerückt. Hierbei handelt es sich um einen Zelltyp mit unbegrenzter, oder zumindest lang anhaltender Fähigkeit zur Selbsterneuerung, der in der Lage ist, mindestens einen hoch differenzierten Nachkömmling zu produzieren. Normalerweise steht zwischen der Stammzelle und ihrem schlussendlichen Abkömmling eine Intermediärpopulation von Zellen mit im Vergleich zur Stammzelle eingeschränktem proliferativen Potential und begrenzter Fähigkeit zur Differenzierung. Sinn dieser Zwischenstufen ist meist die Zahl differenzierter Zellen, die sich von jeder einzelnen Stammzelle ableiten, zu erhöhen (Watt et al., 2000).

Im Dickdarmepithel befinden sich diese Zellen an der Basis der Krypten. Das Kolonepithel erneuert sich aus diesen Stammzellen alle fünf Tage (Potten et al., 1992). Durch asymmetrische Teilung generieren Stammzellen sich ständig neu und erzeugen gleichzeitig eine Population von Übergangszellen, welche die Krypte emporwandern und sich im Verlauf dieser Wanderung zu den Zellen des Dickdarmepithels ausdifferenzieren (Potten et al., 1990). Diese Stammzellen leben im Gegensatz zu ihren kurzlebigen Nachkommen lange an der Kolokrypte und können so über Jahre und Jahrzehnte krebserregende Mutationen anhäufen. Histologische Untersuchungen von kolorektalen Karzinomen zeigten, dass diese Tumoren sich aus einer Vielzahl unterschiedlich differenzierter Zellen zusammensetzen, was nahe legt, dass diese Tumoren aus Stammzellen entstehen, weil nur dieser Zelltyp in der Lage ist, eine solche Vielfalt von Zellen innerhalb eines Tumors zu generieren (Pierce et al., 1977).

Als frühestes Ereignis der Tumorgenese werden auch in diesem Erklärungsmodell APC-Keimbahnmutationen angesehen. Als Folge dieser Mutationen wurde als erste detektierbare Gewebeveränderung bei der familiären adenomatösen Polyposis (FAP) eine Verschiebung der proliferativen Zone innerhalb der Krypten in Richtung Darmlumen beobachtet (Potten et al.,

1992). Als Ursache für diese Verschiebung der proliferativen Zone und auch nachfolgende Schritte der kolorektalen Kanzerogenese, wie Adenombildung und zuletzt Karzinomentstehung, postulieren Boman und Huang (2008) eine Überbevölkerung von Stammzellen an der Kryptenbasis.

Für malignes, also infiltrierendes Wachstum und Metastasierung sind wie eingangs erwähnt, weitere Eigenschaften erforderlich, die sich zum Teil erheblich von den bisher beschriebenen Mechanismen der Tumorentstehung und -progression unterscheiden. Im Vordergrund stehen in diesem Stadium Fähigkeiten wie die Basalmembran sowie den Zellverbund normaler Zellen zu durchbrechen, in Blut oder Lymphflüssigkeit überlebensfähig zu sein, an anderen Stellen des Körpers anhaften und im dortigen Milieu überleben zu können. Die Untersuchung von Genen, die an diesen Prozessen beteiligt sind, wird unter anderem dadurch erschwert, dass möglicherweise das Auftreten von Mutationen bzw. die Expression bestimmter Gene nur räumlich und zeitlich begrenzt stattfindet (Thomlinson et al., 1997).

Doch die Identifizierung von Genen, die für bestimmte Entwicklungsstadien des kolorektalen Karzinoms von Bedeutung sind, ist nicht nur für das Verständnis der Tumorbiologie von Interesse. Bisher ist die frühzeitige Erkennung und Entfernung von Adenomen im Dickdarm mittels Koloskopie die effektivste Früherkennungs- und Präventionsmaßnahme, ein Verfahren, das neben den Kosten auch mit nicht unerheblichen Belastungen für den Patienten behaftet ist. Als nicht invasive Untersuchung steht der fäkale Okkultblut-Test zur Verfügung, ein wenig spezifisches und nur unzureichend sensitives Verfahren, das sich die Blutungsneigung tumoröser Veränderungen zunutze macht. Der Nachweis für das kolorektale Karzinom spezifischer Mutationen in aus Stuhl gewonnenem Zellmaterial oder aus im Blut zirkulierenden Tumorzellen, könnte hier einen wesentlichen Beitrag zu verbesserter Früherkennung und dem gezielteren Einsatz weiterer Diagnostik leisten. Eine Isolierung von DNA hierfür aus Enterozyten im Stuhl ist bereits möglich und vielversprechende Daten liegen vor. So ergab z.B. eine Studie, bei der Stuhl von 46 Patienten mit bekannten Karzinomen oder Adenomen auf APC-Mutationen untersucht wurde, für Karzinome eine Sensitivität von 61%, für Adenome von 50% (Traverso et al., 2002). Aufgrund der noch fehlenden Daten aus der asymptomatischen Bevölkerung sowie des hohen Aufwands und der Kosten, werden dieses und ähnliche Verfahren jedoch bislang nur im Rahmen von Studien empfohlen (AWMF Leitlinien für Diagnostik und Therapie Innere Medizin, 2004).

Auch für andere Tumore ist die Identifizierung von Genen, die bei der Tumorprogression von Bedeutung sind, Gegenstand intensiver Forschung. So konnte bei der Suche nach Genen, die beim Metastasierungsprozess des malignen Melanoms (einem Tumor, der sich von den Melanozyten der Haut ableitet und für die frühzeitige Bildung von Tochtergeschwülsten bekannt ist) von Bedeutung sein könnten, das PHLDA1 (pleckstrin homology-like domain, family A, member 1)-Gen identifiziert werden.

Im Rahmen einer mRNA differential display-Analyse, bei der das Expressionsmuster aus Melanomprimärtumoren und autologen Melanommetastasen gewonnener Zelllinien verglichen wurde, zeigte eine der gefundenen mRNAs eine verminderte Expression in drei Metastasen-Zelllinien im Vergleich zu den autologen Primärtumorzelllinien. Diese mRNA kodierte für PHLDA1 (Kuske, 1998). Western-Blot Analysen bestätigten auf Proteinebene die verminderte Expression in den aus Metastasen gewonnenen Zelllinien (Neef et al., 2002). Dies ließ vermuten, dass beim malignen Melanom die PHLDA1-Expression während der Tumorprogression herunterreguliert wird.

Das PHLDA1-Gen ist auf Chromosom 12q15 lokalisiert (Kuske und Johnson, 2000). Es enthält ein Exon mit einem offenen Leserahmen, der für ein potentielles Protein von ca. 46 kDa kodiert. Sequenzanalysen ließen keine Transmembranregion in der Proteinsequenz erkennen. Ebenso waren keine großen Sequenzhomologien zu anderen Genen nachweisbar. Das PHLDA1-Protein enthält neben einer potentiellen Kernlokalisationssequenz Q-(opa), PQ- und PH-Domänen, wie sie häufig bei Transkriptionsfaktoren vorkommen. Eine direkte Beteiligung an der Transkription erscheint jedoch zunehmend unwahrscheinlich.

PHLDA1 lässt sich sowohl durch Serum und Mitogene, als auch durch Phorbolester (z.B. PMA, Phorbol 12 Myristate 13-Acetate), Cycloheximid-unabhängig, d.h. ohne de novo Proteinsynthese, stimulieren, sodass eine Zuordnung zur Gruppe der „immediate early response gene“ sinnvoll erscheint. Hierbei handelt es sich um eine Gruppe von Genen, deren mRNA-Expression Minuten nach Mitogenstimulation aktiviert wird (Lau und Nathans, 1987). Die Herstellung eines monoklonalen Antikörpers in unserem Labor ermöglichte die immunhistochemische Untersuchung menschlicher melanozytärer Läsionen unterschiedlichen Malignitätsgrades auf ihre PHLDA1-Expression. Dabei zeigten normale Hautmelanozyten keine Reaktivität, während bei gutartigen melanozytären Läsionen (Nävi) ein starkes, gleichmäßiges Expressionsmuster auffiel. Bösartige melanozytäre Läsionen (Primärtumoren und Metastasen) allerdings zeigten im Vergleich zu ihren benignen Vorläufern ein wesentlich schwächeres, wie auch inhomogeneres Färbeverhalten. Am geringsten war hierbei die PHLDA1-Expression in Metastasen. Dieses abnehmende Expressionsmuster von Nävi über

Primärtumoren hin zu Metastasen stützte wiederum die Annahme, dass PHLDA1 in Nävi hochreguliert ist und zu deren gutartiger Natur beiträgt, während ein abnehmendes Expressionsmuster mit der Progression hin zu maligneren Stadien einhergeht.

Durch Untersuchung stabiler PHLDA1-exprimierender Transfektanten konnte an zwei Zelllinien gezeigt werden, dass die Expression von PHLDA1 mit einer Abnahme von Zellwachstum, Klonierungseffizienz und Koloniebildung einhergeht, allerdings ohne eine nachweisbare Veränderung von Zellzyklusparametern. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist, dass die PHLDA1-Expression den programmierten Zelltod beeinflusst. In der Tat konnten Neef et al. zeigen, dass bei PHLDA1 exprimierenden Transfektanten eine deutlich erhöhte Apoptoserate vorlag. Unter normalen Wachstumsbedingungen war in den PHLDA1 exprimierenden Zelllinien der TdT (Terminale Desoxyribonukleotid Transferase)-abhängige Einbau von dUTP (2'-Deoxyuridin 5'-Triphosphat), wie auch die Oberflächenexpression von V-Annexin im Vergleich zu Kontrollzelllinien deutlich erhöht, beides Beobachtungen, die auf eine gesteigerte basale Apoptoserate PHLDA1-exprimierender Zellen hinweisen. Da Apoptoseresistenz ein wesentliches Merkmal des malignen Melanoms beim Menschen darstellt und als Ursache für die ausgeprägte Resistenz gegenüber Chemotherapeutika angesehen wird (die oftmals ihre Wirkung über die Induktion von Apoptose entfalten), liegt die Vermutung nahe, dass der Verlust der PHLDA1-Expression bei fortgeschrittenen Tumorstadien zu dieser Eigenschaft beiträgt. Tatsächlich konnte demonstriert werden, dass PHLDA1-exprimierende Melanomtransfektanten deutlich sensibler gegenüber Chemotherapeutika wie Doxorubicin und Captothecin waren als Kontrolltransfektanten.

Darüber hinaus wurde auch für die PHLDA1-Homologe bei Ratte (PQR) und Maus (TDAG51) eine Rolle bei der Apoptose beschrieben.

Das murine PHLDA1-homolog TDAG51 (T-Cell death associated gene 51) ist auf Aminosäureebene zu 85% identisch zu menschlichem PHLDA1. Es konnte gezeigt werden, dass TDAG51 eine wesentliche Funktion beim T-Zellrezeptor (TCR) aktivierten Zelltod einnimmt (Park et al., 1996). Um immunologische Selbst-Toleranz zu erreichen, werden T-Zellen, die während ihrer Entwicklung im Thymus ihre eigenen Antigene erkennen (d.h. autoreaktive Zellen), durch Apoptose eliminiert (Kappler et al., 1987). Als Modell für diesen Prozess verwendeten Park et al. eine T-Zell-Hybridomzelllinie, die nach Stimulation ihres TCR Interleukin-2 produzierte, Fas und Fas Ligand (FasL) hochregulierte und anschließend apoptotisch wurde. Anhand dieses Modellsystems gelang es Park et al. durch Eliminierung der TDAG51-Expression und anschließender cDNA-Transfektion, zu zeigen, dass bei der

direkten Auslösung von Apoptose über die TCR-vermittelte Fas-Hochregulation die TDAG51-Expression absolut notwendig ist.

Im Rahmen einer Untersuchung zur Apoptoseregulation neuronaler Zellen während der Differenzierung, konnte das Rattenhomolog von PHLDA1 (PQR für proline and glutamine rich) identifiziert werden (Gomes et al., 1999), welches auf Aminosäureebene zu 80% mit humanen PHLDA1 übereinstimmt. Gomes et al. konnten zeigen, dass PQR während der Differenzierung neuronaler Zellen induziert ist. Durch Mikroinjektionen eines neutralisierenden, gegen PQR gerichteten Antikörpers, konnte die Zahl der überlebenden Zellen um 50% erhöht werden, was den Schluss nahe legte, dass PQR, wie auch sein muriner Verwandter TDAG51, an der Apoptoseregulation beteiligt ist.

Der Begriff Apoptose (apoptosis: griechisch für das Fallen der Blätter von den Bäumen) oder programmierter Zelltod bezeichnet hierbei einen in allen Geweben des menschlichen Körpers ablaufenden physiologischen Prozess zur Regulierung der Zellzahl. Sie tritt nicht nur nach Zellschäden und Schäden an der DNA auf, sondern ist auch bei der Embryonalentwicklung von wesentlicher Bedeutung. Fehler in der Regulation oder Ausführung dieses Programms hat Autoimmunerkrankungen oder Neoplasien zur Folge, überschießende Apoptose wird unter anderem für die Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen verantwortlich gemacht (Delhalle et al., 2003).

Ausgelöst durch eine Vielzahl physiologischer Stimuli stellt sie ein Programm dar, bei dessen Ablauf es zu einer Abfolge präzise festgelegter Schritte kommt (Aufbrechen der Zellmembran, Zerlegung des Zytoskeletts, Ausstoßung des Zytosols, Abbau der Chromosomen, Fragmentierung des Zellkerns und Aufnahme des zusammengeschrumpften Rests durch Zellen des umgebenden Gewebes), die innerhalb kurzer Zeit zur Beseitigung der betroffenen Zelle führen (Wyllie et al., 1980).

Die an diesem Prozess beteiligten Komponenten einer Zelle lassen sich allgemein in Sensoren und Effektoren unterteilen, wobei die Sensoren für die Aufnahme von Signalen, die darüber entscheiden, ob die betroffene Zelle leben oder sterben soll, zuständig sind, während die Effektoren den eigentlichen Prozess der Apoptose steuern.

Zu den Sensoren gehören zum einen Zelladhäsionsmoleküle, die bei einem Verlust der Verankerung im Zellverband Apoptose auslösen können, zum anderen aber auch Rezeptoren der TNF-Familie wie der TNF-Rezeptor oder der Fas-Rezeptor (CD95/Apo1) (Ashkenazi und Dixit, 1999). Ein prominentes Beispiel für intrazelluläre Sensoren ist p53, ein für die

Aufrechterhaltung der genomischen Integrität nach DNA-Schäden verantwortliches Tumor Supressor Protein. Als Effektoren fungieren spezifische Proteasen (Caspasen), die über Adaptormoleküle die Signale der Sensoren erhalten (Thornberry and Lazebnik, 1998).

Hierbei werden zwei unterschiedliche Signalwege unterschieden, der Extrinsische und der Intrinsische. Während beim extrinsischen Signalweg die Apoptoseinduktion durch die Stimulation membranständiger Rezeptoren vermittelt wird, handelt es sich beim intrinsischen Weg um eine mitochondriale Signalkaskade, zu deren Auslösern u.a. oxidativer Stress und zytotoxische Pharmaka gehören (Lawen, 2003).

Der intrinsische Weg der Apoptosekaskade läuft über die Mitochondrien. Antiapoptotische Moleküle der Bcl2-Familie (Bcl2, Bcl-X_L, CED9) sind in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert und verhindern die Freisetzung von Cytochrom-C. P53 kann die Apoptose durch Transkription des proapoptotischen, ebenfalls zur Bcl2-Familie gehörenden Moleküls Bax, auslösen. Bax und Bad hemmen die Wirkung von Bcl2 und tragen so zur Freisetzung von Cytochrom-C bei. Dadurch wird die Konformation von Apaf1 (apoptosis activating factor-1) geändert, wodurch seine caspase recruiting domain (CARD) aktiviert wird, welche die Procaspase-9 in die Caspase-9 überführt, die dann wiederum die Effektorcaspasen rekrutiert (Adams und Cory, 1998; Hengartner, 2001).

Der extrinsische Weg wird über sogenannte Todesrezeptoren vermittelt. Ein wichtiger Vertreter dieser Gruppe ist der Fas-Rezeptor. Hierbei handelt es sich um einen auf einer Vielfalt von Zellen exprimierten Typ 1 Transmembran-Rezeptor aus der Familie der TNF-Rezeptoren. Seine Expression kann durch Zytokine wie Interferon Gamma und TNF, aber auch durch lymphozytenvermittelte Aktivierung hochreguliert werden. Interaktionspartner für Fas und damit Auslöser für die Fas-gesteuerte Apoptose ist der Fas-Ligand, ein membranständiges Cytokin aus der TNF-Familie. Der Fas-Ligand wird im Vergleich zu seinem Interaktionspartner ungleich selektiver gebildet. So eliminieren zum Beispiel zytotoxische T-Lymphozyten virusinfizierte Zellen durch Interaktion ihrer Fas-Liganden mit Fas-Rezeptoren auf der Oberfläche ihrer Zielzellen (Krammer, 2000). Dabei trimerisiert der Fas-Rezeptor nach Fas-Ligandbindung und rekrutiert als Adaptermolekül FADD (Fas associated death domain), das wiederum die Procaspase-8 aktiviert. Dadurch werden in einer Caspasenkaskade die Effektorcaspasen aktiviert (Ashkenazi und Dixit, 1998), die letztendlich Strukturproteine (z.B. Actin, Zytokeratin-18, Laminine) sowie Signalproteine (MEKK1, PKCd, MDM2, Rb) spalten und die DNA fragmentieren (Tan und Wang, 1998).

Wie PHLDA1 in die Regulation der Apoptose eingreift konnte bisher noch nicht abschließend geklärt werden. So wurde an T-Hybridomzellen für TDAG51 eine Apoptoseauslösung über die Induktion von Fas beschrieben (Park et al., 1996). Für das Ratten-Homolog PQR hingegen war keine Assoziation zur Fas-Expression feststellbar (Gomes et al., 1999). Auch bei der Untersuchung der in unserem Labor aus Melanomzelllinien generierten stabilen PHLDA1-Transfektanten bestand kein Zusammenhang zwischen PHLDA1- und Fas-Expression. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die PHLDA1-Transfektanten mehr gespaltene Caspase 9 und PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymerase) exprimierten als die Kontrolltransfektanten, was für eine Rolle von PHLDA1 beim intrinsischen Weg der Apoptosekaskade spricht (Neef et al., 2002).

Die Erkenntnis, dass Apoptose eine wichtige Barriere für die Entstehung von Tumoren darstellt, reicht zurück ins Jahr 1972, als es Kerr, Wyllie und Currie gelang zu zeigen, dass die Zellen hormonabhängiger Tumoren unter Hormonentzug in großer Zahl apoptotisch wurden (Kerr et al., 1972). Mittlerweile sind für alle bekannten Ebenen der Apoptoseregulation und Ausführung entsprechende Umgehungsstrategien in Tumoren bekannt. So entzieht sich zum Beispiel eine große Zahl aus Lungen- und Dickdarmkarzinomen gewonnener Zelllinien dem oben beschriebenen Fas-vermittelten Todessignal durch verstärkte Expression eines nicht signalleitenden Fas-Rezeptors (Pitti et al., 1998). Da der zytotoxische Effekt vieler Chemotherapeutika auf Apoptoseinduktion beruht, liegt nahe, dass mangelndes Ansprechen auf Chemotherapie häufig auf Fehler im Apoptoseprogramm zurückzuführen ist (Lowe und Lin, 2000).

Veränderungen in der Funktion von Apoptose spielen somit sowohl bei der Entstehung von kolorektalen Karzinomen, als auch bei der Resistenzentwicklung gegenüber Chemotherapeutika und Strahlentherapie eine wesentliche Rolle (Watson, 2004).

1.1 Zielsetzung der Arbeit:

PHLDA1 ist ein „immediate early response“ Gen und ist in normalen Zellen transient induziert, z.B. durch Wachstumsfaktoren oder TCR-Stimulation (Park et al., 1996). Immunhistochemische Untersuchungen an menschlichem Gewebe zeigten in normaler Haut und Lymphknoten keine erkennbare Expression auf Leukozyten, Epithelzellen und Gefäßen, wie es für transient induzierte Proteine häufig der Fall ist (Soussi, 2000). Auffällig war indessen eine starke Expression von PHLDA1 bei gutartigen Nävi und eine deutliche Expression bei Melanomen. Diese Beobachtungen deuten auf eine veränderte Regulation der PHLDA1-Expression in melanozytären Läsionen hin (Neef et al., 2002). Die Herunterregulation der PHLDA1-Expression im Zuge der Tumorprogression von Nävus über Primärtumor hin zur Metastase unterstreicht hierbei eine mögliche Rolle dieses Moleküls bei der Apoptoseresistenz dieser Tumoren.

In den bislang besprochenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die PHLDA1-Expression in verschiedenen Modellsystemen an der Apoptose beteiligt ist. Eine Assoziation zur Fas-Expression war hierbei nicht immer festzustellen (Park et al., 1996; Gomes et al., 1999; Neef et al., 2002).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, festzustellen, ob dieses ungewöhnliche Expressionsmuster nur bei melanozytären Tumoren vorliegt, oder auch bei Tumoren epithelialen Ursprungs seine Entsprechung findet. Zu diesem Zweck wurden Gewebeproben normaler Kolonschleimhaut und Kolonkarzinome auf ihre PHLDA1-Expression hin untersucht. Darüber hinaus sollte geprüft werden, ob die für das murine PHLDA1-Homolog TDAG51 bei aktivierten T-Lymphozyten gezeigte Assoziation von PHLDA1- und Fas-Expression auch bei Kolonkarzinomen anzutreffen ist.

2 Material und Bezugsquellen:

2.1 Gewebe:

Bei den untersuchten Geweben handelt es sich um intraoperativ gewonnene Präparate, die unmittelbar nach Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80 Grad C gelagert wurden. Alle Gewebeproben stammen aus der Gewebebank der Chirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Großhadern, München. Die Gewebeproben normaler Kolonschleimhaut sind (histopathologisch bestätigt) bei Tumorpatienten entnommene Proben nicht tumorös veränderter Schleimhaut. Bei den Tumoren handelt es sich bis auf eine Ausnahme (Rezidiv) immer um Primärtumoren. Alle Patienten hatten die Diagnose eines kolorektalen Karzinoms (colorectal cancer, CRC). Über das Stadium der Erkrankung beim jeweiligen Patienten lagen keine Informationen vor. Die Entnahmestelle ist durch die Angaben Coecum, Kolon, Sigma, Kolorektum und Rektum bezeichnet. Die Gefriernummer entspricht der Systematik der Gewebebank Großhadern; die Gewebenummer wurde für die Auswertung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit verwendet.

2.1.1 Normale kolorektale Schleimhaut:

| Gewebenummer | Gefriernummer | Gewebeart | Gewebenummer | Gefriernummer | Gewebeart |
|--------------|---------------|--|--------------|---------------|------------------------------|
| 1 | 2411b | Normale Schleimhaut (Kolon) | 2 | 2674 | Normale Schleimhaut (Kolon) |
| 3 | 1035 | Normale Schleimhaut (Kolon descendens) | 4 | 1051 | Normale Schleimhaut (Kolon) |
| 5 | 2381b | Normale Schleimhaut Coecum) | 6 | 2629 | Normale Schleimhaut (Kolon) |
| 7 | 2200 | Normale Schleimhaut (Sigma) | 8 | 1035 | Normale Schleimhaut (Sigma) |
| 9 | 1023 | Normale Schleimhaut (Sigma) | 10 | 1145 | Normale Schleimhaut (Rektum) |
| 11 | 1125 | Normale Schleimhaut (Coecum) | 12 | 1101 | Normale Schleimhaut (Rektum) |
| 13 | 31 | Normale Schleimhaut (Kolon) | 14 | 1129 | Normale Schleimhaut (Sigma) |

| | | | | | |
|-----------|------|------------------------------|-----------|------|---|
| 15 | 1073 | Normale Schleimhaut (Coecum) | 16 | 1090 | Normale Schleimhaut (kolorektaler Übergang) |
| 17 | 1094 | Normale Schleimhaut (Rektum) | 18 | 843 | Normale Schleimhaut (Sigma) |
| 19 | 1052 | Normale Schleimhaut (Sigma) | | | |

2.1.2 Kolorektale Karzinome:

| Gewebenummer | Gefriernummer | Gewebeart | Gewebenummer | Gefriernummer | Gewebeart |
|--------------|---------------|----------------------------|--------------|---------------|-----------------------|
| 1 | 844 | Kolonkarzinom | 2 | 838 | Kolonkarzinom |
| 3 | 2411 | Kolonkarzinom | 4 | 2674 | Kolonkarzinom |
| 5 | 1035 | Kolonkarzinom (descendens) | 6 | 1051 | Kolonkarzinom |
| 7 | 2381a | Kolonkarzinom (Coecum) | 8 | 2629 | Kolonkarzinom |
| 9 | 2200 | Kolonkarzinom (Sigma) | 10 | 1007 | Kolonkarzinom |
| 11 | 1042 | Kolonkarzinom | 12 | 1074 | Kolonkarzinom (Sigma) |
| 13 | 1080 | Rectumkarzinom | 14 | 1014 | Kolonkarzinom |
| 15 | 1015 | Kolonkarzinom | 16 | 1057 | Kolonkarzinom |
| 17 | 1143 | Rectumkarzinom | 18 | 1121 | Rectumkarzinom |

| | | | | | |
|-----------|------|-------------------------------|-----------|------|--------------------------------|
| 19 | 1112 | Rectum- karzinom | 20 | 831 | Kolon- karzinom (Coecum) |
| 21 | 787 | Kolon- karzinom (Sigma) | 22 | 36 | Rectum- karzinom |
| 23 | 1123 | Rectum- karzinom | 24 | 1083 | Kolon- karzinom (Coecum) |
| 25 | 842 | Kolon- karzinom | 26 | 1072 | Rectum- karzinom |
| 27 | 1065 | Rectum- karzinom | 28 | 1082 | Kolon- karzinom |
| 29 | 1087 | Kolo- rektales Karzinom | 30 | 1104 | Rectum- karzinom |
| 31 | 761 | Rectum- karzinom | 32 | 847 | Kolon- karzinom (Sigma) |
| 33 | 837 | Rectum- karzinom | 34 | 856 | Kolon- karzinom |

2.2 Sekundärantikörper/Antikörperkonjugate:

| Bezeichnung | Eingesetzte Verdünnung | Herkunft/Hersteller |
|---|-------------------------------|---------------------------------------|
| Biotinylated Broad Spectrum anti mouse IgG Antibody | 1:2 in 1% BSA-PBS | Histostain, Zymed, San Francisco, USA |
| Streptavidin-Peroxidase Konjugat | 1:500 in 1% BSA-PBS | Roche, Mannheim |

2.3 Monoklonale Antikörper:

| Spezifität | Klon | Isotyp | Verdünnung bzw. eingesetzte Konzentration | Herkunft |
|--------------------------------|-------------|--------|---|--|
| 2.3.1 Isotypkontrollen | | | | |
| murines H-2 | 11-4-1 | IgG2a | Hybridomüberstand, unverdünnt | G. Hammerling, Heidelberg |
| Beta-2-6-linked fructosan | UPC-10 | IgG2a | 20µg/ml | Sigma, Deisenhofen |
| gp75 | 1e8 | IgG1 | Hybridomüberstand, unverdünnt | Institut für Immunologie, LMU München |
| 2.3.2 Infiltratmarker | | | | |
| humanes CD45 | GAP8.3 | IgG2a | Hybridomüberstrand, unverdünnt | ATCC, Manassas, VA, USA |
| 2.3.3 Epithelzellmarker | | | | |
| EpCam | M79 | IgG2a | Hybridomüberstrand, unverdünnt | Institut für Immunologie, LMU München |
| 2.3.4 Testantikörper | | | | |
| humanes Fas (CD95/Apo1) | DX2 | IgG1 | 10 µg/ml | Pharmigen, San Diego, CA, USA |
| PHLDA1 | RN6e2-b9-a4 | IgG2a | Hybridomüberstand, unverdünnt | Institut für Immunologie, LMU München, R. Neef |
| Ki-67 | Ki-67 | IgG1 | 1:100 | DAKO, Hamburg |

2.4 Chemikalien:

| | |
|--------------------------|----------------------|
| Aceton reinst | (Merck, Darmstadt) |
| 3-Amino-9-Ethylcarbazol | (Sigma, Deisenhofen) |
| Wasserstoffperoxid 30% | (Merck, Darmstadt) |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | (Merck, Darmstadt) |
| Rinderserumalbumin (BSA) | (Sigma, Deisenhofen) |
| Natriumazid | |
| Humanes Immunglobulin | (Sigma, Deisenhofen) |

2.5 Kommerzielle Analysensysteme und vorgefertigte Lösungen:

| | |
|--------------------------|--|
| Hämatoxylinlösung | (Sigma, Deisenhofen) |
| Kaisers Glyceringelatine | (Merck, Darmstadt) |
| Tissue freezing medium | (Leica, Bensheim) |
| Histostain-Kit | (Zymed, San Francisco, USA) |
| Blocking-Kit | (Vector Laboratories, Burlingame, USA) |

2.6 Allgemeine Puffer und Lösungen:

| | |
|-------------------------------|---|
| <u>1%-(m/v) BSA-PBS:</u> | 0,5 g BSA auf 50 ml PBS, sterilfiltrieren PBS +0,01% Natrium Azid |
| <u>Hitzeaggregiertes IgG:</u> | menschliches IgG (Sigma) 1 mg/ml in H ₂ O lösen, 45 Minuten bei 60 Grad erhitzen, aliquotieren und bei -20 Grad lagern |
| <u>Peroxidaselösung</u> | 0,2% in 1% BSA-PBS |
| <u>Carbazollösung:</u> | 1,5 molare 3-Amino-9-Ethylcarbazol-Lösung mit 0,025 molarem Azetatpuffer (pH 5,0) plus 0,04% H ₂ O ₂ , |
| <u>PBS pH 7,2:</u> | 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , 137 mM NaCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ |

2.7 Verbrauchsmaterial:

| | |
|--|---------------------------------|
| Fettstift (DAKO-Pen) | (Dako, Hamburg) |
| Eppendorf Reaktionsgefäße (1,5ml, 2ml) | (Eppendorf, Hamburg) |
| Objektträger und Deckgläser | (Schleicher und Schüll, Dassel) |
| Pipettenspitzen | (Sarstedt, Nümbrecht) |
| Pipetten | |
| Feuchte Kammer | |
| Alufolie | |
| Präparatekästen | |

2.8 Geräte:

| | |
|-------------------------------------|----------------------------|
| Trockeninkubator (30/37°C) | (Ehert, Emdingen) |
| Mikrowelle | (Siemens, München) |
| Mikroskop Dialux 20 | (Leitz, München) |
| Fotoautomat für Mikroskop Dialux 20 | (Wild, Heerbrugg, Schweiz) |
| Präzisionswaage HL32 | (Mettler, Gießen) |
| Mikrotom (Frigocut 2800) | (Leica, Bensheim) |
| Wasserbad | (GLW, Würzburg) |

3 Methoden:

3.1 Herstellen von Gewebeschnitten:

Die menschlichen Gewebeproben wurden von der Lagerung bei –80 Grad C in den Kryostaten bei –30 Grad C überführt und mit tissue freezing medium eingebettet. Es wurden 5 Mikrometer dicke serielle Schnitte angefertigt, auf Objektträger gezogen und über Nacht (mindestens aber 2 Stunden bei Raumtemperatur oder 30 min bei 37 Grad) bei Raumtemperatur getrocknet. Eine weitere Lagerung der Gefrierschnitte war durch Alufolie vor direkten Kälteschäden geschützt, bei –80 Grad C möglich. Die so gelagerten seriellen Gewebeschnitte wurden vor ihrer Weiterverarbeitung 30 min bei Raumtemperatur aufgetaut.

3.2 Immunhistochemie:

Die Gewebeschnitte wurden mit einem Streptavidin-Biotin amplifizierten indirekten Immunperoxidaseverfahren gefärbt.

Hierbei wird zunächst ein gegen das nachzuweisende Antigen gerichteter Primärantikörper auf das Gewebe aufgebracht. Sodann wird ein zweiter, gegen diesen Primärantikörper gerichteter Antikörper zugegeben, der mit Biotin markiert ist. Als dritter Schritt wird ein Streptavidin-Peroxidasekonjugat beigegeben, welches an Biotin bindet und das zuletzt zugegebene Farbsubstrat umsetzt (Abbildung 3.1).

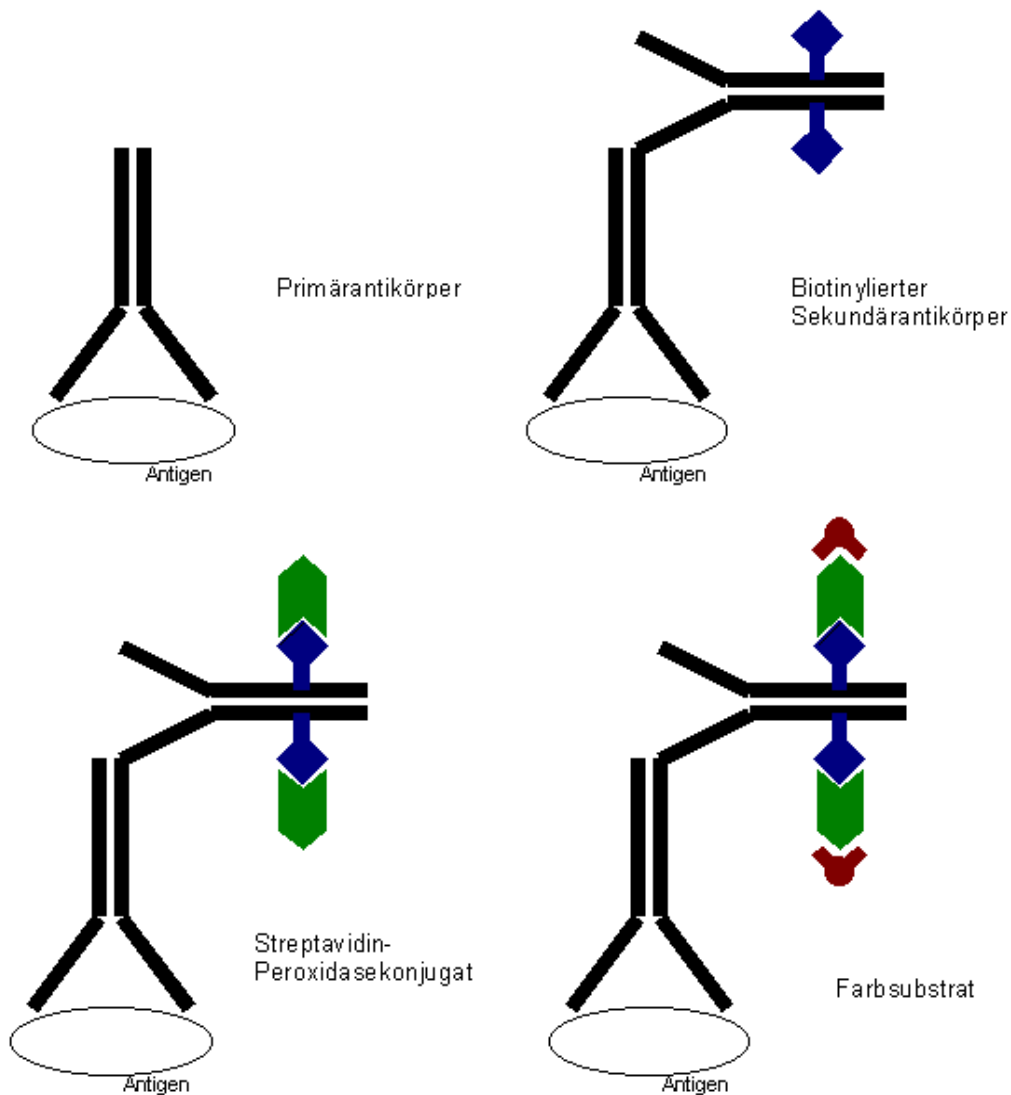


Abbildung 3.1 Immunperoxidasefärbung

Die zu färbenden Gewebeschnitte wurden 5 Minuten mit Aceton fixiert. Danach wurden die Objektträger kurz (ca. 60 Sekunden) unter dem Abzug getrocknet. Die Gewebeschnitte wurden auf dem Objektträger mit Fettstift umrandet, um das Verlaufen der Antikörperlösung zu verhindern. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Zunächst wurden die Gewebeschnitte 5 Minuten mit der Avidin-Komponente des verwendeten Blocking Kits (Vector) behandelt und danach dreimal mit PBS gewaschen. Es folgten weitere 5 Minuten mit der Biotin-Komponente, woraufhin wieder dreimal mit PBS gewaschen wurde. Zweck dieser Vorbehandlung war es, unspezifische Bindung der eingesetzten Streptavidin-Peroxidase an endogenes Biotin oder der Biotin-gekoppelten Antikörper an Biotin-bindende Proteine zu verhindern. Die vom Hersteller

empfohlenen 15 Minuten Inkubationszeit pro Komponente wurde, bei nach eingehender Testung gleichbleibenden Ergebnissen im Bezug auf die angestrebte Reduktion unspezifischer Bindungen und wesentlich weniger Gewebeschäden, auf 5 Minuten reduziert. Weiterhin wurden die Gewebeschnitte 15 Minuten mit aggregiertem, humanen IgG (100 µg/ml in 1%-BSA-PBS) inkubiert, um die Fc-Rezeptoren zu beladen und so Bindungen der spezifischen Antikörper an die Fc-Rezeptoren zu verhindern. Danach wurde die überschüssige Flüssigkeit auf den Objektträgern abgeklopft. Der 1. Antikörper wurde vor dem Auftragen mit 100 µg/ml aggregiertem IgG versetzt. Die Inkubationszeit betrug 1 Stunde. Danach wurde dreimal mit PBS gewaschen, wobei sowohl die mit der Positivkontrolle, als auch die mit den Nachweisantikörpern inkubierten Gewebeschnitte getrennt von den entsprechenden Isotypkontrollen gewaschen wurden, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Im Folgenden wurde der 2. Antikörper (ein biotinylierter Anti-Maus-Antikörper) aufgetragen und 15 Minuten auf den Gewebeschnitten belassen. Erneut wurde dreimal mit PBS gewaschen. Als Enzym wurde Streptavidin-Peroxidase eingesetzt; die Inkubationszeit betrug wiederum 15 Minuten. Nach dreimaligem waschen mit PBS wurden die Gewebeschnitte fünf Minuten mit Substratlösung im zuvor auf 25 Grad C temperierten Wasserbad gefärbt. Daraufhin wurden die Gewebeschnitte zweimal in destilliertem Wasser gewaschen und 30 Sekunden bis eine Minute mit Hämatoxylinlösung gegengefärbt. Die Präparate wurden in Leitungswasser gewaschen bis keine Blaufärbung im Spülwasser mehr zu erkennen war und dann 10 Minuten in der gefüllten Küvette zum Nachbläuen belassen. Um Kalkflecken auf den Präparaten zu vermeiden, wurden sie anschließend mit deionisiertem Wasser abgespült.

Die Schnitte wurden getrocknet und mittels zuvor in der Mikrowelle verflüssigter Glyceringelatine mit Deckgläsern versehen.

Die weitere Lagerung der Präparate erfolgte in lichtundurchlässigen Präparatekästen, um ihr Ausbleichen zu verhindern.

3.3 Auswertung

Die Gewebeschnitte wurden am Lichtmikroskop ausgewertet. Hierbei wurden zunächst die mit Anti-EpCam Antikörper gefärbten Schnitte beurteilt. In der vorliegenden Arbeit waren sowohl bei normaler kolorektaler Schleimhaut, wie auch bei den untersuchten kolorektalen Karzinomen alle Zellen, die sich nach histologischen Kriterien als Enterozyten identifizieren ließen EpCam positiv, so dass EpCam als Positivkontrolle und somit als Grundlage für das Abschätzen der Anteile PHLDA1 bzw. Fas positiver Enterozyten diente. Die Anzahl der gefärbten Enterozyten in der Positivkontrolle wurde mit 100% der Enterozyten angesetzt. In

den mit Anti-PHLDA1 bzw. Anti-Fas gefärbten Gewebeschnitten wurden dann zunächst die in der Positivkontrolle identifizierten Zellpopulationen aufgesucht und der Anteil gefärbter Zellen im Vergleich zur Positivkontrolle in Prozent geschätzt. Die Auswertung des Anteils der gefärbten Zellen erfolgte in den Stufen 0%, <10%, 10-25%, >25-50%, >50-80% und >80%.

Analog zum Anteil der gefärbten Zellen wurde die Intensität der Färbung, d.h. ihre Stärke, in den Abstufungen 0 (nicht nachweisbar), 1 (schwach), 2 (mittel), 3 (stark) und 4 (sehr stark) eingestuft.

Mit diesen Auswertungsstufen gelang eine gute Reproduzier- und Vergleichbarkeit der Auswertungsergebnisse.

Nachfolgend wurden die untersuchten Gewebe mit den Isotypkontrollen verglichen. Hierbei handelt es sich um Gewebeproben, die mit gegen nicht im Gewebe vorkommende Antigene gerichteten Primärantikörpern behandelt wurden. So konnten unspezifische Bindungsphänomene, wie sie z.B. durch Bindung an Fc-Rezeptoren entstehen, zuverlässig von spezifischen Antigen-Antikörper-Bindungen abgegrenzt werden.

Sämtliches Gewebe wurden mindestens zwei mal gefärbt und getrennt ausgewertet. Traten bei der Auswertung Unterschiede von mehr als einer Abstufung auf, so wurde die Färbung ein weiteres mal wiederholt und das jeweils von den anderen beiden abweichende Ergebnis aus der Auswertung ausgeschlossen. Bei einem Unterschied der Auswertungsergebnisse von nur einer Auswertungsstufe wurde auf eine dritte Färbung verzichtet und der jeweils größere Wert übernommen, da aufgrund der Subjektivität des Verfahrens eine erneute Färbung in diesem Fall keine Verbesserung der Messgenauigkeit erbracht hätte.

Der statistische Vergleich der PHLDA1- und Fas-Expression wurde anhand des Fisher Exact Tests durchgeführt. Die Darstellung eines möglichen Zusammenhangs zwischen PHLDA1- und Fas-Expression erfolgte mittels einer Regressionsanalyse.

Für die vorliegende Arbeit wurden einzelne Präparate mit einer Aufsatzkamera in unterschiedlicher Vergrößerung fotografiert.

4 Ergebnisse:

Um die Expression von PHLDA1 und Fas in normaler kolorektaler Schleimhaut und kolorektalen Karzinomen zu untersuchen, wurden serielle Gefrierschnitte von humanen Gewebeproben hergestellt und immunhistochemisch gefärbt. Zur Anfärbung der so gewonnenen Gewebeschnitte wurden ein biotinylierter Anti-Maus-Antikörper, Streptavidin-Peroxidase sowie Carbazol als Substrat verwendet, um so die Bindung der monoklonalen Antikörper als rote Färbung sichtbar zu machen. Alle untersuchten Gewebe sind unter Material aufgelistet und näher charakterisiert.

Die Auswertung der Präparate erfolgte am Lichtmikroskop. Hierbei wurde die Anzahl der gefärbten Enterozyten bzw. Tumorzellen in Prozent mit den Abstufungen 0%, <10%, 10-25%, >25-50%, >50-80% und >80% geschätzt. Als Referenz hierfür diente das Färbeverhalten der Positivkontrolle (M79), einem Antikörper, der an EpCam (epithelial cellular adhesion molecule), einem sowohl auf normalen Enterozyten wie auch auf Tumorzellen vorkommenden transmembranen Glykoprotein, bindet. Die Intensität der Färbung, d.h. ihre Stärke, wurde in den Abstufungen 0 (nicht nachweisbar), 1 (schwach), 2 (mittel), 3 (stark) und 4 (sehr stark) abgeschätzt. Sämtliche Gewebe wurden mindestens zwei mal gefärbt und getrennt ausgewertet. Traten bei der Auswertung Unterschiede von mehr als einer Abstufung auf, so wurde die Färbung ein weiteres mal wiederholt und das jeweils von den anderen beiden abweichende Ergebnis aus der Auswertung ausgeschlossen. Bei einem Unterschied der Auswertungsergebnisse von nur einer Auswertungsstufe wurde auf eine dritte Färbung verzichtet und der jeweils größere Wert übernommen, da aufgrund der Subjektivität des Verfahrens eine erneute Färbung in diesem Fall keine Verbesserung der Messgenauigkeit erbracht hätte.

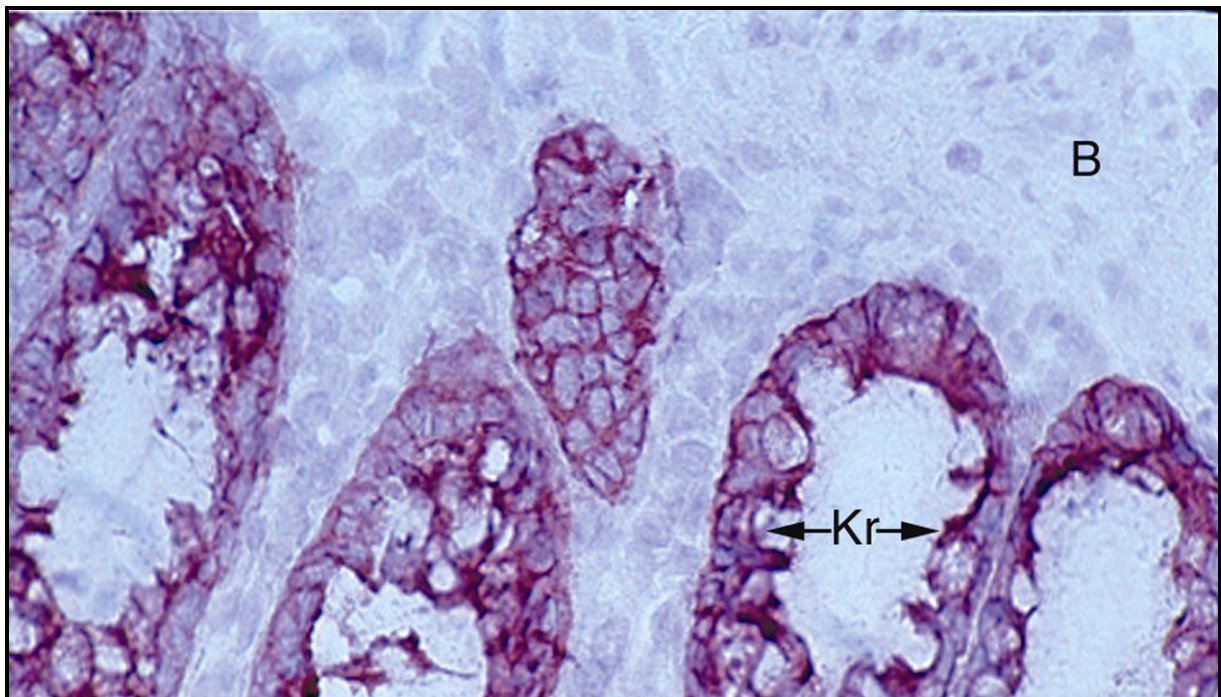
4.1 PHLDA1 und Fas Expression in normaler kolorektaler Schleimhaut:

Insgesamt wurden 19 Gewebeproben normaler kolorektaler Schleimhaut untersucht. Abbildung 4.1 zeigt ein repräsentatives Beispiel. Deutlich ist die Kryptenarchitektur zu erkennen, hier längs angeschnitten. Der vorliegende Bildausschnitt zeigt die Kryptenbasis. In Abbildung 4.1a wurde der gegen EpCam, einem auf Enterozyten exprimierten transmembranen Glykoprotein, gerichtete Antikörper M79 eingesetzt. Aufgrund seiner hohen Affinität zu Enterozyten, nicht aber zu den Zellen des umgebenden Bindegewebes, Leukozyten und der extrazellulären Matrix, eignet er sich als Positivkontrolle und war mit

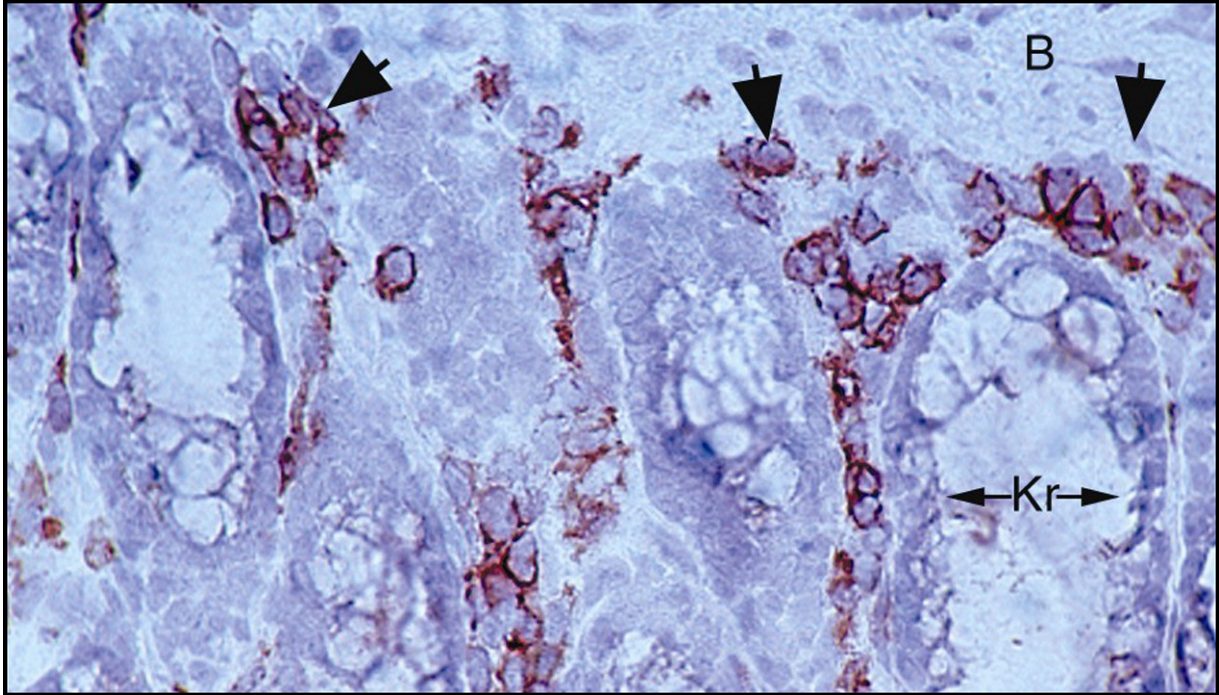
seinem Färbeverhalten Grundlage für die eingangs beschriebene prozentuale Schätzung des Anteils PHLDA1- bzw. Fas-positiver Zellen.

Auffällig ist vor allem die PHLDA1-Expression einiger weniger Enterozytenester in der basalen Proliferationszone der Krypten (Abbildung 4.1c, kurze Pfeile) bei sonst geringer PHLDA1-Expression der Enterozyten. Insgesamt war diese PHLDA1-Färbung einiger weniger Zellen an der Kryptenbasis bei 53% aller untersuchten Gewebeproben normaler kolorektaler Schleimhaut nachzuweisen. Alle PHLDA1-positiven Zellen zeigten ein zytoplasmatisches Färbemuster. Keine PHLDA1-Expression zeigten die Zellen des umliegenden Bindegewebes, glatte Muskelzellen, Gefäßendothelien sowie die extrazelluläre Matrix. In Abbildung 4.1b sind mit Hilfe des gegen CD45, einer auf Leukozyten aller Subklassen vorkommenden Phosphatase, gerichteten Antikörpers GAP8.3 die im Gewebe befindlichen Leukozyten dargestellt (kurze Pfeile). Der Vergleich mit Abbildung 4.1c zeigt, dass auch sie kein PHLDA1 exprimieren.

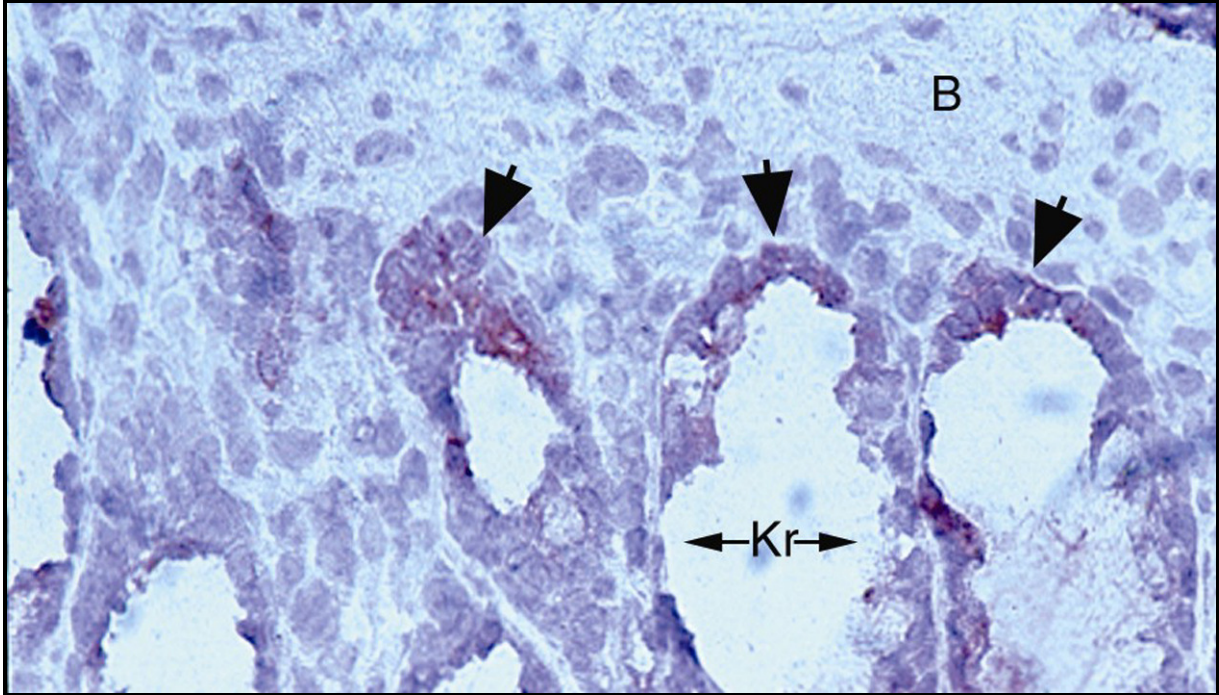
Im Gegensatz dazu war bei der überwiegenden Mehrzahl (94,7%) der gefärbten Gewebeproben normaler Kolonschleimhaut eine gleichmäßige und kräftige Fas-Expression fast aller Enterozyten festzustellen, wie in Abbildung 4.1d exemplarisch zu sehen (Abbildung 4.1e und f zeigen die Isotypkontrollen). Lymphozyten, Bindegewebszellen oder andere zelluläre bzw. azelluläre Strukturen außerhalb des Zellverbundes der Enterozyten zeigten keine Fas-Expression.



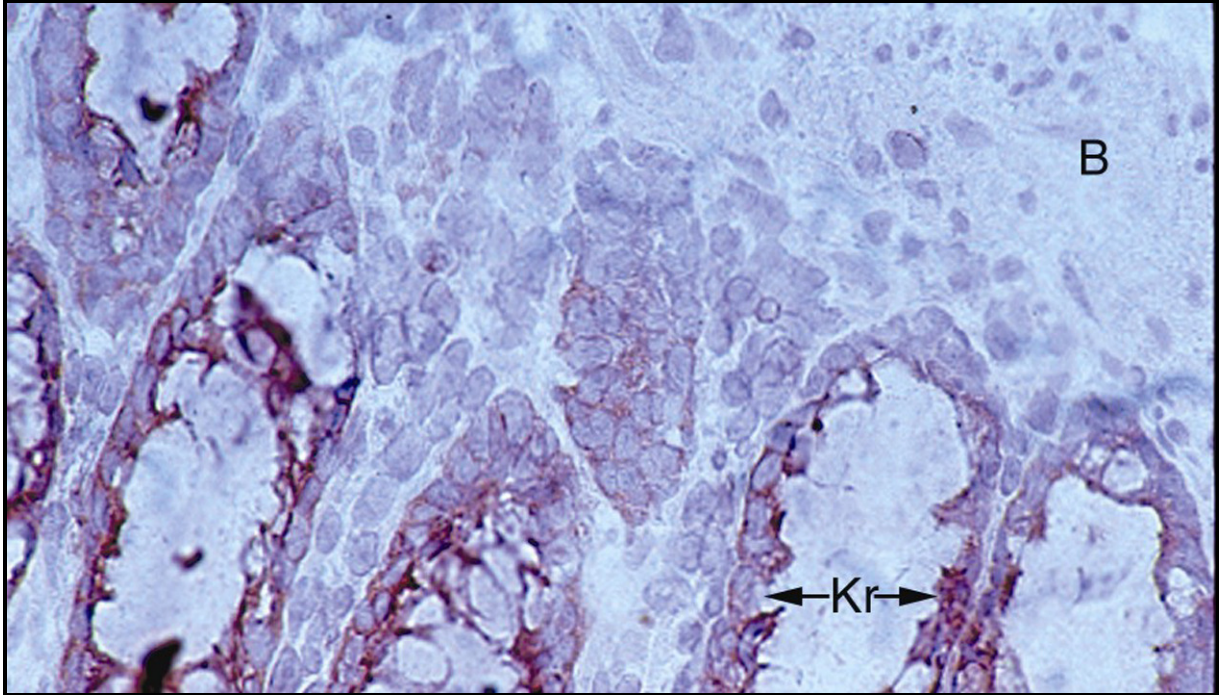
a) EpCam (400-fach)



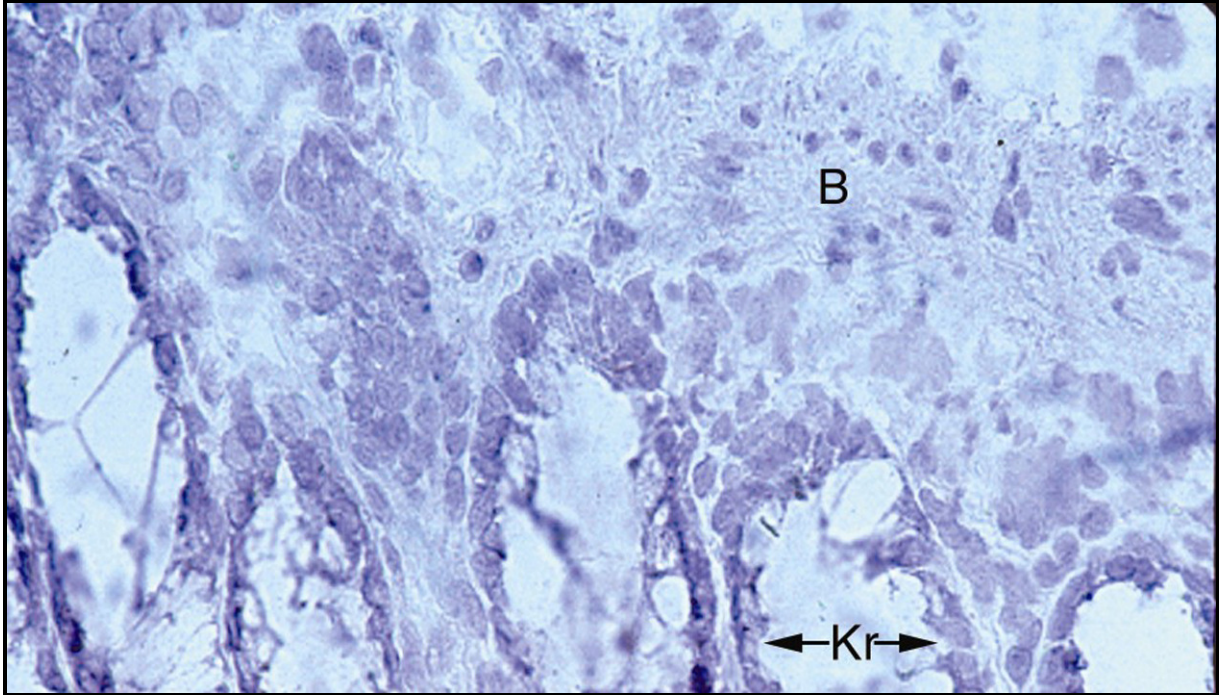
b) CD45 (400-fach)



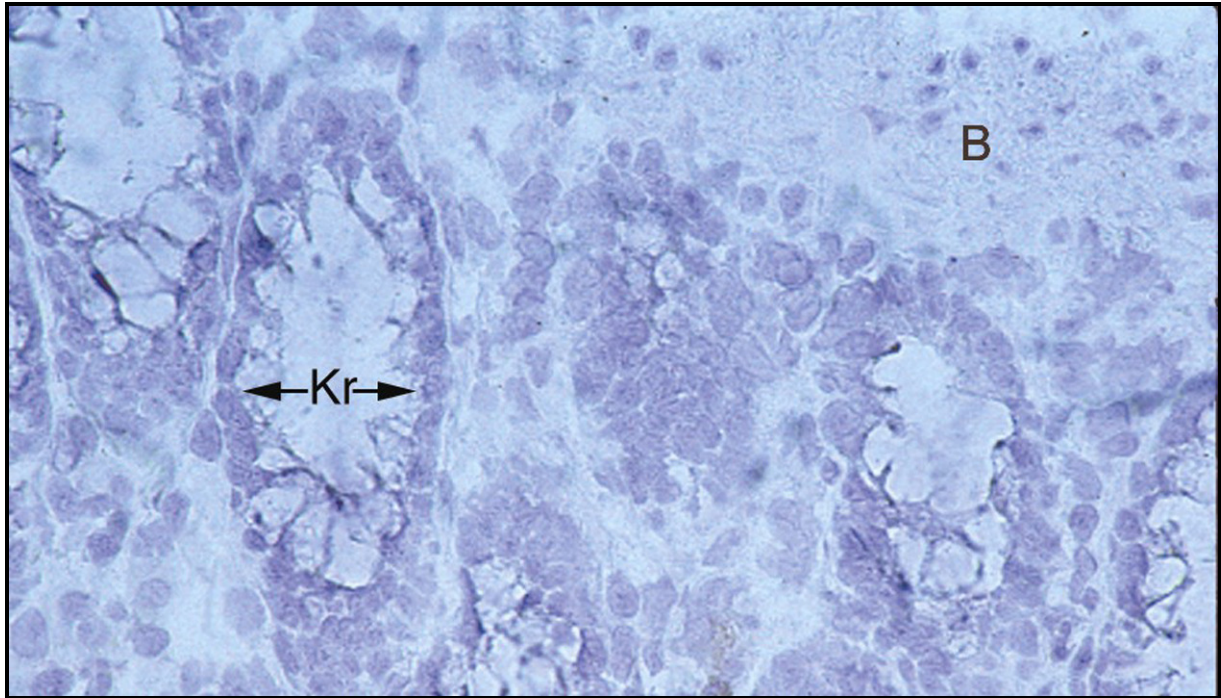
c) PHLDA1 (400-fach)



d) Fas (400-fach)



e) Isotypkontrolle IgG2a (400-fach)



f) Isotypkontrolle IgG1 (400-fach)

Abbildung 4.1 Immunhistochemisch gefärbte normale kolorektale Schleimhaut. Serielle Schnitte in 400-facher Vergrößerung. Gezeigt ist das Gewebe Nummer 10. Der Gewebeschnitt a) wurde mit dem Anti-EpCam-Antikörper M79, der Gewebeschnitt b) mit dem Anti-CD45-Antikörper GAP8.3 gefärbt. Gewebeschnitt c) wurde mit dem Anti-PHLDA1-Antikörper RN6e2 gefärbt und Bild d) zeigt einen mit Anti-Fas-Antikörper gefärbten Gewebeschnitt. Die Abbildungen e) und f) zeigen die Isotypkontrollen für IgG2a (e) und IgG1 (f). Kr: Kolonkrypten, B: Bindegewebe.

4.1.1 Vergleich zwischen PHLDA1 und Ki-67 Expression:

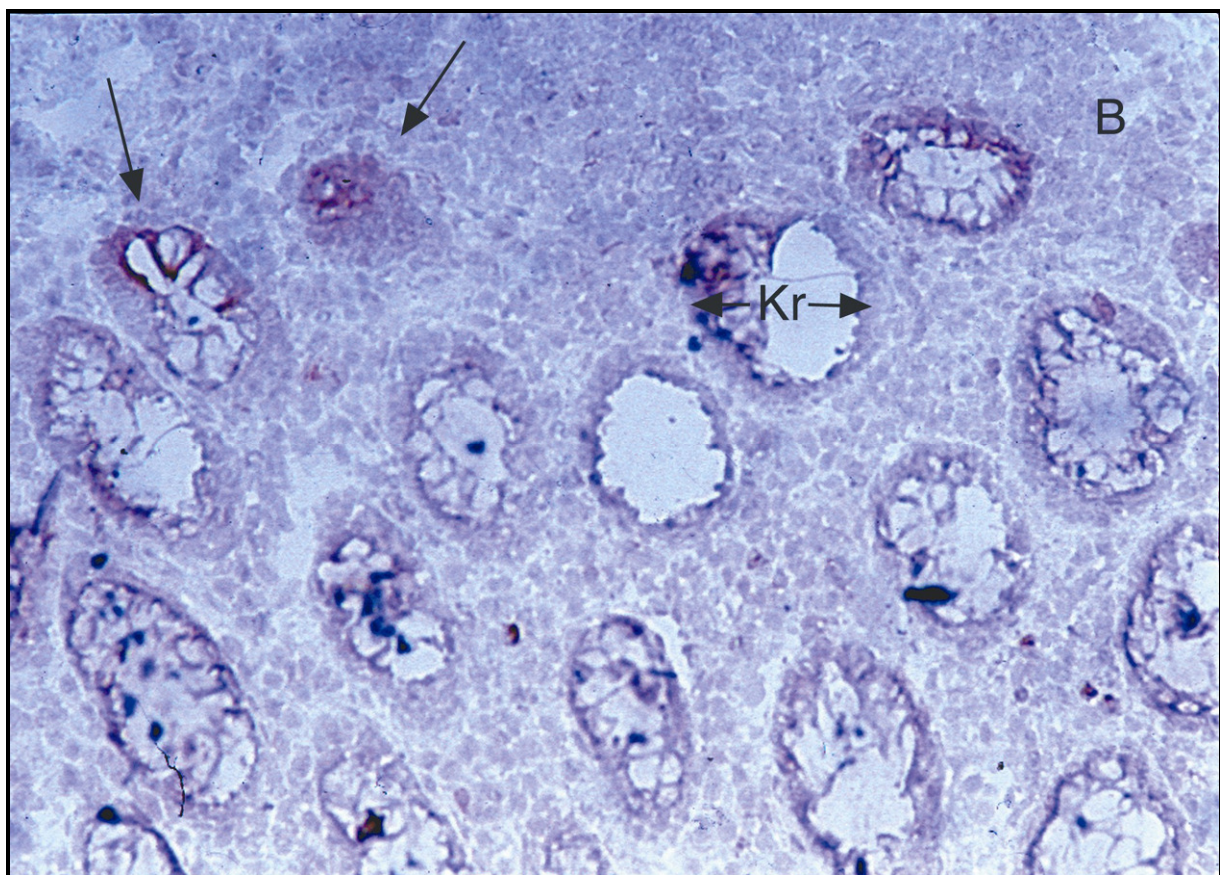
Um zu untersuchen, ob es sich bei diesen PHLDA1-positiven Zellen in der basalen Proliferationszone tatsächlich um proliferierende Zellen handelt, wurden die Gewebeproben normaler kolorektaler Schleimhaut, bei denen solch eine basale PHLDA1-Färbung feststellbar war, mit einem gegen humanes Ki-67 Protein gerichteten Antikörper (Anti-human-Ki-67) gefärbt. Bei Ki-67 handelt es sich um ein nukleäres Protein, das von proliferierenden Zellen während der späten G1-, S-, M- und G2-Phase exprimiert wird, nicht aber von Zellen in der G0- (Ruhe-) Phase. Es eignet sich somit zur Darstellung proliferierender Zellen. Hierbei wurde neben der, wie auch bei allen anderen Geweben, konsequenten Verwendung serieller Gewebeschnitte besonders darauf geachtet, dass es sich bei den mit Anti-PHLDA1 und Anti-Ki-67 gefärbten Geweben immer um direkt aufeinanderfolgende Schnitte handelte. So sollte eine optimale Vergleichbarkeit der Zellpopulationen gewährleistet werden. Insgesamt wurden sieben der Gewebeproben normaler kolorektaler Schleimhaut, die ein solches basales Färbemuster für PHLDA1 gezeigt hatten, erneut untersucht. Der Vergleich ergab, dass die PHLDA1-positiven Zellen zwar bevorzugt in Regionen liegen in denen die Dichte der Ki-67 exprimierenden Zellen ebenfalls hoch ist, allerdings darüber hinaus auch Zellen Ki-67 exprimieren, die PHLDA1-negativ sind. Die PHLDA1 Expression erscheint im Vergleich zur Ki-67 Expression strenger auf die Kryptenbasis beschränkt.

Abbildung 4.2 zeigt als repräsentatives Beispiel das Gewebe Nr.10 in 200- und 400-facher Vergrößerung. Im Gegensatz zu Abbildung 4.1 sind bei den Gewebeschnitten hier die Krypten an der Basis quer angeschnitten und stellen sich somit als zirkuläre Strukturen dar. Bei 200-facher Vergrößerung ist in der Ki-67 Färbung (4.2b) deutlich zu sehen, dass es sich bei den Enterozyten an der Kryptenbasis um proliferierende Zellen handelt, wobei die Ki-67 positiven Zellen ein uniformes nukleäres Färbemuster zeigen und vorrangig an der Kryptenbasis, jedoch auch im unteren Drittel der Krypten anzutreffen sind. Bei den im Bindegewebe einzeln liegenden Ki-67 positiven Zellen handelt es sich vermutlich um Leukozyten.

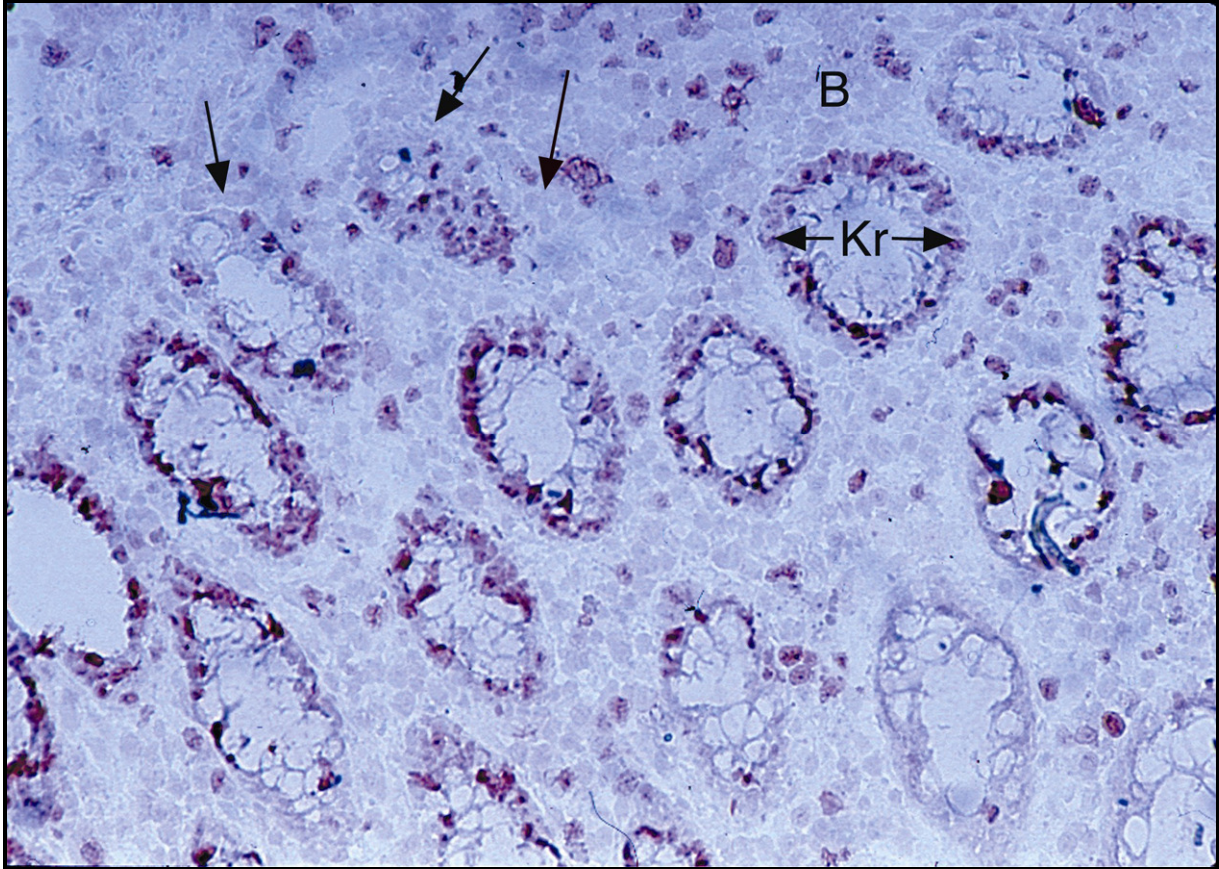
Die 400-fache Vergrößerung zeigt, dass Zellen, die PHLDA1 exprimieren und solche, die Ki-67-positiv sind, zwar in unmittelbarer Nachbarschaft liegen, aber es sich wahrscheinlich nicht um ein und dieselben Zellen handelt (4.2 e und f, lange Pfeile). Zweifelsfrei konnte dieser Sachverhalt jedoch aufgrund der Tatsache, dass bei der Verwendung serieller Schnitte, wie hier geschehen, keine eindeutige Zuordnung von Zellen auf verschiedenen Schnitten

zueinander gemacht werden kann, nicht geklärt werden. Dieser Beweis muss Verfahren, bei denen verschiedene Antikörper auf ein und dem selben Gewebeschnitt zur Anwendung kommen, vorbehalten bleiben.

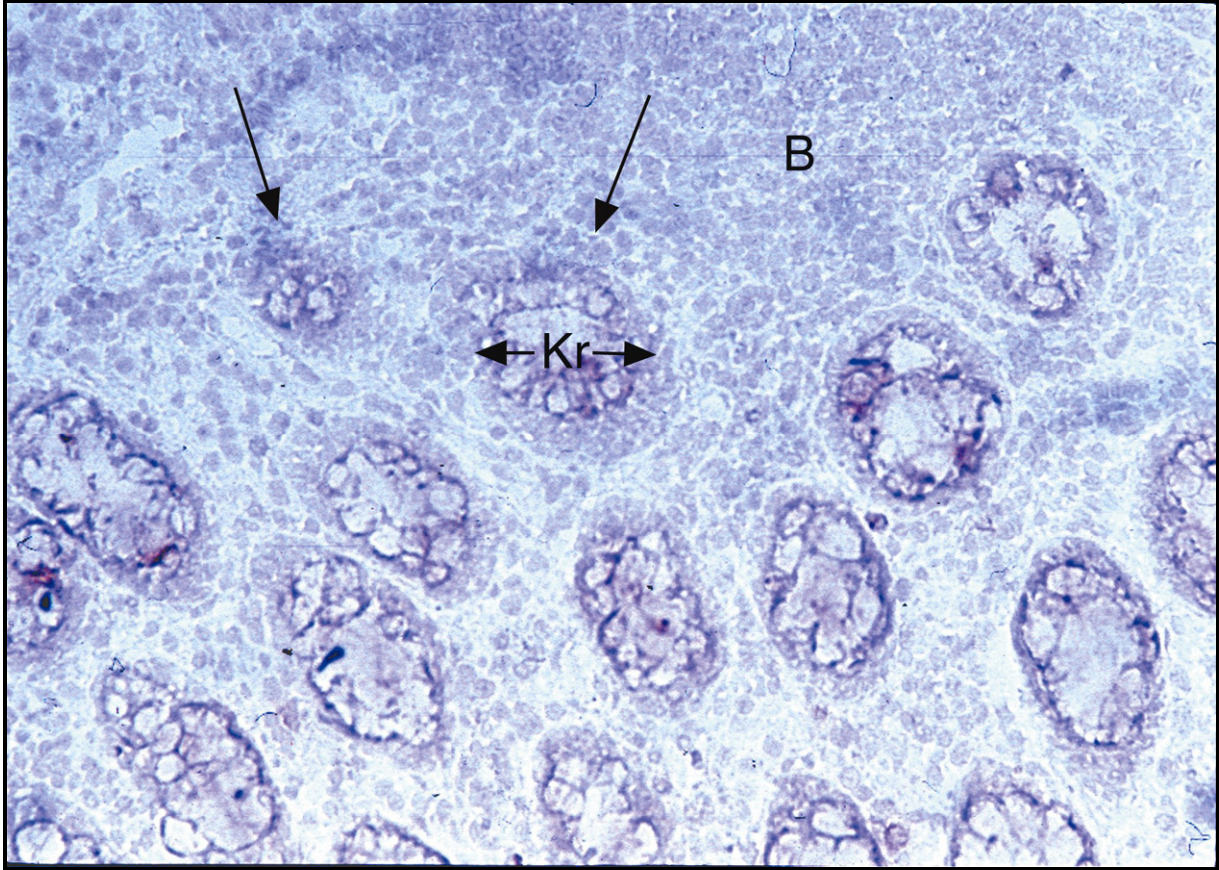
(Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde versucht mittels direkter Immunfluoreszenzfärbung das Expressionsmuster der einzelnen Zellen für PHLDA1 und Ki-67 durch Doppelfärbung zu untersuchen. Unspezifische Bindungsphänomene erschwerten jedoch in diesem Ansatz die eindeutige Identifikation von PHLDA1- und Ki-67-positiven Zellen, so dass auch hier keine eindeutige Zuordnung möglich war.)



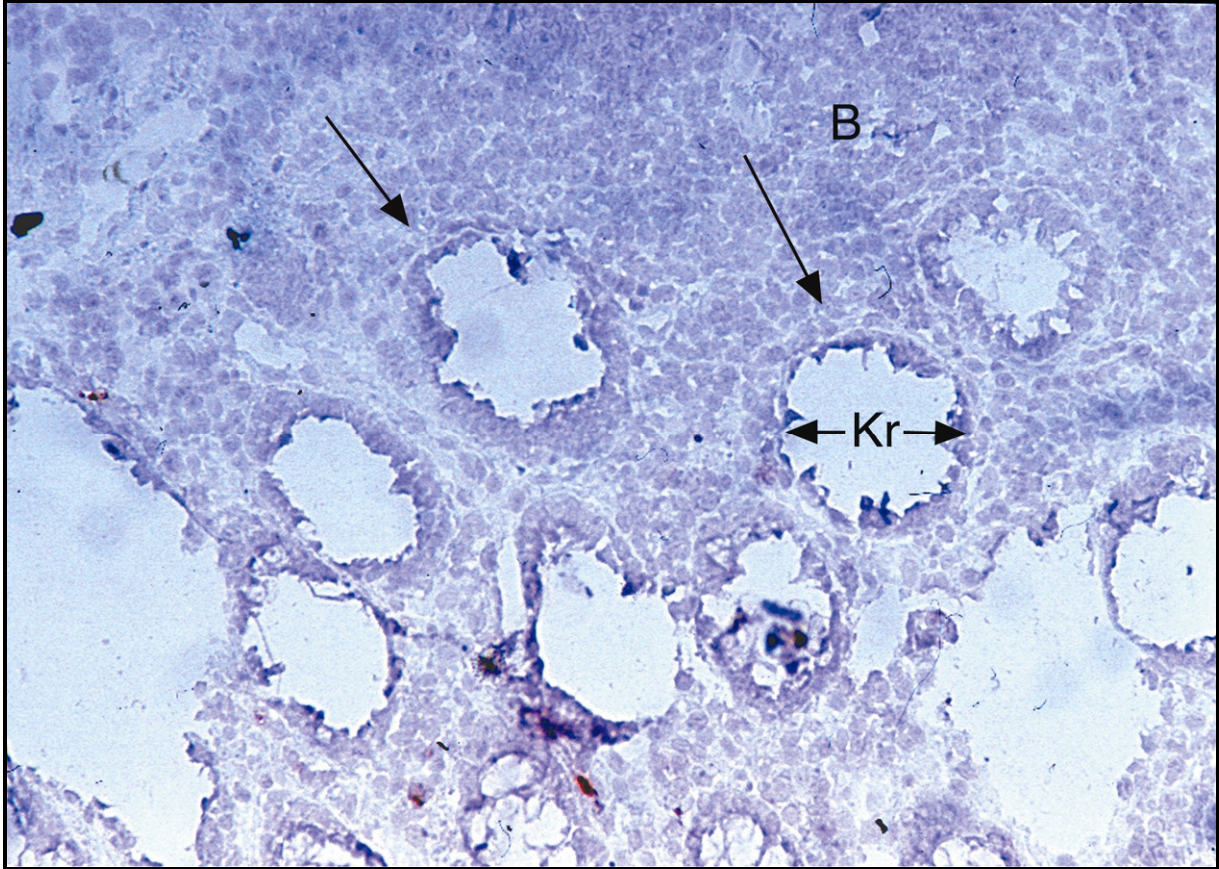
a) PHLDA1 (200-fach)



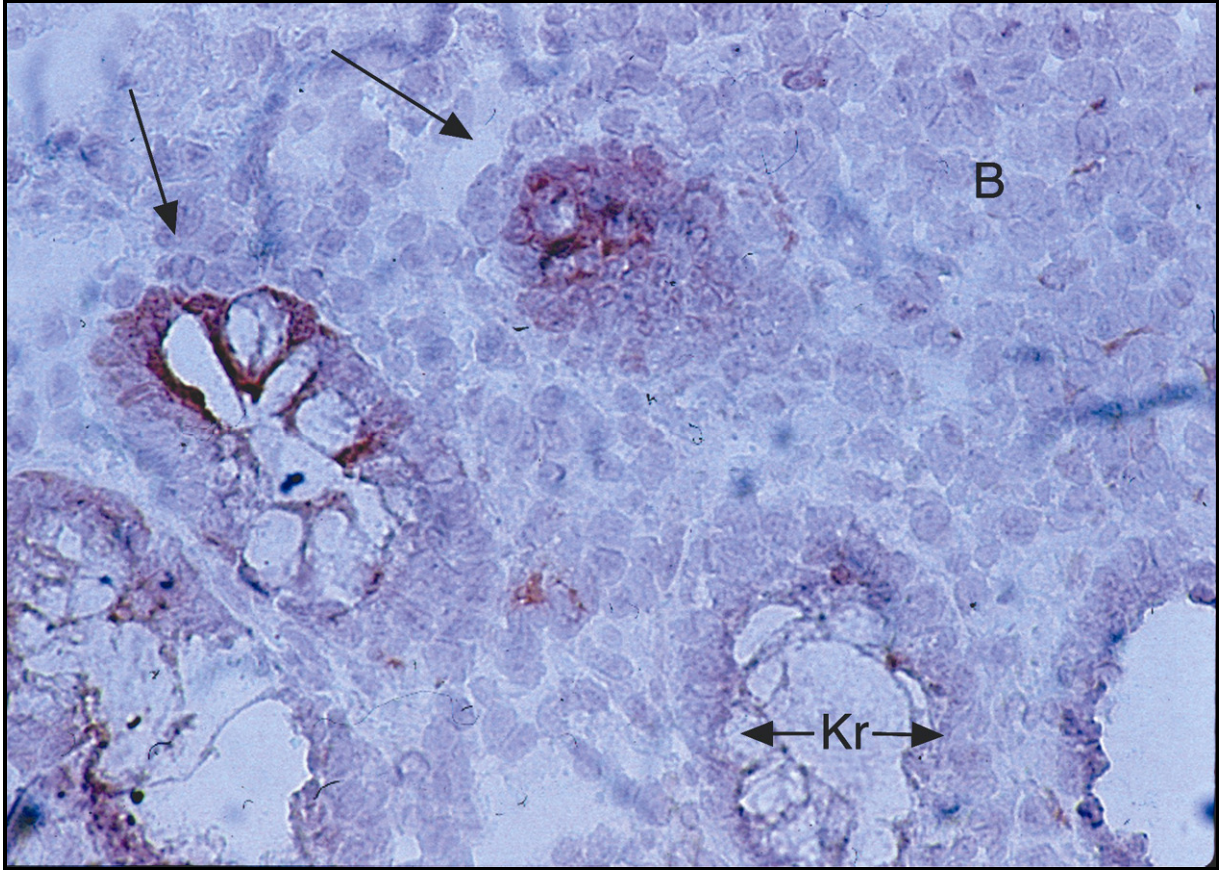
b) Ki-67 (200-fach)



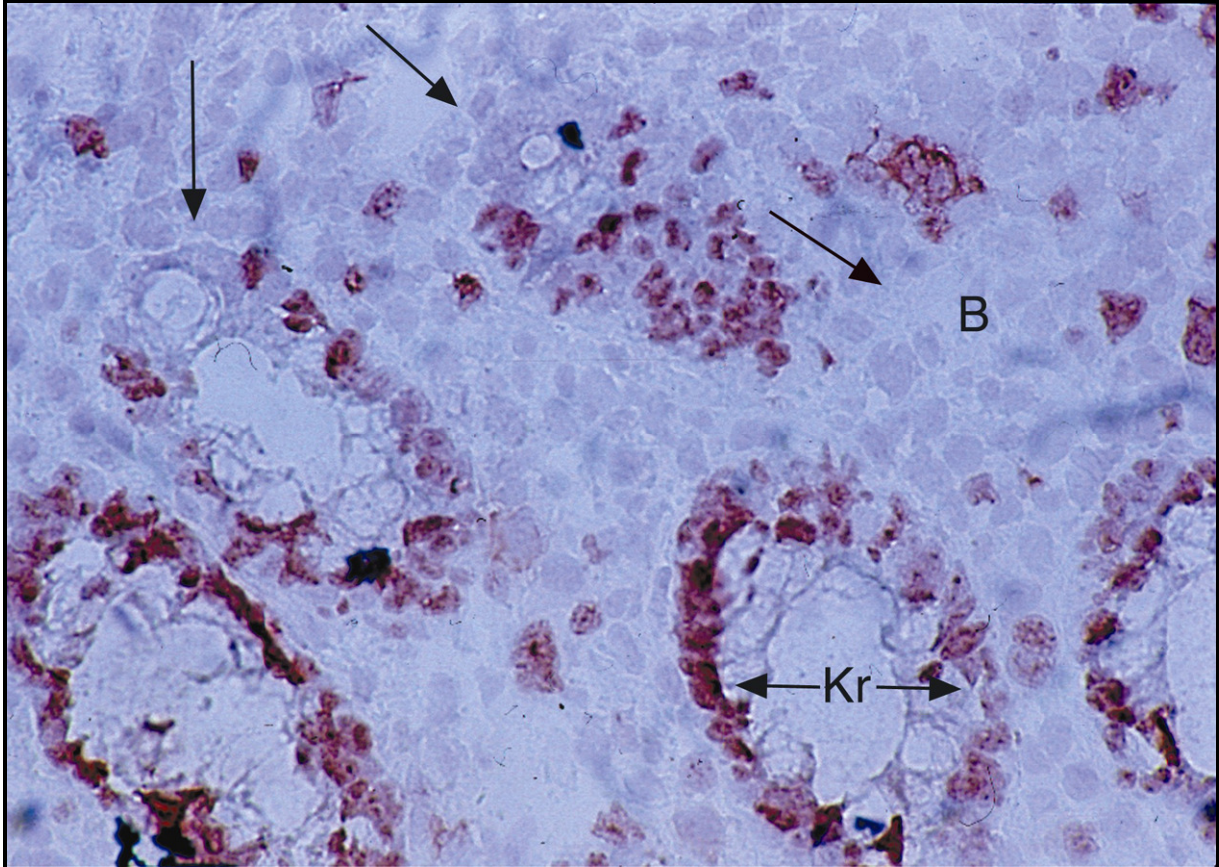
c) Isotypkontrolle IgG2a (200-fach)



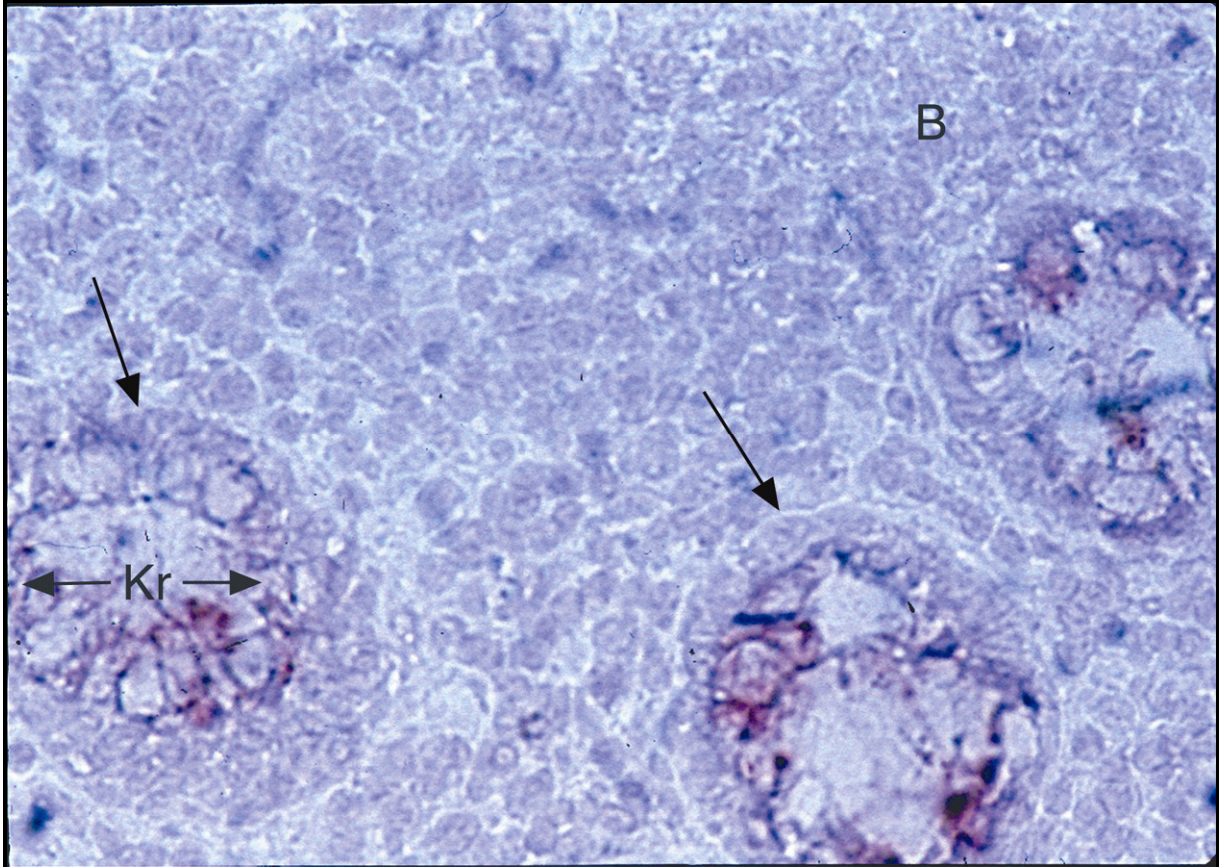
d) Isotypkontrolle IgG1 (200-fach)



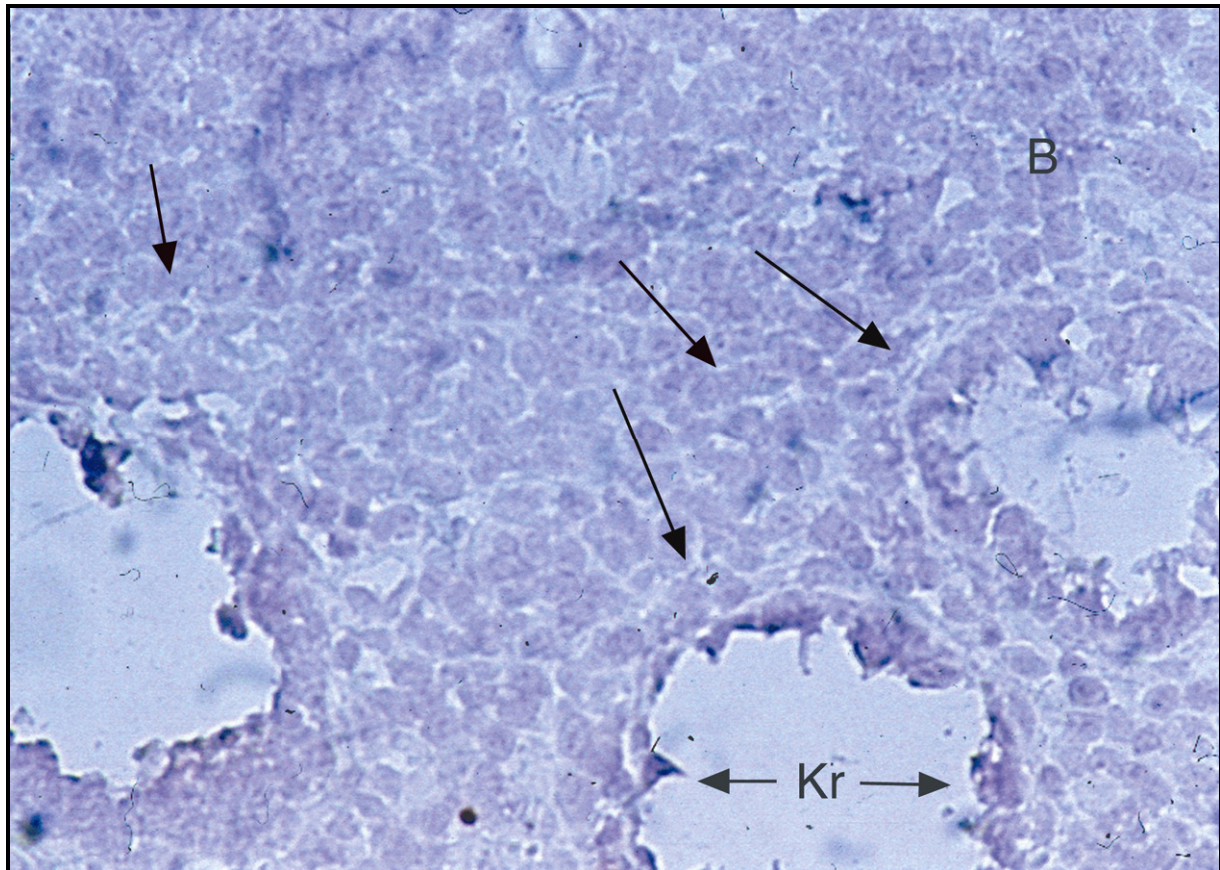
e) PHLDA1 (400-fach)



f) Ki-67 (400-fach)



g) Isotypkontrolle IgG2a (400-fach)



h) Isotypkontrolle IgG1 (400-fach)

Abbildung 4.2 PHLDA1 und Ki-67 Expression in normaler Schleimhaut. Serielle Schnitte in 200- (a-d) bzw. 400-facher (e-h) Vergrößerung. Gezeigt ist das Gewebe Nummer 10. Die Gewebeschnitte a) und e) wurden mit dem Anti-PHLDA1-Antikörper RN6e2, die Gewebeschnitte b) und f) mit Anti-Ki-67-Antikörper gefärbt. Die Abbildungen c) und g) zeigen die IgG2a-, d) und h) die IgG1-Isotypkontrollen. Bei den in den Abbildungen c) und g) rot angefärbten Strukturen innerhalb der Krypten handelt es sich um Artefakte, die durch unspezifische Bindung des verwendeten Antikörpers an Drüsensekretbestandteile entstanden. Ein wiederholbares Färbemuster wurde durch mehrfaches Färben der Präparate ausgeschlossen.

4.1.2 PHLDA1 und Fas Expression in normaler kolorektaler Schleimhaut:

Wie oben beschrieben wurde der Anteil der gefärbten Zellen auf Basis der EpCam-Färbung geschätzt. In allen untersuchten Schleimhautproben waren Fas exprimierende Enterozyten nachweisbar; demgegenüber waren in 58% der untersuchten Gewebe PHLDA1 exprimierende Enterozyten nachweisbar.

Die Abbildung 4.3 zeigt den prozentualen Anteil PHLDA1- (x-Achse) und Fas- (y-Achse) positiver Zellen in 19 Gewebeproben. Jeder Punkt stellt eine Gewebeprobe dar. Obwohl die meisten Proben eine hohe Fas-Expression und eine niedrige PHLDA1-Expression zeigten,

waren die Fas- und PHLDA1-Expression nicht signifikant korreliert (Spearman Rank, $r_s=0,268$, $p=0.134$).

Bei 53% der Proben war der Anteil der pro Gewebe PHLDA1-positiver Zellen zwischen 10% und 25%, nur bei einer Probe war ein Anteil von >25% nachweisbar (Abbildung 4.4). 91% aller Gewebeproben, bei denen PHLDA1-positive Zellen nachweisbar waren, zeigten ein basales Färbemuster. Bei verbleibenden Gewebe mit PHLDA1 positiven Zellen war die Zuordnung der PHLDA1-positiven Zellen zur Kryptenbasis nicht eindeutig möglich, so dass dieses Gewebe, obgleich auch hier die PHLDA1-positiven Zellen zumindest basisnah lagen, kein basales Färbemuster zugeordnet wurde. In keinen der untersuchten Gewebe waren PHLDA1-positive Zellen am luminalen (apikalen) Ende der Krypten anzutreffen.

Demgegenüber war bei 95% aller auf ihre Fas-Expression untersuchten Gewebe eine Färbung von >80% der Zellen nachweisbar; nur eine der Proben zeigte mit 10-25% eine eher geringe Reaktivität (Abbildung 4.4).

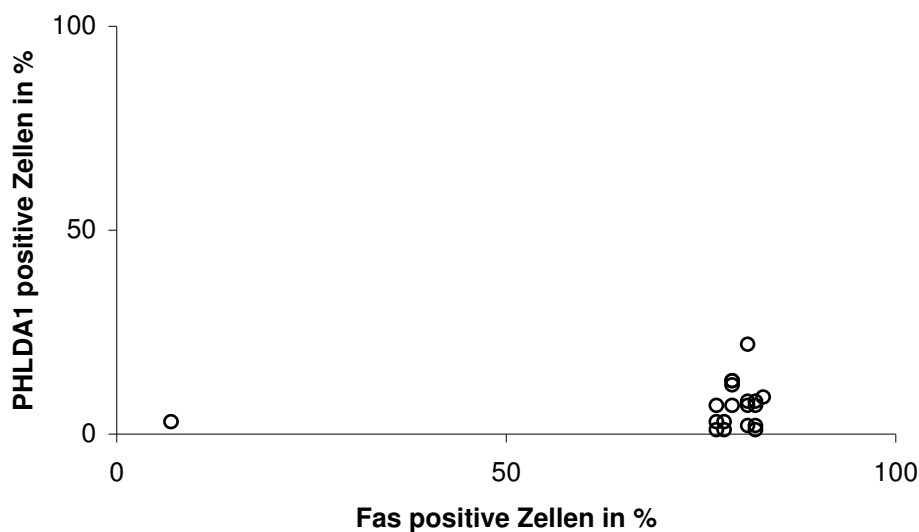


Abbildung 4.3 Normale kolorektale Schleimhaut, Anteil gefärbter Zellen. Auf der x-Achse ist der Anteil PHLDA1-positiver Zellen und auf der y-Achse der Anteil Fas gefärbter Zellen in Prozent aufgetragen. Jeder Punkt stellt eine Gewebeprobe dar. Die Prozentangaben für PHLDA1 und Fas basieren auf den EpCam positiven Enterozyten. N=19. Spearman rank $r_s=0.268$, $p=0.134$.

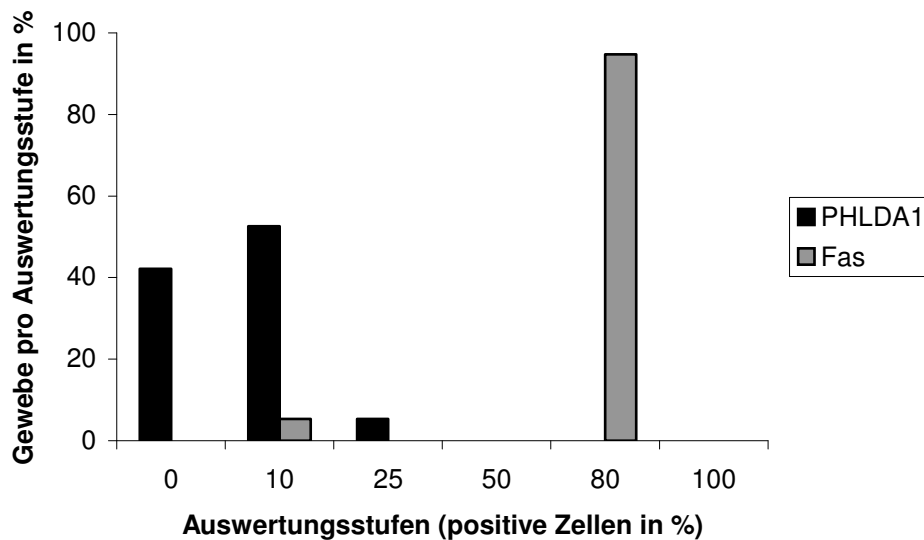


Abbildung 4.4 Normale kolorektale Schleimhaut, Anteil gefärbter Zellen, prozentuale Verteilung. Auf der x-Achse sind die Auswertungsstufen aufgetragen, die y-Achse zeigt den Anteil der untersuchten Gewebe pro Auswertungsstufe in Prozent. N=19.

Neben der Zahl gefärbter Zellen wurde die Intensität der Färbung in den Stufen 0 (nicht nachweisbar), 1 (schwach), 2 (mittel), 3 (stark) und 4 (sehr stark) ausgewertet. Dabei zeigte sich, dass in Gewebe dessen Anteil gefärbter Zellen hoch ist, auch die Farbstärke der einzelnen Zellen zunahm. Abbildung 4.5 zeigt die Farbintensität der einzelnen Gewebe für PHLDA1 und Fas. In den positiven Proben war die PHLDA1 Farbintensität signifikant schwächer, als die Fas Farbintensität (PHLDA1: Mittelwert 1,2 +/-0.4 im Vergleich zu Fas: Mittelwert 3,1 +/-0.66; $z=3,13$, $p<0,001$). Die Korrelationsanalyse zeigt eine signifikante inverse Korrelation zwischen der Fas und PHLDA1 Farbintensität in normaler Schleimhaut (Spearman rank $r_s=-0,395$, $p<0,05$).

Abbildung 4.6 zeigt die prozentuale Verteilung der Gewebe bezogen auf die jeweiligen Auswertungsstufen der Farbintensität. Dabei war bei 11% der Gewebe eine mittlere (2), bei 48% jedoch nur eine schwache (1) Farbintensität der PHLDA1-positiven Zellen nachweisbar. Bei 42% war keine PHLDA1-Färbung nachweisbar (0). Wie schon bei der prozentualen Verteilung zeigten die Fas-positiven Zellen auch hier ein umgekehrtes Bild; hier war nur eine Probe schwach, 74% stark (3) und 21% sehr stark (4) gefärbt (Abbildung 4.6).

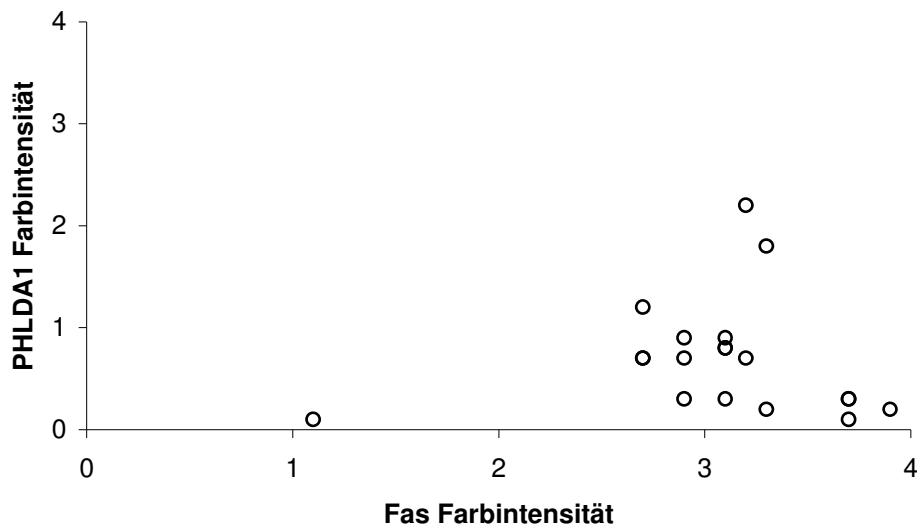


Abbildung 4.5 Normale kolorektale Schleimhaut, Farbintensität. Jeder Punkt stellt eine Gewebeprobe dar. Auf der x-Achse ist die Farbintensität der Fas-Färbung und auf der y-Achse die Farbintensität der PHLDA1-Färbung aufgetragen. Die Farbintensitäten sind invers korreliert. N=19. Spearman rank $r_s = -0.395$, $p < 0.05$.

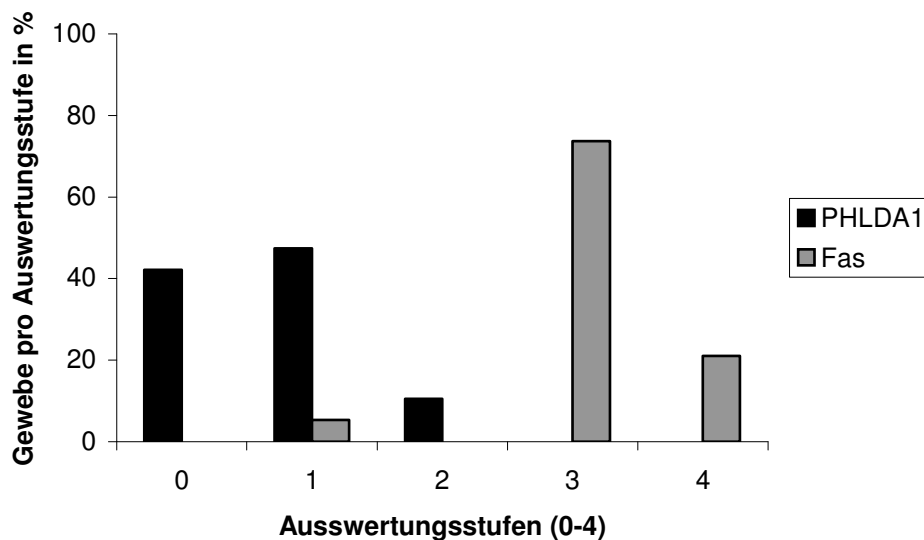


Abbildung 4.6 Normale kolorektale Schleimhaut, Farbintensität, prozentuale Verteilung. Auf der x-Achse sind die Auswertungsstufen aufgetragen, die y-Achse zeigt den Anteil der untersuchten Gewebe pro Auswertungsstufe in Prozent. N=19.

Der Vergleich der Auswertungsergebnisse für Farbintensität und Anzahl gefärbter Zellen im jeweiligen Gewebe zeigt, dass beide Messgrößen sich gleichsinnig verhalten, d.h., in Gewebe mit einem hohen Anteil PHLDA1- bzw. Fas-positiver Zellen war auch eine höhere

Farbintensität der gefärbten Zellen festzustellen (Abbildung 4.7, Spearman rank $r_s=0.904$, $p<0,001$ bzw. 4.8, Spearman rank $r_s=0,508$, $p<0.05$).

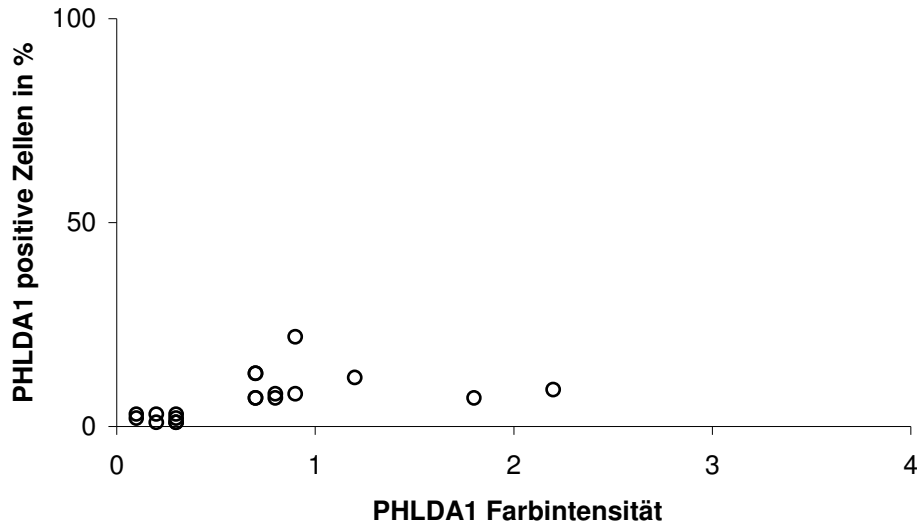


Abbildung 4.7 Normale kolorektale Schleimhaut, Vergleich von Farbintensität und Anzahl PHLDA1-positiver Zellen. Jeder Punkt stellt eine Gewebeprobe dar. Auf der x-Achse ist die Farbintensität der Färbung, auf der y-Achse der Anteil der PHLDA1-positiven Zellen in Prozent aufgetragen. Die Farbintensität und der Prozentanteil PHLDA1-positiver Zellen sind signifikant korreliert. N=19. Spearman rank $r_s=0.904$, $p<0.001$.

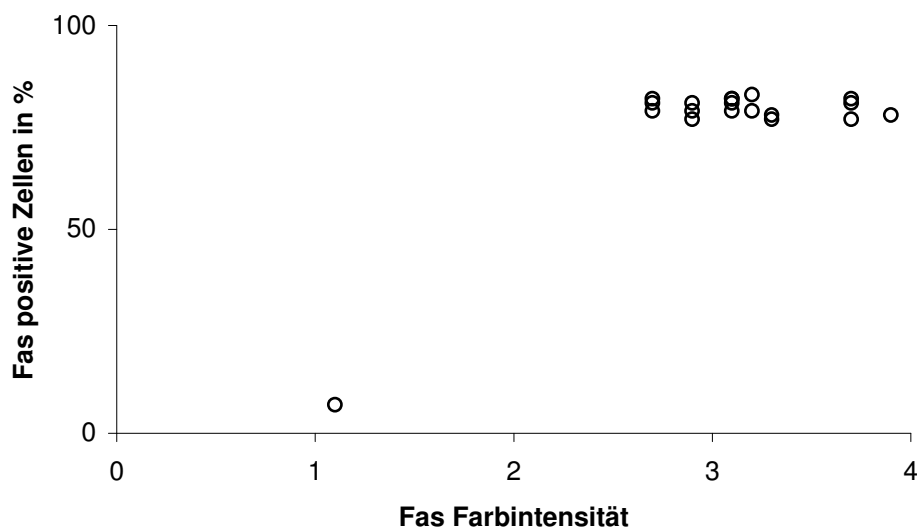


Abbildung 4.8 Normale kolorektale Schleimhaut, Vergleich von Farbintensität und Anzahl Fas-positiver Zellen. Jeder Punkt stellt eine Gewebeprobe dar. Auf der x-Achse ist die Farbintensität der Färbung, auf der y-Achse der Anteil der Fas-positiven Zellen in Prozent aufgetragen. Die Farbintensität und der Prozentanteil Fas-positiver Zellen sind signifikant korreliert. N=19. Spearman rank $r_s=0.508$, $p<0.05$.

4.1.3 Vergleich der PHLDA1- bzw. Fas-Expression in Abhängigkeit von der Lokalisation:

Weiterhin wurde untersucht, ob Unterschiede in der PHLDA1- bzw. Fas-Expression in Abhängigkeit von der Lokalisation innerhalb des Dickdarms bestehen. Abbildung 4.9 zeigt den Anteil PHLDA1- bzw. Fas-positiver Zellen im Vergleich von Coecum über Colon und Sigma bis zum Rectum. Abbildung 4.10 zeigt die prozentuale Verteilung der Auswertungsstufen für PHLDA1 und Fas im jeweiligen Dickdarmabschnitt.

Ogleich die Anzahl der Proben pro Gruppe keine wirklichen Aussagen zulässt, so fällt doch auf, dass die PHLDA1-Expression im Colon im Vergleich zu Coecum, Sigma und Rectum geringer ausfällt. Keine Schwankungen in den unterschiedlichen Darmabschnitten lassen sich für die Fas-Expression erkennen.

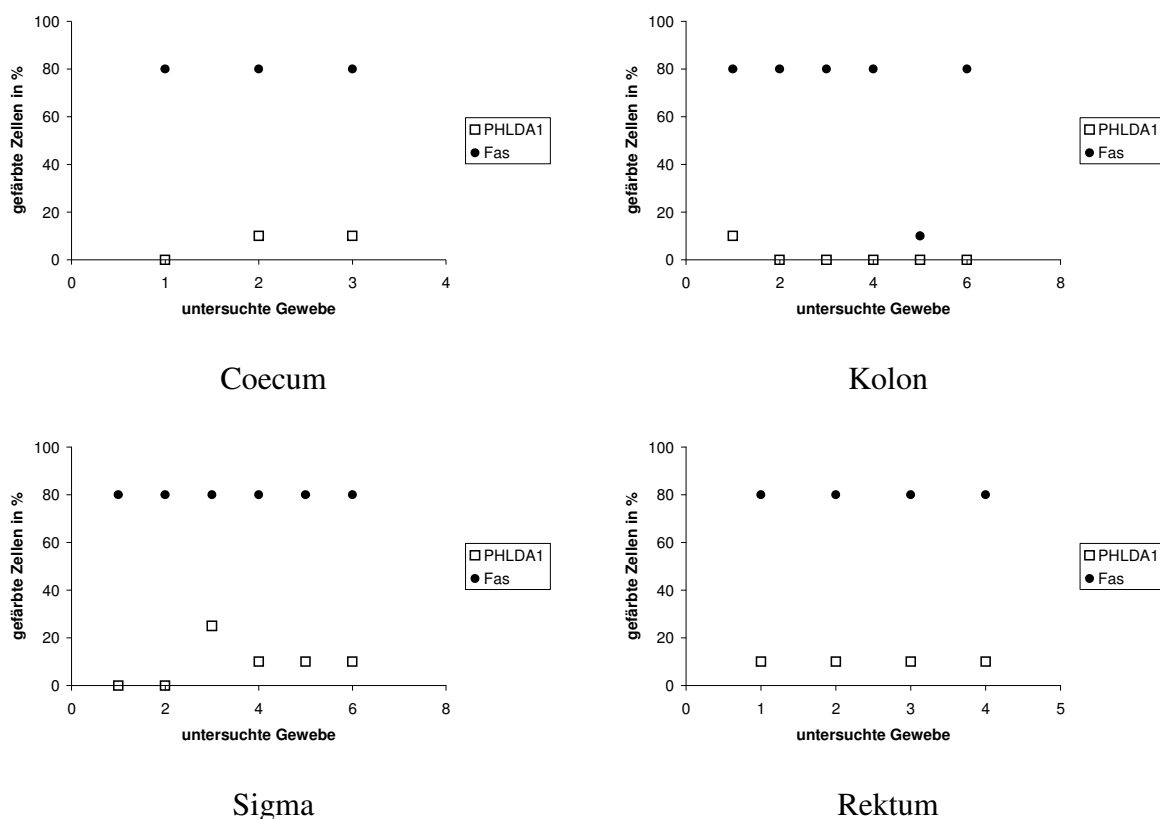


Abbildung 4.9 Normale kolorektale Schleimhaut, prozentualer Anteil PHLDA1-/Fas-positiver Zellen nach Lokalisation. Auf der x-Achse sind die untersuchten Gewebe aufgetragen. Auf der y-Achse ist der Anteil gefärbter Zellen für PHLDA1 und Fas in Prozent aufgetragen. Die PHLDA1- bzw. Fas-Expression einzelner Gewebe ist jeweils übereinanderstehend ablesbar. Coecum N=3, Colon N=6, Sigma N=6, Rectum N=4.

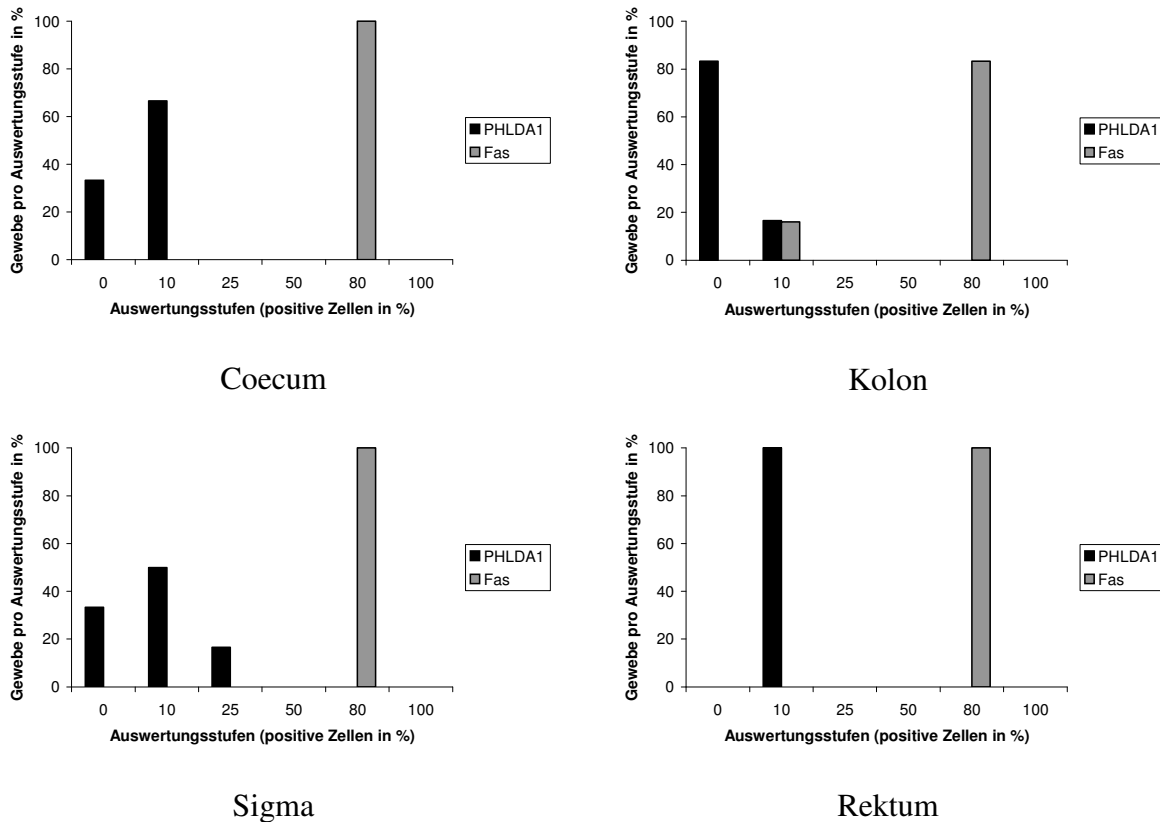
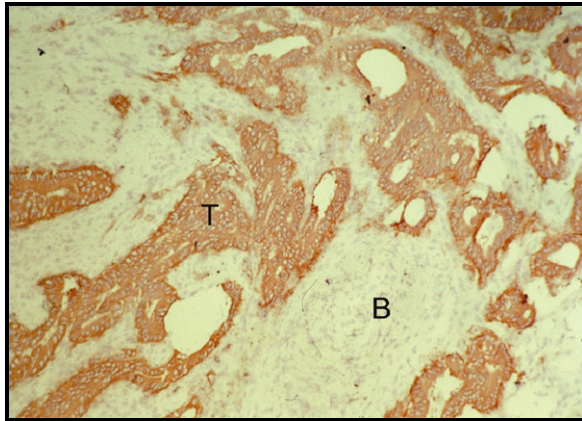


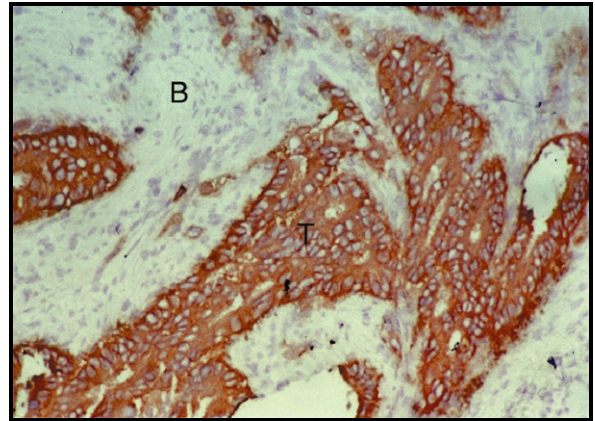
Abbildung 4.10 Normale kolorektale Schleimhaut, Anteil gefärbter Zellen, prozentuale Verteilung nach Lokalisation. Auf der x-Achse sind die Auswertungsstufen aufgetragen, die y-Achse zeigt den Anteil der untersuchten Gewebe pro Auswertungsstufe in Prozent. Coecum N=3, Colon N=6, Sigma N=6, Rectum N=4.

4.2 PHLDA1 und Fas Expression in kolorektalen Karzinomen:

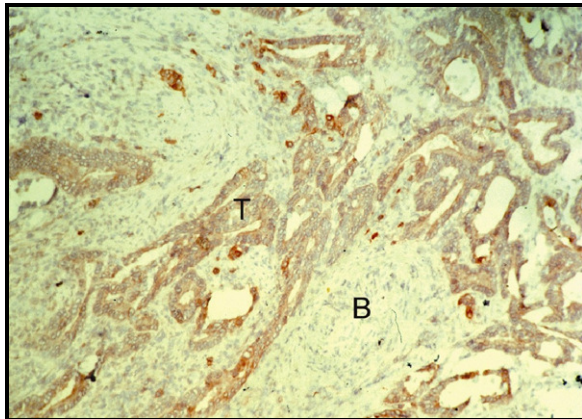
Die Untersuchung aus 34 kolorektalen Karzinomen stammender Gewebeproben auf ihre PHLDA1-Expression ergab ein deutlich von den zuvor für normale Schleimhaut beschriebenen Verhältnissen abweichendes Bild. Abbildung 4.11 zeigt serielle Gewebeschnitte eines repräsentativen Tumors in 200- und 400-facher Vergrößerung. In der Anti-PHLDA1-Färbung (4.11c und d) fällt auf, dass die große Mehrzahl der in der Positivkontrolle (4.11a und b) als Epithel (d.h. EpCam positiv) identifizierten Zellen PHLDA1 exprimieren. Alle PHLDA1-positiven Zellen zeigten ein zytoplasmatisches Färbemuster. Das die Tumorzellnester (mit T gekennzeichnet) umgebende Bindegewebe (mit B gekennzeichnet) zeigt keine PHLDA1-Expression in der Anti-PHLDA1-Färbung. In den Abbildungen 4.11e und f sind die zugehörigen Isotypkontrollen dargestellt.



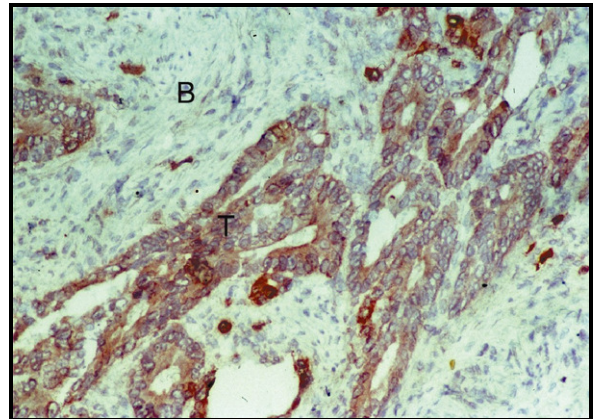
a) EpCam (100-fach)



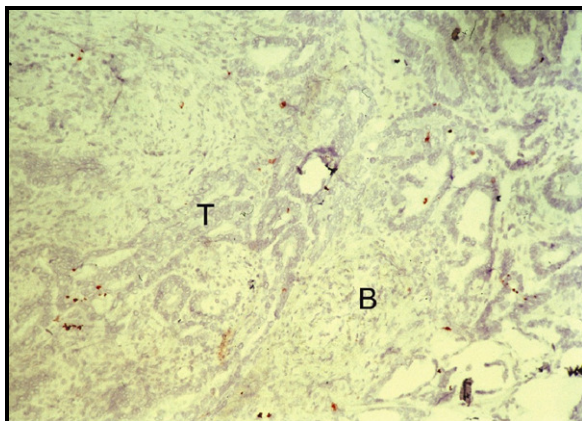
b) EpCam (200-fach)



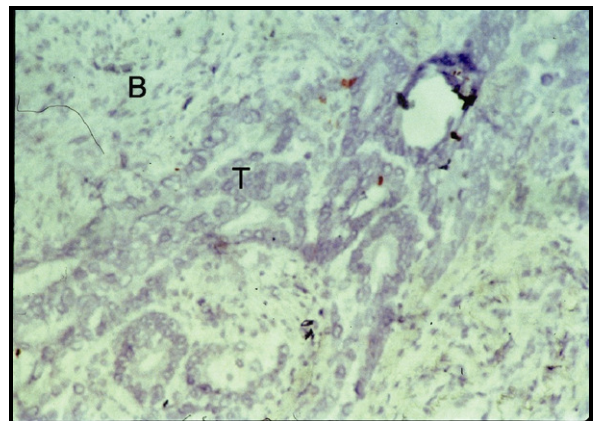
c) PHLDA1 (100-fach)



d) PHLDA1 (200-fach)



e) Isotypkontrolle IgG2a (100-fach)

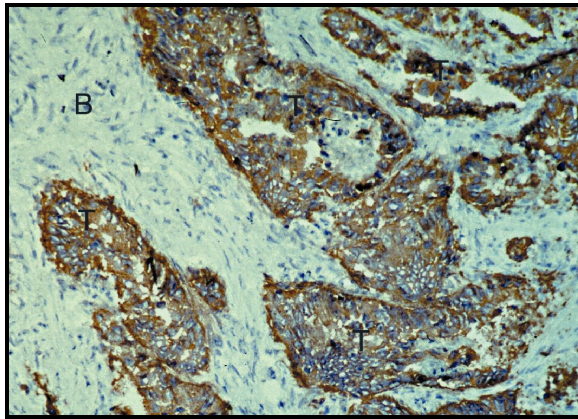


f) Isotypkontrolle IgG2a (200-fach)

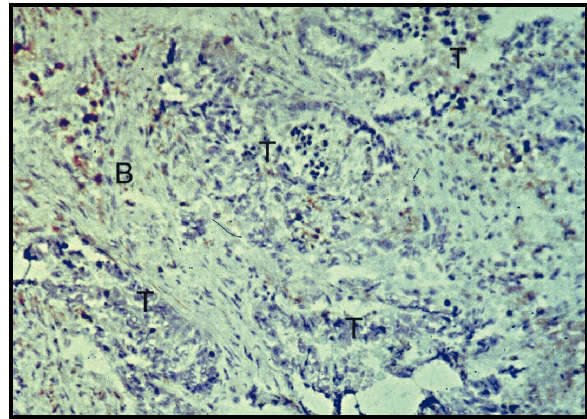
Abbildung 4.11 PHLDA1 Expression in kolorektalem Tumorgewebe. Gezeigt sind serielle Schnitte des Tumors Nummer 30 in 100-facher (linke Spalte) bzw. 200-facher (rechte Spalte) Vergrößerung. Die Abbildungen 4.11 a) und b) zeigen die Positivkontrolle (Anti-EpCam), 4.11 c) und d) die Anti-PHLDA1(RN6e2)-positiven Zellen. 4.11 e) und 4.11 f) sind die Negativkontrollen (IgG2a). T: Tumorzellnester, B: Bindegewebe.

Neben der im Vergleich zu normaler Schleimhaut deutlich erhöhten PHLDA1-Expression bei kolorektalen Karzinomen, verhielt sich die Fas-Expression auch hier gegenläufig, sodass sich das bei normaler Schleimhaut beschriebene Verhältnis von geringer PHLDA1-Expression zu ausgeprägter Fas-Expression ins Gegenteil umkehrte.

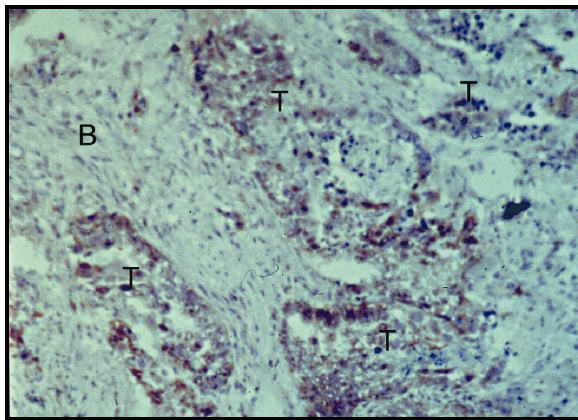
Abbildung 4.12 zeigt die PHLDA1 und Fas Expression in einem repräsentativen Tumor. Hier fällt neben der ausgeprägten PHLDA1-Expression (4.12c) vor allem die geringe Fas-Expression (4.12d) auf. Wiederum exprimieren die Zellen des die Tumorzellnester (mit T gekennzeichnet) umgebenden Bindegewebes (mit B gekennzeichnet) sowie die extrazelluläre Matrix kein PHLDA1. In Abbildung 4.12b sind mithilfe des gegen CD45 gerichteten Antikörpers GAP8.3 die im Gewebe vorhandenen Leukozyten dargestellt. Im gezeigten Gewebe sind relativ wenig Leukozyten enthalten. Die Zahl der Leukozyten war in allen untersuchten Tumorgeweben sehr variabel. Es konnte insgesamt weder eine Korrelation der Leukozytenzahl im Gewebe mit der PHLDA1-, noch mit der Fas-Expression festgestellt werden.



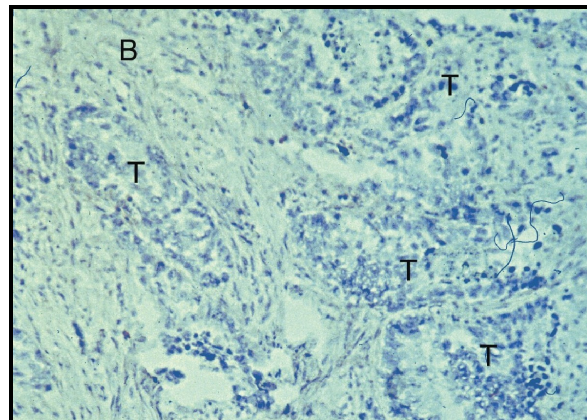
a) EpCam (100-fach)



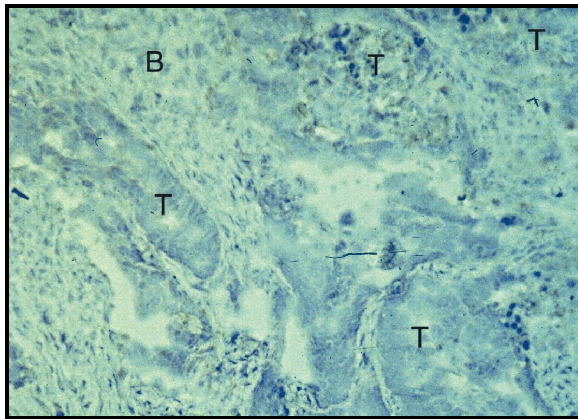
b) CD45 (100-fach)



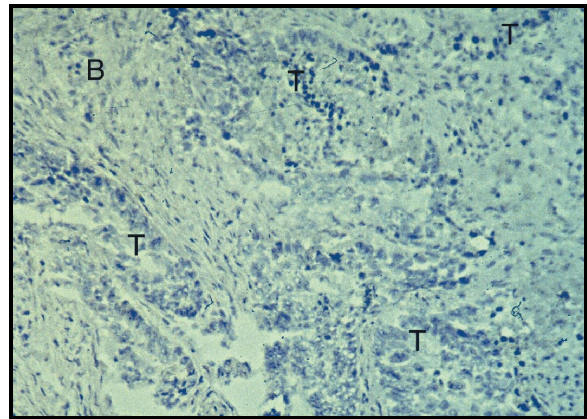
c) PHLDA1 (100-fach)



d) Fas (100-fach)



e) Isotypkontrolle IgG2a (100-fach)



f) Isotypkontrolle IgG1 (100-fach)

Abbildung 4.12 PHLDA1- und Fas-Expression im kolorektalen Karzinom. Serielle Schnitte in 100-facher Vergrößerung. Es ist der Tumor Nummer 12 gezeigt. Der Gewebeschnitt a) wurde mit Anti-EpCam-Antikörper gefärbt (Positivkontrolle). Auf dem Gewebeschnitt b) sind Leukozyten dargestellt (GAP8.3, Anti-CD45). Der Gewebeschnitt c) wurde mit dem Anti-PHLDA1-Antikörper RN6e2, der Gewebeschnitt d) mit Anti-Fas-Antikörper gefärbt. Die Gewebeschnitte e) und f) wurden mit den Isotypkontrollen für die Subklassen IgG2a (e) und IgG1 (f) behandelt.

4.2.1 Verhältnis zwischen PHLDA1- und Fas-Expression in kolorektalen Karzinomen:

Insgesamt wurden 34 Gewebeproben kolorektaler Karzinome untersucht, davon 32 Proben aus Primärtumoren, 2 Gewebeproben stammten aus Tumorrezidiven. Sie wurden analog zu den Normalgeweben gemäß ihrer Reaktivität für PHLDA1 und Fas ausgewertet. Dabei zeigte sich, dass sich das bei normaler kolorektaler Schleimhaut beobachtete Verhältnis von geringer PHLDA1- zu ausgeprägter Fas-Expression (Abbildung 4.3) ins Gegenteil umkehrte. Zwar war der Unterschied in der Anzahl PHLDA1-positiver und Fas-positiver Tumoren nicht signifikant (PHLDA1 positiv: 97%, Fas-positiv: 85%, Fishers exact $p=0.098$), betrachtet man jedoch die Zahl der Tumoren mit mehr als 50% antigenexprimierenden Zellen, so ist ein signifikanter Unterschied festzustellen (PHLDA1 >50% positive Zellen 91%, Fas 50%, Fishers exact $p=0.0002$). In 74% der untersuchten Gewebe waren >80% der Zellen PHLDA1-positiv, nur 32% der Tumoren zeigte eine Fas-Expression von >80% der Zellen (Abbildung 4.14). Abbildung 4.13 zeigt den prozentualen Anteil PHLDA1- und Fas-positiver Zellen pro Gewebe und Abbildung 4.14 die prozentuale Verteilung der untersuchten Gewebe bezogen auf die Auswertungsstufen. Für PHLDA1 ergibt sich hieraus folgende Verteilung: Nur eine Gewebeprobe zeigte keine PHLDA1-Expression (0-10%), bei 6% der untersuchten Gewebe waren >10-25% der Zellen PHLDA1-positiv, bei 18% der Gewebe waren 50-80%, bei der Mehrzahl (74%) jedoch >80% der Zellen PHLDA1-positiv. Bei der Fas Expression zeigten die Tumoren eine breite Verteilung von 0% bis >80% positiven Zellen. Die prozentuale Fas-Expression lag nur bei 32% der Gewebe bei >80%, bei 18% der Gewebe waren 50-80% Fas-positive Zellen nachweisbar, weitere 18% der Gewebe zeigten >25-50% Fas-positive Zellen. >10-25% Fas-positive Zellen waren bei 18% der untersuchten Proben nachweisbar, 15% der Gewebe zeigten keine Fas-Expression (Abbildung 4.14).

Die beiden untersuchten Rezidive zeigten im Vergleich zum Durchschnitt der Primärtumoren kein abweichendes Färbemuster; bei beiden war die PHLDA1 Expression >80% bei geringerer Fas Expression (0-10% bzw. 50-80%). Hinweise auf ein verändertes Expressionsmuster bei fortschreitender Tumorerkrankung ergaben sich somit zunächst nicht.

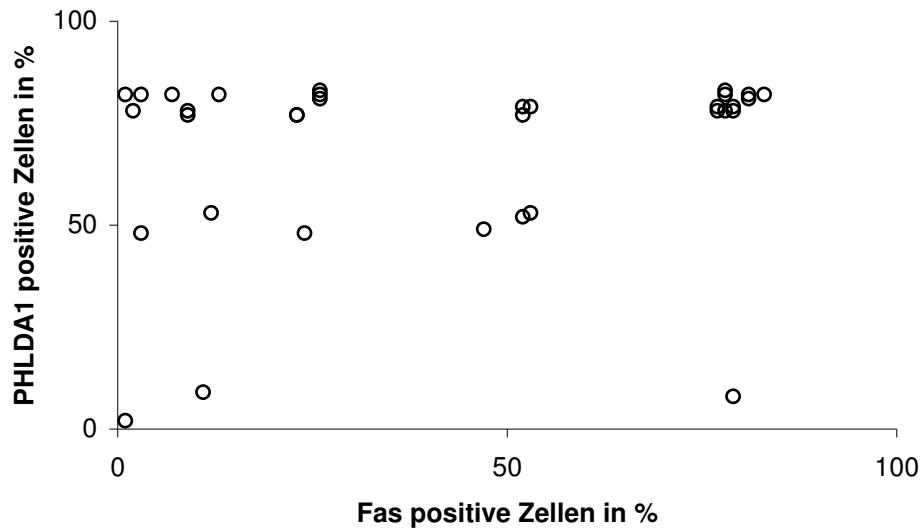


Abbildung 4.13 Kolorektale Karzinome, Anteil gefärbter Zellen. Auf der x-Achse sind die Auswertungsstufen aufgetragen, die y-Achse zeigt den Anteil der untersuchten Gewebe pro Auswertungsstufe in Prozent. Jeder Punkt repräsentiert eine Gewebeprobe. N=34. (Spearman rank $r_s=0.185$, $p=0.15$)

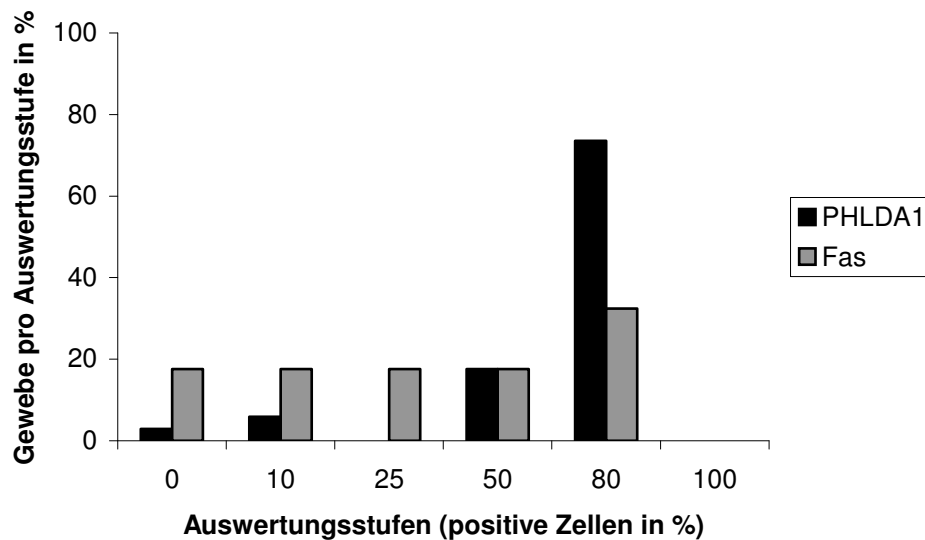
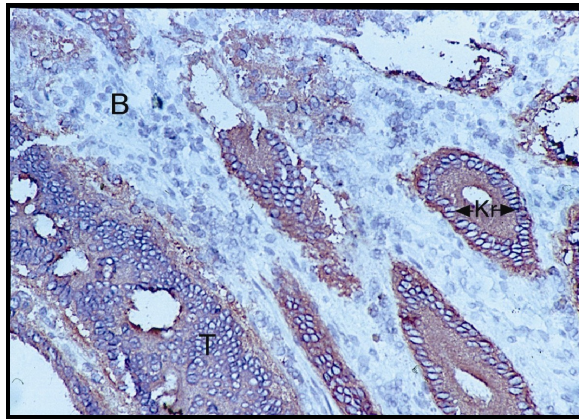
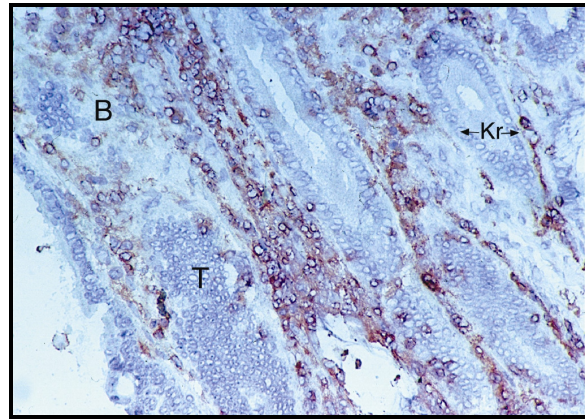


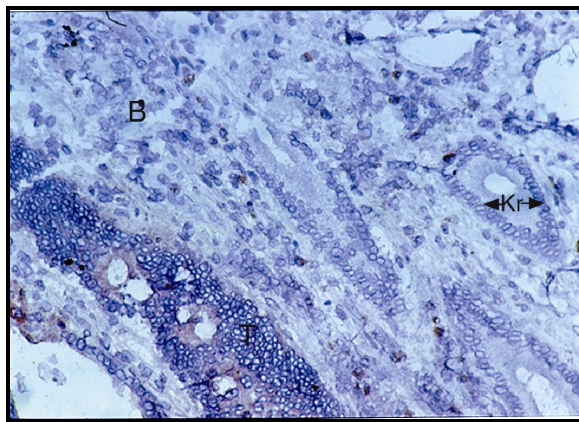
Abbildung 4.14 Kolorektale Karzinome, Anteil gefärbter Zellen, prozentuale Verteilung. Auf der x-Achse sind die Auswertungsstufen aufgetragen, die y-Achse zeigt den Anteil der untersuchten Gewebe pro Auswertungsstufe in Prozent. N=34.



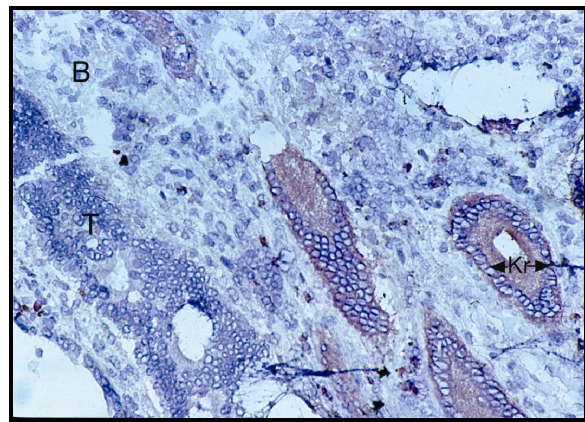
a) EpCam (200-fach)



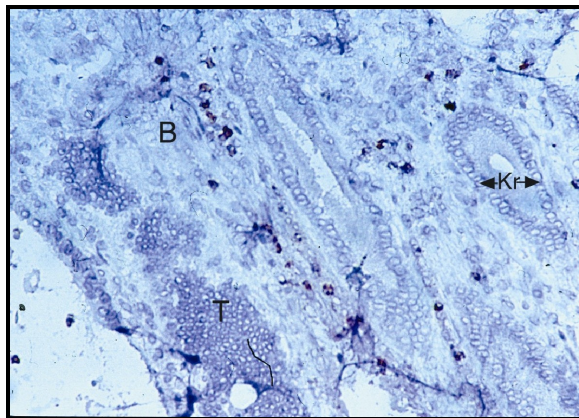
b) CD45 (200-fach)



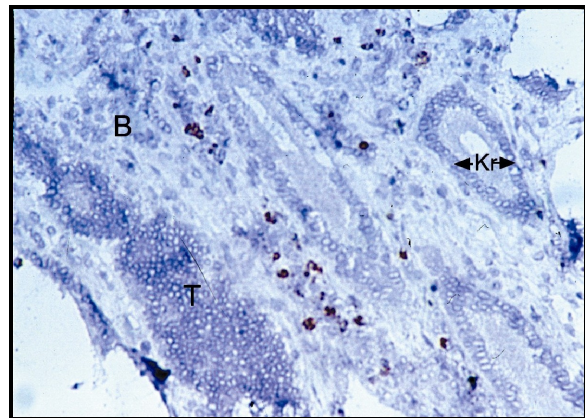
c) PHLDA1 (200-fach)



d) Fas (200-fach)



e) Isotypkontrolle IgG2a (200-fach)



f) Isotypkontrolle IgG1 (200-fach)

Abbildung 4.15 PHLDA1- und Fas-Expression in kolorektalem Karzinom mit angrenzender normaler kolorektaler Schleimhaut. Serielle Schnitte in 200-facher Vergrößerung des Tumors Nummer 29. Der Gewebeschnitt a) wurde mit Anti-EpCam-Antikörper, der Gewebeschnitt b) mit dem Anti-CD45-Antikörper GAP8.3 gefärbt. Der Gewebeschnitt c) wurde mit dem Anti-PHLDA1-Antikörper RN6e2, der Gewebeschnitt d) mit Anti-Fas-Antikörper gefärbt. E) und f) zeigen die Isotypkontrollen für die Subklassen IgG2a (e) und IgG1 (f).

Abbildung 4.15 zeigt in 200-facher Vergrößerung den Randbereich eines Tumors (T) mit angrenzender normaler Schleimhaut (M). Deutlich ist das ungeordnete Wachstumsmuster der Tumorzellen (mit T gekennzeichnet) von dem der normalen Enterozyten zu unterscheiden. Während Erstgenannte in unregelmäßig angeordneten Nestern dicht zusammengedrängt liegen, zeigt die normale Schleimhaut die typische regelmäßige, in diesem Bildausschnitt aufgrund der Schnittrichtung längsovale, Kriptenstruktur (mit Kr gekennzeichnet), bestehend aus einschichtig angeordneten Enterozyten. Das Expressionsmuster der Zellen für PHLDA1 und Fas bestätigt diese histologische Demarkationslinie. Während die aus normalen Enterozyten bestehenden Kolonkripten PHLDA1 nicht exprimieren (Abb. 4.15c), ist Fas stark exprimiert (Abb. 4.15d) und scharf begrenzt. In den maligne veränderten Bereichen der gezeigten Gewebeschnitte kehrt sich dieses Verhältnis um. Hier sind die aus Tumorzellen bestehenden Zellgruppen (Abb. 4.15c) deutlich PHLDA1 positiv, während Fas-Expression nicht nachweisbar ist (Abb. 4.15d).

Dies bestätigt die bereits in dieser Arbeit an getrennten Gewebeproben beschriebene spiegelbildliche Expressionsmuster von PHLDA1 und Fas in normaler Schleimhaut und kolorektalen Karzinomen auf ein und derselben Gewebeprobe.

Wie bei den Normalgeweben wurde auch bei den Tumoren neben der Zahl gefärbter Zellen die Intensität der Färbung in den Stufen 0 (nicht nachweisbar), 1 (schwach), 2 (mittel), 3 (stark) und 4 (sehr stark) ausgewertet. Abbildung 4.16 zeigt die Farbintensität der einzelnen Gewebe für PHLDA1 und Fas. Dabei zeigten bei 65% der Gewebe die PHLDA1-positiven Zellen eine starke Farbintensität (3), nur bei 18% der untersuchten Gewebe lag eine vergleichbare Farbintensität der Fas-positiven Zellen vor (Abbildung 4.17).

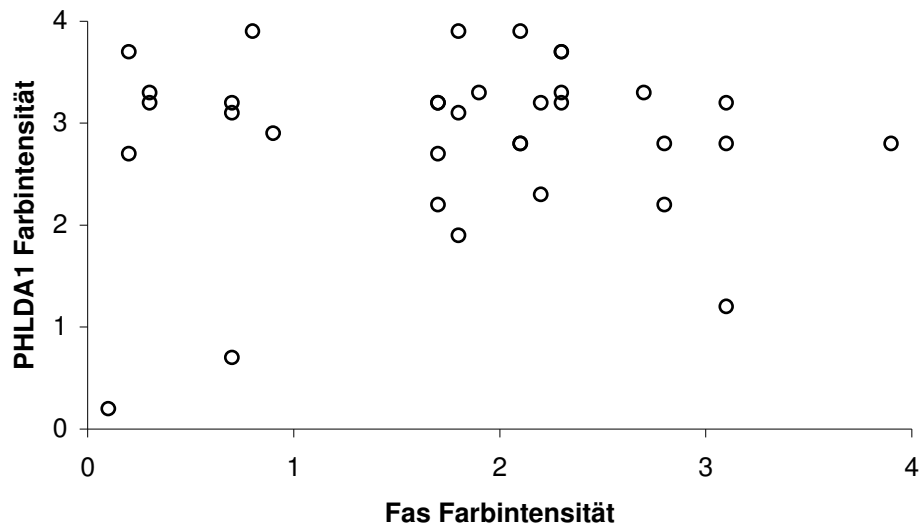


Abbildung 4.16 Kolorektale Karzinome, Farbintensität. Jeder Punkt stellt eine Gewebeprobe dar. Auf der x-Achse ist die Farbintensität der Fas-Färbung und auf der y-Achse die Farbintensität der PHLDA1-Färbung aufgetragen. N=34. (Spearman rank $r_s=-0.226$, $p=0.099$)

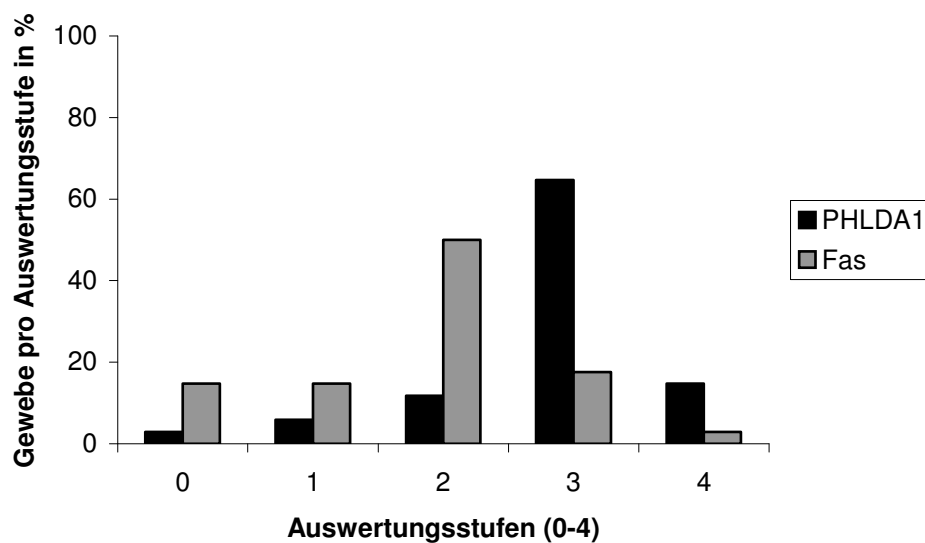


Abbildung 4.17 Kolorektale Karzinome, Farbintensität, prozentuale Verteilung. Auf der x-Achse sind die Auswertungsstufen aufgetragen, die y-Achse zeigt den Anteil der untersuchten Gewebe pro Auswertungsstufe in Prozent. N=34.

Wie schon für die Normalgewebe beschrieben, zeigte auch bei Tumoren der Vergleich der Auswertungsergebnisse für Farbintensität und Anzahl gefärbter Zellen im jeweiligen Gewebe, dass beide Messgrößen sich gleichsinnig verhalten, d.h. in Geweben mit einem hohen Anteil

PHLDA1- bzw. Fas-positiver Zellen war auch eine höhere Farbintensität der gefärbten Zellen festzustellen. Abbildung 4.18 und Abbildung 4.19 illustrieren diesen Zusammenhang für PHLDA1 bzw. Fas.

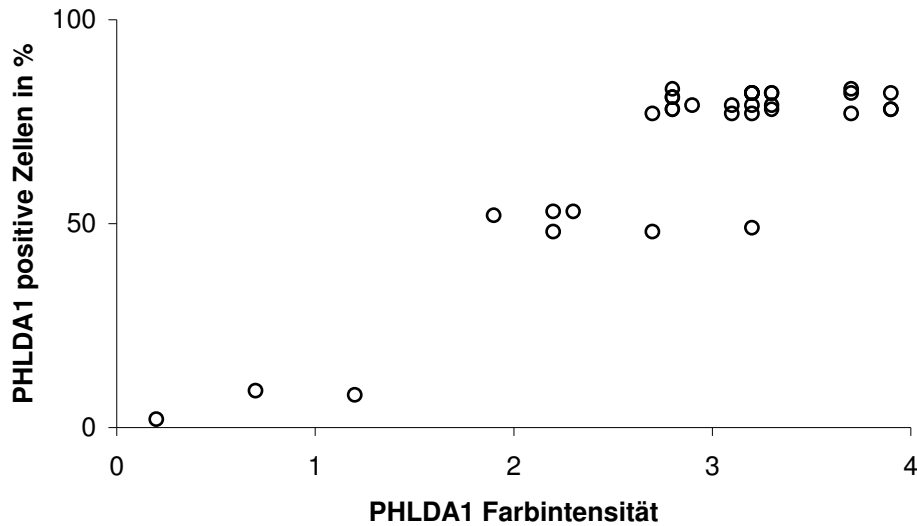


Abbildung 4.18 Kolorektale Karzinome, Vergleich von Farbintensität und Anzahl PHLDA1-positiver Zellen. Jeder Punkt stellt eine Gewebeprobe dar. Auf der x-Achse ist die Farbintensität der Färbung, auf der y-Achse der Anteil der PHLDA1-positiven Zellen in Prozent aufgetragen. Die Farbintensität und Anzahl PHLDA1-positiver Zellen sind signifikant korreliert. N=34. (Spearman rank $r_s=0.764$, $p<0.001$)

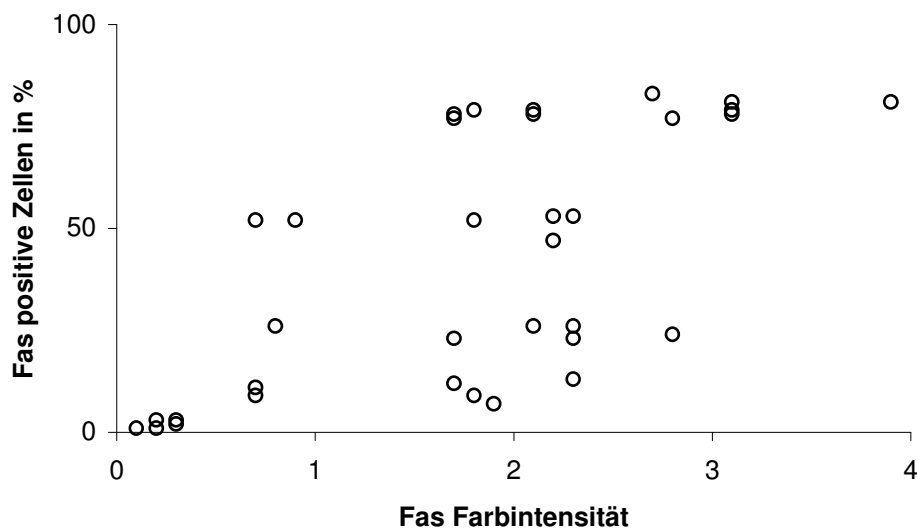


Abbildung 4.19 Kolorektale Karzinome, Vergleich von Farbintensität und Anzahl Fas-positiver Zellen. Jeder Punkt stellt eine Gewebeprobe dar. Auf der x-Achse ist die Farbintensität der Färbung, auf der y-Achse der Anteil der PHLDA1-positiven Zellen in Prozent aufgetragen. Die Farbintensität und Anzahl Fas-positiver Zellen sind signifikant korreliert. N=34. (Spearman rank $r_s=0.718$, $p<0.001$).

4.2.2 Vergleich der PHLDA1-/Fas-Expression in Abhängigkeit von der Lokalisation:

Weiterhin wurde untersucht, ob Unterschiede in der PHLDA1- bzw. Fas-Expression in Abhängigkeit von der Lokalisation innerhalb des Dickdarms bestehen. Abbildung 4.20 illustriert die PHLDA1- bzw. Fas-Expression von proximal (Coecum) nach distal (Rectum). Abbildung 4.21 stellt die prozentuale Verteilung der Auswertungsstufen gegenüber. Wiederum sind aufgrund der geringen Zahl untersuchter Gewebe in den jeweiligen Dickdarmabschnitten keine definitiven Aussagen zu treffen. Eine Schwankung der PHLDA1- und Fas-Expression in Abhängigkeit von der Provenienz der kolorektalen Karzinome lässt sich jedoch nicht ableiten.

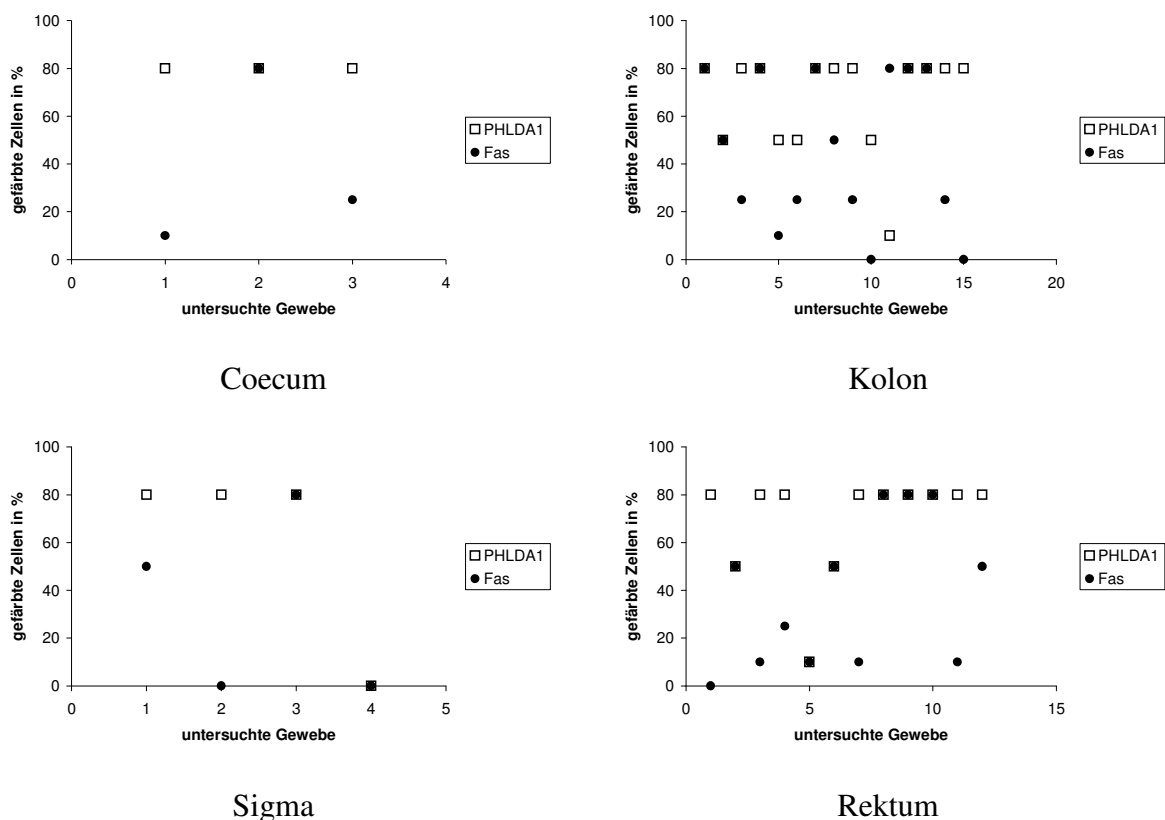


Abbildung 4.20 Kolorektale Karzinome, prozentualer Anteil PHLDA1-/ Fas-positiver Zellen von proximal nach distal. Coecum N=3, Colon N=15, Sigma N=4, Rectum N=12.

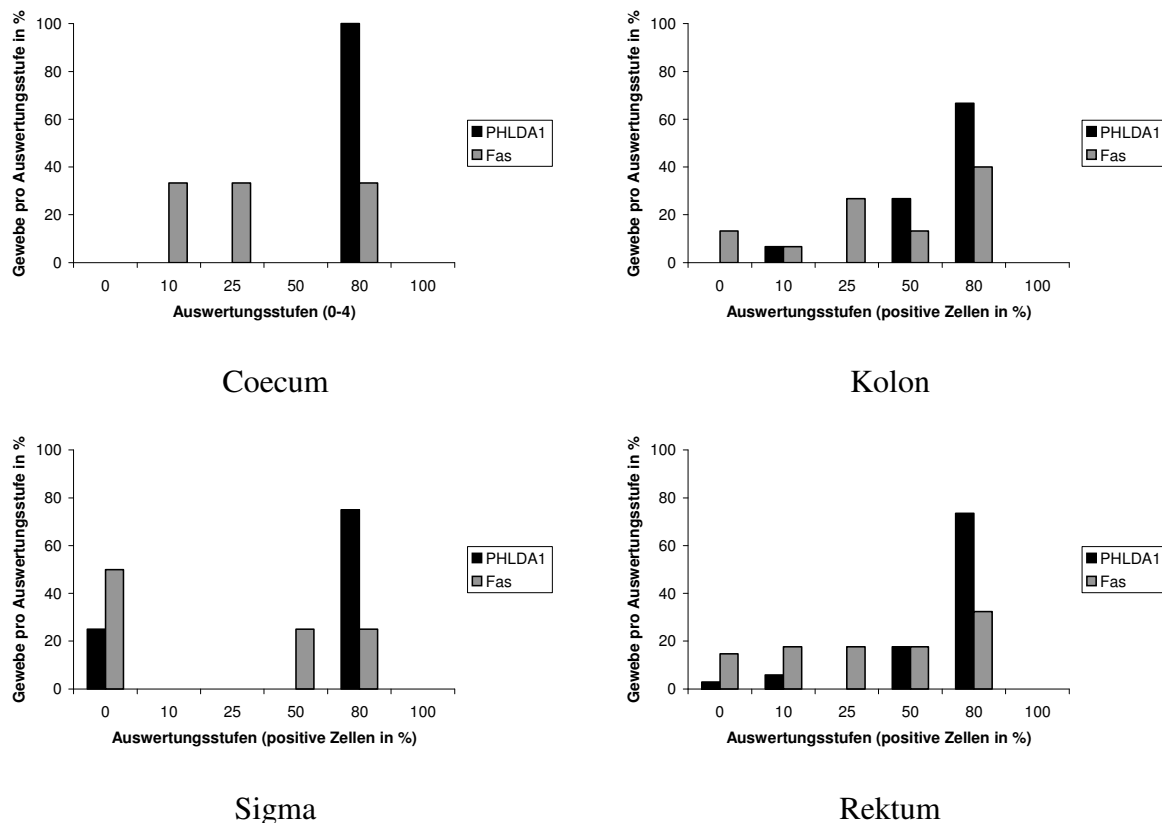


Abbildung 4.21 Normale kolorektale Schleimhaut, Anteil gefärbter Zellen, prozentuale Verteilung nach Lokalisation. Auf der x-Achse sind die Auswertungsstufen aufgetragen, die y-Achse zeigt den Anteil der untersuchten Gewebe pro Auswertungsstufe in Prozent. Coecum N=3, Colon N=15, Sigma N=4, Rectum N=12.

4.3 Vergleich der PHLDA1- bzw. Fas-Expression in normaler kolorektaler Schleimhaut und kolorektalen Karzinomen:

Der Vergleich der PHLDA1-Expression in normaler kolorektaler Schleimhaut und in kolorektalen Karzinomen zeigt, dass PHLDA1 in kolorektalen Karzinomen hochreguliert ist. In normaler kolorektaler Schleimhaut zeigten 58% der untersuchten Gewebe eine PHLDA1-Expression verglichen mit 97% PHLDA1 exprimierenden Karzinomen (Fisher exact, $p < 0.001$). Weiterhin konnten in keiner Gewebeprobe normaler kolorektaler Schleimhaut mehr als 50% PHLDA1-positive Zellen nachgewiesen werden. Demgegenüber zeigten in der Gruppe der kolorektalen Karzinome 91% der untersuchten Gewebe eine PHLDA1-Expression $> 50\%$ (Fisher exact $p < 0.0001$), 74% sogar eine PHLDA1-Expression von mehr als 80% der Zellen (Abbildung 4.22).

Einer ausgeprägten PHLDA1-Expression in kolorektalen Karzinomen steht somit eine geringgradige PHLDA1-Expression in normaler kolorektaler Schleimhaut gegenüber.

Gleichsinnig verhält sich hierbei die Farbintensität der gefärbten Zellen; auch hier steht eine schwache Farbintensität für PHLDA1 in normaler kolorektaler Schleimhaut (90% aller Gewebe entfallen auf die Auswertungsstufen 0 und 1) einer starken Farbintensität der gefärbten Zellen in Karzinomen (80% entfallen auf die Auswertungsstufen 3 und 4) gegenüber (Abbildung 4.23).

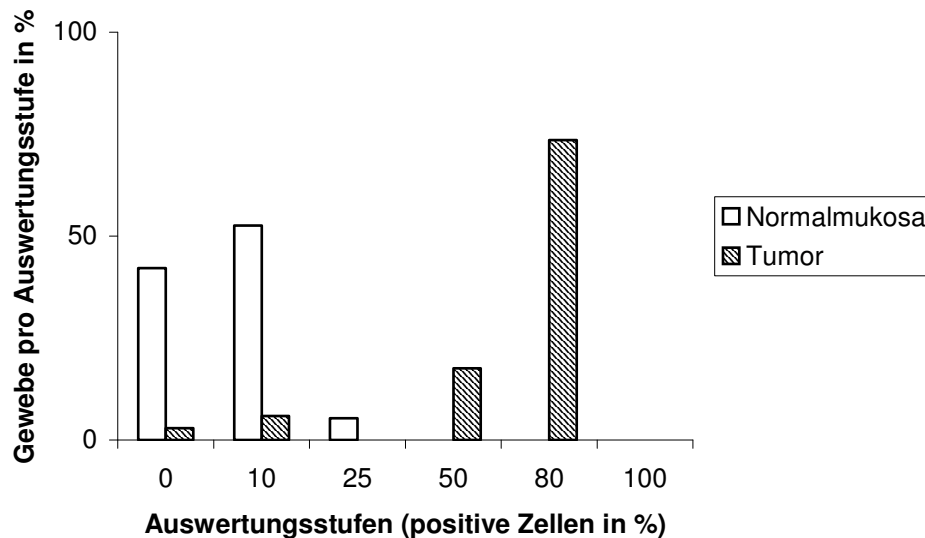


Abbildung 4.22 PHLDA1-Expression in normaler kolorektaler Schleimhaut und kolorektalen Karzinomen. Auf der x-Achse sind die Auswertungsstufen aufgetragen in Prozent gefärbter Zellen, die y-Achse zeigt den Anteil der untersuchten Gewebe pro Auswertungsstufe in Prozent. Normalmukosa N=19, Tumor N=34.

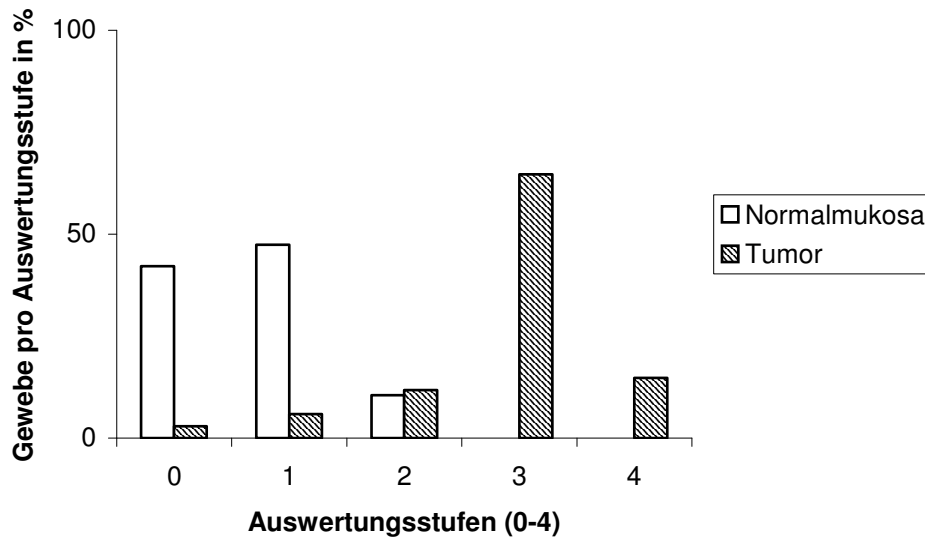


Abbildung 4.23 PHLDA1 Farbintensität in normaler kolorektaler Schleimhaut und kolorektalen Karzinomen. Auf der x-Achse sind die Auswertungsstufen aufgetragen, die y-Achse zeigt den Anteil der untersuchten Gewebe pro Auswertungsstufe in Prozent. Normalmukosa N=19, Tumor N=34.

Im Vergleich dazu stand der homogen starken Fas-Expression in normaler kolorektaler Schleimhaut (95% der untersuchten Gewebe zeigten eine Fas-Expression von mehr als 80% der Zellen) eine Fas-Expression in kolorektalen Karzinomen gegenüber, die keine klare Tendenz ablesen ließ; die Gewebe sind mit ihrer Fas-Expression relativ gleichmäßig über die Auswertungsstufen verteilt (Abbildung 4.24). Obwohl der Unterschied zwischen dem Prozentsatz Fas-positiver Schleimhautproben (100%) und Fas-positiver Karzinome (85%) nicht signifikant ist (Fishers exact, $p=0.09$), so ist doch, betrachtet man nur die Gewebe mit >50% gefärbten Zellen, die Fas-Expression bei Tumoren (50%) signifikant niedriger als in normaler kolorektaler Schleimhaut (95%, Fishers exact $p<0.0001$).

Die Farbintensität der Fas-positiven Zellen war ebenso in normaler kolorektaler Schleimhaut bei 73,7% der untersuchten Gewebe stark (Stufe 3), bei den Karzinomen war bei 70,5% der untersuchten Gewebe die Farbintensität immer noch 2 (mittel) und stärker (Abbildung 4.25).

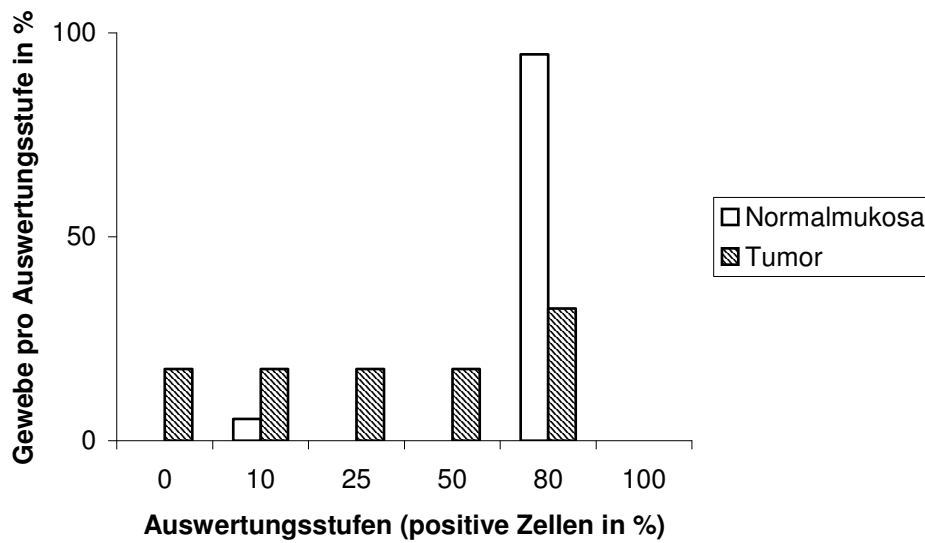


Abbildung 4.24 Fas-Expression in normaler kolorektaler Schleimhaut und kolorektalen Karzinomen. Auf der x-Achse sind die Auswertungsstufen aufgetragen, die y-Achse zeigt den Anteil der untersuchten Gewebe pro Auswertungsstufe in Prozent. Normalmukosa N=19, Tumor N=34.

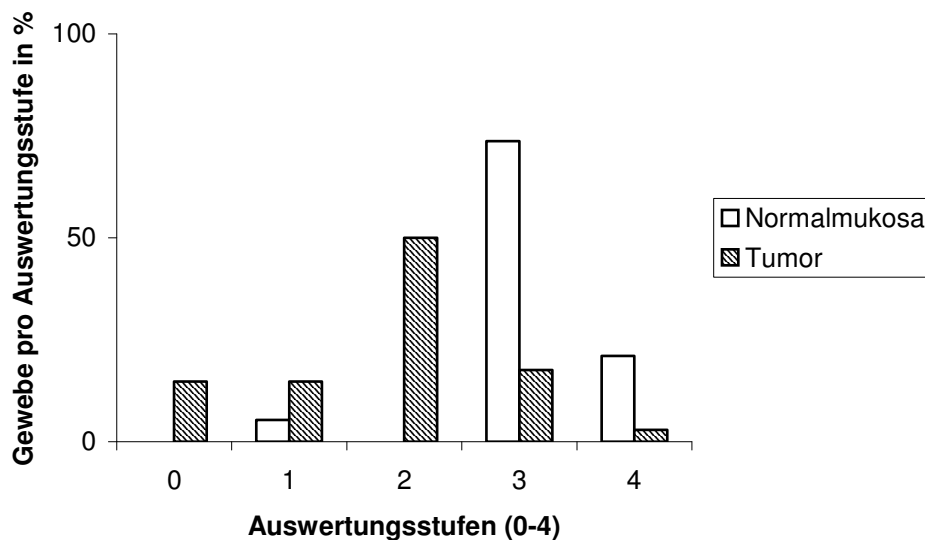


Abbildung 4.25 Fas Farbintensität in normaler kolorektaler Schleimhaut und kolorektalen Karzinomen. Auf der x-Achse sind die Auswertungsstufen aufgetragen, die y-Achse zeigt den Anteil der untersuchten Gewebe pro Auswertungsstufe in Prozent. Normalmukosa N=19, Tumor N=34.

PHLDA1 ist somit hochreguliert in kolorektalen Karzinomen. In deutlichem Kontrast zu normaler kolorektaler Schleimhaut, bei der nur wenig PHLDA1 exprimierende Zellen an der Kryptenbasis liegen, zeigen die transformierten Enterozyten der kolorektalen Karzinome eine homogene, über das gesamte Tumorgewebe hinweg sichtbare PHLDA1 Expression.

Die Fas-Expression geht mit diesem gegenläufigen Bild nur mit Einschränkungen konform; bei den Tumoren ist weiterhin eine, wenn auch geringere Fas Expression festzustellen.

5 Diskussion:

PHLDA1 (pleckstrin homology-like domain, family A member 1) ist ein zytoplasmatisches Protein von ca. 40 kDa, das auf Protein-Protein Interaktion hinweisende Q-(opa), PQ- und PH-Domänen enthält (Kuske 1998; Park et al., 1996). Es handelt sich um das humane Homolog zum murinen TDAG51 (T cell death-associated gene 51; Park et al., 1996). Seine Transkription ist durch Mitogene, Wachstumsfaktoren oder Serumstimulation, wie auch durch Phorbol ester (z.B. PMA, Phorbol 12-Myristate 13-Acetate) -Behandlung Cycloheximid-unabhängig induzierbar, weshalb die Zuordnung zur Gruppe der „immediate early response“ Gene, deren mRNA-Expression nach Mitogenstimulation innerhalb von Minuten aktiviert wird, sinnvoll erscheint (Kuske, 1998). In Zelllinien war nach Induktion eine transiente PHLDA1-Expression festzustellen mit einem Maximum nach 3-6 Stunden und einer Rückkehr auf Ausgangsniveau nach 48 Stunden. Auf mRNA-Ebene war, außer bei hämatopoetischen Zellen, eine ubiquitäre PHLDA1-Expression feststellbar (Kuske, 1998). Immunhistochemische Untersuchungen mit einem monoklonalen Antikörper ergaben keine detektierbare PHLDA1-Expression in normaler Haut und Lymphknoten. Im Gegensatz dazu zeigten immunhistochemisch gefärbte melanozytäre Primärtumoren bei 91% der untersuchten Gewebe einen Anteil von mehr als 50% PHLDA1-positiver Zellen, so dass hier von einer konstitutiven PHLDA1-Expression auszugehen ist (Neef et al., 2002). Ein entsprechendes Muster konnte in der vorliegenden Arbeit auch an Gewebeproben kolorektaler Tumoren festgestellt werden, hier lag ebenfalls bei 91% der untersuchten Proben der Anteil PHLDA1-positiver Zellen über 50% und sogar bei 74% der Gewebe über 80%. Nur eine einzige Kolonkarzinomprobe zeigte keine PHLDA1-Expression. Der Vergleich unterschiedlicher Lokalisationen innerhalb des Dickdarms ergab eine geringere PHLDA1-Expression im Kolon im Vergleich zu den übrigen Dickdarmabschnitten, die geringe Zahl der untersuchten Gewebe in der jeweiligen Gruppe ließ eine statistische Beurteilung dieses möglichen Zusammenhanges jedoch nicht zu. Im Gegensatz hierzu war in normaler kolorektaler Schleimhaut nur eine geringe Zahl PHLDA1-positiver Zellen in 58% der Proben nachweisbar (siehe unten). Diese Ergebnisse zeigen, dass die PHLDA1-Expression nicht nur in Melanomen, sondern auch in kolorektalen Karzinomen hochreguliert ist.

Die Funktion von PHLDA1 ist noch nicht vollständig geklärt, in mehreren Modellsystemen war aber seine Expression mit der Induktion des programmierten Zelltods (Apoptose)

assoziiert. So war in einem von Park et al. verwendeten Mausmodell PHLDA1 (TDAG51)-Expression eine notwendige Voraussetzung für die T-Zellrezeptor vermittelte Apoptose (Park et al. 1996). Für das auf Proteinebene zu 80% mit PHLDA1 übereinstimmende PQR (für prolin and glutamin rich) -Protein der Ratte ist eine Rolle bei der Apoptoseregulation während der Differenzierung neuronaler Zellen beschrieben (Gomes et al., 1999). Darüber hinaus konnte bei einer Untersuchung an aus humanen Gefäßendothelien generierten Zellkulturen gezeigt werden, dass PHLDA1 sich durch Homocystein, einem unabhängigen Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen, induzieren ließ, was zu einer vermehrten ablösungsinduzierten Apoptose führte. Bei Apolipoprotein E defizienten Mäusen, die mit einer homozysteinreichen Diät ernährt wurden, war in den atherosklerotischen Läsionen (Plaques) vermehrt PHLDA1 nachweisbar, weshalb die Autoren PHLDA1 über dessen proapoptotische Wirkung eine Rolle bei der hyperhomozysteinvermittelten Atheroskleroseentstehung zuschreiben (Hossain et al., 2003).

Analog zu diesen Resultaten zeigten Hayashida et al. (2006), dass PHLDA1 durch Hitzeschock induzierbar ist und bei der Apoptoseinduktion in männlichen Keimzellen nach Hitzeschock eine wichtige Rolle spielt. In unserem Labor generierte stabile PHLDA1-exprimierende Transfektanten zeigten eine Abnahme von Zellwachstum, Klonierungseffizienz und Koloniebildung. Annexin V Markierung und TUNEL Assays offenbarten, dass bei diesen PHLDA1-exprimierenden Transfektanten eine erhöhte basale Apoptoserate vorlag. Darüber hinaus war auch die Sensibilität gegenüber Doxorubicin, einem Chemotherapeutikum, bei den PHLDA1-positiven Zellen deutlich erhöht (Neef et al., 2002).

Über welche zellulären Mechanismen PHLDA1 seine proapoptotische Wirkung entfaltet, ist weiter unklar. Die bisher publizierten Arbeiten zeichnen ein zum Teil widersprüchliches Bild. So war in einem von Park et al. verwendeten Mausmodell die PHLDA1-Expression eine notwendige Voraussetzung für die über Stimulation des T-Zellrezeptors getriggerte Hochregulation des Fas-Rezeptors, einem wichtigen Bestandteil der Apoptose-Kaskade aus der Gruppe der „death receptors“, weshalb für PHLDA1 eine Rolle bei der Fas-vermittelten Apoptose postuliert wurde (Park et al. 1996). In vivo dagegen konnte diese Annahme bisher nicht bestätigt werden, so zeigten TDAG51-defiziente Mäuse keinerlei Abnormalitäten bei normaler Fas-Expression und ungestörter T-Zell-vermittelter Apoptose. Als Grund für diesen Widerspruch zu den zuvor an T-Zell-Hybridomzelllinien gewonnenen Erkenntnissen wird vermutet, dass in TDAG51-defizienten Mäusen der Ausfall von TDAG51 durch funktionell homologe Proteine kompensiert wird (Rho et al., 2001).

Ein Zusammenhang zwischen Fas-Expression, PHLDA1-Expression und Apoptoserate wurde auch bei einer Untersuchung zur Hitzeschock-induzierten Apoptose festgestellt. In einem Mausmodell konnten Hayashida et al. zeigen, dass männliche Keimzellen bereits im Normalzustand eine Induktion von PHLDA1 mRNA zeigten, welche sich nach Exposition zu hohen Temperaturen nochmals steigern ließ. In PHLDA1-Null Mäusen zeigten diese Zellen eine reduzierte Fas-Expression und eine verminderte Apoptoserate nach Hitzeschock, weswegen sie, analog zu Park et al., PHLDA1 eine Rolle bei der Fas-induzierten Apoptose zuschreiben (Hayashida et al., 2006).

PHLDA1 ist während der Differenzierung *in vitro* von aus Ratten stammenden neuronalen Zellen induziert und an der Apoptose beteiligt (Gomes et al., 1999). Eine Assoziation zur Fas-Expression lag für PHLDA1 in diesem Modellsystem nicht vor. Bei den in unserem Labor aus Melanom- und 293 Nierenepithelzelllinien generierten stabilen PHLDA1-Transfektanten war ebenfalls keine Korrelation von PHLDA1- und Fas-Expression feststellbar (Neef et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit ergab die Untersuchung kolorektaler Primärtumoren in Bezug auf die PHLDA1- und Fas-Expression ein divergierendes Bild. Während die Mehrzahl der Tumoren einen hohen Anteil deutlich PHLDA1-positiver Zellen zeigte, war der Anteil Fas-positiver Zellen geringer. So war bei 74% der untersuchten Gewebe der Anteil der PHLDA1-positiven Zellen an der Gesamtheit der Enterozyten bei >80%, nur 32% der Tumoren zeigten hingegen eine Fas-Expression von >80% der Zellen. Der Unterschied in der Anzahl PHLDA1 und Fas positiver Tumoren war zwar nicht signifikant, betrachtete man jedoch die Zahl der Tumoren mit mehr als 50% antigenexprimierenden Zellen, so war ein signifikanter Unterschied festzustellen. Für die Farbintensität ergab sich ein ähnliches Verteilungsmuster. Insgesamt waren die wenigen Fas-positiven Zellen unregelmäßig über die Gewebe verteilt, ein wiederkehrendes Verteilungsmuster oder eine Häufung Fas-positiver Zellen entlang von Gefäßen oder ähnlichen Leitstrukturen im Gewebe war nicht feststellbar. Ebenso bestand keine Korrelation zwischen der Anzahl oder Lokalisation der im Gewebe nachweisbaren Lymphozyten und der Fas-Expression.

Die Expressionsmuster für PHLDA1 und Fas in normaler kolorektaler Schleimhaut unterschieden sich wiederum deutlich von jenen bei kolorektalen Tumoren. So waren bei allen untersuchten Gewebeproben normaler kolorektaler Schleimhaut Fas-positive Zellen in großer Zahl nachweisbar. Insgesamt zeigten fast alle untersuchten Gewebe eine vergleichbar hohe Fas-Expression, sowohl bezüglich der Anzahl gefärbter Zellen, als auch in der Farbintensität. In der überwiegenden Mehrzahl der Gewebe (95%) exprimierten >80% der

Enterozyten Fas. In den untersuchten Geweben zeigten die Fas-positiven Zellen ein homogenes Färbemuster. Eine lokale Häufung Fas-positiver Zellen innerhalb der Enterozytenpopulation war nicht feststellbar. Ebenso ergaben sich keine nennenswerten Unterschiede in der Farbintensität Fas-positiver Zellen.

Es bestand somit bei den in dieser Arbeit untersuchten Gewebeproben ein auffälliges inverses Expressionsmuster sowohl für PHLDA1, als auch für Fas. Interessant ist hierbei, dass nicht nur PHLDA1 und Fas innerhalb einer Gewebeart (Tumor- oder Normalgewebe) gegenläufig exprimiert waren, sondern auch die PHLDA1- und Fas-Expression in Tumoren und Normalgeweben ein inverses Muster zeigten.

Für Fas wurde eine homogene, ausgeprägte Expression in normaler kolorektaler Schleimhaut bereits in anderen Publikationen beschrieben. Allerdings stammten die untersuchten Gewebeproben auch in diesen Arbeiten von Tumorpatienten (von Reyher et al. 1998) bzw. von Patienten, die an Kolitis ulzerosa litten (Strater et al., 1997), was die Aussagekraft einschränkt. Zumindest in der Arbeit von von Reyher et al. (1998) ist ein Mindestabstand der Entnahmestellen normaler kolorektaler Schleimhaut zu den Tumoren von 10 cm dokumentiert. Es ist also anzunehmen, dass es sich bei dem in allen genannten Arbeiten beschriebenen homogenen, ausgeprägten Expressionsmuster für Fas um einen physiologischen Zustand handelt.

Demgegenüber waren PHLDA1-positive Zellen in den untersuchten Gewebeproben normaler kolorektaler Schleimhaut dünn gesät. In nur 58% der Gewebe waren überhaupt PHLDA1-positive Zellen nachweisbar, die jedoch innerhalb der Gesamtheit der in einer Gewebeprobe vorhandenen Enterozyten eine relativ kleine Gruppe darstellten. So lag bei 53% der Gewebe der Anteil PHLDA1-positiver Zellen bei nur >10%-25%. Nur bei einer Gewebeprobe waren 25-50% der Enterozyten PHLDA1-positiv. Einer ausgeprägten Fas-Expression stand somit eine nur geringgradige PHLDA1-Expression gegenüber, wenn auch zwischen PHLDA1 und Fas-Expression keine signifikante inverse Korrelation bestand. Der Vergleich der Farbintensität der einzelnen Gewebe für PHLDA1 und Fas ergab ebenso eine insgesamt geringe Intensität der PHLDA1-positiven Zellen bei ausgeprägter Farbintensität der Fas-positiven Zellen, hier bestand eine signifikante inverse Korrelation.

Das in der vorliegenden Arbeit angetroffene Verteilungsmuster von PHLDA1 und Fas lässt sich als Widerspruch zu der Annahme, PHLDA1 sei notwendig zur Fas-Expression, interpretieren und steht somit vordergründig im Gegensatz zu der von Park et al. für TDAG51 beschriebenen Funktion bei der Fas-Expression (Park et al., 1996). Zu gering erscheint die

Anzahl PHLDA1-positiver Zellen im Vergleich zur Vielzahl der Fas-positiven Enterozyten, auch wenn denkbar ist, dass an der Kryptenbasis, wie von Park et al. beschrieben, PHLDA1-abhängig Fas exprimiert wird, PHLDA1 aber im Anschluss wieder herunterreguliert wird, während die Fas-Expression während der Wanderung der Zellen von der Kryptenbasis Richtung Lumen bestehen bleibt und möglicherweise bei der Elimination überalterter Enterozyten von Bedeutung ist, einem Prozess, der ebenfalls durch Apoptose erfolgt (Bullen et al., 2006).

Bislang ist allerdings noch unklar, auf welchem Weg PHLDA1 die Fas-Expression beeinflusst und welche weitere Mediatoren an dieser Interaktion beteiligt sind. Somit stellt diese Darstellung nur eine Interpretationsmöglichkeit des o.g. Sachverhaltes dar. Ebenso könnte das Verhältnis von mäßiger Fas- zu ausgeprägter PHLDA1-Expression auch als Beleg dafür gewertet werden, dass der von Park et al. (1996) gefundene Zusammenhang bei kolorektalen Karzinomen nicht besteht und der PHLDA1-Expression in diesem Kontext eine andere Bedeutung zukommt.

In normaler kolorektaler Schleimhaut zeigten die wenigen PHLDA1-positiven Zellen ein lokal begrenztes Verteilungsmuster innerhalb der Kryptenarchitektur; typischerweise lagen sie in kleinen Zellnestern dicht zusammengedrängt an der Kryptenbasis. Dieses basale Verteilungsmuster war bei 91% aller Gewebe, in denen PHLDA1-positive Zellen vorlagen, nachweisbar. Keine PHLDA1-Expression zeigten die im Gewebe befindlichen Leukozyten sowie die Zellen des Bindegewebes und die extrazelluläre Matrix.

Die Kryptenbasis ist ein Kompartiment, dem innerhalb der Architektur der Darmschleimhaut eine besondere Bedeutung zukommt. Hier befinden sich die Stammzellen, aus denen sich die den Dickdarm auskleidenden Enterozyten ständig erneuern. So werden an der Oberfläche des Darmlumens abgeschilferte Zellen ständig durch neue, aus der Tiefe der Krypten emporwandernde Enterozyten ersetzt (Potten und Loeffler, 1990). Als wesentlicher Schutzmechanismus dieser Zellen vor Mutationen, wird postuliert, dass sie sich asymmetrisch teilen, d.h. während die Tochterzelle die neu synthetisierte DNA erhält, verbleibt die „alte“ DNA in der Stammzellpopulation (Potten et al., 2002). Weiterhin scheint eine besondere Neigung dieser Stammzellen, auf Schädigung der DNA mit Apoptose zu reagieren, zum Schutz vor maligner Entartung beizutragen. Die Ursache für diese besonderen Fähigkeiten liegt vermutlich nicht in den Stammzellen selbst begründet, vielmehr wird angenommen, dass ihre Lokalisation innerhalb einer bestimmten Nische im Zellverband sie zu ihrer besonderen Funktion befähigt (Spardling et al., 2001). So wird postuliert, dass diese Nische zumindest teilweise von endokrinen Zellen erzeugt wird, indem sie wachstumshemmende Peptide wie

Somatostatin oder Guanylin/Uroguanylin sezernieren und so die Stammzellen in einem ruhenden Zustand halten (Radford und Lobachevsky, 2006). Bisher kann über die Funktion von PHLDA1 in diesem Kompartiment nur spekuliert werden. Eine Untersuchung, die an menschlichen Haarfollikeln durchgeführt wurde, unterstreicht jedoch die mögliche Rolle von PHLDA1 bei der Kontrolle von Stammzellen. Haarfollikel sind Strukturen, die einen Zyklus durchlaufen und sich das ganze Leben hindurch aus Keratinozytenstammzellen selbst erneuern. Ohyama et al. gelang es zu zeigen, dass PHLDA1 auf mRNA und Proteinebene bevorzugt in den Zellen der äußeren Wurzelhülle, und somit im Bereich der Keratinozytenstammzellen, exprimiert wird (Ohyama et al., 2006). Welche Funktion PHLDA1 hier zukommt, ist noch unklar. Ebenso sind in diesem Kontext bisher keine Interaktionspartner identifiziert, eine Assoziation zu Signalwegen, die an der Regulation und Ausführung der Apoptose beteiligt sind, erscheint jedoch sinnvoll.

Ein wesentliches Problem bei der Beurteilung von Zellen an der Kryptenbasis stellt ihre Identifikation dar. Stammzellen sind zwar funktionell gut als undifferenzierter Zelltyp mit der Fähigkeit zur Proliferation und Selbsterhaltung, Produktion einer Vielzahl von Zelltypen und der Anlage zur Geweberegeneration nach Verletzungen definiert, dieser funktionellen Beschreibung stehen bisher aber keine klaren morphologischen Kriterien gegenüber, so dass die Identifikation von Stammzellen im wesentlichen von molekularen Markern abhängt. Um der Frage nachzugehen, ob es sich bei den in der vorliegenden Arbeit gefundenen PHLDA1-positiven Zellen an der Kryptenbasis um proliferierende oder ruhende Zellen handelt, wurde ein Anti-Ki-67-Antikörper eingesetzt. Das Ki-67-Protein ist in allen aktiven Phasen des Zellzyklus (G1, S, G2, Mitose), nicht jedoch in Zellen, die sich in der G0- (Ruhe-) Phase befinden, nachweisbar (Scholzen und Gerdes, 2000). Dies macht es zu einem exzellenten Marker zur Identifikation proliferierender Zellen innerhalb einer Zellpopulation. Durch Verwendung streng aufeinanderfolgender Gewebeschnitte wurde versucht, maximale Vergleichbarkeit der PHLDA1- bzw. Ki-67-positiven Enterozyten zu erreichen. Hierbei bestätigte sich die Annahme, dass es sich bei den an der Kryptenbasis gelegenen PHLDA1-positiven Zellnestern um proliferativ aktive Regionen handelt. Es bestand eine weitgehende Überlappung von PHLDA1- und Ki-67-positiven Gewebeanteilen, insgesamt waren aber mehr Ki-67-positive Zellen nachweisbar, deren Verbreitungsgebiet auch über die Kryptenbasis hinausreichte. Ob und wenn ja wie häufig Ki-67 und PHLDA1 von ein und der selben Zelle exprimiert werden, oder ob beide Proteine in unterschiedlichen Zellen, die in unmittelbarer Nachbarschaft lokalisiert sind, vorkommen, konnte nicht mit letzter Sicherheit

festgestellt werden. Die Klärung dieser Frage muss Methoden überlassen bleiben, bei denen verschiedene Antikörper auf ein und demselben Gewebeschnitt zum Einsatz kommen und somit nicht mit dem Manko serieller Schnitte behaftet sind, Zellen nicht zweifelsfrei als identisch identifizieren zu können. In Zukunft könnte auch ein Vergleich mit der Expression von Musashi-1 hilfreich sein, einem Protein, dessen fokale Expression in den Krypten kolorektaler Schleimhaut beschrieben ist. Hierbei handelt es sich um das humane Homolog eines Genprodukts, welches erstmals als RNA-Bindungsprotein bei der asymmetrischen Teilung von Vorläuferzellen der Sinnesorgane von *Drosophila melanogaster* beschrieben wurde (Nakamura et al., 1994). Nachdem Musashi-1 bereits in neuronalen Vorläuferzellen nachgewiesen werden konnte (Kaneko et al., 2000), gelang es diesen mutmaßlichen Kofaktor asymmetrischer Zellteilung, einem wesentlichen Merkmal pluripotenter Stammzellen, auch in den Krypten kolorektaler Schleimhaut nachzuweisen (Nishimura et al., 2003).

In zukünftigen Untersuchungen könnte deshalb ein direkter Vergleich der Expressionsmuster von PHLDA1 und Musashi-1 eine klarere Identifikation PHLDA1-positiver Zellen an der Kryptenbasis erlauben.

Das menschliche PHLDA1 (pleckstrin homology-like domain, family A member 1) -Gen wurde erstmals bei der Suche nach Genen, die am Metastasierungsprozess des malignen Melanoms beteiligt sind, identifiziert. Seine mRNA war bei einer differential display-Analyse, bei der das Expressionsmuster aus Melanomprimärtumoren und autologen Melanommetastasen gewonnener Zelllinien verglichen wurde, vermindert exprimiert in Metastasen-Zelllinien im Vergleich zu den autologen Primärtumorzelllinien (Kuske, 1998; Neef et al., 2002). Western-Blot Analysen bestätigten auf Proteinebene die verminderte Expression in den aus Metastasen gewonnenen Zelllinien. Immunhistochemische Untersuchungen an melanozytären Läsionen ergaben ebenfalls eine abnehmende PHLDA1-Expression von (benignen) Nävi über Primärtumoren hin zu Metastasen (Neef et al., 2002).

Dies führte zu der Annahme, dass beim malignen Melanom die PHLDA1-Expression während der Tumorprogression herunterreguliert wird bzw. der Verlust von PHLDA1 mit einem maligneren Phänotyp einhergeht.

Inzwischen wurden bei Studien an Mammakarzinomen ähnliche Beobachtungen gemacht und für diese Tumorart eine Korrelation zwischen PHLDA1-Verlust und einer schlechten Prognose bestätigt. Beim Vergleich des Expressionsmusters von Mammakarzinomen und normalem Brustgewebe mittels differential display Technik war PHLDA1 in Mammakarzinomen herunterreguliert (Nagai et al, 2003). In einer anschließenden Studie

wurde das Expressionsmuster von PHLDA1 in fast 700 primären Mammakarzinomen auf mRNA- und Proteinebene bestimmt und mit der Prognose korreliert. Dabei zeigte sich, dass der Verlust der PHLDA1-Expression ein unabhängiger (negativer) prognostischer Parameter bei Mammakarzinompatientinnen ist. Obwohl in der untersuchten Primärtumorengruppe keine Korrelation bestand zwischen PHLDA1-Expression und Östrogenrezeptor-Positivität, hatten Patientinnen mit Tumoren, die einen PHLDA1- und Östrogenrezeptormangel zeigten, das schlechteste Outcome. Interessanterweise hatten Patientinnen mit Östrogenrezeptor-negativen Tumoren die PHLDA1 exprimierten einen besseren Krankheitsverlauf, als Patientinnen mit Östrogenrezeptor-positiven Brusttumoren die PHLDA1 exprimierten. Herunterregulation der PHLDA1 Protein-Expression war durchweg mit einem erhöhten Todesrisiko verbunden und wurde bereits bei 80% der im Frühstadium befindlichen Tumoren gefunden (Nagai et al., 2007).

Die zugrundeliegenden Mechanismen hierfür sind unklar, eine Bedeutung von PHLDA1 bei der Apoptose ist, sowohl im physiologischen Kontext der Brustdrüse, als auch bei Brusttumoren jedoch denkbar, da Apoptose eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der Brustdrüsengänge, Erhalt und Involution nach Laktation spielt und seine beeinträchtigte Kontrolle bei der Entwicklung und Progression von Brusttumoren von wesentlicher Bedeutung ist.

Vergleicht man die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit den an Melanomen und Mammakarzinomen gewonnenen Erkenntnissen, so besteht vordergründig eine deutliche Diskrepanz.

Die Gegenüberstellung der Ergebnisse dieser Arbeit mit den von Neef et al. (2002) an melanozytären Läsionen erhobenen Befunden ist jedoch nur eingeschränkt möglich, da unterschiedliche Stadien der Tumorgenese des jeweiligen Tumors untersucht wurden. Für die vorliegende Arbeit standen leider weder kolorektale Adenome (als benigne Vorstufe des kolorektalen Karzinoms analog zum Nävus), noch Metastasen zur Verfügung. Somit können die an kolorektalen Gewebeproben erhobenen Befunde nicht zweifelsfrei als im Widerspruch zu den an melanozytären Läsionen erhobenen Daten stehend gewertet werden. Es muss vielmehr auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass der ausgeprägten PHLDA1-Expression in kolorektalen Karzinomen eine noch stärkere PHLDA1-Expression in kolorektalen Adenomen gegenüberstehen könnte. Auch bezüglich der PHLDA1-Expression in Metastasen kann, in Ermangelung entsprechender Gewebeproben, keine Aussage gemacht werden.

Neef et al. (2002) konnten in der die melanozytären Nävi umgebenden Epidermis keine PHLDA1-Expression feststellen. Allerdings wäre es falsch, diese Tatsache mit der geringen PHLDA1-Expression innerhalb normaler kolorektaler Schleimhaut gleichzusetzen. Kolorektale Tumoren entwickeln sich aus Enterozyten, d.h. aus dem in der kolorektalen Schleimhaut vorherrschenden Zelltypus. Die Epidermis besteht jedoch überwiegend aus Epithelzellen, Melanozyten kommen in diesem Zellverband nur als Einzelzellen und in deutlich geringerer Zahl vor.

Einschränkend bezüglich der Interpretierbarkeit der vorliegenden Daten muss weiterhin bedacht werden, dass alle untersuchten Gewebeproben normaler kolorektaler Schleimhaut intraoperativ von Tumorpatienten gewonnen wurden. Somit kann nicht mit letzter Sicherheit davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem beschriebenen Expressionsmuster um einen wirklich physiologischen Zustand handelt. Die Möglichkeit, dass in der Umgebung von Tumoren auch Anteile der Dickdarmschleimhaut, die histopathologisch unverändert erscheinen, auf molekularer Ebene bereits Veränderungen zeigen, muss bei der Auslegung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zumindest in Betracht gezogen werden. Unter diesem Blickwinkel bliebe darüber hinaus zu klären, ob es sich bei einem mutmaßlich veränderten Expressionsmuster augenscheinlich unveränderter Zellen um eine Reaktion auf das benachbarte Tumorgewebe handelt, oder ob es Ausdruck einer beginnenden Entartung der Zellen selbst ist.

Letztlich ist, auf der Grundlage der in dieser Arbeit erhobenen Daten, auch eine Funktion von PHLDA1 bei der Proliferation von Zellen denkbar. Das Vorkommen von PHLDA1-positiven Zellen sowohl in der proliferativ aktiven Zone normaler kolorektaler Schleimhaut, als auch in Tumorgewebe, lässt diese Sichtweise durchaus zu.

Interessant ist in diesem Kontext eine Arbeit, die einen Zusammenhang zwischen PHLDA1 und den antiapoptischen Effekten von Insulin-like growth factor I (IGF-I), einem Polypeptidhormon das strukturell homolog zu Insulin ist, herstellt. IGF-I ist mit Zellproliferation, Zellwachstum und Schutz vor Apoptose assoziiert, welche molekularen Mechanismen diesen Fähigkeiten zugrunde liegen, ist jedoch noch weitgehend unbekannt (Dupont et al., 2001). PHLDA1-Expression ist durch IGF-I induziert. In der Folge konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der PHLDA1-Expression durch PHLDA1 siRNA (für small interfering RNA) -Expression die Fähigkeit von IGF-I, Zellen vor der Apoptose durch Serumentzug zu schützen, aufhob. Aus dieser Beobachtungen schlossen die Autoren, dass

PHLDA1 ein wichtiger Regulator der antiapoptotischen Effekte von IGF-I sei (Toyoshima et al., 2004).

Alternativ zu den bisher genannten Publikationen, wurde für PHLDA1 als Funktionsmechanismus eine Rolle bei der Translation beschrieben. Grund für diese Annahme war die Beobachtung, dass bei Kotransfektion einer Luziferase-mRNA und PHLDA1 in die Mammalia 293T-Zelllinie die Expression von PHLDA1 eine reduzierte Translation des Luziferase-Reportergens zur Folge hatte, weshalb die Autoren einen hemmenden Effekt auf die Proteinsynthese als mögliche Grundlage für seine Funktion annahmen. Darüber hinaus gelang es ihnen in einem yeast to hybrid screen drei mögliche Interaktionspartner für PHLDA1 zu identifizieren, für die eine Beteiligung an der Regulation der Translation beschrieben ist (Hinz et al., 2001). Auch Neef (2001) konnte in einem yeast to hybrid screen mögliche Interaktionspartner für PHLDA1 identifizieren. Hierbei handelt es sich unter anderem um die p47-Untereinheit des Translationsinitiationsfaktors eIF3 (eIF3-p47), welcher bei der Translationseinleitung von wesentlicher Bedeutung ist (Methot et al., 1997).

Ob diese beschriebenen Interaktionen jedoch auch unter physiologischen Bedingungen stattfinden ist noch offen. Eine generelle Hemmung der Proteinsynthese als Mechanismus der proapoptotischen Wirkung, wie von Hinz et al. postuliert, wurde von Neef et al. nicht beobachtet, stabile PHLDA1-Transfektanten zeigten keine Reduktion der Gesamtproteinmenge im Vergleich zur Kontrollgruppe (Neef, 2001).

Mittlerweile sind weitere Gene bekannt, die Sequenzhomologien zu PHLDA1 aufweisen. So wurde bei der Untersuchung von Genen, die genomischem Imprinting (Imprinting, genomisches: unterschiedliche Expression eines Gens oder einer Genregion in Abhängigkeit von der Vererbung über die männliche oder weibliche Gametogenese) unterliegen, das IPL- (für Imprinted in Placenta and Liver) Gen identifiziert, das nur vom mütterlichen Allel exprimiert wird und vor allem in Plazenta, Dottersack und fetaler Leber vorkommt (Qian et al., 1997). Auch Tih1 (für TDAG51/ IPL homolog 1) weist in der Sequenz Ähnlichkeiten zu TDAG51 auf und ist auf einer Vielzahl fetaler und adulter Gewebe exprimiert (Frank et al., 1999). Eine über den Kontext von Proliferation und Apoptose hinausreichende Funktion von PHLDA1 ist somit denkbar.

Die vorliegende Arbeit untersuchte erstmalig die PHLDA1 Expression in normaler kolorektaler Schleimhaut und kolorektalen Karzinomen.

Sowohl im gesunden, als auch bei maligne verändertem Gewebe konnte PHLDA1 nachgewiesen werden. In normaler kolorektaler Schleimhaut war nur ein sehr geringer Anteil

PHLDA1-positiver Zellen auszumachen. Diese lagen an der Kryptenbasis. Bei kolorektalen Karzinomen war der Anteil PHLDA1-positiver Zellen deutlich größer. Normale kolorektale Schleimhaut zeigte eine ausgeprägte Fas-Expression, während kolorektale Karzinome im Vergleich weniger Fas exprimierten.

Die PHLDA1-Expression im Stammzellkompartiment normaler kolorektaler Schleimhaut wurde in dieser Arbeit erstmals beschrieben. Ob es sich bei den PHLDA1-positiven Zellen um Stammzellen handelt, oder ob es Zellen sind, die am Milieu dieser Nische im Zellverbund beteiligt sind, muss in zukünftigen Untersuchungen eine Klärung finden. Der Vergleich der PHLDA1-Expression mit Stammzellmarkern wie z.B. Musashi-1 könnte hierbei hilfreich sein.

In verschiedenen Modellsystemen konnte mit unterschiedlichen experimentellen Ansätzen gezeigt werden, dass PHLDA1 eine Rolle beim programmierten Zelltod spielt. Bezüglich der Mechanismen über die PHLDA1 sowohl in physiologischen Geweben, wie auch bei Tumoren hier eingreift, ist bisher nur wenig bekannt. Die Charakterisierung von Signalwegen, in die PHLDA1 involviert ist, könnte hierbei hilfreich sein und vielleicht auch die bisher noch widersprüchlichen Resultate zum möglichen Zusammenhang von PHLDA1- und Fas-Expression in Einklang bringen.

Das Expressionsmuster der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gewebeproben unterschied sich von den bisher für andere Tumorarten publizierten Resultaten. Die Untersuchung von Tumorstufen (Adenomen) und Metastasen könnte hier für eine bessere Vergleichbarkeit und möglicherweise für die Auflösung dieser Diskrepanz sorgen.

Beim Mammakarzinom liegen für PHLDA1 Daten vor, die eine zukünftige Verwendung zur Beurteilung der individuellen Prognose eines Tumorleidens denkbar machen. Ob PHLDA1 auch beim kolorektalen Karzinom in Zukunft als prognostischer Marker Verwendung finden kann, muss in größeren Untersuchungen und unter Einbeziehung der Krankheits- und Therapieverläufe geklärt werden. Sollte sich in Zukunft zeigen, dass die Expression von PHLDA1 mit bestimmten (Früh?-) Stadien eines Tumorleidens einhergeht, so ist auch eine Verwendung zum Screening oder zur Verlaufsbeurteilung denkbar.

Die in dieser Arbeit erstmals beschriebene Expression von PHLDA1 bei einem häufigen Tumor wie dem kolorektalen Karzinom, wie auch im Stammzellkompartiment kolorektaler Schleimhaut, unterstreicht den möglichen Beitrag, den ein tieferes Verständnis der Funktion dieses Proteins für das Verständnis von Tumorentstehung und -progression leisten kann.

6 Zusammenfassung:

PHLDA1 (pleckstrin homology-like domain, family A member 1) ist ein zytoplasmatisches Protein von ca. 40 kDa. Seine Transkription ist innerhalb von Minuten durch Mitogene Cycloheximid-unabhängig induzierbar, was eine Eingruppierung als „immediate early response“ Gen nahe legt.

Seine Funktion konnte bisher noch nicht vollständig geklärt werden, in einer Vielzahl von unterschiedlichen Modellsystemen wurde aber für PHLDA1 eine Assoziation zur Induktion der Apoptose, dem programmierten Zelltod, festgestellt.

Das menschliche PHLDA1 wurde im Rahmen einer differential display Analyse bei Melanomprimärtumoren und Melanommetastasen entdeckt. PHLDA1 war in Primärtumoren hochreguliert und wurde in Metastasen herunterreguliert, was möglicherweise mit einer verminderten Fähigkeit der Zellen, apoptotisch zu werden, einhergeht.

Die vorliegende Arbeit beschreibt erstmalig die Expression von PHLDA1 in normaler kolorektaler Schleimhaut und kolorektalen Karzinomen. Es wurden 34 Gewebeproben kolorektaler Karzinome und 19 Proben normaler kolorektaler Schleimhaut mit einem gegen PHLDA1 gerichteten monoklonalen Antikörper immunhistochemisch gefärbt und die Gewebeschnitte im Bezug auf die Anzahl PHLDA1-positiver Zellen in Prozent und deren Farbintensität ausgewertet.

33 von 34 untersuchten kolorektalen Karzinomen exprimierten PHLDA1 wobei die Mehrheit (74%) eine ausgeprägte PHLDA1-Expression zeigte (>80% der Zellen). Bei den Gewebeproben normaler kolorektaler Schleimhaut waren nur in 58% der untersuchten Proben PHLDA1-positiv Zellen nachweisbar, die nur einen geringen Anteil der Zellen ausmachten. Diese Ergebnisse zeigen, dass PHLDA1 auch beim kolorektalen Karzinom hochreguliert ist.

In manchen Modellsystemen ist die PHLDA1-Expression mit der Expression des Fas-Rezeptors, eines Todesrezeptors aus der Familie der TNF-Rezeptoren, assoziiert.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich ein inverses Expressionsmuster für PHLDA1 und Fas. Die überwiegende Mehrzahl (95%) der untersuchten Proben normaler kolorektaler Schleimhaut zeigte eine ausgeprägte Fas-Expression bei geringer PHLDA1-Expression, wenn auch dieses inverse Expressionsmuster nicht signifikant korreliert war. Der Vergleich der Farbintensität der PHLDA1- und Fas-positiven Zellen ergab ebenfalls ein inverses Muster mit geringer Intensität der PHLDA1-positiven Zellen bei ausgeprägter Intensität der Fas-positiven

Zellen, hier war eine signifikante inverse Korrelation festzustellen (Spearman rank $r_s = -0,395$, $p < 0,05$).

In Tumoren kehrte sich dieses Verhältnis um, hier waren deutlich mehr Zellen PHLDA1- als Fas-positiv. Betrachtete man die Zahl der Tumoren mit mehr als 50% antigenexprimierenden Zellen, so war ein signifikanter Unterschied festzustellen (PHLDA1 >50% positive Zellen 91%, Fas 50%, $p = 0,0002$).

Für den Zusammenhang von PHLDA1- und Fas-Expression sind bisher widersprüchliche Daten veröffentlicht, eine inverse Korrelation von PHLDA1 und Fas, wie in der vorliegenden Arbeit gefunden, ist bisher in der Literatur noch nicht beschrieben. Auf der Grundlage der in dieser Arbeit gefundenen Resultate erscheint ein notwendiger Zusammenhang von PHLDA1- und Fas-Expression beim kolorektalen Karzinom jedoch eher unwahrscheinlich.

Normale kolorektale Schleimhaut zeigt in ihrem Aufbau eine charakteristische Kryptenarchitektur. In der vorliegenden Arbeit konnten nur wenig PHLDA1-positive Zellen in gesunder Schleimhaut detektiert werden, welche aber regelmäßig in Zellnestern zusammengedrängt an der Basis dieser Krypten lagen. Hier befinden sich die Stammzellen, aus denen sich das Dickdarmepithel ständig erneuert. Die Färbung der untersuchten Gewebeschnitte mit einem gegen Ki-67 (einem Proliferationsmarker) gerichteten Antikörper ergab, dass die PHLDA1-positiven Zellen in proliferativ aktiven Regionen liegen. Insgesamt waren aber mehr Ki-67-positive Zellen nachweisbar, deren Verbreitungsgebiet auch über die Kryptenbasis hinausreichte. Ob und wenn ja wie häufig Ki-67 und PHLDA1 von ein und derselben Zelle exprimiert werden, oder ob beide Proteine in unterschiedlichen Zellen, die in unmittelbarer Nachbarschaft lokalisiert sind, vorkommen, konnte nicht mit letzter Sicherheit festgestellt werden.

PHLDA1 ist hochreguliert in kolorektalen Karzinomen. Eine kleine Population PHLDA1-exprimierender Zellen ist außerdem an der Kryptenbasis normaler kolorektaler Schleimhaut anzutreffen. Welche Funktion PHLDA1 als mutmaßlich apoptoseassoziiertes Protein in diesen Regionen einnimmt, ist bisher unklar. Eine mögliche Gemeinsamkeit dieser beiden Areale stellen sogenannte Stammzellen dar, die zum einen an der Kryptenbasis den Zellpool bereitstellen, aus denen sich das kolorektale Epithel erneuert, andererseits aber auch als wesentlicher Bestandteil von Tumoren angesehen werden.

Der Nachweis von PHLDA1 bei einer häufigen Tumorart wie dem kolorektalen Karzinom unterstreicht den Beitrag, den das Verständnis der Funktion dieses Proteins zum grundsätzlichen Verständnis der Tumorentstehung leisten kann.

7 Abkürzungsverzeichnis:

| | |
|--------|---|
| Apaf1 | <u>a</u> poptosis <u>a</u> ctivating <u>f</u> actor-1 |
| APC | adenomatous polyposis coli |
| BSA | Rinder-Serumalbumin |
| CARD | <u>c</u> aspase <u>r</u> ecruiting <u>d</u> omain |
| CD45 | Cluster of Differentiation 45 |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dUTP | 2'-Deoxyuridin 5'-Triphosphat |
| EpCam | epithelial cellular adhesion molecule |
| FADD | <u>F</u> as <u>a</u> ssociated <u>d</u> eath <u>d</u> omain |
| FAP | familiäre adenomatöse Polyposis |
| HNPCC | hereditäres, nichtpolypöse Kolonkarzinomsyndrom |
| IGF-I | Insulin-like growth factor I |
| IPL | Imprinted in Placenta and Liver |
| MMR | mismatch-repair |
| mRNA | messenger Ribonukleinsäure |
| PARP | Poly-ADP-Ribose-Polymerase |
| PBS | phosphate buffered saline |
| PHLDA1 | pleckstrin homology-like domain, family A, member 1 |
| PMA | Phorbol 12 Myristate 13-Acetate |
| PQR | prolin and glutamin rich |
| siRNA | small interfering RNA |
| TCR | T-Zellrezeptor |
| TDAG51 | T cell death-associated gene 51 |
| TdT | Terminale Desoxyribonukleotid Transferase |
| Tih1 | TDAG51/ IPL homolog 1 |
| TNF | Tumor necrosis factor |
| TNM | Tumor, Nodes, Metastases |
| TUNEL | TdT-mediated dUTP-biotin nich end labeling |
| UICC | Union internationale contre le cancer |

8 Literaturverzeichnis:

Aaltonen L.A., Peltomaki P., Leach F.S., Sistonen P., Pylkkanen L., Mecklin J.P., Jarvinen H., Powell S.M., Jen J. and Hamilton S.R. (1993). Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* **260**, 812-816.

Adams J.M. and Cory S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* **281**, 1322-1326

Ames B.N. and Gold L.S. (1990). Too many rodent carcinogens: mitogenesis increases mutagenesis. *Science* **249**, 970-971

Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF), Leitlinien für Diagnostik und Therapie Innere Medizin / Gastroenterologie, Kolorektales Karzinom, Stand 09/2004

Ashkenazi, A. and Dixit, V.M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**, 1305-1308

Baker S.J., Preisinger A.C., Jessup J.M., Paraskeva C., Markowitz S., Willson J.K., Hamilton S. and Vogelstein B. (1990). p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* **50**, 7717-7722

Behrens J., Jerchow B.A., Wurtele M., Grimm J., Asbrand C., Wirtz R., Kuhl M., Wedlich D. and Birchmeier W. (1998). Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science* **280**, 596-599

Bishop, J.M. (1991). Molecular themes in oncogenesis. *Cell* **64**, 235-248

Boman B.M. and Huang E. (2008). Human colon cancer stem cells: a new paradigm in gastrointestinal oncology. *J Clin Oncol (United States)* **26**, 2828-2838

Bos J.L. (1988). The ras gene family and human carcinogenesis. *Mutat Res* **195**, 255-271

- Bullen T.F., Forrest S., Campbell F., Dodson A.R., Hershman M.J., Pritchard D.M., Turner J.R., Montrose M.H. and Watson A.J. (2006). Characterization of epithelial cell shedding from human small intestine. *Lab Invest* **86**, 1052-1063
- Burmer G.C., Levine D.S., Kulander B.G., Haggitt R.C., Rubin C.E. and Rabinovitch P.S. (1990). c-Ki-ras mutations in chronic ulcerative colitis and sporadic colon carcinoma. *Gastroenterology*, **99**, 416-420
- Connell W.R., Talbot I.C., Harpaz N., Britto N., Wilkinson K.H., Kamm M.A. and Lennard-Jones J.E. (1994). Clinicopathological characteristics of colorectal carcinoma complicating ulcerative colitis. *Gut*, **35**, 1419-1422
- Delhalle S., Duvoix A., Schnekenburger M., Morceau F., Dicato M. and Diederich M. (2003). An introduction to the molecular mechanisms of apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* **1010**, 1-8
- Donehower L.A. and Bradley A. (1993). The tumor suppressor p53. *Biochim Biophys Acta* **1155**, 181-205
- Dukes C.E. and Bussey H.J. (1958). The spread of rectal cancer and its effect on prognosis. *Br J Cancer*. **12**, 309-320
- Dupont J., Khan J., Qu B.H., Metzler P., Helman L. and Le Roith D. (2001). Insulin and IGF-1 induce different patterns of gene expression in mouse fibroblast NIH-3T3 cells: identification by cDNA microarray analysis. *Endocrinology*, **142**, 4969-4975
- Fishel R., Lescoe M.K., Rao M.R., Copeland N.G., Jenkins N.A., Garber J., Kane M. and Kolodner R. (1993). The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* **75**, 1027-1038
- Frank D., Mendelsohn C.L. and Ciccone E. (1999). A novel pleckstrin homology-related gene family defined by Ipl/Tssc3, TDAG51, and Tih1: tissue-specific expression, chromosomal location, and parental imprinting. *Mamm Genome (United States)*, **10**, 1150-1159

- Gomes I., Xiong W., Miki T., and Rosner M.R. (1999). A proline- and glutamine-rich protein promotes apoptosis in neuronal cells. *J Neurochem*, **73**, 612-622
- Hanahan D. and Weinberg R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**, 57-70
- Hayashida N., Inouye S. and Fujimoto M. (2006). A novel HSF1-mediated death pathway that is suppressed by heat shock proteins. *EMBO J (England)*, **25**, 4773-4783
- Hengartner M.O. (2001). Apoptosis. DNA destroyers. *Nature*, **412**, 27-29
- Hinz T., Flindt S., Marx A., Janssen O., and Kabelitz D. (2001). Inhibition of protein synthesis by the T cell receptor-inducible human TDAG51 gene product. *Cell Signal*, **13**, 345-352
- Hossain G.S., van Thienen J.V., Werstuck G.H., Zhou J., Sood S.K., Dickhout J.G., de Koning A.B., Tang D., Wu D., Falk E., Poddar R., Jacobsen D.W., Zhang K., Kaufman R.J., and Austin R.C. (2003). TDAG51 is induced by homocysteine, promotes detachment-mediated programmed cell death, and contributes to the development of atherosclerosis in hyperhomocysteinemia. *J Biol Chem*, **278**, 30317-30327
- Howe G.R., Benito E., Castelleto R., Cornee J., Esteve J., Gallagher R.P., Iscovich J.M., Deng-ao J., Kaaks R. and Kune G.A. (1992). Dietary intake of fiber and decreased risk of cancers of the colon and rectum: evidence from the combined analysis of 13 case-control studies. *J Natl Cancer Inst*, **84**, 1887-1896
- Ilyas M., Tomlinson I.P., Novelli M.R., Hanby A., Bodmer W.F. and Talbot I.C. (1996). Clinico-pathological features and p53 expression in left-sided sporadic colorectal cancers with and without microsatellite instability. *J Pathol*, **179**, 370-375
- Jass J.R., Love S.B. and Northover J.M. (1987). A new prognostic classification of rectal cancer. *Lancet*, **8545**, 1303-1306
- Jemal A., Murray T., Samuels A., Ghafoor A., Ward E., and Thun M.J. (2003). Cancer statistics 2003. *CA cancer J Clin*, **53**, 5-25

- Kaneko Y., Sakakibara S., Imai T., Suzuki A., Nakamura Y., Sawamoto K., Ogawa Y., Toyama Y., Miyata T., and Okano H. (2000). Musashi1: an evolutionally conserved marker for CNS progenitor cells including neural stem cells. *Dev Neurosci*, **22**, 139-53
- Kappler J.W., Roehm N., and Marrack P. (1987). T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell*, **49**, 273-280
- Kerr J.F., Wyllie A.H. and Currie A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, **26**, 239-257
- Krammer P.H. (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*, **6805**, 789-795
- Kroboth K., Newton I.P., Kita K., Dikovskaya D., Zumbunn J., Waterman-Storer C.M. and Nathke I.S. (2007). Lack of adenomatous polyposis coli protein correlates with a decrease in cell migration and overall changes in microtubule stability. *Mol Biol Cell*, **18**, 910-918
- Kuske M. D. (1998). Identifizierung und Charakterisierung von Phrip, einem differentiell exprimierten Gen in autologen Primärtumor- und Metastasezelllinien. *Doktorarbeit an der Fakultät für Biologie der LMU-München*
- Kuske M.D. and Johnson J.P.(2000). Assignment of the human PHLDA1 gene to chromosome 12q15 by radiation hybrid mapping. *Cytogenet Cell Genet*, **89**, 1
- Lau L.F. and Nathans D. (1987). Expression of a set of growth-related immediate early genes in BALB/c 3T3 cells: coordinate regulation with c-fos or c-myc. *Proc Natl Acad Sci USA*, **84**,1182-1196
- Lawen A. (2003). Apoptosis-an introduction. *Bioessays*, **25**, 888-896
- Leek R.D., Harris A.L. and Lewis C.E. (1994). Cytokine networks in solid human tumors: regulation of angiogenesis. *J Leukoc Biol*, **56**, 423-435
- Linn S.C. and Giaccone G. (1995). MDR1/P-glycoprotein expression in colorectal cancer. *Eur J Cancer*, **31**, 1291-1294

- Liu J., Xing Y., Hinds T.R., Zheng J. and Xu W. (2006). The third 20 amino acid repeat is the tightest binding site of APC for beta-catenin. *J Mol Biol*, **30**, 133-144
- Lowe S.W. and Lin A.W. (2000). Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, **21**, 485-495
- Methot N., Rom E., Olsen H. and Sonenberg N. (1997). The human homologue of the yeast Prt1 protein is an integral part of the eukaryotic initiation factor 3 complex and interacts with p170. *J Biol Chem*, **272**, 1110-1116
- Minamoto T., Yamashita N., Ochiai A., Mai M., Sugimura T., Ronai Z. and Esumi H. (1995). Mutant K-ras in apparently normal mucosa of colorectal cancer patients. Its potential as a biomarker of colorectal tumorigenesis. *Cancer*, **75**, 1520-1526
- Miyaki M., Konishi M., Kikuchi-Yanoshita R., Enomoto M., Igari T., Tanaka K., Muraoka M., Takahashi H., Amada Y. and Fukayama M. (1994). Characteristics of somatic mutation of the adenomatous polyposis coli gene in colorectal tumors. *Cancer Res*, **54**, 3011-3020
- Nagai M.A., Fregnani J.H., Netto M.M., Brentani M.M. and Soares F.A. (2007). Down-regulation of PHLDA1 gene expression is associated with breast cancer progression. *Breast Cancer Res Treat*, **106**, 49-56
- Nagai M.A., Ros N., Bessa S.A., Mourao Neto M., Miracca E.C. and Brentani M.M. (2003). Differentially expressed genes and estrogen receptor status in breast cancer. *Int J Oncol*, **23**, 1425-1430
- Nakamura M., Okano H., Blendy J.A. and Montell C. (1994). Musashi, a neural RNA-binding protein required for Drosophila adult external sensory organ development. *Neuron*, **13**, 67-81
- Neef R., Kuske M.A., Prols E. and Johnson J.P. (2002). Identification of the human PHLDA1/TDAG51 gene: down-regulation in metastatic melanoma contributes to apoptosis resistance and growth deregulation. *Cancer Res*, **62**, 5920-5929
- Neef, R., Kuske M.A., Prols E. and Johnson J.P. (2002). Identification of the human PHLDA1/TDAG51 gene: down-regulation in metastatic melanoma contributes to apoptosis resistance and growth deregulation. *Cancer Res*, **62**, 5920-5929

- Neef, R (2001): Expression und Funktion des Apoptose-assoziierten Moleküls PHLDA1 im humanen Melanom, Doktorarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München
- Nishimura S., Wakabayashi N., Toyoda K., Kashima K. and Mitsufuji S. (2003). Expression of Musashi-1 in human normal colon crypt cells: a possible stem cell marker of human colon epithelium. *Dig Dis Sci*, **48**, 1523-1529
- Ohyama M., Terunuma A., Tock C.L., Radonovich M.F., Pise-Masison C.A., Hopping S.B., Brady J.N., Udey M.C. and Vogel JC. (2006). Characterization and isolation of stem cell-enriched human hair follicle bulge cells. *J Clin Invest*, **116**, 249-260
- Park C.G., Lee S.Y., Kandala G., Lee S.Y. and Choi Y. (1996). A novel gene product that couples TCR signaling to Fas (CD95) expression in activation-induced cell death. *Immunity*, **4**, 583-591
- Pierce G.B., Nakane P.K. and Martinez-Hernandez A. (1977). Ultrastructural comparison of differentiation of stem cells of murine adenocarcinomas of colon and breast with their normal counterparts. *J Natl Cancer Inst (United States)*, **58**, 1329-1345
- Pitti R.M., Marsters S.A., Lawrence D.A., Roy M., Kischkel F.C., Dowd P., Huang A., Donahue C.J., Sherwood S.W., Baldwin D.T., Godowski P.J., Wood W.I., Gurney A.L., Hillan K.J., Cohen R.L., Goddard A.D., Botstein D. and Ashkenazi A. (1998). Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature*, **396**, 699-703
- Potten C.S., Kellett M. and Rew D.A. (1992). Proliferation in human gastrointestinal epithelium using bromodeoxyuridine in vivo: data for different sites, proximity to a tumour, and polyposis coli. *Gut (England)*, **33**, 524-529
- Potten C.S., Kellett M. and Roberts S.A. (1992). Measurement of in vivo proliferation in human colorectal mucosa using bromodeoxyuridine. *Gut (England)*, **33**, 71-78
- Potten C.S. and Loeffler M. (1990). Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development*, **110**, 1001-1020

- Potten C.S., Owen G. and Booth D. (2002). Intestinal stem cells protect their genome by selective segregation of template DNA strands. *J Cell Sci*, **115**, 2381-2388
- Powell S.M., Zilz N., Beazer-Barclay Y., Bryan T.M., Hamilton S.R., Thibodeau S.N., Vogelstein B. and Kinzler K.W. (1992). APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature*, **359**, 235-237
- Qian N., Frank D. and O'Keefe D. (1997). The IPL gene on chromosome 11p15.5 is imprinted in humans and mice and is similar to TDAG51, implicated in Fas expression and apoptosis. *Hum Mol Genet (England)*, **6**, 2021-2029
- Radford I.R. and Lobachevsky P.N. (2006). An enteroendocrine cell-based model for a quiescent intestinal stem cell niche. *Cell Prolif (England)*, **39**, 403-414
- Rho J., Gong S. and Kim N. (2001). TDAG51 is not essential for Fas/CD95 regulation and apoptosis in vivo. *Mol Cell Biol (United States)*, **21**, 8365-8370
- Rubinfeld B., Souza B., Albert I., Muller O., Chamberlain S.H., Masiarz F.R., Munemitsu S. and Polakis P. (1993). Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science*, **262**, 1731-1734
- Scholzen T. and Gerdes J. (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol (United States)*, **182**, 311-322
- Smith A.J., Stern H.S., Penner M., Hay K., Mitri A., Bapat B.V. and Gallinger S. (1994). Somatic APC and K-ras codon 12 mutations in aberrant crypt foci from human colons. *Cancer Res*, **54**, 5527-5530
- Soussi T. (2000). The p53 Tumor suppressor gene: From molecular Biology to clinical investigation. *Ann NY Acad Sci*, **910**, 121-139
- Spardling A., Drummond-Barbosa D. and Kai T. (2001). Stem cells find their niche. *Nature*, **414**, 98-104

- Strater J., Wellisch I., Riedl S., Walczak H., Koretz K., Tandara A., Krammer P.H. and Moller P. (1997). CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis in colon epithelial cells: a possible role in ulcerative colitis. *Gastroenterology*, **113**, 160-167
- Takayama T., Miyanishi K., Hayashi T., Sato Y. and Niitsu Y. (2006). Colorectal cancer: genetics of development and metastasis. *J Gastroenterol*, **41**, 185-192
- Tan X. and Wang J.Y. (1998). The caspase-RB connection in cell death. *Trends Cell Biol*, **8**, 116-120
- Thornberry N.A. and Lazebnik Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science*, **281**, 1312-1316
- Tomlinson I., Ilyas M. and Novelli M. (1997). Molecular genetics of colon cancer. *Cancer Metastasis Rev*, **16**, 67-79
- Tomlinson I.P. and Bodmer W.F. (1997). Modelling the consequences of interactions between tumour cells. *Br J Cancer*, **75**, 157-160.
- Toyoshima Y., Karas M., Yakar S., Dupont J., Lee Helman. and Le Roith D. (2004). TDAG51 mediates the effects of insulin-like growth factor I (IGF-I) on cell survival. *J Biol Chem*, **279**, 25898-904
- Traverso G., Shuber A. and Levin B. (2002). Detection of APC mutations in fecal DNA from patients with colorectal tumors. *N Engl J Med (United States)*, **346**, 311-320
- Tumorregister München, 2005
- Umetani N., Sasaki S., Masaki T., Watanabe T., Matsuda K. and Muto T. (2000). Involvement of APC and K-ras mutation in non-polypoid colorectal tumorigenesis. *Br J Cancer*, **82**, 9-15
- Vogelstein B., Fearon E.R., Hamilton S.R., Kern S.E., Preisinger A.C., Leppert M., Nakamura V., White R., Smits A.M. and Bos L.J. (1988). Genetik alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*, **319**, 525-532

von Reyher U., Strater J., Kittstein W., Gschwendt M., Krammer P.H. and Moller P. (1998). Colon carcinoma cells use different mechanisms to escape CD95-mediated apoptosis. *Cancer Res*, **58**, 526-534

Watson A.J.M. (2004). Apoptosis and colorectal cancer. *Gut*, **53**, 1701-1709

Watt F.M. and Hogan B.L. (2000). Out of Eden: stem cells and their niches. *Science*, **287**, 1427-1430

Wyllie A.H., Kerr J.F. and Currie A.R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*, **68**, 251-306

Young J., Leggett B., Gustafson C., Ward M., Searle J., Thomas L., Buttenshaw R. and Chenevix-Trench G. (1993). Genomic instability occurs in colorectal carcinomas but not in adenomas. *Hum Mutat*, **2**, 351-354

9 Danksagung:

Danken möchte ich Frau Prof. Johnson, die von den ersten Versuchen bis zur Korrektur der Zusammenfassung mir jederzeit mit konstruktivem Rat zur Seite stand.

Ferner möchte ich Herrn Rüdiger Neef danken, der mich in die Prinzipien der Immunhistochemie eingeführt hat und stets bereit war, seine Erfahrung mit mir zu teilen.

Wesentlichen Anteil daran, dass diese Arbeit fertiggestellt werden konnte hat meine Frau Magdalena, die mir in Zeit der Zusammenschrift konzentriertes und ungestörtes Arbeiten ermöglicht hat.

Danken möchte ich auch meinen Eltern, die mich immer positiv ermutigt haben, diesen Weg zu gehen und mir jederzeit mit grundsätzlichem Rückhalt und konkretem Einsatz zur Seite standen.

10 Lebenslauf:

| | |
|----------------------------|---|
| Geburtsdatum: | 1. November 1974 |
| Geburtsort: | Stuttgart |
| Nationalität: | deutsch |
| Familienstand: | verheiratet, zwei Kinder |
| 1985-1994 | Eugen-Bolz-Gymnasium Rottenburg, Abitur im Juni 1994 |
| Mai 1996 - Oktober 2003 | Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München |
| seit Oktober 2000 | Doktorarbeit am Institut für Immunologie der LMU München Thema: Untersuchung der Expression eines neu identifizierten Regulatorproteins (PHLDA1/TDAG51) auf gesunder und maligne entarteter Kolonschleimhaut |
| Seit April 2004 | Ausbildung zum Kinderarzt |