

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie

Direktor: Prof. Dr. med. Jakob R. Izbicki

Neoexpression des Rezeptors Neogenin und seines Liganden
Netrin-1 beim kolorektalen Karzinom
- Nachweis möglicher prognostischer Marker am Gefrierpräparat -

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Salma Abdel Hamid
aus Hamburg

Hamburg 2010

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 04.11.2010

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. E. Yekebas

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: PD Dr. M. Bockhorn

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: Prof. Dr. K. Pantel

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1. Arbeitshypothese und Fragestellung	5
1.2. Kolon- und Rektumkarzinom	7
1.2.1. Epidemiologie.....	7
1.2.2. Ätiologie und Pathogenese.....	7
1.2.3. Lokalisation und Pathologie.....	8
1.2.4. Molekulare Pathogenese.....	9
1.2.5. Dissemination und Metastasierung.....	10
1.2.6. Klinik, Diagnostik und Differentialdiagnostik	11
1.2.7. Stadieneinteilung.....	12
1.2.8. Chirurgische Therapie des kolorektalen Karzinoms.....	14
1.2.9. Postoperative Ergebnisse.....	15
1.2.10. Adjuvante Therapie	16
1.3. Netrin-1 und seine Rezeptoren.....	17
2. Material und Methoden.....	20
2.1. Materialien	20
2.2. Chemikalien/ Reagenzien	20
2.3. Pufferlösungen/ Farbstoffsubstrat	21
2.4. Verdünnungsmedien	21
2.5. Antikörper und Negativkontrollen	21
2.6. Immunhistochemie	22
2.6.1. Prinzip der Immunhistochemie	22
2.6.2. Avidin-Biotin-Komplex (ABC)- Methode.....	22
2.6.3. Gewebefixierung und Herstellung der Gefrierschnitte.....	23
2.6.4. Nachweis von Netrin-1	24
2.6.5. Nachweis von Neogenin.....	25
2.7. Hämatoxylin- Eosin- Übersichtsfärbung	26
2.8. Histologische Auswertung und Quantifizierung der Färbungen	26
2.9. Patienten.....	31
2.10. Statistische Analyse und immunhistochemische Auswertung.....	31
3. Ergebnisse	33
3.1. Patientendaten und pathologisch- anatomische Befunde.....	33
3.2. Pathologisch- anatomische Befunde und Prognose	37

Inhaltsverzeichnis

3.3 Immunhistochemische Ergebnisse.....	40
3.3.1. Korrelation der Netrin-1- Expression mit klinischen und pathologischen Parametern	40
3.3.2. Einfluss der Netrin-1- Expression auf das rezidivfreie Überleben und das Gesamtüberleben	42
3.3.3. Korrelation der Neogenin- Expression mit klinischen und pathologischen Parametern	45
3.3.4. Einfluss der Neogenin- Expression auf das rezidivfreie Überleben und das Gesamtüberleben	47
4. Diskussion	52
5. Zusammenfassung.....	61
6. Abkürzungsverzeichnis.....	63
7. Quellenverzeichnis	65
8. Danksagung	72
9. Lebenslauf.....	73
10. Eidesstattliche Erklärung.....	74

1. Einleitung

Das kolorektale Karzinom ist eines der häufigsten Karzinome weltweit. Seine Entstehung ist in ca. 85 % der Fälle nicht eindeutig geklärt (Weitz 2004).

Akkumulation verschiedener Genmutationen, vor allem von Protoonkogenen, Onkogenen und Tumorsuppressorgenen scheinen an der Tumorgenese beteiligt zu sein (Fearon et al. 1990). Vogelstein et al. konnten bereits Ende der 80er Jahre den allelischen Verlust auf Chromosom 18q in über 70 % der kolorektalen Karzinome nachweisen und vermuteten, dass ein Tumorsuppressorgen dort lokalisiert sein müsse (Vogelstein et al. 1988; Vogelstein et al. 1989). Diese somatische Mutation konnte 1989 als „Deleted in Colorectal Cancer“ (DCC) identifiziert werden (Vogelstein et al. 1989; Fearon et al. 1990). Seitdem galt DCC als putatives Tumorsuppressorgen, bei dessen Ausfall eine Mitbeteiligung an der Tumorgenese kolorektaler Karzinome angenommen wurde. Im Verlauf konnte zum einen das DCC- Genprodukt als Rezeptor des Glykoproteins Netrin-1 (Keino-Masu et al. 1996), zum anderen Neogenin als homologes DCC- Gen identifiziert werden (Meyerhardt et al. 1997). Aufgrund der strukturellen Verwandtschaft des DCC- Proteins mit Zelladhäsionsproteinen der CAM-Familie (Cho et al. 1995) wird vermutet, dass DCC an Kontrollmechanismen von Zelltod und Zellüberleben beteiligt sein könnte.

Netrine wiederum sind lange mit axonaler Führung und neuronalem Wachstum in Verbindung gebracht worden (Tessier-Lavigne et al. 1996). Die mögliche Beteiligung von Netrin-1 und seinen Rezeptoren an Zelladhäsionsmechanismen in anderen Organen bzw. der Tumorgenese verschiedener Karzinome wird zunehmend analysiert.

1.1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Die Expression von Netrin-1 und seinem Rezeptor Neogenin, der zur Familie der DCC-Rezeptoren zählt (Keino-Masu et al. 1996), ist Grundlage dieser Studie. Dazu wird das Vorhandensein dieser Proteine in Primärtumorpräparaten von 82 Patienten mit kolorektalem Karzinom immunhistochemisch an kryokonserviertem Frischgewebe untersucht.

Ziel dieser Arbeit ist zunächst herauszufinden, ob Patienten überhaupt Netrin-1 bzw. dessen Rezeptor Neogenin exprimieren. Bei erfolgreichem Nachweis der Proteine wird anschließend untersucht, ob diese einen prognostischen Einfluss auf das rezidivfreie Überleben oder auf das Gesamtüberleben haben. Es liegt die Hypothese vor, dass Netrin-1 und sein Rezeptor Neogenin am Epithelaufbau beteiligt seien und einen prognostischen Einfluss auf das kolorektale Karzinom haben könnten. Bei Nachweis von Rezeptoren des DCC- Typs wird ein prognostisch günstiger Verlauf bei Neogenin-Expression erwartet. Entsprechend aktueller Studien stellt die Expression von Netrin-1

einen noch unklaren Einflussfaktor dar (Meyerhardt et al. 1999; Mazelin et al. 2004). Bei Expression dieser Proteine wäre demnach ein besserer klinischer Verlauf, bei Verlust der Proteine ein schlechterer Verlauf denkbar.

In mehreren Studien konnte das Vorhandensein von DCC in kolorektalen Karzinomen als günstiger prognostischer Marker interpretiert werden (Jen et al. 1994; Shibata et al. 1996). Neogenin hingegen wurde im Hinblick auf die Tumorgenese in kolorektalen Karzinomen im Gegensatz zu DCC nur unzureichend untersucht. Beim Mammakarzinom konnte bereits ungeordnetes Zellwachstum in Abwesenheit von Neogenin und Netrin-1 beobachtet werden (Srinivasan et al. 2003).

Das Vorhandensein bzw. die immunhistochemische Intensität bei Expression von Netrin-1 und seinem Rezeptor Neogenin wird hier beim vorliegenden Patientenkollektiv retrospektiv untersucht. Die Expression der Proteine wird sowohl mit patientenbezogenen und tumorbezogenen Daten (Tumorlokalisierung, TNM- Stadium, histologischer Differenzierungsgrad, UICC- Stadium, Alter der Patienten, etc.) als auch mit Überlebensraten (Gesamtüberleben, rezidivfreies Überleben) korreliert und in ihrer Aussagekraft als prognostischer Faktor beim kolorektalen Karzinom analysiert.

1.2. Kolon- und Rektumkarzinom

1.2.1. Epidemiologie

Das kolorektale Karzinom zählt zu den häufigsten malignen Erkrankungen der westlichen Nationen und steht an vierter Stelle der häufigsten Krebserkrankungen weltweit. Mit jährlich ca. 37.000 Neuerkrankungen bei Männern und etwa 36.000 bei Frauen weist Deutschland, im Vergleich zu anderen europäischen Ländern, die höchste Inzidenz auf. Innerhalb Deutschlands stehen das Saarland und Niedersachsen an oberster Stelle, während Hamburg und Berlin die niedrigsten Neuerkrankungsraten aufweisen. Mit fast 30.000 Sterbefällen jährlich ist das kolorektale Karzinom, nach dem Mammakarzinom bei Frauen und dem Bronchialkarzinom bei Männern, die zweithäufigste Ursache krebserkrankter Todesfälle. In Deutschland erkranken Männer im Mittel mit ca. 69 Jahren, Frauen mit ca. 75 Jahren. Nach einem seit 1980 zunehmenden Trend bleiben die geschätzten Erkrankungsraten in den letzten zehn Jahren nahezu unverändert. Die Sterberaten hingegen nehmen für beide Geschlechter stets ab (Robert Koch-Institut 2008; Katalinic 2004).

1.2.2. Ätiologie und Pathogenese

Bei der Entstehung des kolorektalen Karzinoms lassen sich drei verschiedene Gruppen unterscheiden: Das sporadische Karzinom macht hier ca. 85 % der kolorektalen Karzinome aus. Bis zu 10 % der Karzinome entstehen im Rahmen hereditärer Krebs syndrome und ca. 5 % sind Folge chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (Weitz 2004). Mutationen von Onkogenen, Tumorsuppressorgenen und Mutator-/Reparaturgenen sind zentrale Mechanismen der Tumorentwicklung. Tumorsuppressorgene kontrollieren, über Hemmung des Zellzyklus, die Zellproliferation, während Mutator-/Reparaturgene die genetische Information schützen und bei der Replikation entstandene Defekte beseitigen. Dagegen fördern Onkogene das Zellwachstum. Der Funktionsverlust bzw. die Mutation beider Allele kann zu einer ungehemmten Proliferation atypischer Zellen führen (Fearon et al. 1990; Vogelstein et al. 1988).

Sporadische Karzinome:

Obwohl bei den meisten Betroffenen umweltbedingte Faktoren wie Ernährung und Lebensgewohnheiten prädisponierend wirken, ist die Ätiologie nicht sicher geklärt. Übermäßiger Fleischverzehr, tierische Fette, erhöhter Alkohol- bzw. Bierkonsum, verminderte körperliche Aktivität, ballaststoffarme Ernährung, Übergewicht und Tabakkonsum erhöhen die Inzidenz eines kolorektalen Karzinoms (Willett 1989; Weitz et al. 2005). Ein deutlich erhöhtes Erkrankungsrisiko haben Menschen mit Vorliegen

anderer Krebserkrankungen und kolorektalen bzw. anderen Karzinomen in der Vorgeschichte. Ebenso ist das Risiko bei Verwandten ersten Grades von Betroffenen mit kolorektalen Karzinomen erhöht (Hall et al. 1996).

Kolorektale Karzinome bei hereditären Krebsyndromen:

Bei den definierten familiären Krebsyndromen stehen Polyposissyndrome und HNPCC („hereditary non- polyposis colorectal cancer“) im Vordergrund.

Die familiäre adenomatöse Polyposis coli (FAP) ist eine obligate Präkanzerose, die mit einer 100 %igen Penetranz autosomal- dominant vererbt wird. Ca. 1 % aller kolorektalen Karzinome geht auf eine FAP zurück; verschiedene extraintestinale Manifestationen sind bekannt. Kennzeichnend für eine FAP ist das frühe Auftreten hunderter bis tausender kolorektaler Adenome (Weitz 2004). Die Keimbahnmutation des Tumorsuppressorgens APC auf Chromosom 5 (5q21) ist für die FAP verantwortlich (Grodin et al. 1991; Kinzler et al. 1991). Unbehandelt entwickeln Patienten durchschnittlich im Alter von ca. 36 Jahren über eine Adenom- Karzinom- Sequenz ein kolorektales Karzinom (Bülow 1987).

Das hereditäre nicht polypöse kolorektale Karzinom (HNPCC)- Syndrom wird autosomal- dominant mit einer ca. 80 %igen Dominanz vererbt (Bernstein et al. 2005). Etwa 5- 10 % aller kolorektalen Karzinome gehen auf HNPCC zurück (Weitz 2004). Die Mutation eines der sechs bekannten DNA- Reparatur- Gene, der so genannten DNA- Mismatch- repair- Gene, kann ein HNPCC auslösen (Bronner et al. 1994; Fishel et al. 1993; Ikeda et al. 1998). HNPCC- Betroffene leiden bereits oft vor dem 50. Lebensjahr an kolorektalen bzw. extrakolonischen Malignomen (Lynch et al. 1993).

Karzinome bei chronisch- entzündlichen Darmerkrankungen:

Auf dem Boden von chronisch- entzündlichen Darmerkrankungen entstehen bis zu 5 % der kolorektalen Karzinome (Weitz 2004). An Colitis ulcerosa Erkrankte haben bereits in frühem Lebensalter ein deutlich erhöhtes Risiko für eine maligne Entartung und synchrone Zweit- bzw. Mehrfachkarzinome (Herfarth et al. 1998).

1.2.3. Lokalisation und Pathologie

Etwa 15 % der kolorektalen Karzinome befinden sich im Caecum und Colon ascendens, 8 % im Colon transversum, 7 % im Colon descendens, 20 % im Sigma und 50 % im Rektum (Weitz 2004). Synchrone und metachrone kolorektale Karzinome finden sich bei ca. 2- 10 % der Patienten (Papadopoulos et al. 2004). Zu den Rektumkarzinomen zählen Tumore, die mit dem starren Rektoskop gemessen, weniger

als 16 cm von der Anokutanlinie bzw. weniger als 12 cm von der Linea dentata entfernt liegen.

Makroskopisch unterscheidet man beim kolorektalen Karzinom: Schüsselförmig ulzerierende Karzinome (55- 60 %), polypös- blumenkohlartige Karzinome (25 %), plattenartige Karzinome (15- 20 %) und diffus- infiltrierende, szirrhöse Karzinome (1 %) (Dürig 2003).

Histologisch machen die Adeno- (90 %) und muzinösen Adenokarzinome (9 %) den größten Anteil aus (Weitz 2004). Siegelringzell-, Plattenepithel-, adenosquamöse, kleinzellige und undifferenzierte Karzinome machen nur ca. 2 % aus (Dörfer 2008).

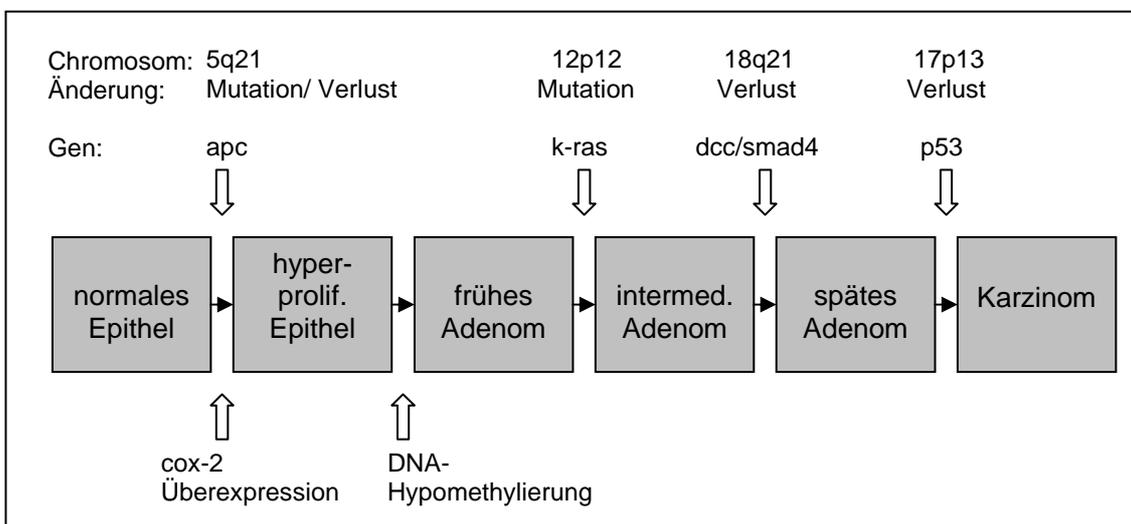
Die meisten sporadischen kolorektalen Karzinome entstehen aus Adenomen, was als Adenom- Dysplasie -Karzinom- Sequenz bezeichnet wird (Hermanek 1992, Vogelstein et al. 1988). Die Dysplasie ist eine Neoplasie, bei der epitheliales Gewebe proliferiert, aber die Submukosa nicht infiltriert. Bei Infiltration der Submukosa mit atypischen Zellen liegt bereits ein invasives Karzinom vor. Im Kolon entwickeln sich Dysplasien fast ausschließlich aus Adenomen, die epithelialen Tumoren entsprechen und in Form von flachen Adenomen bzw. neoplastischen Polypen auftreten. Nach dem histologischen Typ werden drei Adenomtypen unterschieden: Tubuläre (66 %), villöse (8- 10 %) und tubulovillöse (22 %) Adenome (Lepeniec 2004). Morphologisch lassen sich die Adenome nach Form in sessile (66 %), gestielte (20 %) und taillierte (14 %) unterteilen (Weitz 2004). Das Entartungsrisiko von Adenomen ist abhängig von der Adenomgröße, der histologischen Differenzierung, dem Grad zellulärer Atypien und der Wuchsform. Bei kleinen Adenomen ist die Entartungswahrscheinlichkeit am geringsten, bei > 4 cm bedeutend größer (Hohenberger et al. 1996). Villöse, und vor allem sessile Adenome entarten mit 20- 40 % häufiger als tubulovillöse (20 %); tubuläre stellen mit 1- 10 % das geringste Risiko dar (Lepeniec 2004).

1.2.4. Molekulare Pathogenese

Das histopathologische Modell der Tumorentstehung über eine Adenom- Karzinom- Sequenz wurde 1990 durch das molekulargenetische Tumorprogressionsmodell ergänzt (Abb.1). Auf dem Weg vom normalen Gewebe zum Adenom bzw. maligner Entartung konnte das Zusammentreffen verschiedener genetischer Läsionen beobachtet werden (Fearon et al. 1990; Vogelstein et al. 1988). Durch erworbene, somatische Mutationen kommt es über die Aktivierung von Onkogenen, wie z.B. k-ras bzw. dem Verlust von Tumorsuppressorgenen, wie p53, DCC, APC zur ungehemmten Produktion maligner Zellen. Das Mismatch- Reparatur- System (MMR) sorgt für die

Reparatur von Fehlpaarungen, die vor allem bei der Replikation von Mikrosatelliten entstehen. Hierbei handelt es sich um repetitive DNA- Sequenzen, die im Genom verstreut liegen und während der Replikation bei Strangverschiebungen große Schleifen bilden können. Diese Schleifen werden in der Regel vom MMR- System erkannt und repariert. Ein Verlust oder Defekt dieses Reparatursystems kann dementsprechend zu hohen Mutationsraten und Instabilitäten vor allem in Mikrosatelliten führen. Inaktivierende Mutationen der MMR- Gene (msh2, mlh1, mlh2, etc.) gelten als Ursache der HNPCC und konnten auch bei einer Reihe von sporadischen Karzinomen nachgewiesen werden (Bronner et al. 1994; Fishel et al. 1993).

Abb.1: Genetisches Modell der Adenom- Dysplasie- Karzinom- Sequenz



Quelle: Fearon et al. 1990; Vogelstein et al. 1988

1.2.5. Dissemination und Metastasierung

Die Ausbreitung kolorektaler Karzinome erfolgt per continuitatem, lymphogen und hämatogen (Weitz 2004). Lymphogen kann sich das kolorektale Karzinom durch Einbruch in Lymphgefäße in epikolischen bzw. perirektalen Lymphknoten der Darmwand und weiter entlang der arteriellen Versorgung des Darms ausbreiten (Lehnert et al. 1996). Nach Tumorinvasion in Blut- bzw. Lymphgefäße ist die hämatogene Metastasierung möglich. Entsprechend des venösen Rückstroms überwiegen beim Kolon- und hochsitzenden Rektumkarzinom Lebermetastasen. Über die Vv. rectales mediae und inferiores ist bei tiefsitzenden Rektumkarzinomen eine direkte Metastasierung in die Lunge möglich (Weitz 2004). Das Ausmaß der

lymphogenen und hämatogenen Metastasierung korreliert mit der Invasionstiefe des Karzinoms. Bei pT1- Karzinomen liegt das Risiko der lymphogenen Metastasierung bei etwa 4 %, bei pT2- Karzinomen steigt es auf 12 %, bei pT3- Tumoren auf bis zu 60 %. Umso größer wird schließlich auch das Risiko einer hämatogenen Streuung (Jochum 2008).

1.2.6. Klinik, Diagnostik und Differentialdiagnostik

Die Adenokarzinome von Kolon und Rektum wachsen in der Regel langsam. Bis zum Auftreten erster Symptome können annähernd fünf Jahre vergehen. Bei asymptomatischen Patienten ist allerdings häufig ein okkultes Blutverlust nachweisbar, der mit Größe oder Ulzerationen des Tumors zunimmt (Dürig 2003). Häufig sind die klinischen Symptome abhängig von der Tumorlokalisation. Proximale Karzinome verursachen wegen der weichen Stuhlbeschaffenheit erst spät eine Stenosesymptomatik. Gewichtsverlust, Eisenmangelanämie und Leistungsknick können hier Hinweise auf ein mögliches Karzinom darstellen. Karzinome des rektosigmoidalen Übergangs verursachen dagegen früher Änderungen der Stuhlgewohnheiten wie Obstipation, paradoxe Diarrhoen, Bleistiftstühle und Tenesmen (Weitz 2004). In 75-80 % sind okkulte oder manifeste anale Blutungen weitere klinische Zeichen distaler Karzinome (Jochum 2008). Diese werden oft als Hämorrhoidal- oder Divertikelblutung verkannt und können zu einer späten Diagnosestellung führen (Dürig 2003). Die Obstruktion bzw. Stenose des Darmlumens mit Ausbildung eines Obstruktionsileus, kreislaufwirksame Blutungen und Perforationen zählen zu den wichtigsten Komplikationen kolorektaler Karzinome (Dörfer 2008). Bis zu 60 % der Dickdarmilei beim alten Menschen sind Folge eines stenosierenden kolorektalen Karzinoms. Weitere gefürchtete Komplikationen sind Darmperforationen und Fistelbildungen (Weitz 2004). Bei 10-15 % der Patienten mit kolorektalen Karzinomen manifestiert sich das Karzinom erstmalig als Ileus (Dörfer 2008).

Neben der sorgfältigen Anamnese ist die digital- rektale Untersuchung ein wichtiger Bestandteil der klinischen Diagnostik. Bei der apparativen Diagnostik entspricht die komplette Koloskopie dem Goldstandard (Dürig 2003). Die Koloskopie gibt Aufschluss über die Lokalisation von Neoplasien, deren Histologie und mögliche synchrone Zweitumore. Ist die Durchführung einer Koloskopie nicht möglich, können alternativ Kolon- Kontrasteinläufe, CT- oder MRT- Untersuchungen Aufschluss über lokale Ausbreitung und Metastasierung geben. Zu den Routineuntersuchungen zählen neben körperlicher Untersuchung und Koloskopie, bildgebende Verfahren wie der Röntgenthorax in zwei Ebenen, die Abdomen-Sonographie und die Beobachtung der Tumormarker CA 19-9 und CEA als Verlaufsparemeter. Bei Rektumkarzinomen

gehören zusätzlich die endorektale Sonographie und die Untersuchung von Urinsedimenten zur Basisdiagnostik. Bei der differentialdiagnostischen Abklärung von Lebermetastasen weist der intraoperative Ultraschall eine besonders hohe Sensitivität und Spezifität auf (Weitz 2004).

1.2.7. Stadieneinteilung

Die erste Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms wurde 1932 von Dukes eingeführt und ist in ihren Grundelementen immer noch gültig. Heute wird das kolorektale Karzinom nach der 6. Auflage der TNM- Klassifikation maligner Tumoren der UICC (Union International Contre le Cancer 2002, Wittekind 2002) nach folgenden Kriterien eingeteilt (s. Tabellen 1-4):

- Histopathologisches Grading (GX-IV)
- Residualtumorklassifikation nach operativer Resektion (RX-II)
- TNM- Klassifikation und Stadieneinteilung
- Fakultative Deskriptoren (Lymphgefäßinvasion, venöse Invasion) (Weitz 2004)

Tab.1: Histopathologisches Grading

GX	Differenzierungsgrad nicht bestimmbar
G I	Gute Differenzierung: Ein Karzinom mit histologischen und zellulären Merkmalen, die normalem Epithel sehr ähnlich sind
G II	Mäßige Differenzierung: Ein Karzinom, das im Differenzierungsmuster zwischen G I und G III einzuordnen ist
G III	Schlechte Differenzierung: Ein Karzinom mit histologischen und zellulären Merkmalen, die normalem Epithel kaum ähneln (mindestens eine Drüsenformation oder Schleimproduktion muss erkennbar sein)
G IV	Undifferenziert: Es lassen sich keine glandulären oder plattenepitheltypischen Differenzierungsmuster erkennen (beim kolorektalen Karzinom nur für undifferenzierte und kleinzellige Karzinome anwendbar)

Quelle: Union International Contre le Cancer 2002, Wittekind 2002

Tab.2: Residualtumorklassifikation nach operativer Resektion

R X	Residualtumor kann nicht bestimmt werden
R 0	kein nachweisbarer Residualtumor nach operativer Therapie
R 1	mikroskopisch nachweisbarer Residualtumor nach operativer Therapie
R 2	makroskopisch nachweisbarer Residualtumor nach operativer Therapie

Quelle: Union International Contre le Cancer 2002, Wittekind 2002

Tab. 3: TNM- Klassifikation

T - Primärtumor	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor infiltriert Submukosa
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert durch die Muscularis propria in die Subserosa oder in nichtperitonealisiertes perikolisches oder perirektales Fett
T4	Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen und/oder perforiert das viszerale Peritoneum

N - Regionäre Lymphknoten	
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in 1-3 regionären Lymphknoten
N2	Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten

M - Fernmetastasen	
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Quelle: Union International Contre le Cancer 2002, Wittekind 2002

Tab.4: TNM- Stadiengruppierung (UICC 2002)

Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1, T2	N0	M0
Stadium IIA	T3	N0	M0
Stadium IIB	T4	N0	M0
Stadium IIIA	T1, T2	N1	M0
Stadium IIIB	T3, T4	N1	M0
Stadium IIIC	Jedes T	N2	M0
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1

Quelle: Union International Contre le Cancer 2002, Wittekind 2002

1.2.8. Chirurgische Therapie des kolorektalen Karzinoms

Grundlage der Therapie des kolorektalen Karzinoms stellt die chirurgische Resektion dar. Diese wird bei 15- 20 % in palliativer, bei etwa 75 % in potentiell kurativer Absicht durchgeführt (Dörfer 2008; Dürig 2003). Bei fortgeschrittenen, lokal nicht R0-resezierbaren Primärtumoren, bei multipler Fernmetastasierung oder bei diffuser Peritonealkarzinose müssen die Therapieoptionen sorgfältig diskutiert werden. Auch bei primär nicht resektablen Metastasen sollte die Resektion des Primärtumors trotz fortgeschrittenem Lokalbefund angestrebt werden, um tumorbedingte Komplikationen wie Ileus, Blutungen oder Perforationen zu vermeiden (Dörfer 2008). Ebenso ist die Wiederherstellung der Darmpassage anzustreben. Bei Patienten, bei denen eine Resektion nicht möglich ist, sollte eine Stomaanlage proximal der Stenose bzw. eine enteroenterale Umgehungsanastomose erwogen werden (Dörfer 2008).

Ziel der operativen Behandlung ist die en bloc Resektion des befallenen Darmanteils mit entsprechendem Lymphabflussgebiet. Das Resektionsausmaß wird von der Blutversorgung, der Tumorlokalisation und der Verteilung der regionalen Lymphknoten bestimmt (Dürig 2003; Lehnert et al. 1996). Je nach Lokalisation zählen die Hemikolektomien, Transversum- und Sigmaresektionen in Kombination mit Lymphadenektomien entsprechend dem arteriellen Versorgungsgebiet zu den Standard- Resektionsverfahren am Kolon (Dürig 2003).

Bei der chirurgischen Therapie von Rektumkarzinomen gilt, wie beim Kolonkarzinom auch, zum einen den Tumor im Gesunden zu entfernen (R0), ein lokoregionäres Rezidiv zu vermeiden und die Darmkontinuität wiederherzustellen. Zum anderen gilt bei Rektumkarzinomen, die Schließmuskelfunktion zu erhalten und autonome Nervenstrukturen des kleinen Beckens zu schonen, um postoperative Störungen von Blasen- und Sexualfunktion zu verhindern (Dörfer 2008). Für die radikale Operation von fortgeschrittenen Rektumkarzinomen stehen 3 operative Verfahren zur Verfügung:

- anteriore bzw. tiefe anteriore Rektumresektion
- abdominoperanale intersphinkteräre Rektumresektion
- abdominoperineale Rektumexstirpation.

Bei Karzinomen im oberen Drittel des Rektums (12 cm oberhalb der Anokutanlinie) ist die abdominale anteriore Rektumresektion mit partieller mesorektaler Exzision bei einem aboralen Sicherheitsabstand von 5 cm möglich (Weitz 2004). Bei Karzinomen des mittleren Rektumdrittels können Lymphknotenmetastasen auch sehr weit kaudal im Mesorektum auftreten, so dass bei Tumoren im mittleren und unteren Drittel immer eine totale mesorektale Resektion erfolgen sollte (Dörfer 2008). Hier wird das komplette Mesorektum bei Vorhandensein eines 1- 2 cm langen, aboralen Sicherheits-

abstandes entfernt (Weitz 2004). Bei sehr großen Tumoren, jungen Männern mit einem sehr straffen Beckenboden oder adipösen Patienten ist eine tiefe Präparation vom Abdomen her oft nicht mit ausreichender Sicherheit möglich. Hier wird häufig eine intersphinkteräre Operation notwendig, auch um noch die Kontinenz erhalten zu können. Das untere Rektumdrittel wird hierbei sowohl von abdominal als auch von peranal präpariert. Voraussetzung für den Sphinktererhalt ist u. a. ein aboraler Sicherheitsabstand von 1 cm (Dörfer 2008). Unter bestimmten Voraussetzungen sind kontinenserhaltende Eingriffe teilweise trotz fehlenden Sicherheitsabstandes mit Hilfe einer abdominoperanal Resektion oder des lokalen Ausschneidens mittels TEM (transanal endoskopische Mikrochirurgie) möglich.

Bei darmwandüberschreitenden Tumoren oder bei fehlendem Sicherheitsabstand kann bei Rektumkarzinomen des unteren Drittels die abdominoperineale Rektumexstirpation mit kompletter Entfernung des Analkanals bzw. Schließmuskels und anschließender Anlage eines permanenten Kolostomas notwendig sein (Weitz 2004; Dörfer 2008).

1.2.9. Postoperative Ergebnisse

Bei allen kurativ resezierten Patienten mit kolorektalen Karzinomen zeigte sich in der SGCRC- Studie (Study Group Colo- Rectal Carcinoma) eine Lokalrezidivrate von ca. 10,5 % durchschnittlich. Insbesondere ab Stadium III zeigten sich häufiger lokoregionäre Lymphknotenmetastasen (Dörfer 2008).

Nach dem Erlanger Register Colorektaler Carzinome (ERCRC) haben Patienten mit Kolonkarzinomen stadienabhängig, bei kurativ durchgeführten Operationen und ohne adjuvante Therapie, 5- Jahres- Überlebensraten von bis zu 97 % bei UICC- Stadium I, 91 % bei Stadium II und immerhin 68 % bei Stadium III (Dörfer 2008).

Beim Rektumkarzinom ist die tumorbezogene 5- Jahres- Überlebensrate zwar auch vom UICC- Stadium und der Lymphknotenbeteiligung abhängig, aber im Vergleich zum Kolonkarzinom stärker abhängig vom durchgeführten Eingriff, von der Erfahrung des Operateurs und der neoadjuvanten bzw. adjuvanten Therapie.

Nach dem Erlanger Register Colorektaler Carzinome (ERCR) haben Patienten mit Rektumkarzinomen stadienabhängig, bei kurativ durchgeführten Operationen 5- Jahres- Überlebensraten von bis zu 95 % bei UICC- Stadium I, 88 % bei Stadium II, 60 % bei Stadium III und 9 % bei UICC- Stadium IV. Etwa 10 % der untersuchten Patienten wurden neoadjuvant und ca. 13 % adjuvant therapiert (Dörfer 2008).

Im Vergleich zu Kolonkarzinomen neigen Rektumkarzinome eher zu Lokalrezidiven, während Kolonkarzinome häufig Fernmetastasen auslösen (Ragnhammar et al. 2001). Vor allem bei positivem Lymphknotenbefall der Kolonkarzinome in Stadium III scheinen

Mikrometastasen in peripherem Blut zu zirkulieren. Aus diesem Grund ist hier bei R0-Resektion des Primärtumors eine systemische, adjuvante Chemotherapie indiziert.

1.2.10. Adjuvante Therapie

Ziel der postoperativen, adjuvanten Therapie ist die Entstehung von Fernmetastasen und Lokalrezidiven zu verhindern. Die vollständige chirurgische Entfernung des Tumors ist eine Voraussetzung für das Durchführen einer adjuvanten Therapie (Dörfer 2008).

Beim Kolonkarzinom werden die neoadjuvante Therapie und adjuvante Radiatio kaum durchgeführt. Für Patienten in UICC- Stadium I und II ist im Regelfall keine adjuvante Therapie indiziert. Bei Patienten in Stadium III erfolgte seit Jahren standardmäßig die Durchführung einer sechs- monatigen postoperativen Chemotherapie mit Fluoruracil (5- FU) und Folinsäure (FA, Leucovorin). Zahlreiche Studien haben eine signifikante Verbesserung der Fernmetastasierungsrate beim additiven Einsatz von Oxaliplatin nachweisen können, so dass diese Kombination mit Oxaliplatin, das sogenannte FOLFOX- Protokoll, sich zunehmend als neues Standardprotokoll durchsetzen konnte (Dörfer 2008). Neuere Studienergebnisse (QUASAR- Studie) sehen auch einen Vorteil bei der Anwendung adjuvanter Therapien in Stadium II bei Kolonkarzinomen (Quasar collaborative group et al. 2007).

Im Vergleich zu Kolonkarzinomen neigen Rektumkarzinome eher zu Lokalrezidiven und nicht so häufig zu Fernmetastasen (Ragnhammar et al. 2001). Obwohl das neue chirurgische Standardverfahren der totalen mesorektalen Exzision die Rezidivrate von Rektumkarzinomen bereits reduzieren konnte, ist die Verlängerung der Überlebensrate Ziel der postoperativen Radiochemotherapie. Beim Rektumkarzinom galt die adjuvante, kombinierte Radiochemotherapie mit Fluoruracil (5- FU)/ Folinsäure für 6 Monate und 50 Gy Bestrahlung bei T3- und T4- Tumoren (UICC II) und allen T- Stadien mit positivem Lymphknoten- Befall (UICC III) lange als Standard. Neoadjuvante Behandlungen fanden initial hauptsächlich Anwendung zum Down-Staging bei T4- Tumoren. Mittlerweile konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass die Anwendung einer neoadjuvanten Therapie im Stadium II und III zu einer signifikanten Reduktion von Lokalrezidiven und, durch eine verminderte Toxizität, zu einer besseren Verträglichkeit geführt hat, so dass die neoadjuvante Radiochemotherapie mittlerweile auch bei Stadium II und III des Rektumkarzinoms angewendet wird (Sauer et al. 2004).

1.3. Netrin-1 und seine Rezeptoren

Netrin-1 ist ein sezerniertes Glykoprotein, das strukturelle Ähnlichkeit mit Laminin aufweist und vor allem als Mediator an der Regulation, Führung und Zellmigration von Axonen bei der Entwicklung des ZNS bekannt geworden ist (Tessier-Lavigne et al. 1996; Kennedy et al. 1994). Ursprünglich wurde eine gestörte neuronale Entwicklung bei Würmern (*Caenorhabditis elegans*) mit Mutationen im UNC-6 Gen beobachtet (Serafini et al. 1994). Im Verlauf gelang bei Wirbeltieren die Identifikation zum UNC-6 Genprodukt homologer Proteine: Netrin-1, Netrin-2 und später Netrin-3 (Thessier-Lavigne et al. 1996, Serafini et al. 1994/ 1996; Seaman et al. 2001). Beim Menschen wurden sie als NTN1L (netrin-1 like) und NTN2L (netrin-2 like) bezeichnet (Meyerhardt et al. 1999).

Es konnte gezeigt werden, dass Netrine chemotropische Eigenschaften besitzen, die beteiligt sind an Wachstum und Orientierung der Neurone im sich entwickelnden ZNS. In Abhängigkeit des beteiligten Rezeptors konnten, sowohl chemoattraktive (DCC-Rezeptoren), als auch chemorepulsive Eigenschaften (UNC5H- Rezeptoren) beobachtet werden (Hong et al. 1999).

Die Netrin- Rezeptoren zählen zu Rezeptoren der Immunglobulin- Superfamilie. Im Verlauf konnten homologe Netrin- Rezeptoren bzw. zwei Rezeptorfamilien bei Vertebraten identifiziert werden: Die UNC5H- Familie mit den Rezeptoren UNC5H 1- 4 und die DCC- Familie mit den Rezeptoren DCC und Neogenin-1 (Leonardo et al. 1997; Engelkamp 2002). DCC und Neogenin-1 werden zu den Typ I Transmembran-Rezeptoren gezählt, die Sequenzähnlichkeiten mit Proteinen der CAM- Familie (cellular adhesion molecules) und Immunglobulin- Superfamilie aufweisen (Cho und Fearon 1995; Keino-Masu et al. 1996). Diese Rezeptoren besitzen in der extrazellulären Domäne vier Immunglobulin- und sechs Fibronectin- Domänen, einen transmembranen Teil und eine zytoplasmatische Domäne (Mehlen et al. 2005).

DCC- bzw. Neogenin- Rezeptoren sind an der Anziehung von Netrin-1 und dessen Bindung als Liganden beteiligt, während Mitglieder der UNC5H- Rezeptorfamilie u. a. über Bindung des DCC- Rezeptors zur Abstoßung von Netrin-1 führen (Keino-Masu et al. 1996; Wang et al. 1999). Bei Fehlen des Glykoproteins Netrin-1 konnte zunehmend DCC- vermittelte Apoptose beobachtet werden, während bei Bindung des Liganden Netrin-1 vermehrt Zelladhäsion und anti- apoptotische Effekte nachgewiesen wurden (Mazelin et al. 2004). Da Netrin-1 in Abhängigkeit des Rezeptors chemoattraktiv bzw. chemorepulsiv agiert und Einfluss auf Apoptosevorgänge nimmt, wird Netrin-1 als sog. „survival factor“ angesehen (Llambi et al. 2001). DCC wiederum zählt zu den „dependence receptors“, die je nach Anwesenheit ihres Liganden unterschiedliche Einflüsse auf das Zellüberleben oder aber den Zelltod nehmen (Mehlen et al. 1998).

DCC wurde zunächst von Vogelstein und Kollegen in einem anderen Zusammenhang entdeckt. Vogelstein und Fearon wiesen Ende der 80er Jahre in kolorektalen Karzinomen Mutationen auf Chromosom 18q21 nach (Vogelstein et al. 1989). Diese Mutation ging mit dem Verlust bzw. der Reduktion des entsprechenden Genprodukts einher, woraufhin dieser Genlokus als DCC (deleted in colorectal cancer) bezeichnet wurde. Da eine Deletion von DCC in 50- 70 % der kolorektalen Karzinome gezeigt werden konnte, in gesundem Gewebe und gesunder Kolonschleimhaut hingegen DCC vorhanden war, wurde DCC als putatives Tumorsuppressorgen angesehen, das bei Fehlen zur Tumorentstehung beiträgt. Die verminderte Expression von DCC konnte im Verlauf auch in anderen Karzinomen zunehmend beobachtet werden (Fearon et al. 1990).

Der Verlust von DCC ist aber nicht nur mit dem invasiven, metastasierenden kolorektalen Karzinom assoziiert: Bei entarteten Keratinozyten- Zelllinien, die nicht mehr zur endogenen DCC- Expression fähig waren, konnte durch ektope Expression von DCC bei Nacktmäusen ein Tumorprogress unterdrückt werden. In derselben Studie konnte gezeigt werden, dass ein Tumorrückfall mit dem Verlust bzw. einer Änderung der DCC- Expression assoziiert war (Klingelutz et al. 1993). Auch bei zahlreichen anderen Studien wird angenommen, dass bei Wiederherstellung der DCC- Expression (in Nacktmäusen oder in vitro) ein Tumorprogress unterdrückt werden kann (Kato et al. 2000). Es ist vorstellbar, dass DCC vor allem die Apoptose induziert bei Zellen kolorektaler Karzinome, die außerhalb der Reichweite der Liganden liegen (Mehlen et al. 1998).

Trotz zahlreicher Studien, die DCC als möglichen protektiven Faktor interpretierten, gab es auch Studien, die DCC als Tumorsuppressor in Frage stellten. Fazeli et al. untersuchten homozygote knockout- Mäuse, die trotz fehlendem DCC- Gen kein vermehrtes Risiko der Tumorentstehung zeigten (Fazeli et al. 1997).

Diese unterschiedlichen Beobachtungen stützen die Hypothese, dass es sich bei DCC um einen „dependence receptor“ handelt, der ggf. nicht direkt als Tumorsuppressor fungiert, sondern je nach Bindungsstatus seines Liganden an Apoptose oder aber an vermehrter Zelladhäsion beteiligt sein könnte (Mehlen et al. 1998; Mehlen et al. 2005). Hsu und Kollegen gelang in vivo der Nachweis von DCC und Netrin-1 im gesunden Intestinaltrakt. Hier konnte Netrin- 1 in gesundem Kolongewebe bevorzugt an der Kryptenbasis, nicht aber im villösen Teil beobachtet werden, während sein Rezeptor DCC durchgehend bis in die Villi nachgewiesen wurde. Diese Verteilung, also der abnehmende Netrin- Gradient in Zellen, je weiter sie von den basalen Krypten in Richtung oberflächliches, villöses Epithel wandern, um letztendlich ins Lumen abgestoßen zu werden, stützt die Vermutung, Netrin-1 als zellulären Überlebensfaktor

zu interpretieren. Bei hoher Konzentration in hoch proliferativem, undifferenzierterem Gewebe, wie der Kryptenbasis, scheint die Netrin/ DCC- Interaktion einen protektiven, anti- apoptotischen Effekt auf die Zellen auszuüben (Hsu et al. 2001; Mehlen et al. 2005). Mazelin beobachtete, dass bei Überexpression von Netrin-1 im Gastrointestinaltrakt von Mäusen nicht nur Apoptose gehemmt wurde, sondern sogar die Entstehung neo- und hyperplastischer Läsionen gefördert wurde (Mazelin et al. 2004).

Aufgrund der identischen Sekundärstruktur von DCC wird der Neogenin- Rezeptor zur DCC- Rezeptor-Familie gezählt (Keeling et al.1997; Leonardo et al. 1997). Neogenin-1 ist, wie auch DCC, an der intakten neuronalen Entwicklung von Vertebraten beteiligt, konnte inzwischen aber auch außerhalb des ZNS, u. a. in Epithelzellen von Lunge und Gastrointestinaltrakt nachgewiesen werden (Gad et al. 1997). Rajagopalan et al. haben Neogenin als einen Rezeptor von RGMs (repulsive guidance molecules) im ZNS von Hühnern identifizieren können. Wie auch bei DCC wird eine Funktion als „dependence receptor“ vermutet (Rajagopalan et al. 2004). Es wird angenommen, dass Neogenin/ Netrin-1 Interaktionen, ähnlich wie DCC/ Netrin-1 Interaktionen, auch außerhalb des ZNS Einfluss nehmen auf Signaltransduktionswege, die sowohl Gewebemorphogenese, Angiogenese, Myoblastendifferenzierung als auch axonale Entwicklung betreffen (Park et al. 2004; Wilson et al. 2007).

Srinivasan et al. gelang es in vivo Interaktionen zwischen Neogenin und Netrin-1 in sich entwickelnden Brustdrüsen bei Mäusen nachzuweisen. Die Bindung von Netrin-1 an seinen Rezeptor Neogenin-1 war dort für die Zelladhäsion zwischen zwei Epithelschichten und somit für regelrechte Morphogenese essentiell. Bei Mutationen von Neogenin und Netrin-1 konnten unorganisiertes Wachstum, Einbrüche der Basallamina und verstärkt Apoptose beobachtet werden (Srinivasan et al. 2003).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Gleichgewicht von Netrin-1 und seinen „dependence receptors“ bedeutend für die Kontrolle von Zellwachstum, Zellüberleben und Zelltod zu sein scheint.

Die Netrin- Rezeptoren werden als konditionale Tumorsuppressor interpretiert, die in Abhängigkeit ihrer Umgebung und ihres Liganden die Tumorgenese beeinflussen (Bredesen et al. 2004).

Neben der Korrelation bekannter Prognosefaktoren, wie z.B. TNM- Stadien, soll in dieser Arbeit erstmalig am Gefrierpräparat kolorektaler Karzinome immunhistochemisch die Expression von Netrin-1 und seinem noch unzureichend erforschten Rezeptor Neogenin untersucht und retrospektiv mit klinischen und tumorspezifischen Daten der Patienten korreliert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

Becherglas 500 ml/ 1000ml	Fa. Schott Duran
Deckgläser	Fa. Marienfeld
Einmalpipetten	Fa. Elkay, Ireland
Eppendorf Tubes 0,5 ml/ 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Pipetten	Fa. Eppendorf, Hamburg
Erlenmeierkolben 100ml/ 5000ml	Fa. Schott Duran
Filterpapier	Fa. Schleicher & Schnell, Dassel
Inkubator	Heraeus Instruments
Küvetten	Fa. C. Roth, Karlsruhe
Küvetteneinsatz	Fa. C. Roth, Karlsruhe
Labor pH – Meter	WTW GmbH & Co, Weilheim
Magnetrührer	Fa. Gerhardt
Messzylinder 1000 ml	Fa. Brand
Messzylinder 100 ml	Fa. Schott Duran
Mikroskop	Fa. Zeiss, Jena, Axioskop 40
Objekträger	Fa. Marienfeld
Pipettenspitzen	Fa. Sarstedt
Polystyrol - Pinzette	Söllner GmbH, Deggendorf
Schlittenmikrotom	Fa. Mikrom, Heidelberg
Waage	Sartorius Laboratory

2.2. Chemikalien/ Reagenzien

ABC kit, Elite PK - 6105	Vector Laboratories, Burlingane, USA
DAB - Peroxidase Substrate kit SK - 4100	Vector Laboratories, Burlingane, USA
Ethanol 80%, 96%, 100%	Fa. Walter CMP GmbH & Co
Eukitt	Fa.O. Kindler GmbH & Co, Freiburg
Magermilchpulver	Fa. MERCK, Darmstadt
MAYER`s HEMATOXYLIN SOLUTION	Fa. SIGMA, Steinheim
Methanol	Fa. J.T. Baker, Deventer, Holland
Natronlauge 1N / 2N	Fa. MERCK, Darmstadt

Salzsäure 2 N	Fa. MERCK, Darmstadt
Sodium Chloride	Fa. J.T. Baker, Deventer, Holland
Tissue- Tek	Fa. Sakura Finetek
Trisma base, minimum 99,9% ige Titration	Fa. SIGMA, Steinheim
Wasserstoffperoxid 30% ig	Fa. MERCK, Darmstadt
Xylol	Fa. VOTRE PARTENAIRE CHIMIE Frankreich

2.3. Pufferlösungen/ Farbstoffsubstrat

TRIS - Puffer	Ansatz für 5 Liter: <ul style="list-style-type: none">- 30 g TRISMA - Pulver- 42,5 g Na Cl- 100 ml HCl (2 N)- Auffüllen mit destilliertem Wasser auf 5 Liter- pH - Wert auf 7,4 einstellen
DAB - Substrat	<ul style="list-style-type: none">- 5 ml destilliertes Wasser- 2 Tropfen Buffer- 4 Tropfen DAB Farbstoff- 2 Tropfen Wasserstoffperoxid

2.4. Verdünnungsmedien

- 1.) TRIS - Puffer
- 2.) TRIS - Puffer mit Magermilchpulver
 - 0,5 %ig - 0,5 g Magermilchpulver + 100 ml TRIS - Puffer
 - 1 %ig - 0,5 g Magermilchpulver + 50 ml TRIS - Puffer

2.5. Antikörper und Negativkontrollen

Antikörper

Neogenin (C-20)	sc - 6536, Lot # G 210, goat polyclonal Ig G Fa. Santa Cruz Biotechnologie
Netrin - 1 (N-18)	sc - 9291, Lot # H 2604, goat polyclonal Ig G Fa. Santa Cruz Biotechnologie

Negativkontrollen

normal goat Ig G	sc - 2028, Lot # G 1504, control Ig G Fa. Santa Cruz Biotechnologie
------------------	--

2.6. Immunhistochemie

2.6.1. Prinzip der Immunhistochemie

Immunhistochemische Verfahren haben seit ihrer Einführung eine zunehmende Bedeutung in der Medizin und Biologie erreicht. Aufgrund der Verfeinerung der immunhistochemischen Techniken werden Sensitivität und Spezifität stetig verbessert. Heute ist diese Technik vor allem Bestandteil der Pathologie und Anatomie, wo zahlreiche histopathologische Fragestellungen erforscht und beantwortet werden. Das Prinzip der Immunhistochemie besteht darin, dass im Gewebe vorhandene Antigene mit spezifischen Antikörpern reagieren und diese über ein Enzym oder einen fluoreszierenden Farbstoff im Mikroskop sichtbar gemacht werden. Diese Antikörper können monoklonal oder polyklonal sein und stammen von verschiedenen Tierspezies. Monoklonale Antikörper werden meistens aus Mäusen gewonnen und haben den Vorteil, dass sie nur gegen ein Epitop gerichtet sind und dementsprechend eine höhere Spezifität als polyklonale Antikörper besitzen. Polyklonale Antikörper wiederum eignen sich gut, da sie mehrere antigene Determinanten erkennen, denn sie werden von verschiedenen B- Zellen im Tier gebildet und zudem auch noch häufig mit Antiseren mehrerer Tiere gepoolt. Außerdem sind polyklonale Antikörper preiswerter und nicht so empfindlich für pH- Veränderungen.

Es gibt zahlreiche Methoden zur immunhistochemischen Darstellung. Bei der direkten Methode ist der Primärantikörper direkt mit einem Marker konjugiert. Diese Methode ist zwar sehr schnell, aber teuer, weil Antikörper in hohen Konzentrationen eingesetzt werden müssen. Bei der indirekten Methode erfolgt der Nachweis zwar auch mit einem spezifischen, aber unkonjugierten Primärantikörper, zu dem ein weiterer Antikörper, der so genannte Sekundärantikörper, hinzugefügt wird. Dieser ist spezifisch gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichtet und mit einem Markerenzym konjugiert. Somit stellt der Sekundärantikörper eine Brückenfunktion zwischen dem Primärantikörper und dem Farbstoffkomplex dar. Der Vorteil dieser Methode ist eine höhere Sensitivität gegenüber der direkten Methode. Hierzu zählen die APAAP- (alkalische Phosphatase anti- alkalische Phosphatase), PAP- (Peroxidase anti- Peroxidase) und die ABC- (Avidin Biotin Komplex) Methode (Noll 2000).

2.6.2. Avidin-Biotin-Komplex (ABC)- Methode

Die ABC- Methode stellt die gebräuchlichste indirekte Methode zum Nachweis von Antigenen dar und macht sich die Affinität von Avidin, einem Glykoprotein aus Hühnereiweiß, zu Biotin, einem wasserlöslichen Vitamin, zunutze. An das Antigen bindet zunächst der Primärantikörper. Dieser reagiert mit dem biotinylierten Brückenantikörper, der den ABC- Komplex bindet. Hier wird meist eine Lösung aus

Multi- Link- Antikörpern verwendet, die sich aus Brückenantikörpern verschiedener Tierspezies zusammensetzt. Das an den Komplex gekoppelte Enzym Peroxidase reagiert anschließend mit dem Substrat 3`3`- Diaminobenzidin (DAB), woraufhin das gesuchte Antigen durch Braunfärbung sichtbar gemacht wird. Die bedeutsamsten Vorteile der ABC- Methode, im Vergleich zu anderen indirekten Methoden, sind die höhere Sensitivität und die geringere Gefahr, die falsche Tierspezies als Sekundärantikörper verwendet zu haben (Noll 2000).

2.6.3. Gewebefixierung und Herstellung der Gefrierschnitte

Immunhistochemische Verfahren an Gefrierschnitten kommen zum Einsatz, wenn es um den Nachweis von besonders labilen Antigenen geht, die bei Formalin- oder Paraffinfixierung zerstört würden. Da es bei der Fixierung von Gefrierschnitten nicht zu einer Vernetzung des Antigens mit Aldehyden kommt (Maskierung), entfällt die enzymatische Demaskierung. Routinemäßig sind hier Diagnosen vor allem im Rahmen der Schnellschnittdiagnostik in sehr kurzer Zeit möglich (Noll 2000).

Um einer Autolyse vorzubeugen, wurden die einzelnen Tumorproben in Tissue Tek eingebettet und bei -80 °C kryokonserviert. Tissue Tek ist ein Trägermedium, das beim Gefrieren annähernd die gleiche Konsistenz wie das Probematerial erreicht und den Schneidevorgang wesentlich erleichtert. Anschließend konnten mit Hilfe des Mikrotoms 5 µm dünne Schnitte der Tumorblöcke hergestellt und auf Objektträgern glatt gezogen werden.

Die Schnitte wurden anschließend bei Raumtemperatur mindestens 20 Minuten getrocknet, bevor sie in Aceton fixiert und in Pufferlösung von anhaftendem Aceton frei gewaschen wurden. Um eine potentielle endogene Rest- Enzymaktivität im Gewebe und damit verbundene falsch positive Ergebnisse zu verhindern, ist die Blockierung der endogenen Peroxidase mit Methanol im Verlauf nötig gewesen. Die Inkubation mit Normalserum bzw. Nicht- Immunserum (Serum einer Tierspezies, die nicht mit dem gesuchten Antigen immunisiert wurde und somit keine Antikörper gegen das gesuchte Antigen besitzt) verhindert unspezifische Anfärbungen, indem die Proteine des Normalserums unterschiedliche elektrostatische Ladungen des Gewebes binden, um dem Primärantikörper nur noch spezifische Bindungen zu erlauben (Noll 2000).

2.6.4. Nachweis von Netrin-1

Zum Nachweis von Netrin-1 (N18) wurde das VECTASTAIN ABC KIT, Elite PK - 6105, Goat Ig G verwendet. Folgendes Protokoll wurde benutzt:

mind. 20 Min.	Schnitte lufttrocknen lassen
2 Min.	Objektträger in Aceton fixieren
3 x 2 Min.	in TRIS - Puffer waschen
20 Min.	Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität mit 0,3 %- Lsg. (Methanol + H ₂ O ₂ 30%) bei Raumtemperatur
3 x 2 Min.	in TRIS - Puffer waschen
30 Min.	Blockierung unspezifischer Bindungen mit Normal Serum, rabbit, VECTASTAIN in einer Verdünnung 1:25 mit TRIS/ Magermilchpulver 0,5 % im Wärmeschrank bei 37°C
60 Min.	Inkubation mit Netrin - 1 (N 18) in einer Verdünnung 1:25 mit TRIS/Magermilchpulver 0,5 % im Wärmeschrank bei 37°C
3 x 2 Min.	in TRIS - Puffer waschen
30 Min.	Inkubation mit Anti - Goat IgG, Biotinylated Antibody, VECTASTAIN in einer Verdünnung 1:50 mit TRIS/ Magermilchpulver 0,5 % im Wärmeschrank bei 37°C
3 x 2 Min.	in TRIS - Puffer waschen
30 Min.	Inkubation des Avidin - Biotin - Komplexes in einer Verdünnung 1:25 mit TRIS - Puffer im Wärmeschrank bei 37°C
3 x 2 Min.	in TRIS - Puffer waschen
3 Min.	Färben mit DAB - Substratlösung
2 x kurz	in Aqua dest. zum Stoppen der Färbung
1 Min.	Gegenfärben mit Mayer`s Hämatoxylin
2 x kurz	Spülen mit Aqua dest.
5 Min.	Bläuen unter Leitungswasser
2 x kurz	Spülen mit Aqua dest.
1 x 1 Min.	80 %iges Ethanol
2 x 1 Min.	96 %iges Ethanol
2 x 1 Min.	100 %iges Ethanol
5 Min.	Xylol

Eindeckung mit Eukitt

Als Negativkontrolle wurde analog zum Primärantikörper normal goat Ig G, sc - 2028, der Firma Santa Cruz Biotechnologie verwendet.

2.6.5. Nachweis von Neogenin

Zum Nachweis von Neogenin wurde das VECTASTAIN ABC KIT, Elite PK-6105, Goat Ig G verwendet. Folgendes Protokoll wurde benutzt:

mind. 20 Min.	Schnitte lufttrocknen lassen
2 Min.	Objektträger in Aceton fixieren
3x 2 Min.	in TRIS- Puffer waschen
20 Min.	Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität mit 0,3 %- Lsg. (Methanol + H ₂ O ₂ 30%) bei Raumtemperatur
3 x 2 Min.	in TRIS - Puffer waschen
30 Min.	Blockierung unspezifischer Bindungen mit Normal Serum, rabbit, VECTASTAIN in einer Verdünnung 1:10 mit TRIS/ Magermilchpulver 1 % im Wärmeschrank bei 37°C
60 Min.	Inkubation mit Neogenin (C 20) in einer Verdünnung 1:25 mit TRIS/Magermilchpulver 1 % im Wärmeschrank bei 37°C
3 x 2 Min.	in TRIS - Puffer waschen
30 Min.	Inkubation mit Anti - Goat IgG, Biotinylated Antibody, VECTASTAIN in einer Verdünnung 1:50 mit TRIS/ Magermilchpulver 1 % im Wärmeschrank bei 37°C
3 x 2 Min.	in TRIS - Puffer waschen
30 Min.	Inkubation des Avidin - Biotin - Komplexes in einer Verdünnung 1:25 mit TRIS - Puffer im Wärmeschrank bei 37°C
3 x 2 Min.	in TRIS - Puffer waschen
3 Min.	Färben mit DAB- Substratlösung
2 x kurz	in Aqua dest. zum Stoppen der Färbung
1 Min.	Gegenfärben mit Mayer`s Hämatoxylin
2 x kurz	Spülen mit Aqua dest.
5 Min.	Bläuen unter Leitungswasser
2 x kurz	Spülen mit Aqua dest.
1 x 1 Min.	80 %iges Ethanol
2 x 1 Min.	96 %iges Ethanol
2 x 1 Min.	100 %iges Ethanol
5 Min.	Xylol

Eindeckung mit Eukitt

Als Negativkontrolle wurde analog zum Primärantikörper normal goat Ig G, sc - 2028, der Firma Santa Cruz Biotechnologie verwendet.

2.7. Hämatoxylin- Eosin- Übersichtsfärbung

Um die pathologischen Veränderungen der Gewebe beurteilen zu können, wurden von jedem Tumorblock zwei Schnitte (jeweils der erste und letzte) mit Hämatoxylin- Eosin-Färbung angefertigt.

Die Hämatoxylin- Eosin (H.E.) Färbung ist eine Sukzedanfärbung, d.h. es wird nacheinander gefärbt. Sie basiert auf dem Prinzip der Durchtränkung und der elektrostatischen Absorption. Hämalaun wird üblicherweise progressiv gefärbt, d. h. der Färbegrad wird während der Färbung kontrolliert, und die Färbung bei gewünschtem Farbergebnis abgebrochen. Hämalaun ist positiv geladen und bindet sich an die sauren Bestandteile der DNS, wodurch eine Kernfärbung erzielt wird. Eosin wird regressiv gefärbt, d. h. es wird also erst überfärbt und anschließend differenziert. Eosin ist negativ geladen und bindet sich an die positiven Gewebsbestandteile (Eiweiße), wodurch eine Plasmafärbung erzielt wird.

Für die H.E.- Übersichtsfärbung wurden die Gefrierschnitte zunächst 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet, anschließend in Aceton bzw. in 96 %igem Ethanol für 2 Minuten fixiert. Daraufhin wurden sie 1 Minute in destilliertem Wasser gewaschen, um anschließend 1 Minute mit Mayer´s Hämatoxylin gefärbt zu werden. Es folgte das Bläuen der Schnitte unter fließendem Leitungswasser und anschließend das ca. 30 sekundige Färben in Eosin, wiederum von Spülen unter fließendem Leitungswasser gefolgt. Danach wurden die Schnitte dehydriert, zunächst mit 80 %igem, 96 %igem und 100 %igem Ethanol für jeweils 2 x 2 Minuten und abschließend mit Xylol für 2 x 5 Minuten. Mit Eukitt erfolgte das Eindecken und Konservieren der Präparate.

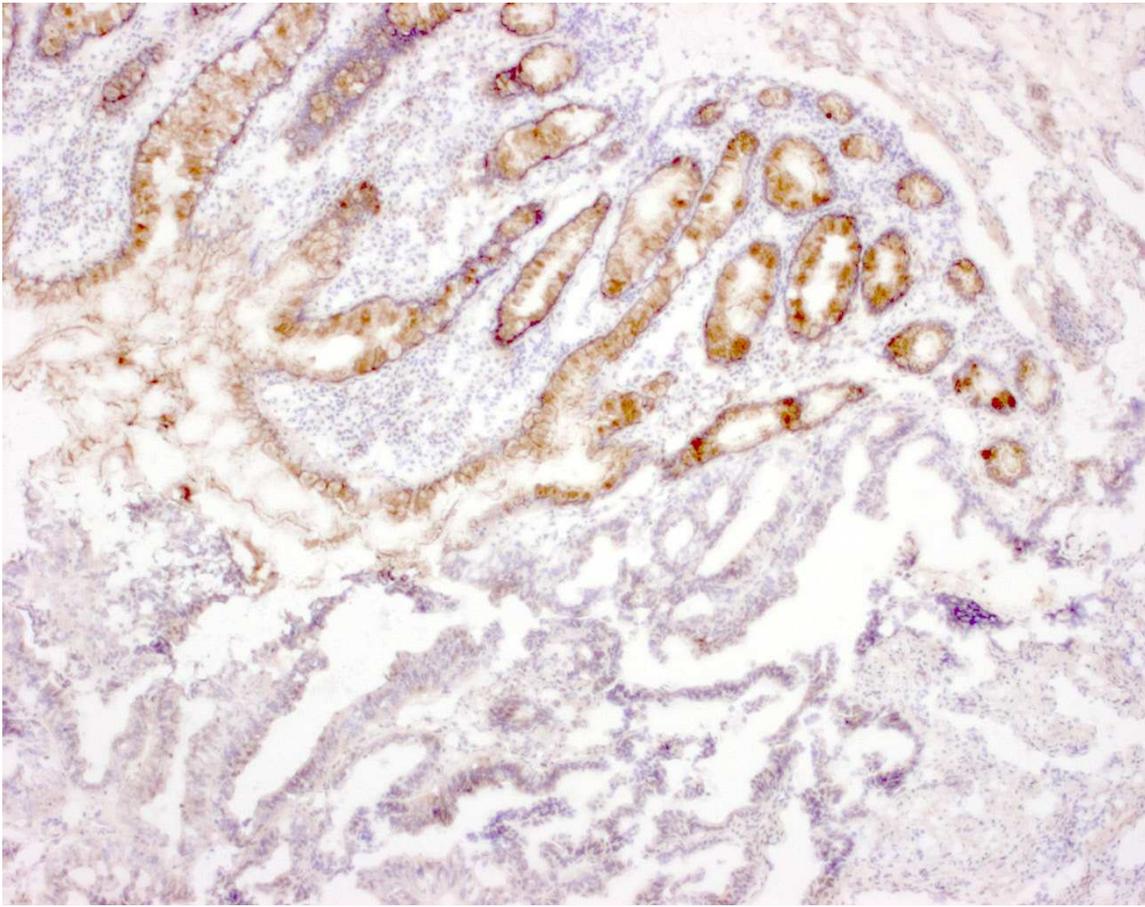
2.8. Histologische Auswertung und Quantifizierung der Färbungen

Die immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurden von zwei unabhängigen Pathologen beurteilt (U. Reichelt, S. Petri). Hier wurde das Lichtmikroskop Axioskop 40 (Firma Zeiss) benutzt und mit Hilfe einer dazugehörigen Digitalkamera die Färbungen fotografisch dokumentiert.

Die Intensität der Färbungen wurde nach einem Grading eingestuft. Hierbei steht 0 für keine zytoplasmatische Färbung, 1+ für schwach zytoplasmatisch gefärbt, 2+ für mittelstark zytoplasmatisch gefärbt und 3+ für eine starke zytoplasmatische Färbung.

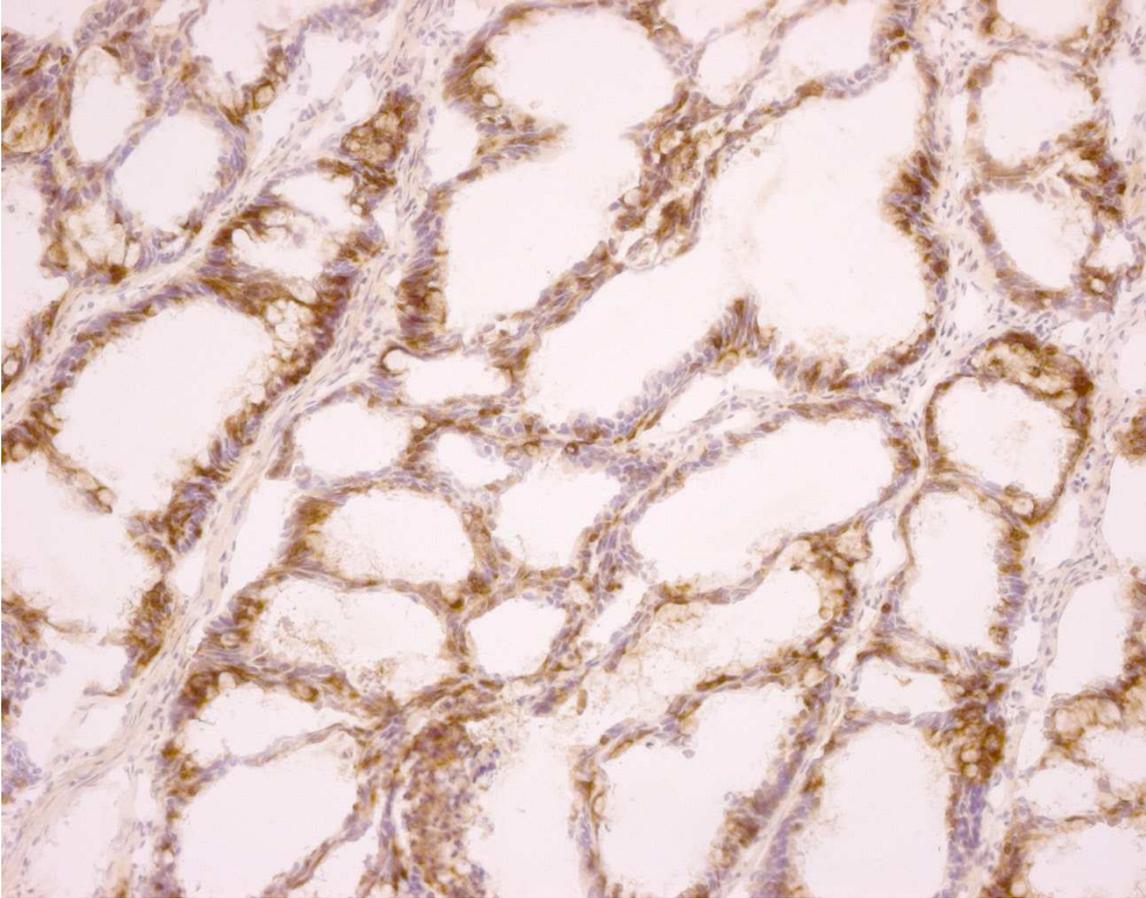
Die Abbildungen 2- 5 zeigen exemplarisch mittelstarke Färbungen (2+):

Abb.2: Expression von Neogenin in angrenzender, gesunder Rektumschleimhaut (Braunfärbung), fehlende Expression im Karzinom (Schnitt- Nr. 2600; 50- fache Vergrößerung)



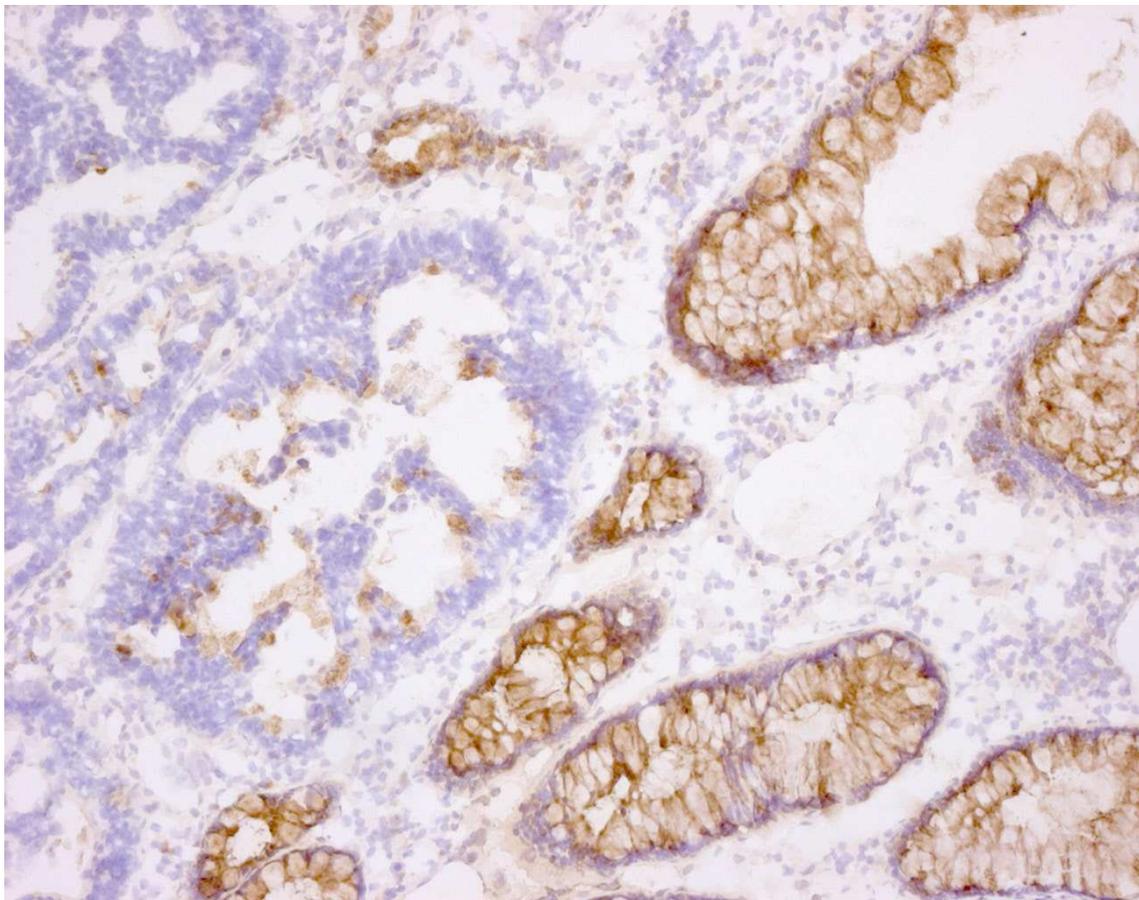
Quelle: Eigene Abbildung

Abb.3: Expression von Neogenin im Kolonkarzinom (Braunfärbung)
(Schnitt Nr. 2914; 100- fache Vergrößerung)



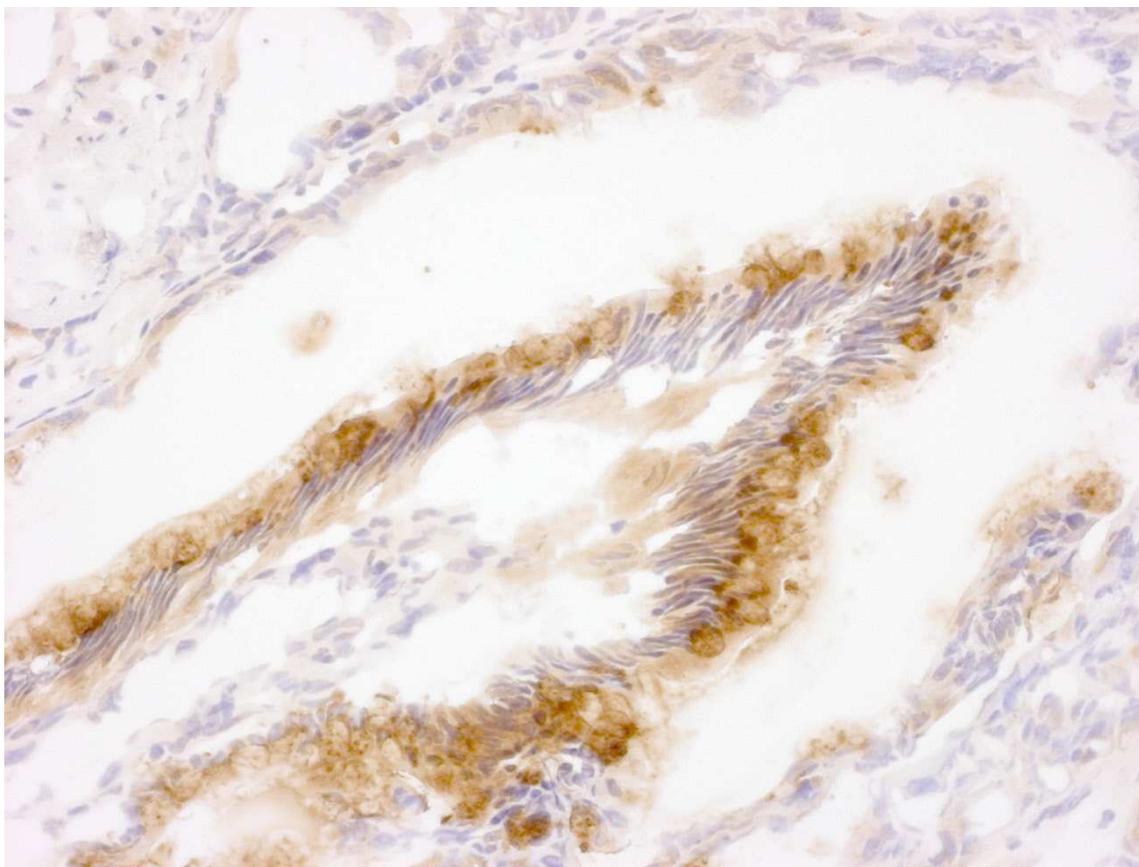
Quelle: Eigene Abbildung

Abb.4: Expression von Netrin-1 in Krypten gesunder Rektumschleimhaut (Braunfärbung), fehlende Expression im Karzinom (Schnitt Nr. 3788, 100- fache Vergrößerung)



Quelle: Eigene Abbildung

Abb.5: Expression von Netrin-1 im Kolonkarzinom (Braunfärbung)
(Schnitt Nr. 2912; 200- fache Vergrößerung)



Quelle: Eigene Abbildung

2.9. Patienten

In diese Studie wurden retrospektiv 82 Patienten mit Karzinomen des Kolons und Rektums eingeschlossen, die sich im Zeitraum von 1993 bis 2003 im Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf einer operativen Therapie unterzogen hatten. Ausgeschlossen wurden Patienten mit neoadjuvanter Chemo- bzw. Radiochemotherapie, Patienten ohne R0- Resektion und jene, die postoperativ innerhalb der ersten 30 Tage verstorben sind. Alle Patientendaten einschließlich Alter, Geschlecht, Tumorstadium, Lymphknotenstatus, Fernmetastasenstatus, Tumordifferenzierung und Resektionsstatus stammen aus Datenbanken der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie bzw. dem Institut für Pathologie der Universität Hamburg Eppendorf. Die klinischen Follow- up Daten wurden ebenfalls diesen Datenbanken entnommen, bzw. durch Kontakt von Patienten und Angehörigen vervollständigt.

2.10. Statistische Analyse und immunhistochemische Auswertung

Die für die vorliegende Studie erhobenen Daten wurden unter Zuhilfenahme von Microsoft Excel 2000 erfasst. Alle statistischen Berechnungen wurden dann mit dem Statistical Package for Social Sciences (SPSS), Version 13 (SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt. Für alle Patienten wurde die Gesamtüberlebenszeit vom Operationszeitpunkt bis zum Todesdatum bzw. die rezidivfreie Überlebenszeit bis zum Auftreten von Lokalrezidiven oder Fernmetastasen errechnet.

Die Schätzungen der Überlebensraten aus den beobachteten Überlebenszeiten und die dazugehörige graphische Darstellung erfolgte mit Hilfe der Kaplan-Meier-Methode (Moeschberger et al. 1995) mit einem Konfidenzintervall von 95% (CI95%, $p=0,05$). Zum Vergleich der Überlebenskurven wurde der Log Rank- Test verwendet. Für die Berechnung signifikanter Zusammenhänge zwischen kategorischen Variablen wurden der Fisher's exact Test mit seinen Kreuztabellen, sowie der Chi- Quadrat-Unabhängigkeitstest verwendet. Kontinuierliche Variablen wurden mit dem nicht parametrischen Mann- Whitney- U- Test bewertet. Für alle Testverfahren galt jeweils die exakte zweiseitige Signifikanz. Ein p - Wert $< 0,05$ wurde als signifikant definiert.

Die Ergebnisse des untersuchten Glykoproteins Netrin-1 und seines Rezeptors Neogenin werden in standardisierter Vorgehensweise vorgestellt:

Für Netrin-1 und Neogenin wurden jeweils die folgenden Parameter untersucht:

- Expressionsstärke der Marker
- Prognoserelevanz des jeweiligen Markers in Bezug zum Gesamtüberleben bzw. zum rezidivfreien Überleben

- Beziehung der Expressionsstärke zu TNM- Stadium, histologischem Grad, UICC-Stadium, Rezidiven/ Metastasierung, adjuvanter Therapie, Tumorlokalisation und Alter der Patienten

Um die statistische Aussagekraft zu verbessern, wurden die meisten Parameter als dichotomisierte (kategoriale) Variablen eingesetzt.

Es wurden beim Tumor- Stadium T1- und T2- Tumore mit T3- und T4- Tumoren verglichen. Beim Nodalstatus wurden nodalpositive Patienten mit nodalnegativen, beim Alter Patienten ≤ 65 vs. > 65 , beim Grading G1/G2- vs. G3- Stadien und beim UICC-Stadium UICC I/ II vs. UICC III/ IV verglichen. Außerdem wurden Patienten, die im Verlauf ein Rezidiv bzw. Metastasen entwickelten, mit Patienten, die rezidivfrei blieben, verglichen. Zudem wurden Patienten mit Erhalt einer adjuvanten Therapie mit denen ohne adjuvante Therapie und beide Geschlechter verglichen. Bei der Tumorlokalisation wurde zwischen Tumoren im Colon ascendens, Colon transversum, Colon descendens und denen im sigmorektoidalen Übergang unterschieden.

Bei Patienten mit nur schwacher (fraglich positiver) Färbung von Netrin-1 ($n= 5$) war die genaue Zuordnung zu positiver oder eher negativer Expression nicht eindeutig. Bei statistisch unbedeutenden Differenzen der Überlebensdaten zwischen Patienten mit negativer bzw. schwacher Expressionsstärke von Netrin-1 entschlossen wir uns dazu, diese zu einer Gruppe zusammenzufassen und sie mit Ergebnissen der Patienten mit eindeutig positiver, also mittelstarker und starker Expression, zu vergleichen.

Bei Neogenin hingegen wurden Überlebensdaten von Patienten ohne Neogenin-Nachweis mit der Patientengruppe, die schwache, mittlere und starke Expression aufwies, korreliert.

3. Ergebnisse

3.1. Patientendaten und pathologisch- anatomische Befunde

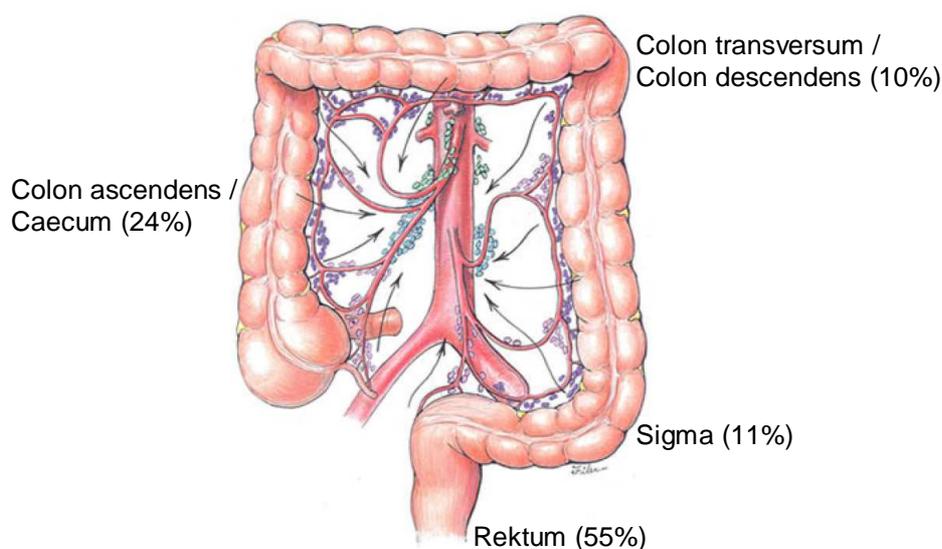
Insgesamt wurden 82 Patienten mit kolorektalem Karzinom, die sich im Zeitraum von Dezember 1993 bis August 2003 im Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf einer Operation unterzogen, in diese Studie eingeschlossen. Ausgeschlossen wurden Patienten mit neoadjuvanter Radio- oder Chemotherapie, Patienten, die nach WHO-Klassifikation nicht R0 reseziert waren und jene, die innerhalb von 30 Tagen postoperativ verstarben.

Ebenso erfüllten Patienten, bei denen hereditäre Syndrome wie FAP (familiäre adenomatöse Polyposis coli), HNPCC (hereditary non- polyposis colorectal cancer) oder chronisch entzündliche Darmerkrankungen (Colitis ulcerosa, Morbus Crohn) bekannt waren, nicht die Kriterien zum Einschluss in diese Arbeit.

Das Patientenkollektiv setzt sich aus 33 (40.2 %) Frauen und 49 (59.8 %) Männern zusammen, deren medianes Alter 65 Jahre (33- 94 Jahre) betrug (Tab. 5).

Bezüglich der Tumorlokalisation befand sich das Karzinom bei 20 (24.3 %) Patienten im Caecum/ Colon ascendens, bei 8 (9.8 %) Patienten im Colon transversum/ Colon descendens, bei 9 (11 %) im Sigma und bei 45 (54.9 %) Betroffenen im Rektum (Abb. 6).

Abb. 6) Lokalisation der kolorektalen Karzinome des Patientenkollektivs



Ergebnisse

Für das Tumorstadium wurde bei 6 Patienten ein pT1 (7.3 %), bei 23 Patienten ein pT2 (28.0 %), bei 43 Patienten ein pT3 (52.4 %) und bei 10 Patienten ein pT4 (12.3 %) diagnostiziert. Lymphknotenmetastasen waren bei 36 Patienten (44 %) vorhanden; hier lag bei jeweils 18 Patienten (22 %) ein N1 bzw. N2- Status vor. 46 Patienten (56 %) waren nodalnegativ. Fernmetastasen wurden bei 18 Patienten (22 %) diagnostiziert. Bei der Tumordifferenzierung betrug die Anzahl der gut bzw. mäßig (G1/ 2) differenzierten Tumore 66 (80.5 %), die der wenig differenzierten 16 (19.5 %).

Entsprechend der UICC Klassifikation befand sich genau 50 % des Patientenkollektivs in Stadium I/ II, die anderen 41 Patienten in Stadium III/ IV. Des Weiteren erhielten 47 Patienten (57.3 %) eine adjuvante Radio-/ Chemotherapie. Bei den übrigen 35 (42.7 %) war zum Beobachtungszeitpunkt keine adjuvante Therapie indiziert (Tab. 5).

Ergebnisse

Tab.5: Tabellarische Zusammenfassung der demographischen Daten, pathologisch-anatomischen Ergebnisse und der Einfluss auf das Gesamt- bzw. rezidivfreie Überleben

	Patienten N=82	%	Gesamt- überleben p-Wert	Rezidivfreies Überleben p-Wert
Alter in Jahren			0.504	0.386
Median	65.0			
Standard- abweichung	11.7			
Geschlecht			0.556	0.824
Weiblich	33	40.2		
Männlich	49	59.8		
Tumor- lokalisation			0.355	0.353
Caecum/ Colon asc./ transv./ desc.	28	34.1		
Sigma/ Rektum	54	65.9		
T - Stadium			0.004	0.007
pT1/pT2	29	35.4		
pT3/pT4	53	64.6		
N - Status			0.001	0.015
pN0	46	56.0		
pN1/N2	36	44.0		
M - Status			0.000	0.000
pM0	64	78.0		
pM1	18	22.0		
G - Status			0.087	0.059
G1/G2	66	80.5		
G3	16	19.5		

Ergebnisse

	Patienten N=82	%	Gesamt- überleben p-Wert	Rezidivfreies Überleben p-Wert
Stadium (UICC)			0.000	0.000
I/II	41	50.0		
III/IV	41	50.0		
Rezidiv / Metastasen			0.000	n.a.
Nein	55	67.1		
Ja	27	32.9		
Adjuvante Therapie			0.011	0.001
Nein	35	42.7		
Ja	47	57.3		

3.2. Pathologisch- anatomische Befunde und Prognose

Für das Tumorstadium haben wir zwei Gruppen miteinander verglichen: Patienten mit T1- bzw. T2- Stadium (n=29) versus Patienten mit T3- bzw. T4- Stadium (n=53). Die Gruppe mit T1/ T2- Tumoren hatte ein mittleres Gesamtüberleben von 88.4 Monaten (95%CI, 75.9-100.9), während Patienten mit T3/ T4- Stadium eine mittlere Gesamtüberlebenszeit von 59.7 Monaten hatten (95%CI, 49.4-70.0; **p=0.004**) (Abb.7). Das mittlere Gesamtüberleben entsprach bei Patienten ohne Lymphknotenbefall (n=46) 76.5 Monate (95%CI 67.6-85.4), bei Patienten mit Lymphknotenmetastasen (n=36) 56.5 Monate (95%CI 43.1-69.8; **p=0.001**). Patienten ohne Fernmetastasen (n=64) zeigten eine mittlere Gesamtüberlebenszeit von 85.3 Monaten (95%CI 76.5-94.1), während Patienten mit pM1- Status (n=18) ein Gesamtüberleben von 29.6 Monaten (95%CI 21.6-37.6; **p=0.000**) aufwiesen. Patienten, die sich entsprechend der UICC- Klassifikation in Stadium I/ II (n=41) befanden, hatten im Mittel eine Überlebenszeit von 81.8 Monaten (95%CI 73.6-90.0). Betroffene in Stadium III/ IV (n=41) überlebten im Durchschnitt 54.9 Monate (95%CI 42.7-67.2; **p=0.000**) (Abb. 8). Patienten, die eine adjuvante Radio- bzw. Chemotherapie (n=47) erhielten, wiesen eine mittlere Überlebenszeit von 61.6 Monaten (95%CI 50.1-73.2) auf, während bei Patienten ohne Indikation für eine adjuvante Therapie (n=35) das mittlere Überleben 77.8 Monaten (95%CI 68.2-87.4; **p=0.011**) entsprach. Patienten, die an einem Rezidiv bzw. Metastasen (n=27) im Verlauf erkrankten, zeigten eine Gesamtüberleben von durchschnittlich 37.8 Monaten (95%CI 29.5-46.1). Im Beobachtungszeitraum zeigten rezidivfreie Patienten (n=55) hingegen eine Gesamtüberlebenszeit von 89.5 Monaten (95%CI 81.1-98.0; **p=0.000**).

Im Beobachtungszeitraum konnte bezüglich des rezidivfreien Überlebens ebenfalls ein statistisch signifikanter Einfluss bei den Variablen Tumorstadium, Lymphknotenmetastasen, Fernmetastasen, UICC- Stadium und Anwendung adjuvanter Therapie festgestellt werden.

So zeigten Patienten mit T1- und T2- Stadium (n=29) ein rezidivfreies Überleben von durchschnittlich 89.8 Monaten (95%CI 78.0-101.5), Patienten mit T3- und T4- Stadium eines von 57.2 Monaten (95%CI 45.9-68.5; **p=0.007**). Auch die Lymphknotenbeteiligung hatte einen signifikanten Einfluss auf das rezidivfreie Überleben. So zeigten Patienten mit positivem Lymphknotenbefall (n=36) eine mittlere rezidivfreie Überlebenszeit von 56.1 (41.2-71.1) Monaten, Patienten mit N0- Status (n=46) eine von 73.4 Monaten (95%CI 63.3-83.5; **p=0.015**).

Patienten mit Fernmetastasen (n=18) hatten zum Beobachtungszeitpunkt eine mittlere rezidivfreie Überlebenszeit von nur 25.1 Monaten (95%CI 15.4-34.8) während Patienten mit M0- Status (n=64) eine von 85.4 Monaten aufwiesen (95%CI 76.2-94.7;

p=0.000). Auch bei der, an die TNM- Klassifikation angelehnte Stadieneinteilung nach UICC, zeigte sich ein statistisch signifikanter, prognostischer Einfluss auf das rezidivfreie Überleben. Hier konnte im Beobachtungszeitraum bei Patienten in Stadium I und II (n=41) ein rezidivfreies Überleben von 81.7 Monaten (95%CI 73.2-90.2) ermittelt werden, während bei Patienten in Stadium III und IV (n=41) eines von 50.7 Monaten beobachtet werden konnte (95%CI 37.3-64.1; **p=0.000**). Bei Anwendung einer adjuvanten Therapie (n=47) zeigten Patienten ein rezidivfreies Überleben von 55.6 Monaten (95%CI 42.8-68.4), während bei Patienten, bei denen zum Beobachtungszeitpunkt keine Indikation für eine adjuvante Therapie (n=35) bestand, ein rezidivfreies Überleben von 81.2 Monaten ermittelt werden konnte (95%CI 72.2-90.1; **p=0.001**).

Ergebnisse

Abb.7) Einfluss des Tumorstadiums auf das Gesamtüberleben; $p=0.004$

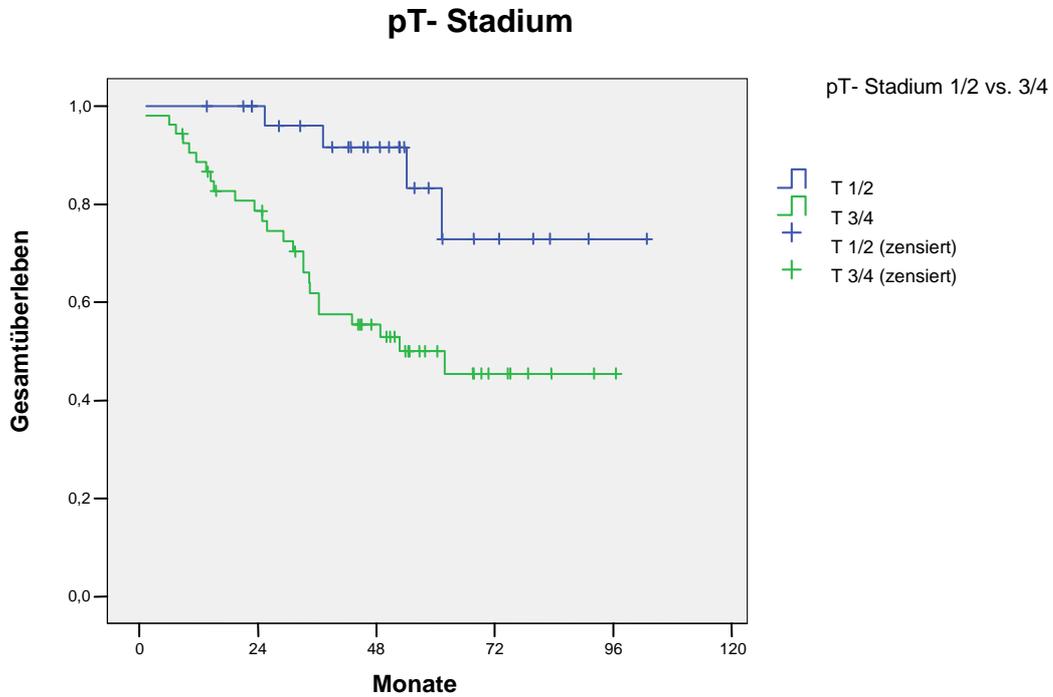
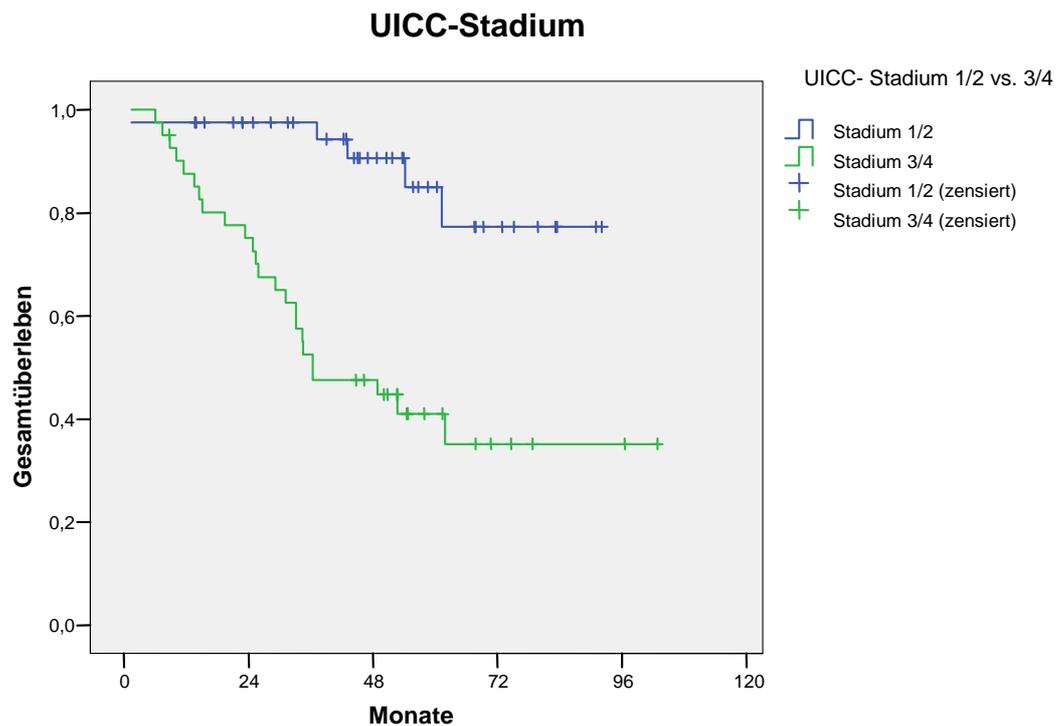


Abb.8) Einfluss des Stadiums nach UICC auf das Gesamtüberleben; $p=0.000$



3.3 Immunhistochemische Ergebnisse

3.3.1. Korrelation der Netrin-1- Expression mit klinischen und pathologischen Parametern

Bei 63.4 % des Patientenkollektivs (n=52) konnte immunhistochemisch keine Expression von Netrin-1 festgestellt werden. Bei den anderen 36.6 % (n=30) gelang der Netrin-1- Nachweis in folgender Verteilung: Eine schwache Expression lag hier in 6.1 % (n=5), eine mittelstarke in 25.6 % (n=21) und eine starke in 4.9 % (n=4) vor (Tab. 8). Bei 6 % unseres Kollektivs (n=5) gelang lediglich ein äußerst schwacher Netrin-Nachweis, der schwer von Tumoren ohne Netrin- Expression zu unterscheiden war, so dass wir bei Nachweis annähernd gleicher Ergebnisse bezüglich des Überlebens, Patienten ohne Netrin- Expression und Patienten mit sehr schwacher Netrin- Expression zu einer Gruppe zusammenfassten. Diese Gruppe wurde anschließend mit der Gruppe von mittelstark und stark Netrin exprimierenden Tumoren verglichen.

Es wurde zunächst die Beziehung der Expressionsstärke von Netrin-1 mit klinischen und pathologischen Parametern untersucht. Hierzu wurden die Expressionsspiegel von Netrin-1 als kontinuierliche Variablen mit den dichotomisiert kategorisierten Variablen für TNM-/ UICC- Stadium, histologischem Grading, Auftreten von Rezidiv/ Metastasen, Anwendung adjuvanter Therapie, Tumorlokalisierung und Alter der Patienten verglichen. Signifikante Unterschiede zeigten sich beim Grading und der adjuvanten Therapie. Hier konnte gezeigt werden, dass von den insgesamt 66 Patienten mit G1- oder G2- Status 42 Patienten (64 %) kein oder nur schwach Netrin-1 exprimierten. Bei Patienten mit G3- Status (n=16) haben fast alle (94 %) keine oder nur sehr schwache Netrin-1- Expression gezeigt (**p=0.031**). Anders ausgedrückt hatten von den insgesamt 57 Patienten, die keine oder nur schwache Netrin- Expression aufwiesen, 42 Patienten (73 %) einen G1/ 2- Status, während bei den 25 Patienten mit mittelstarker oder starker Netrin-1- Expression fast alle (24 Patienten, 96 %) einen G1- oder G2-Status hatten (Tab.6).

Auch beim Vergleich von Netrin-1- Expression und Erhalt adjuvanter Therapien konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang dargestellt werden. Von den insgesamt 47 Patienten, die eine adjuvante Therapie erhielten, zeigten nur 9 Patienten (19 %) eine mittelstarke bzw. starke Netrin-1- Expression, während ein signifikant höherer Anteil der Patienten (n=38, 81 %) kein oder nur schwach Netrin-1 exprimierte (**p=0.015**). Anders ausgedrückt erhielten von den insgesamt 57 Patienten, bei denen gar kein oder nur ein schwacher Netrin- Nachweis gelang, 38 Patienten (67 %) eine adjuvante Therapie. Umgekehrt konnte festgestellt werden, dass von den insgesamt 25 Patienten, die eine mittelstarke bzw. starke Netrin- Expression aufwiesen, 16 Patienten (64 %) keine adjuvante Therapie benötigten. Zwischen den anderen klinisch-

Ergebnisse

pathologischen Parametern und der Netrin- 1 Expression fand sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang (Tab.6).

Tab.6: Darstellung der Beziehung der Expressionsstärke von Netrin-1 zu pT/pN/pM-Stadium, histologischem Grad, UICC-Stadium, Rezidiv/Metastasen, adjuvanter Therapie, Tumorlokalisation und Alter der Patienten

		N gesamt	nicht/ schwach	in %	mittel/ stark	in %	p-Wert
T	1/2	29	18	62.1	11	37.9	0.321
	3/4	53	39	73.6	14	26.4	
N	0	46	28	60.9	18	39.1	0.090
	1/2	36	29	80.6	7	19.4	
M	0	64	42	65.6	22	34.4	0.246
	1	18	15	83.3	3	16.7	
G	1/2	66	42	63.6	24	36.4	0.031
	3	16	15	93.8	1	6.3	
Stadium (UICC)	I/II	41	24	58.5	17	41.5	0.054
	III/IV	41	33	80.5	8	19.5	
Rezidiv / Metastasen	Nein	55	34	61.8	21	38.2	0.293
	Ja	27	23	85.2	4	14.8	
Adjuvante Therapie	Nein	35	19	54.3	16	45.7	0.015
	Ja	47	38	80.9	9	19.1	
Tumor- lokalisation	Colon	28	19	67.9	9	32.1	0.806
	Sigma/ Rektum	54	38	70.4	16	29.6	
Alter (in Jahren)	≤ 60	26	19	73.1	7	26.9	0.798
	> 60	56	38	67.9	18	32.1	

3.3.2. Einfluss der Netrin-1- Expression auf das rezidivfreie Überleben und das Gesamtüberleben

Um die Netrin-1- Expression als prognostischen Faktor zu untersuchen, wurden univariate Analysen für den Einfluss der einzelnen Faktoren, sowohl auf das rezidivfreie Überleben, als auch auf das Gesamtüberleben durchgeführt. Hierzu wurden die Patienten mit dichotomisierten Variablen stratifiziert.

Netrin-1 konnte in dieser Arbeit in kolorektalem Tumorgewebe, teilweise aber auch in angrenzendem, gesunden kolorektalen Gewebe, nachgewiesen werden. Bei 63.4 % des Patientenkollektivs (n=52) konnte immunhistochemisch keine Expression von Netrin-1 festgestellt werden. Bei den anderen 36.6 % (n=30) konnte Netrin-1 nachgewiesen werden: Eine schwache Expression lag hier in 6.1 % (n=5), eine mittelstarke in 25.6 % (n=21) und eine starke in 4.9 % (n=4) vor (Tab.8).

Es konnte ein Einfluss von Netrin- Expression auf das Gesamtüberleben, vor allem aber auf das rezidivfreie Überleben gezeigt werden. Aufgrund annähernd gleicher Ergebnisse wurden Tumore ohne Nachweis von Netrin mit denen schwacher Netrin-Expression zu einer Gruppe zusammengefasst und mit der Gruppe mit mittelstarker und starker Expression verglichen. Patienten mit keiner bzw. schwacher Netrin-Expression (n=57) hatten ein mittleres Gesamtüberleben von 66.5 Monaten (95%CI 55.7- 77.4), während Patienten mit mittelstarker und starker Expression (n=25) im Beobachtungszeitraum ein mittleres Gesamtüberleben von 67.6 Monaten (95%CI 58.3-76.9; p=0.088) (Abb.9) zeigten.

Für das rezidivfreie Überleben konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang bei der Netrin- Expression gezeigt werden: Patienten ohne bzw. mit schwachem Nachweis von Netrin-1 (n=57) hatten eine mittlere rezidivfreie Überlebenszeit von 63.9 Monaten (95%CI 52.0-75.9), während Patienten mit mittelstarker oder starker Expression (n=25) ein rezidivfreies Überleben von 69.3 Monaten (95%CI 60.3-78.3; **p=0.040**) zeigten (Abb.10).

Auch in der Subgruppe der Patienten mit Karzinomlokalisierung im Sigma oder Rektum konnte ein statistisch signifikanter Einfluss beobachtet werden. So zeigten Patienten mit Tumorlokalisierung im Sigma bzw. Rektum bei fehlender oder schwacher Netrin-Expression (n=38) ein mittleres rezidivfreies Überleben von 65.4 Monaten (95%CI 51.2-79.5), während bei Patienten mit mittelstarker oder starker Netrin- Expression (n=16) eines von 74.4 Monaten (95%CI 66.3-82.4; **p=0.035**) beobachtet werden konnte (Abb.11).

Abb.9) Einfluss von Netrin-1- Expression auf das Gesamtüberleben; $p=0.088$

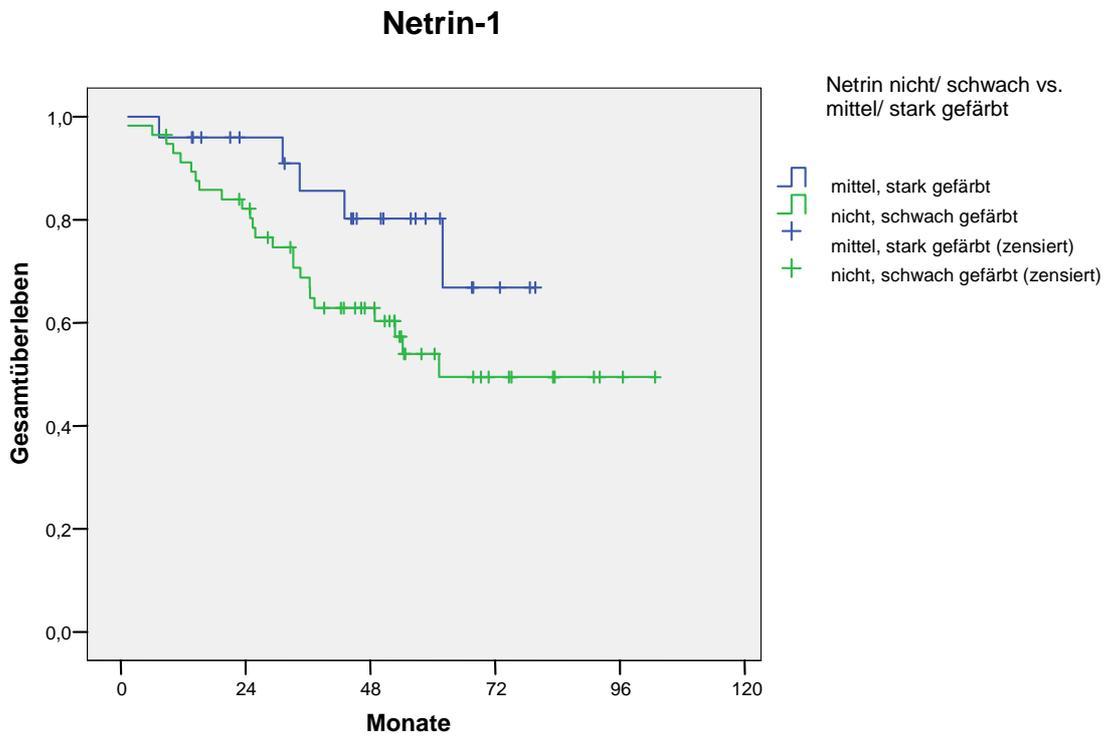


Abb.10) Einfluss von Netrin-1- Expression auf das rezidivfreie Überleben; $p=0.040$

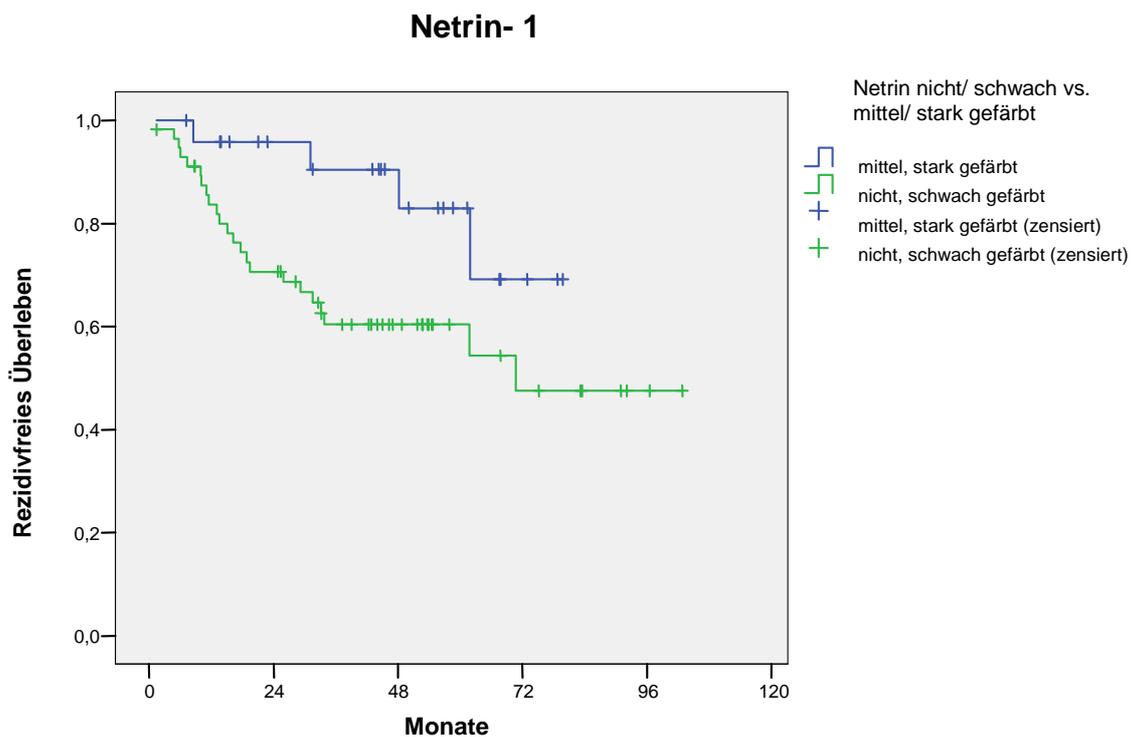
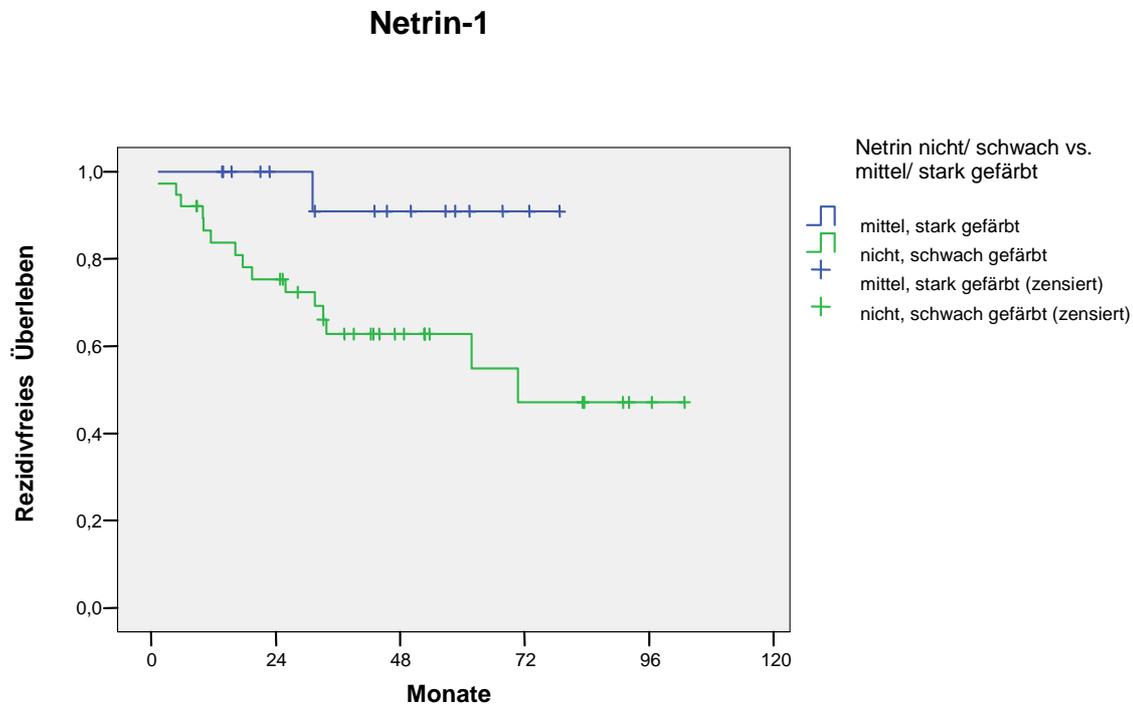


Abb.11) Einfluss von Netrin-1- Expression auf das rezidivfreie Überleben bei Karzinomlokalisation im Sigma/ Rektum; **p=0.035**



In der Untergruppe der Patienten mit pT3- und pT4- Stadium wurde beobachtet, dass Patienten ohne bzw. mit schwacher Netrin- Expression (n=39) ein mittleres rezidivfreies Überleben von 51.7 Monaten hatten (95%CI 38.7-64.6), während Patienten mit gleichem Tumorstadium, aber mit mittelstarker oder starker Netrin- Expression (n=14) eines von 64.2 Monaten (95%CI 50.7-77.8; p=0.090) zeigten. In der Altersgruppe der unter bzw. 60- Jährigen hatten Patienten ohne oder mit schwacher Netrin- Expression (n=19) eine mittlere rezidivfreie Überlebenszeit von 53.6 Monaten (95%CI 34.2-72.9), wobei Patienten derselben Altersgruppe mit mittelstarker oder starker Netrin- Expression (n=7) eine von 73.8 Monaten (95%CI 64.2-83.3; p=0.087) zeigten.

Somit kann zusammengefasst werden, dass in unserer Untersuchung eine mittelstarke bzw. starke Netrin-1- Expression bei kolorektalen Karzinomen mit einem günstigen Einfluss auf das Gesamtüberleben (p=0.088) und mit einem statistisch signifikanten Einfluss auf das rezidivfreie Überleben (**p=0.040**) assoziiert ist.

In der Subgruppe der Patienten mit Tumorlokalisation im Sigma oder Rektum konnte zudem eine statistisch signifikante Korrelation zwischen Netrin-1- Expression und rezidivfreiem Überleben gezeigt werden (**p=0.035**).

3.3.3. Korrelation der Neogenin- Expression mit klinischen und pathologischen Parametern

Bei der Hälfte des Patientenkollektivs (n=41) konnte Neogenin immunhistochemisch nicht nachgewiesen werden. Bei den anderen 41 Patienten wurde eine Neogenin-Expression mit folgender Verteilung beobachtet: 11 % (n=9) wiesen eine schwache, 31.7 % (n=26) eine mittelstarke und 7.3 % (n=6) eine starke Expression des Netrin-Rezeptors auf (Tab. 8).

Tumore ohne Nachweis von Neogenin wurden verglichen mit Tumoren mit positivem Neogenin- Nachweis (schwache, mittelstarke, und starke Neogenin- Expression).

Es wurde zunächst die Beziehung der Expressionsstärke von Neogenin mit klinischen und pathologischen Parametern untersucht. Hierzu wurden der Expressionsspiegel von Neogenin als kontinuierliche Variable mit den dichotomisiert kategorisierten Variablen für TNM-/ UICC- Stadium, histologischem Grading, Auftreten von Rezidiv/ Metastasen, Anwendung adjuvanter Therapie, Tumorlokalisierung und Alter der Patienten verglichen (Tab. 7).

Signifikante Unterschiede zeigten sich beim Nodalstatus und dem UICC- Stadium. Hier konnte gezeigt werden, dass von den insgesamt 46 Patienten ohne Lymphknotenmetastasen, 17 Patienten (37 %) kein Neogenin exprimierten, während die restlichen 29 Patienten (63 %) eine positive Neogenin- Expression aufwiesen. Bei Patienten mit Lymphknotenbefall, also N1/2- Status (insgesamt 36 Patienten), ließ sich bei 24 Patienten (67 %) kein Neogenin nachweisen (**p=0.014**). Anders ausgedrückt hatten von den insgesamt 41 Patienten, bei denen kein Neogenin nachgewiesen werden konnte, 17 Patienten (41 %) einen N0- Status, während 24 Patienten nodalpositiv waren (59 %). Von den 41 Patienten mit positivem Neogenin- Nachweis hatten immerhin 29 Patienten (70 %) keine Lymphknotenbeteiligung (Tab. 7).

Die Hälfte unseres Patientenkollektivs befand sich im UICC- Stadium I/ II. In dieser Gruppe hatten 26 Patienten (63 %) einen positiven Neogenin- Nachweis, während von den insgesamt 41 Patienten im UICC- Stadium III/ IV 26 Patienten (63 %) keine Neogenin- Expression aufwiesen (**p=0.027**). Anders ausgedrückt befanden sich von den 41 Patienten ohne Neogenin- Expression bereits 26 Patienten (63 %) im UICC- Stadium III oder IV. Bei dem Patientenkollektiv mit positivem Neogenin- Nachweis befanden sich nur 15 Patienten (37 %) im Stadium III oder IV nach UICC (Tab. 7).

Ergebnisse

Tab.7: Darstellung der Beziehung der Expressionsstärke von Neogenin zu pT/pN/pM-Stadium, histologischem Grad, UICC-Stadium, Rezidiv/Metastasen, adjuvanter Therapie, Tumorlokalisation und Alter der Patienten

		N gesamt	nicht	in %	schwach/ mittel/ stark	in %	p-Wert
T	1/2	29	10	34.5	19	65.5	0.064
	3/4	53	31	58.5	22	41.5	
N	0	46	17	37.0	29	63.0	0.014
	1/2	36	24	66.7	12	33.3	
M	0	64	30	46.9	34	53.1	0.424
	1	18	11	61.1	7	38.9	
G	1/2	66	30	45.5	36	54.5	0.162
	3	16	11	68.8	5	31.3	
Stadium (UICC)	I/II	41	15	36.6	26	63.4	0.027
	III/IV	41	26	63.4	15	36.6	
Rezidiv / Metastasen	Nein	55	25	45.5	30	54.5	0.602
	Ja	27	16	59.3	11	40.7	
Adjuvante Therapie	Nein	35	15	42.9	20	57.1	0.372
	Ja	47	26	55.3	21	44.7	
Tumor- lokalisation	Colon	28	17	60.7	11	39.3	0.244
	Sigma/ Rektum	54	24	44.4	30	55.6	
Alter (in Jahren)	≤ 60	26	12	46.2	14	53.8	0.813
	> 60	56	29	51.8	27	48.2	

3.3.4. Einfluss der Neogenin- Expression auf das rezidivfreie Überleben und das Gesamtüberleben

Um die Neogenin- Expression als prognostischen Faktor zu untersuchen, wurden univariate Analysen für den Einfluss der einzelnen Faktoren, sowohl auf das rezidivfreie Überleben, als auch auf das Gesamtüberleben durchgeführt. Hierzu wurden die Patienten mit dichotomisierten Variablen stratifiziert.

Wie auch sein Ligand konnte Neogenin in dieser Arbeit in kolorektalem Tumorgewebe, teilweise aber auch in angrenzendem, gesunden kolorektalen Gewebe nachgewiesen werden. Bei der Hälfte des Patientenkollektivs (n=41) konnte Neogenin immunhistochemisch nicht nachgewiesen werden. Bei den anderen 41 Patienten wurde eine Neogenin- Expression mit folgender Verteilung beobachtet: 11 % (n=9) wiesen eine schwache, 31.7 % (n=26) eine mittelstarke und 7.3 % (n=6) eine starke Expression des Netrin- Rezeptors auf (Tab. 8).

Es konnte der Einfluss von Neogenin- Expression auf das rezidivfreie Überleben, vor allem aber ein statistisch signifikanter Einfluss auf das Gesamtüberleben deutlich gemacht werden. Tumore ohne Nachweis von Neogenin wurden verglichen mit Tumoren mit positivem Neogenin- Nachweis (schwache, mittelstarke und starke Neogenin- Expression).

Patienten ohne Neogenin- Nachweis (n=41) hatten ein mittleres Gesamtüberleben von 63.2 Monaten (95%CI 50.9-75.5), während Patienten der Gruppe mit positivem Neogenin- Nachweis (n=41) eine von 74.1 Monaten (95%CI 64.0-84.3; **p=0.049**) aufwiesen (Abb.12).

Der Vergleich der Neogenin- Expression mit Tumorstadium, Differenzierungsgrad, Stadium und Tumorlokalisation ergab keinen statistisch signifikanten Zusammenhang. Dieser ließ sich aber deutlich in den Untergruppen bezüglich des M- Status, der adjuvanten Therapie und des Alters beobachten. So hatten Patienten in der Subgruppe mit M0- Status bei fehlendem Neogenin- Nachweis (n=30) eine mittlere Gesamtüberlebenszeit von 74.8 Monaten (95%CI 60.7-89.0), während Patienten mit M0- Stadium, aber positivem Neogenin- Nachweis (n=34) immerhin eine von 86.7 Monaten (95%CI 79.5- 93.9; **p=0.012**) zeigten (Abb.13).

In der Gruppe der Patienten, die keine adjuvante Therapie erhielten, konnte bei denen ohne Nachweis von Neogenin (n=15) eine mittlere Gesamtüberlebenszeit von 65.9 Monaten (95%CI 48.0-83.9) beobachtet werden, während Patienten mit schwacher, mittelstarker oder starker Neogenin- Expression (n=20) eine deutlich längere Überlebenszeit von 80.1 Monaten (95%CI 74.2-85.9; **p=0.030**) aufwiesen (Abb.14).

Abb.12) Einfluss von Neogenin- Expression auf das Gesamtüberleben; **p=0.049**

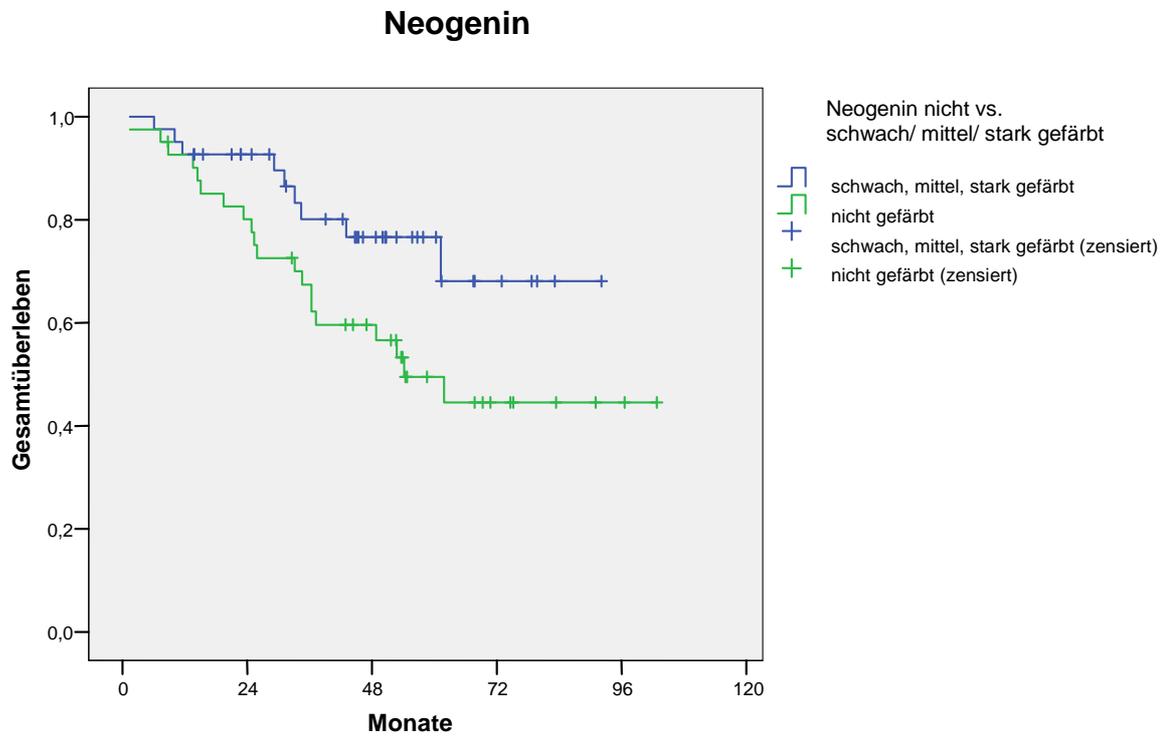


Abb.13) Einfluss von Neogenin- Expression auf das Gesamtüberleben bei M0- Status; **p=0.012**

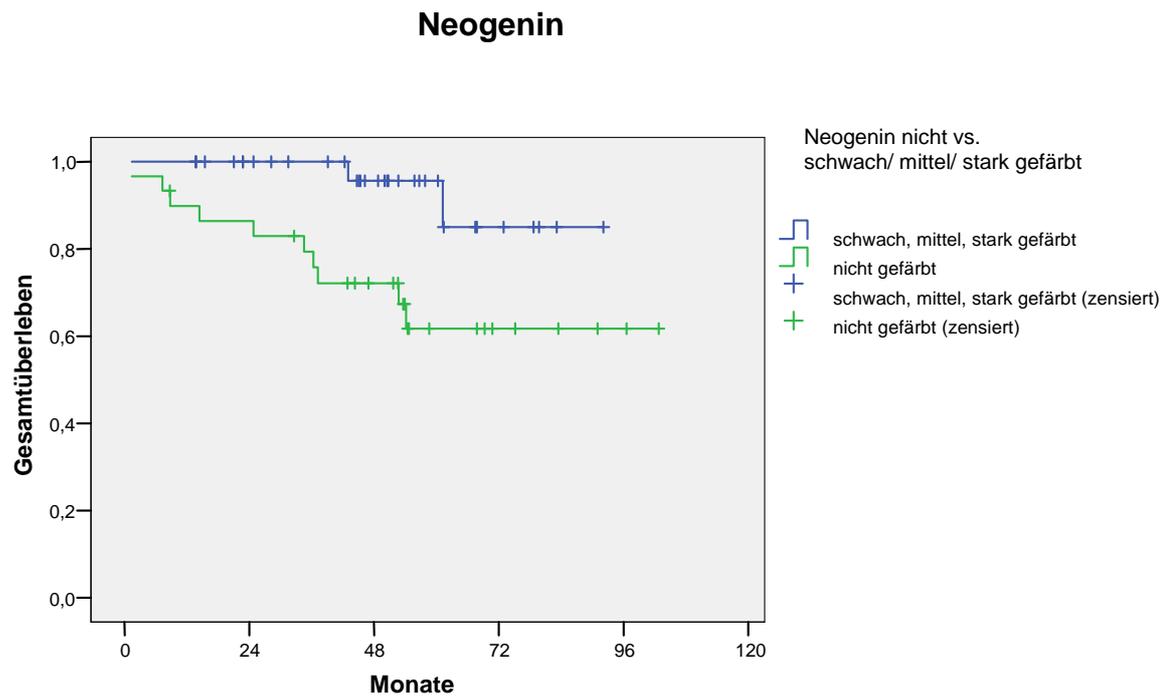
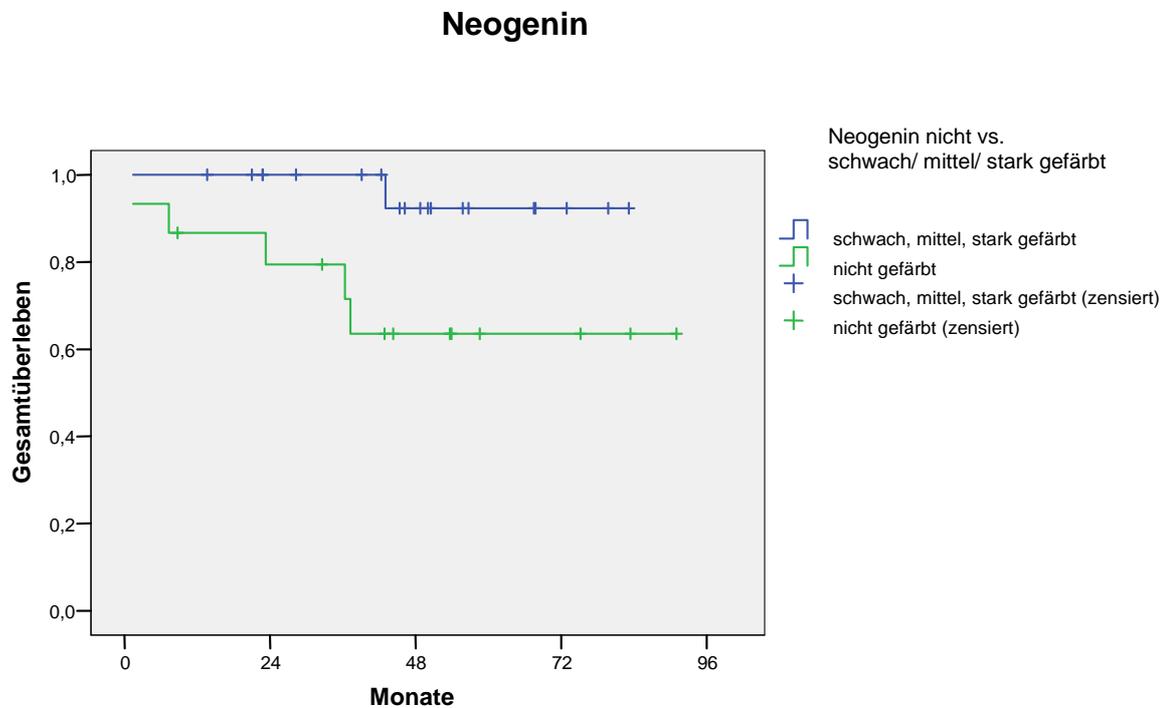


Abb.14) Einfluss von Neogenin auf das Gesamtüberleben bei fehlender adjuvanter Therapie; **p=0.030**



Patienten, die nicht älter als 60 Jahre waren, zeigten bei fehlender Neogenin-Expression (n=12) ein mittleres Gesamtüberleben von 46.5 Monaten (95%CI 28.4-64.5), wobei Patienten derselben Altersgruppe, aber mit positivem Neogenin-Nachweis (n=14) eines von 80.4 Monaten (95%CI 65.5-95.3; **p=0.023**) zeigten.

Auch beim Vergleich des Nodalstatus konnte ein Zusammenhang erkannt werden. Patienten mit N1- oder N2- Status und ohne Neogenin- Expression (n= 24) hatten eine mittlere Gesamtüberlebenszeit von 49.4 Monaten (95%CI 34.5-64.3), während Patienten mit Neogenin- Nachweis (n=12) eine von 59.6 (95%CI 43.9-75.3; p=0.131) aufwiesen.

Für das rezidivfreie Überleben wurde bei Patienten ohne Neogenin- Expression (n=41) eine mittlere rezidivfreie Überlebenszeit von 63.4 Monaten beobachtet (95%CI 49.4-77.4), wobei Patienten mit schwachem, mittelstarkem oder starkem Nachweis (n=41) immerhin eine von 70.2 Monaten (95%CI 59.3-81.1; p=0.262) zeigten.

Bei Patienten, die nicht älter als 60 Jahre waren, konnte ein statistisch signifikanter Einfluss von Neogenin- Expression auf das rezidivfreie Überleben beobachtet werden. Patienten dieser Altersgruppe ohne Nachweis von Neogenin (n=12) hatten eine mittlere rezidivfreie Überlebenszeit von 40.6 Monaten (95%CI 18.3-63.0), während

Patienten mit schwacher, mittelstarker oder starker Expression von Neogenin (n=14) eine von 74.8 Monaten (95%CI 57.7-91.8; **p=0.026**) zeigten.

Auch bezüglich des Nodalstatus konnte ein, wenn auch nicht signifikanter, Zusammenhang beobachtet werden. Patienten mit N1- oder N2- Status und fehlender Neogenin- Expression (n=24) hatten eine mittlere rezidivfreie Überlebenszeit von 48.3 Monaten (95%CI 31.4-66.4), wobei Patienten mit N1- bzw. N2- Status bei positivem Neogenin- Nachweis (n=12) eine von 59.5 Monaten (95%CI 43.7-75.2; p=0.189) zeigten.

Somit kann zusammengefasst werden, dass in unserer Untersuchung eine Neogenin- Expression in kolorektalen Karzinomen mit einem statistisch signifikanten, prognostisch günstigen Einfluss auf das Gesamtüberleben assoziiert ist (**p=0.049**).

Bei Patienten mit M0- Status (**p=0.012**), Patienten, die keine adjuvante Therapie (**p=0.030**) erhielten und jene, die nicht älter als 60 Jahre (**p=0.023**) waren, konnte ebenfalls ein prognostisch günstiger und statistisch signifikanter Einfluss der Neogenin- Expression auf das Gesamtüberleben beobachtet werden.

Bezüglich des rezidivfreien Überlebens konnte zwar ein prognostisch günstiger Einfluss von Neogenin- Expression gezeigt werden (p=0.262), jedoch ergab sich statistische Signifikanz nur bei Patienten, die nicht älter als 60 Jahre waren (**p=0.026**).

Ergebnisse

Tab.8: Nachweis von Netrin- und Neogenin- Expression am Patientenkollektiv und der Einfluss auf das Gesamt- bzw. rezidivfreie Überleben

	Patienten N =82	%	Gesamt- überleben p-Wert	Rezidivfreies Überleben p-Wert
Netrin-1			0.088#	0.040#
Kein Nachweis	52	63.4		
Schwache Expression	5	6.1		
Mittelstarke Expression	21	25.6		
Starke Expression	4	4.9		
Neogenin			0.049+	0.262+
Kein Nachweis	41	50.0		
Schwache Expression	9	11.0		
Mittelstarke Expression	26	31.7		
Starke Expression	6	7.3		

+ keine Expression vs. schwache/ mittelstarke/ starke Expression

keine/ schwache Expression vs. mittelstarke/ starke Expression

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Expression des Glykoproteins Netrin-1 und die seines Rezeptors Neogenin immunhistochemisch an 82 kolorektalen Karzinomen untersucht. Ursprünglich wurden Netrine im Zusammenhang mit neuronalem Wachstum im ZNS entdeckt. Mittlerweile wurde das Interesse an Netrin-1 und seinen Rezeptoren DCC, Neogenin und der UNC5H- Familie zunehmend im Hinblick auf Organogenese und Tumorgenese gerichtet.

Bei den Netrin- Rezeptoren wird angenommen, dass es sich hier um „dependence receptors“ handelt, die je nach Bindungsstatus ihres Liganden unterschiedliche Funktionen aufweisen können. In Anwesenheit ihres Liganden können diese Rezeptoren positive Signale für Zelldifferenzierung, Proliferation und Migration übermitteln, während sie bei Abwesenheit ihres Liganden in der Lage scheinen, vermehrt Zelltod zu induzieren. Demzufolge führt die Expression dieser Rezeptoren bei Zellen zu einer Abhängigkeit des entsprechenden Liganden, um das weitere Zellüberleben zu garantieren (Bernet et al. 2007). Es wird vermutet, dass bei Abwesenheit des Liganden, Apoptose- vermittelt, die Entstehung oder Progression von Tumorwachstum verhindert werden kann. Dementsprechend gelten „dependence receptors“ als mögliche Tumorsuppressor, sogenannte „conditional tumorsuppressors“. Unter den Netrin-1- Rezeptoren ist DCC bis dato am besten erforscht. DCC konnte vor einigen Jahren als ein Netrin- Rezeptor identifiziert werden, nachdem DCC bereits Anfang der 90- er Jahre hauptsächlich in Zusammenhang mit der Entstehung kolorektaler Karzinome assoziiert war. Das DCC- Genprodukt wurde 1989 von Vogelstein und Kollegen als potentieller Tumorsuppressor identifiziert, nachdem bei mehr als 70 % der untersuchten kolorektalen Karzinome der allelische Verlust bzw. Deletionen des DCC- Genprodukts auf Chromosom 18q beobachtet werden konnten (Vogelstein et al. 1989). Im Verlauf gelang auch in anderen Karzinomen der Nachweis verminderter DCC-Expression, u. a. in Karzinomen von Magen, Prostata, Ovar, Endometrium, Ösophagus, Mamma und Neuroblastomen (Mehlen et al. 2004).

Auch bei entarteten Keratinozyten- Zelllinien, die nicht mehr zur endogenen DCC- Expression fähig waren, konnte durch ektope Expression von DCC bei Nacktmäusen ein Tumorprogress unterdrückt werden. In derselben Studie konnte gezeigt werden, dass ein Tumorrückfall mit dem Verlust bzw. einer Änderung der DCC- Expression assoziiert war (Klingelhutz et al. 1993). Ebenso wird bei zahlreichen anderen Studien angenommen, dass bei Wiederherstellung der DCC- Expression (in Nacktmäusen oder in vitro) ein Tumorprogress unterdrückt werden kann (Kato et al. 2000). Es wird vermutet, dass DCC vor allem die Apoptose bei Zellen kolorektaler Karzinome induziert, die außerhalb der Reichweite ihrer Liganden liegen (Mehlen et al. 1998).

Trotz zahlreicher Studien, die DCC als möglichen protektiven Faktor interpretierten, gab es auch Studien, die DCC als Tumorsuppressor in Frage stellten. Fazeli et al. untersuchten homozygote knockout- Mäuse, die trotz fehlendem DCC- Gen kein vermehrtes Risiko der Tumorentstehung zeigten (Fazeli et al. 1997).

Diese unterschiedlichen Beobachtungen stützen die Hypothese, dass es sich bei DCC um einen „dependence receptor“ handelt, der ggf. nicht direkt als Tumorsuppressor fungiert, sondern je nach Bindungsstatus seines Liganden an Apoptose oder aber an vermehrter Zelladhäsion beteiligt sein könnte (Mehlen et al. 1998; Mehlen et al. 2005).

Mittlerweile konnte in zahlreichen Studien belegt werden, dass es sich bei DCC um einen „dependence receptor“ handelt, der Netrin-1 als Liganden bindet (Mehlen et al. 1998). Das intestinale Vorkommen von DCC und Netrin-1 konnte 2001 von Hsu belegt werden (Hsu et al. 2001).

Mazelin und Kollegen zeigten 2004, dass DCC in gesunder Kolonschleimhaut bei Mäusen gleichmäßig in den Villi beobachtet wurde. Im Gegensatz dazu fiel ein Netrin-1- Konzentrationsgefälle auf: Hier konnte eine abnehmende Netrin-1- Konzentration zum Darmlumen hin beobachtet werden, während die höchste Netrin-1- Konzentration in den basalen Krypten nachgewiesen wurde. Man interpretierte den hohen Netrin-1- Anteil in den basalen Krypten als Überlebensfaktor für hochproliferative Basalzellen, die in Richtung Darmlumen zunehmend differenzierten. Bei zunehmender Distanz zu den Netrin-1 reichen Krypten und somit vermehrter Abwesenheit des Liganden, wurden diese Zellen durch DCC- vermittelte Apoptose vom Zellverband gelöst und ins Lumen abgestoßen. Der abnehmende Netrin-1- Gradient führte also DCC- vermittelt zu gesteigerter Apoptose, während eine erhöhte Netrin-1- Konzentration in den basalen Krypten einen anti- apoptotischen, proliferationsfördernden Effekt vermuten ließ (Hsu et al. 2001; Mazelin et al. 2004).

Diese Beobachtungen stützen die Hypothese, dass Netrin-1 und seine Rezeptoren an der Regulation zellulärer Überlebensmechanismen beteiligt zu sein scheinen. Das Fehlen von Netrin-1, die damit verbundene Induktion von Apoptose und das mechanische Loslösen der Zellen im Lumen, scheinen bedeutende protektive Faktoren für die Unterdrückung oder Progression maligner Entartung darzustellen (Mehlen et al. 2005).

Es scheint zwei Mechanismen zu geben, bei denen „dependence receptors“ an der Tumorentstehung oder dem Tumorprogress beteiligt sein können: Entweder durch Inaktivierung bzw. verminderter Expression der Rezeptoren selbst und damit verminderter Apoptosefähigkeit bei reduzierter Ligandenkonzentration, oder aber durch

exzessiv erhöhte Expression des Liganden bzw. Ligandenanwesenheit am falschen Ort (Bernet et al. 2007).

In der Studie von Mazelin und Kollegen konnte Netrin-1 nicht nur als Überlebensfaktor, sondern als ein die Entstehung und den Progress von Tumoren fördernder Faktor interpretiert werden. Mazelin und Kollegen beobachteten bei Überexpression von Netrin-1 eine um 50 % reduzierte Apoptoserate in intestinalen Epithelien von Mäusen (Mazelin 2004). Im Vergleich zu Kontrollmäusen war diese verminderte Apoptoserate assoziiert mit einer vermehrten Entstehung fokaler Hyperplasien und Adenomen und somit assoziiert mit der vermehrten Initiierung der Tumorgenese kolorektaler Karzinome. Interessanterweise wurden in der gleichen Studie Mäuse mit Netrin-1-Überexpression und gleichzeitiger APC- Mutation (adenomatöse Poliposis coli) untersucht.

Bei isolierter APC- Mutation zeigten sich eher geringgradige Adenome, während bei kombinierter APC- Mutation und Netrin-1- Überexpression eine Verlagerung zu hochgradigen Adenomen und Adenokarzinomen beobachtet werden konnte. Diese Ergebnisse ließen die Schlussfolgerung zu, dass die inhibierte Apoptose, durch Überexpression des Liganden Netrin-1, nicht nur eine frühe Tumorprädisposition, sondern auch den späteren Tumorprogress fördert (Mazelin et al. 2004; Bernet 2007).

Neben DCC wird auch bei anderen Netrin-1- Rezeptorfamilien, wie den UNC5H-Rezeptoren, eine Funktion als „dependence receptor“ angenommen. Thiebault und Kollegen fanden bei über 90 % ihrer untersuchten kolorektalen Karzinome eine stark reduzierte Expression von UNC5H1 und UNC5H3 (Thiebault et al. 2003), während UNC5H2 sogar ein direktes Transkriptionsziel des Tumorsuppressorgens p53 zu sein scheint (Tanikawa et al. 2003).

Im Rahmen weiterer Untersuchungen von Netrin-1/ Rezeptor- Interaktionen konnte sowohl Neogenin als einer der Netrin- Rezeptoren, als auch seine strukturelle Verwandtschaft mit DCC identifiziert werden. Neogenin ist, wie auch DCC, an der intakten neuronalen Entwicklung von Vertebraten beteiligt, konnte inzwischen aber auch außerhalb des ZNS, u. a. in Epithelzellen von Lunge und Gastrointestinaltrakt beobachtet werden (Gad et al. 1997). Rajagopalan et al. haben Neogenin als einen Rezeptor von RGMs (repulsive guidance molecules) im ZNS von Hühnern identifizieren können. Wie auch bei DCC wird eine Funktion als „dependence receptor“ angenommen (Rajagopalan et al. 2004). Es wird vermutet, dass Neogenin/ Netrin-1- Interaktionen, ähnlich wie DCC/ Netrin-1- Interaktionen, auch außerhalb des ZNS, Einfluss auf Signaltransduktionswege nehmen, die sowohl Gewebemorphogenese, Angiogenese, Myoblastendifferenzierung als auch axonale Entwicklung betreffen (Park et al. 2004; Wilson et al. 2007). Sowohl die Herunterregelung von RGM als auch die

Neogenin- Überexpression war im Neuralrohr von Hühnerembryonen mit einem massiven Zelltod assoziiert (Matsunaga et al. 2004). Goldschneider et al. konnten 2008 zeigen, dass Neogenin bei Abwesenheit von RGM von Proteasen (sogenannten Caspasen) gespalten wird, die die pro- apoptotische Domäne von Neogenin freilegen. Diese Domäne interagiert wiederum mit anderen pro- apoptotischen Proteinen. Diese Beobachtung stützt die Hypothese, dass in Abwesenheit des Liganden, oder aber bei Überexpression des Rezeptors, eine erhöhte Apoptoserate von „dependence receptors“ initiiert wird (Bernet et al. 2007; Goldschneider et al. 2008).

Srinivasan et al. konnten schließlich 2003 eine Interaktion zwischen Neogenin und Netrin-1 in sich entwickelnden Brustdrüsen bei Mäusen zeigen. Diese wird für die Anziehung zweier Epithelschichten und somit für den intakten Aufbau des Epithels in Drüsenendstücken verantwortlich gemacht. In Abwesenheit von Netrin-1 oder Neogenin beobachteten Srinivasan und Kollegen Einbrüche in die Basallamina und ungeordnete Zellmigration in den Drüsen (Srinivasan et al. 2003). Obwohl hier die Beteiligung von Neogenin an der Organogenese beobachtet werden konnte, fanden nach unserem Wissen bislang keine Untersuchungen im Hinblick auf die Tumorgenese in kolorektalen Karzinomen statt.

In der vorliegenden Arbeit konnte schließlich nicht nur der immunhistochemische Nachweis von Neogenin und Netrin-1 in kolorektalen Karzinomen, sondern auch erstmalig ein prognostischer Einfluss der Proteine gezeigt werden.

Hier konnten Netrin-1 und Neogenin teilweise in mit angeschnittener, angrenzender gesunder Kolonschleimhaut, aber auch in Tumorgewebe nachgewiesen werden.

Netrin-1- Expression konnte bei 36.6 % unseres Patientenkollektivs mit kolorektalem Karzinom beobachtet werden. Bei Patienten, die eine mittelstarke und starke Netrin-1- Expression aufwiesen, konnte ein mittleres rezidivfreies Überleben von 69.3 Monaten gezeigt werden, während bei Patienten ohne oder nur mit äußerst schwachem Netrin-1- Nachweis eine rezidivfreie Überlebenszeit von 63.9 Monaten beobachtet wurde. Dieser statistisch signifikante Zusammenhang zwischen Netrin- Expression und rezidivfreiem Überleben ($p=0.040$) stützt die Vermutung, dass Netrin-1 nicht nur bei der neuronalen Entwicklung einen Einfluss zeigt, sondern auch in kolorektalen Karzinomen an der Regulation von Zellwachstum und Zelltod beteiligt zu sein scheint. In dieser Studie konnte Netrin-1 als prognostisch günstiger Faktor im Hinblick auf Gesamtüberleben, vor allem aber auf das rezidivfreie Überleben interpretiert werden.

Roperch und Kollegen untersuchten Interaktionen zwischen Tumorsuppressoren der p53- Familie (Isoformen von p63 und p73) und Netrin-1 und seinen Rezeptoren im

Hinblick auf das Zellüberleben. Hier beobachteten sie eine vermehrte, DCC unabhängige Apoptose bei Netrin-1 exprimierenden Zelllinien, die sie im Zusammenhang mit einer Überregulierung des p53 Homolog TAp73 α sehen (Roperch et al. 2008).

Meyerhardt und Kollegen untersuchten das Vorkommen von Netrin-1 in Hirntumoren und fanden heraus, dass bei 50 % ihrer Neuroblastome eine deutliche Netrin-1-Reduktion bzw. überhaupt kein Netrin-1- Nachweis gelang. In einem Neuroblastom gelang sogar der Nachweis einer Missense- Mutation in einem Netrin-1- Codon, so dass Meyerhardt und Kollegen davon ausgehen, dass ähnlich wie bei DCC, eine Reduktion oder Deletion von Netrin-1 die Entstehung von Neuroblastomen und anderen Hirntumoren fördern könnte und somit Netrin-1 als protektiver Faktor interpretiert werden müsste (Meyerhardt et al. 1999).

Letzteres wäre mit unseren Ergebnissen in Einklang zu bringen: Ein fehlender oder sehr schwacher Nachweis von Netrin-1 war in unserer Arbeit mit einer kürzeren rezidivfreien Überlebenszeit assoziiert. In anderen Studien, wie der von Mazelin und Kollegen, war eine erhöhte Netrin-1- Expression jedoch mit dem vermehrten Auftreten kolorektaler Neoplasien und dem Tumorprogress assoziiert. Dieses können wir in dieser Arbeit nicht bestätigen, da zum einen lediglich etwa ein Drittel unseres Kollektivs überhaupt einen positiven Netrin-1- Nachweis zeigte, zum anderen ein signifikant höherer Anteil von Patienten mit eindeutigem Netrin-1- Nachweis sich in der Gruppe der gut und mäßig differenzierten Karzinome und in der Gruppe von Patienten, die keine adjuvante Therapie benötigte, befand. Nur etwa 20 % der Patienten, bei denen eine adjuvante Therapie indiziert war, zeigten einen mittelstarken bzw. starken Netrin-1- Nachweis, während bei über 80 % keine oder nur schwache Netrin-1- Expression beobachtet werden konnte ($p=0.015$).

Ein signifikant höherer Anteil der Patienten mit Nachweis von mittelstarker/ starker Netrin-1- Expression (insgesamt $n=25$) hatte einen G1- bzw. G2- Status nach WHO ($n=24$), während nur ein einziger Patient mit mittelstarker/ starker Netrin-1- Expression einen G3- Status aufwies (Tab. 6). Von den insgesamt 16 Patienten mit G3- Status zeigten 94 % ($n=15$) keine oder nur sehr schwache Netrin-1- Expression ($p=0.031$).

Es wäre demnach denkbar, dass eine Netrin-1- Expression in differenzierterem Gewebe noch ausreichend exprimiert wird und mit zunehmender Entdifferenzierung „verloren“ geht.

Es gibt Studien, die bei Verlust des Liganden oder aber bei Überexpression des Rezeptors vermehrt Apoptose beobachteten. Die genauen Interaktionen und der Einfluss der „dependence receptors“ bleiben in unserer Studie weiter unklar.

Ebenfalls nicht eindeutig in unserer Arbeit geklärt bleibt die Frage, warum Patienten mit Tumorlokalisierung im Sigma oder Rektum bei deutlichem Netrin-1- Nachweis eine signifikant längere rezidivfreie Überlebenszeit aufweisen ($p=0.035$). Auch hier könnte eine mögliche Überexpression bzw. eine Interaktion mit einem der bekannten oder noch unbekanntem Netrin-1- Rezeptoren bedeutend sein. Von den Patienten, die eine positive Neogenin- Expression aufwiesen ($n=41$), befand sich bei 73 % ($n=30$) das kolorektale Karzinom im Sigma oder Rektum. Es wäre also denkbar, dass nicht das isolierte Vorkommen von Netrin-1 für den Überlebensvorteil bei Patienten mit Tumorlokalisierung im Sigma bzw. Rektum, sondern dass vielmehr das Zusammenspiel mit Neogenin, möglicherweise sogar eine verhältnismäßige Überexpression von Neogenin hier den entscheidenden Vorteil darstellt.

Eine Neogenin- Expression konnte in unserer Studie bei 50 % der Patienten ($n=41$) mit kolorektalen Karzinomen immunhistochemisch nachgewiesen werden. Im Hinblick auf Überlebensraten konnte ein mittleres Gesamtüberleben von 63.2 Monaten bei Patienten ohne Nachweis von Neogenin festgestellt werden. Patienten mit positivem Neogenin- Nachweis hatten hingegen ein mittleres Gesamtüberleben von 74.1 Monaten. Hier konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Neogenin- Expression und Gesamtüberleben gezeigt werden ($p=0.049$).

Dieses Ergebnis ist eindeutig mit unseren Erwartungen in Einklang zu bringen. Es liegen nach unseren Erkenntnissen bisher keine Studien über den Neogenin- Nachweis in kolorektalen Karzinomen vor, jedoch gibt es zahlreiche Untersuchungen zu dem strukturell verwandten Netrin-1- Rezeptor DCC. Da das DCC- Genprodukt wiederholt als Tumorsuppressor interpretiert wurde, ist der prognostisch günstige Einfluss von Neogenin auf das Gesamtüberleben nicht überraschend.

Um den Einfluss von Neogenin beim kolorektalen Karzinom besser beurteilen zu können, führten wir eine weitere Aufteilung der klinisch- pathologischen Daten durch: In der Gruppe der Patienten, die keine Fernmetastasen aufwiesen (M_0), konnte der prognostisch günstige Einfluss von Neogenin auf das Gesamtüberleben noch deutlicher gemacht werden. Hier wurde die mediane Gesamtüberlebenszeit bei Patienten mit Neogenin- Expression statistisch signifikant um 11.9 Monate, im Gegensatz zu Patienten ohne Neogenin Nachweis, übertroffen ($p=0.012$). Auch bei Patienten, bei denen eine adjuvante Therapie zum Beobachtungszeitpunkt nicht indiziert war, konnte bei positivem Neogenin- Nachweis eine signifikant längere Gesamtüberlebenszeit beobachtet werden ($p=0.030$).

Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass Neogenin, als „dependence receptor“, in nicht weit fortgeschrittenen Malignomen in der Lage ist, über eine gesteigerte Apoptoserate den Tumorprogress zu inhibieren und damit einen prognostisch

günstigen Einfluss auszuüben. Hierfür könnte auch die Verteilung von Neogenin in unserem Kollektiv sprechen: Von den 41 Patienten mit positivem Neogenin- Nachweis waren 71 % (n=29) nodalnegativ (p=0.014). Ebenso zeigte sich bei Patienten mit positiver Neogenin- Expression (n=41), dass sich fast 2/3 von ihnen (n=26) bei der Diagnosestellung im UICC- Stadium I oder II befanden (p=0.027).

Bei jüngeren Patienten, also unterhalb oder einschließlich des 60. Lebensjahres, konnte bei positivem Neogenin- Nachweis ein signifikant längeres, mittleres Gesamtüberleben (p=0.023), ebenso ein signifikant längeres, mittleres rezidivfreies Überleben (p=0.026) beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass das Ansprechen des Organismus auf einen möglichen Tumorsuppressor in fortschreitendem Alter abnimmt. Ebenso sind Interaktionen mit dem Liganden Netrin-1 oder aber anderen Liganden und Rezeptoren mögliche Erklärungen für den prognostisch günstigen Einfluss in dieser Altersgruppe. So konnte z. B. bei Patienten in dieser Altersgruppe (n=26) keine oder nur eine schwache Netrin-1- Expression in 73 % der Fälle (n=19) beobachtet werden. Eine relative Überexpression des „dependence receptor“ Neogenin könnte bei diesen Patienten möglicherweise zu vermehrter Apoptose, zu Inhibition von Tumorprogress und darüber letztlich zu einem prognostisch günstigen Einfluss auf das Überleben geführt haben.

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit mit DCC sind unsere Ergebnisse in Einklang zu bringen mit zahlreichen Studien, die bei DCC einen prognostisch günstigen Effekt in kolorektalen Karzinomen nachweisen konnten (Shibata et al. 1996; Aschele et al. 2004). Latil und Kollegen beobachteten im Vergleich zu gesundem Prostatagewebe beim humanen Prostatakarzinom eine signifikante Reduktion von DCC, Neogenin und Netrin-1 (Latil et al. 2003). Demnach kann man schlussfolgern, dass das Vorhandensein von DCC, Neogenin und Netrin-1 auch bei anderen Geweben mit einem günstigen, protektiven Einfluss assoziiert sein müsste.

Wie auch DCC, könnte Neogenin einem potentiellen Tumorsuppressor entsprechen, bei dem der genaue Wirkmechanismus unbekannt bleibt. Srinivasan et al. zeigten in vivo, dass Neogenin/ Netrin-1-Interaktionen einen günstigen, essentiellen Einfluss auf geordnetes Wachstum und epitheliale Adhäsivprozesse in sich entwickelndem Brustdrüsengewebe haben.

Die in unserer Studie nachgewiesenen prognostisch günstigen Einflüsse der untersuchten Proteine könnten durch deren Mitwirkung an regelrechter Organogenese und Tumorsuppression bedingt sein.

Eine mögliche Schwäche unserer Studie ist, dass die genauen Wirkmechanismen und Interaktionen von Neogenin und Netrin-1 in dieser Arbeit weiterhin unklar bleiben. Wir konnten zwar zeigen, dass eine mittelstarke und starke Netrin-1- Expression mit einer signifikant längeren mittleren rezidivfreien Überlebenszeit bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen assoziiert ist, inwiefern dieser Einfluss jedoch in Zusammenhang mit den Netrin- Rezeptoren und besonders mit Neogenin steht, kann nur vermutet werden.

Bei Neogenin handelt es sich um einen „dependence receptor“, der als „konditionaler Tumorsuppressor“ fungieren könnte und somit eine protektive Funktion besitzen könnte. Diese sogenannten „konditionalen Tumorsuppressor“ können jedoch, je nach Anwesenheit und Konzentration ihres Liganden, auch gegenteilige Effekte ausüben.

In dieser Arbeit wurde außerdem kein gesundes kolorektales Gewebe gezielt untersucht, sondern primär der Nachweis von Neogenin und Netrin-1 in entartetem kolorektalen Gewebe retrospektiv erforscht. Interessant wären ergänzende Untersuchungen an gesundem kolorektalen Gewebe, besonders multizentrische und prospektive Studien.

Ein weiterer Nachteil unserer Studie könnte der isolierte immunhistochemische Nachweis sein. Die Wechselbeziehungen von Rezeptoren und deren Liganden werden häufig in Abhängigkeit von Konzentrationen beschrieben, so dass für eine Quantifizierung der Proteine der alleinige immunhistochemische Nachweis wahrscheinlich nicht ausreicht. Gentechnische Untersuchungen bzw. DNA- und RNA-Analysen sollten unsere immunhistochemischen Untersuchungen ergänzen.

Da lediglich im Hinblick auf das rezidivfreie Überleben ein signifikanter Einfluss von Netrin-1 in kolorektalen Karzinomen beobachtet werden konnte, fast 70 % der Patienten in unserer Studie aber keine oder nur schwache Expression aufwiesen, sind auch Schwierigkeiten bezüglich der immunhistochemischen Auswertung als potentielle Fehlerquellen denkbar. Diese gestaltet sich bei Gefrierschnitten schwieriger als bei den gängigeren Paraffinschnitten. Im Hinblick auf spätere Routine- Untersuchungen, z. B. im Rahmen von Schnellschnittuntersuchungen, stellt die Analyse an Gefrierschnitten jedoch für uns den praxisbezogeneren Ansatz dar.

Eine weitere Erklärung für unzureichende Ergebnisse bezüglich der Wechselwirkungen von Netrin-1 und seinem Rezeptor stellt die geringe Fallzahl unseres Patientenkollektivs dar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in unserer Arbeit zum einen erstmalig der immunhistochemische Nachweis von Netrin-1 und seinem Rezeptor Neogenin in Gefrierpräparaten kolorektaler Karzinome erbracht werden konnte, und zum anderen der prognostische Zusammenhang hier untersucht wurde.

Wir konnten nachweisen, dass die Expression von Neogenin einen prognostisch günstigen, signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben und die Expression von Netrin-1 einen prognostisch günstigen, signifikanten Einfluss auf das rezidivfreie Überleben der untersuchten Patienten mit kolorektalen Karzinomen hat.

Für das genaue Verständnis der zugrunde liegenden Interaktionen zwischen Netrin-1 und Neogenin sind mit Sicherheit in Zukunft prospektive und multizentrische Studien sinnvoll.

5. Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom stellt sowohl bei Frauen als auch bei Männern das zweithäufigste Karzinom dar. Trotz unterschiedlicher Theorien der Pathomechanismen der Tumorgenese bleiben prognostische Faktoren, zuverlässige Biomarker und die genauen Mechanismen der Entstehung des sporadischen Karzinoms weiterhin unbekannt.

In dieser Arbeit wurden zunächst kolorektale Karzinome von 82 Patienten hinsichtlich ihrer Expression des Glykoproteins Netrin-1 und seines Rezeptors Neogenin untersucht. Im Anschluss wurde retrospektiv der prognostische Einfluss dieser Proteine im Hinblick auf das rezidivfreie Überleben und das Gesamtüberleben untersucht.

Netrin-1 und seine Rezeptoren wurden ursprünglich besonders in Zusammenhang mit regelrechter neuronaler Entwicklung gebracht, werden mittlerweile aber zunehmend im Hinblick auf geordnetes Wachstum bzw. maligne Entartung in unterschiedlichen Geweben untersucht.

In unserer Arbeit gelang bei Netrin-1 zum einen der immunhistochemische Nachweis des Glykoproteins, zum anderen konnte retrospektiv ein günstiger, statistisch signifikanter Einfluss von Netrin-1- Expression auf das rezidivfreie Überleben gezeigt werden: Patienten ohne oder mit nur schwachem Nachweis von Netrin-1 hatten ein mittleres rezidivfreies Überleben von 64 Monaten, während Patienten mit eindeutigem Nachweis des Glykoproteins ein rezidivfreies Überleben von 69 Monaten zeigten ($p=0.040$).

In unserer Arbeit gelang außerdem erstmalig der immunhistochemische Nachweis des Netrin-1- Rezeptors Neogenin bei der Hälfte unseres Patientenkollektivs mit kolorektalen Karzinomen. Retrospektiv konnte bei Patienten mit positivem Neogenin-Nachweis ein statistisch signifikanter Zusammenhang bezüglich des Gesamtüberlebens beobachtet werden: Hier hatten Patienten mit Neogenin-Expression ein mittleres Gesamtüberleben von 74 Monaten, Patienten ohne Neogenin-Expression eines von 63 Monaten ($p=0.049$).

In der weiteren Unterteilung unseres Patientenkollektivs konnte ein prognostisch günstiger, signifikanter Einfluss von Neogenin- Expression auf das Gesamtüberleben, besonders bei Patienten ohne Metastasen (M0- Status) und denen, die keine adjuvante Therapie erhielten, beobachtet werden.

Einen protektiven Faktor oder eine Funktion als potentieller Tumorsuppressor in wenig fortgeschrittenen, kolorektalen Karzinomen ist nach unserer Studie somit bei Netrin-1 und seinem Rezeptor Neogenin denkbar.

Netrin-1 und sein Rezeptor Neogenin könnten neue prognostische Marker darstellen. Weitere ergänzende Untersuchungen für das genaue Verständnis der Netrin-/

Zusammenfassung

Rezeptor- Interaktionen in kolorektalen Karzinomen, aber auch in anderen Malignomen sind sicherlich notwendig, von großem Interesse und könnten in der Zukunft ggf. neue Therapieansätze bieten.

6. Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin Biotin Complex
APC	Adenomatous Polyposis Coli
APAAP	Alkalische Phosphatase Anti- Alkalische Phosphatase
bzw.	beziehungsweise
CA 19-9	Carbohydrat- Antigen 19-9
CAM	Cellular Adhesion Molecules
CEA	Carcino- Embryonales Antigen
CT	Computertomographie
DAB	Diaminobenzidin
DCC	Deleted in Colorectal Cancer
d.h.	das heißt
DNA/ DNS	Desoxyribonukleinsäure
ERCRC	Erlanger Register Colorectaler Carcinome
FA	Folinsäure
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis coli
FOLFOX	Kombination aus 5-FU, Folinsäure und Oxaliplatin
FU	Fluoruracil
G	Grading
ggf.	gegebenenfalls
Gy	Gray
H.E.	Hämatoxylin- Eosin
HNPCC	Hereditary Non- Polyposis Colorectal Cancer
k-ras	Kirsten- rat sarcoma (Proto- Onkogen der ras-Familie)
Min.	Minuten
MMR	Mismatch- Reparatur
msh2	MutS Homolog 2 (Mismatch- Reparatur- Gen)
mlh1	MutL Homolog 1 (Mismatch- Reparatur- Gen)
mlh2	MutL Homolog 2 (Mismatch- Reparatur- Gen)
MRT	Magnetresonanztomographie
n.a.	not applicable
NTN1L	Netrin-1 like Gen
NTN2L	Netrin-2 like Gen
o.g.	oben genannt
PAP	Peroxidase Anti Peroxidase
p53	Tumorsuppressor Gen, sog. "Wächter des Genoms"
RGM	Repulsive Guidance Molecules

Abkürzungsverzeichnis

RNA	Ribonukleinsäure
smad4	Homolog von Drosophila MAD (mothers against dpp)- Protein
SGCRC	Study Group Colo- Rectal Carcinoma
TNM	Klassifikation, die sich nach Tumor-, Nodal- und Metastasenstatus orientiert
Tap73 a	Homolog vom Tumorsuppressorgen p53
TEM	Transanal endoskopische Mikrochirurgie
TRIS	Tris (hydroxymethyl)- aminomethan (Puffersubstanz)
u.a.	unter anderem
UICC	Union internationale contre le cancer
UNC	Uncoordinated Gene
UNC5H	Uncoordinated Gene-5 human
WHO	World Health Organization
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

7. Quellenverzeichnis

- Aschele C, Debernardis D, Lonardi S, Bandelloni R, Casazza S, Monfardini S, Gallo L (2004) Deleted in colon cancer protein expression in colorectal cancer metastases: a major predictor of survival in patients with unresectable metastatic disease receiving palliative fluorouracil-based chemotherapy. *J Clin Oncol* 22, 18: 3758-65.
- Bernet A, Mehlen P (2007) Dependence receptors: when apoptosis controls tumor progression. *Bull Cancer* 94, 4: 12-7.
- Bernstein IT, Bülow S (2005) Hereditary colorectal cancer. *Ugeskr Laeger* 167, 44: 4159-63.
- Bredesen DE, Mehlen P, Rabizadeh S (2004) Apoptosis and dependence receptors: a molecular basis for cellular addiction. *Physiol Rev.* 84, 2: 411-30.
- Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, Kane M, Earabino C, Lipford J, Lindblom A, et al. (1994) Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 368, 3468: 258-61.
- Bülow S (1987) Familial polyposis coli. *Dan Med Bull* 34, 1: 1-15.
- Cho KR, Fearon ER (1995) DCC linking tumour suppressor genes and altered cell surface interactions in cancer? *Eur J Cancer* 31A, 7-8: 1055-60.
- Dörfer J, Hohenberger W, Schmiegel W, Schulmann K, Andre N (2008) Kolorektales Karzinom. In: Riemann J, Fischbach W, Galle P, Mössner J (Hrsg). *Gastroenterologie-Band 1*, Thieme, Stuttgart, S 846-83.
- Dürig M (2003) Kolon und Rektum. In: Henne-Bruns D, Dürig M, Kremer B (Hrsg). *Chirurgie*, Thieme, Stuttgart, 2. Aufl., S 391-431.
- Engelkamp D (2002) Cloning of three mouse Unc5 genes and their expression patterns at mid- gestation. *Mech Dev* 118, 1-2: 191-7.
- Fazeli A, Dickinson SL, Hermiston ML, Tighe RV, Steen RG, Small CG, Stoeckli ET, Keino- Masu K, Masu M, Rayburn H, Simmons J, Bronson RT, Gordon JI, Tessier-Lavigne M and Weinberg RA (1997) Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. *Nature* 386, 6627: 796-804.
- Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Thomas G, Kinzler KW et al. (1990) Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 247, 4938: 49-56.

- Fearon ER, Vogelstein B (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 5: 759-67.
- Fishel R, Lescoe MK, Rao MRS et al. (1993) The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 75, 5: 1027-38.
- Gad JM, Keeling SL, Wilks AF, Tan SS, Cooper HM (1997) The expression patterns of guidance receptors, DCC and Neogenin, are spatially and temporally distinct throughout mouse embryogenesis. *Dev Biol* 192, 2: 258-73.
- Goldschneider D, Rama N, Guix C, Mehlen P (2008) The neogenin intracellular domain regulates gene transcription via nuclear translocation. *Mol Cell Biol* 28, 12: 4068-79.
- Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, Joslyn G, Stevens J, Spirio L, Robertson M, et al. (1991) Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 66, 3: 589-600.
- Hall NR, Bishop DT, Stevenson BM, Finan PJ (1996) Hereditary susceptibility to colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 39, 7: 739-43.
- Herfarth Ch, Heuschen G, Heuschen UA (1998) Die maligne Entartung im Verlauf der Colitis ulcerosa und ihre chirurgischen Implikationen. *Chirurg* 69, 10: 1020-7.
- Herfarth Ch, Runkel N (1994) Chirurgische Standards beim primären Colonicarcinom. *Chirurg* 65: 514-23.
- Hermanek P (1992) Dysplasie- Karzinom- Sequenz im Kolorektum. *Zent bl Chir* 117:476-82.
- Hermanek P, Wiebelt H, Staimmer D, Riedl S and the German Study Group Colorectal Carcinoma (1995) Prognostic factors of rectum carcinoma- experience of the German multicentre study SGCRC. *Tumori* 81 (Suppl): 60-4.
- Hermanek P Jr, Wiebelt H, Riedl S, Staimmer D, Hermanek P und die Studiengruppe Kolorektales Karzinom (1994) Langzeitergebnisse der chirurgischen Therapie des Colonicarcinoms. *Chirurg* 65: 287-97.
- Hohenberger W, Hermanek P, König HJ (1996) Kolon-, Rektum- und Analkanaltumoren. In: Hahn EG, Riemann JF (Hrsg). *Klinische Gastroenterologie*, Thieme, Stuttgart New York, S 991-1024.

- Hong K, Hinck L, Nishiyama M, Poo MM, Tessier- Lavigne M and Stein E (1999) A ligand- gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin- induced growth cone attraction to repulsion. *Cell* 97, 7: 927-41.
- Hsu YH, Shaw CK, Chuong CM (2001) Immunohistochemical localization of deleted-in-colon-cancer (DCC) protein in human epithelial, neural, and neuro-endocrine tissues in paraffin sections with antigen retrieval. *Kaohsiung J Med Sci* 17, 7: 351-7.
- Ikeda M, Orimo H, Moriyama H, Nakajima E, Matsubara N, Mibu R, Tanaka N, Shimada T, Kimura A, Shimizu K (1998) Close correlation between mutations of E2F4 and hMSH3 genes in colorectal cancers with microsatellite instability. *Cancer Res* 58, 4: 594-8.
- Jen J, Kim H, Piantadosi S, Liu ZF, Levitt RC, Sistonen P, Kinzler KW, Vogelstein B, Hamilton SR (1994) Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med* 331, 4: 213-21.
- Jochum W (2008) Kolon, Rektum und Analkanal. In: Böcker W, Denk H, Heitz Ph U, Moch H (Hrsg). *Pathologie*, Urban & Fischer, München Jena, 4. Aufl., S 761-73.
- Katalinic A, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland (2004) Das kolorektale Karzinom aus epidemiologischer Sicht. Symposium „Früherkennung kolorektaler Karzinome“, Universität Lübeck.
- Kato H, Zhou Y, Asanoma K, Kondo H, Yoshikawa Y, Watanabe K, Matsuda T, Wake N, Barrett JC (2000) Suppressed tumorigenicity of human endometrial cancer cells by the restored expression of the DCC gene. *Br J Cancer* 82, 2: 459-66.
- Keeling SL, Gad JM, Cooper HM (1997) Mouse Neogenin, a DCC- like molecule, has four splice variants and is expressed widely in the adult mouse and during embryogenesis. *Oncogene* 15, 6: 691-700.
- Keino-Masu K, Masu M, Hinck L, Leonardo ED, Chan SS, Culotti JG, Tessier-Lavigne M (1996) Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell* 87, 2: 175-85.
- Kennedy TE, Serafini T, de la Torre JR, Tessier-Lavigne M (1994) Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* 78, 3: 425-35.

- Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, Smith KJ, Preisinger AC, Hedge P, McKechnie D, et al. (1991) Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* 253, 5020: 661-5.
- Klingelhutz AJ, Smith PP, Garrett LR, McDougall JK (1993) Alteration of the DCC tumor-suppressor gene in tumorigenic HPV-18 immortalized human keratinocytes transformed by nitrosomethylurea. *Oncogene* 8, 1: 95-9.
- Latil A, Chene L, Cochant- Priollet B, Mangin P, Fournier G, Berthon P, Cussenot O (2003) Quantification of expression of netrins, slits and their receptors in human prostate tumors. *Int J Cancer* 103, 3: 306-15.
- Lehnert T, Herfarth Ch (1996) Grundlagen und Wert der Lymphadenektomie beim kolorektalen Karzinom. *Chirurg* 67: 889-99.
- Leonardo ED, Hinck L, Masu M, Keino- Masu K, Ackerman SL & Tessier- Lavigne M (1997) Vertebrate homologues of *C. elegans* UNC-5 are candidate netrin receptors. *Nature* 386, 6627: 833-8.
- Lepenies J, Bühling K, Witt K (2004) Tumorartige Läsionen des Dickdarms und kolorektales Karzinom. In: Lepenies J, Bühling K, Witt K (Hrsg). *Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pathologie*, Urban& Fischer, München, 3.Aufl., S 229-31.
- Llambi F, Causeret F, Bloch-Gallego E, Mehlen P (2001) Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC. *Embo J* 20, 11: 2715-22.
- Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, Lanspa SJ, Lynch JF, Lynch PM, Cavalieri RJ, Boland CR (1993) Genetics, natural history, tumor spectrum and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology* 104, 5: 1535-49.
- Matsunaga E, Tauszig- Delamasure S, Monnier PP, Mueller BK, Strittmatter SM, Mehlen P, Chedotal A (2004) RGM and its receptor neogenin regulate neuronal survival. *Nat Cell Biol* 6, 8: 749-55.
- Mazelin L, Bernet A, Bonod- Bidaud C, Pays L, Arnaud S, Gespach C, Bredesen DE, Scoazec JY, Mehlen P (2004) Netrin-1 controls colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis. *Nature* 431, 7004: 80-4.
- Mehlen P, Fearon ER (2004) Role of the dependence receptor DCC in colorectal cancer pathogenesis. *J Clin Oncol* 22, 16: 3420-8.
- Mehlen P, Goldschneider D (2005) Dependence receptors DCC and UNC5H: the role of apoptosis in the control of tumorigenesis. *J Soc Biol* 199, 3: 211-8.

- Mehlen P, Llambi F (2005) Role of netrin-1 and netrin-1 dependence receptors in colorectal cancers. *Br J Cancer* 93, 1: 1-6.
- Mehlen P, Rabizadeh S, Snipas SJ, Assa- Munt N, Salvesen GS, Bredesen DE (1998) The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature* 395, 6704: 801-4.
- Meyerhardt JA, Caca K, Eckstrand BC, Hu G, Lengauer C, Banavali S, Look AT, Fearon ER (1999) Netrin-1: interaction with deleted in colorectal cancer (DCC) and alterations in brain tumors and neuroblastomas. *Cell Growth Differ.* 10, 1: 35-42.
- Meyerhardt JA, Look AT, Bigner SH, Fearon ER (1997) Identification and characterization of neogenin, a DCC- related gene. *Oncogene* 14, 10: 1129-36.
- Moeschberger ML, Klein JP (1995) Statistical methods for dependent competing risks. *Lifetime Data Ana* 11, 2: 195-204.
- Noll S, Schaub- Kuhnen S (2000) *Praxis der Immunhistochemie*. Urban & Fischer, München Jena.
- Papadopoulos V, Michalopoulos A, Basdanis G, Papapolychroniadis K, Paramythiotis D, fotiadis P, Berovalis P, Harlaftis N (2004) Synchronous and metachronous colorectal carcinoma. *Tech Coloproctol* 8, 1: 97-100.
- Park KW, Crouse D, Lee M, Karnik SK, Sorensen LK, Murphy KJ, Kuo CJ and Li DY (2004) The axonal attractant Netrin-1 is an angiogenic factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 46: 16210-5.
- Quasar Collaborative Group, Gray R, Barnwell J, McConkey C, Hills RK, Williams NS, Kerr DJ (2007) Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study. *Lancet* 370, 9604: 2020-9.
- Ragnhammar P, Hafström L, Nygren P, Glimelius B, SBU- group. Swedish Council of Technology Assessment in Health Care (2001) A systematic overview of chemotherapy effects in colorectal cancer. *Acta Oncol* 40, 2-3: 282-308.
- Rajagopalan S, Deitinghoff L, Davis D, Conrad S, Skutella T, Chedotal A, Mueller BK, Strittmatter SM (2004) Neogenin mediates the action of repulsive guidance molecule. *Nat Cell Biol.* 6, 8: 756-62.
- Robert Koch- Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2008): *Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends*, 6. überarbeitete Aufl., Berlin.

- Roperch JP, El Quadrani K, Hendrix A, Emami S, De Wever O, Melino G, Gespach C (2008) Netrin-1 induces apoptosis in human cervical tumor cells via the TAp73 α tumor suppressor. *Cancer Res* 68, 20: 8231-9.
- Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rödel C, Wittekind C, Fietkau R, Martus P, Tschmelitsch J, Hager E, Hess CF, Karstens JH, Liersch T, Schmidberger H, Raab R, German Rectal Study Group (2004) Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med* 351, 17: 1731-40.
- Seaman C, Cooper HM (2001) Netrin-3 protein is localized to the axons of motor, sensory, and sympathetic neurons. *Mech Dev* 101, 1-2: 245-8.
- Serafini T, Colamarino SA, Leonardo ED, Wang H, Beddington R, Skarnes WC, Tessier-Lavigne M (1996) Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell* 87, 6: 1001-14.
- Serafini T, Kennedy TE, Galko MJ, Mirzayan C, Jessell TM, Tessier-Lavigne M (1994) The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* 78, 3: 409-24.
- Shibata D, Reale MA, Lavin P, Silverman M, Fearon ER, Steele G Jr, Jessup JM, Loda M, Summerhayes IC (1996) The DCC protein and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med* 335, 23: 1727-32.
- Srinivasan K, Strickland P, Valdes A, Shin GC, Hinck L (2003) Netrin-1/ neogenin inter-action stabilizes multipotent progenitor cap cells during mammary gland morphogenesis. *Dev Cell* 4, 3: 371-82.
- Tanikawa C, Matsuda K, Fukuda S, Nakamura Y, Arakawa H (2003) p53RDL1 regulates p53-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol* 5, 3: 216-23.
- Tessier-Lavigne M, Goodman CS (1996) The molecular biology of axon guidance. *Science* 274, 5290: 1123-33.
- Thiebault K, Mazelin L, Pays L, Llambi F, Joly MO, Scoazec JY, Saurin JC, Romeo G, Mehlen P (2003) The netrin-1 receptors UNC5H are putative tumor suppressors controlling cell death commitment. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 7: 4173-8.
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL (1988) Genetic alterations during colorectal tumor development. *N Engl J Med* 319, 9: 525-32.
- Vogelstein B, Fearon ER, Kern SE, Hamilton SR, Preisinger AC, Nakamura Y, White R (1989) Allelotype of colorectal carcinomas. *Science* 244, 4901: 207-11.

- Wang H, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Tessier- Lavigne M (1999) Netrin-3, a mouse homolog of human NTN2L, is highly expressed in sensory ganglia and shows differential binding to netrin receptors. *J Neurosci.* 19, 12: 4938-47.
- Weitz J, Koch M, Debus J, Hohler T, Galle PR, Buchler MW (2005) Colorectal cancer. *Lancet* 365, 9454: 153-65.
- Weitz J, Schalhorn A, Kadmon M, Eble MJ, Herfarth C (2004) Kolon- und Rektumkarzinom. In: *Die Onkologie.* Springer, Berlin/ Heidelberg/ New York, 875-932.
- Willett W (1989) The search for the causes of breast and colon cancer. *Nature* 338, 6214: 389-94.
- Wilson NH, Key B (2007): Neogenin: One receptor, many functions. *Int J biochem Cell Biol* 39: 874-8.
- Wittekind CH, Meyer HJ, Bootz F (2002) UICC, TNM- Klassifikation maligner Tumoren. Springer, Berlin Heidelberg New York, 6. Aufl..

8. Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Emre Yekebas bedanken, durch den meine Promotion in der Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf (UKE) möglich geworden ist. Ich möchte Ihnen für die Überlassung dieses interessanten Themas, die freundliche Zusammenarbeit und die hilfreiche Unterstützung während meiner Promotion danken.

Auch Herrn Prof. Dr. med. Jakob R. Izbicki, dem ärztlichen Direktor der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie, möchte ich für die Unterstützung während meiner Promotion und für die Bereitstellung der technischen Geräte, Räume und des Labors danken.

Ein besonderer Dank geht an meine Betreuer Herrn Dr. med. Björn Christian Link und Frau Dr. med. Uta Reichelt, die sich sehr viel Zeit für mich genommen haben, mich stets ermutigten und als Ansprechpartner immer zu meiner Verfügung standen.

Frau Dr. med. Reichelt und Frau Dr. med. Susanne Petri möchte ich außerdem für die histologische und immunhistochemische Auswertung meiner Tumorpräparate danken.

Herrn Dr. med. Link danke ich besonders für den motivierenden Zuspruch und für die freundliche und hilfsbereite Beratung bei der statistischen Auswertung der Daten. Hier gilt auch Herrn Eik Vetorrazi vom Institut für Biometrie am UKE- Hamburg ein ganz besonderer Dank.

Natürlich möchte ich auch allen Patienten danken, ohne deren Einverständnis zu Forschungszwecken die Auswertung und Durchführung meiner Arbeit gar nicht möglich gewesen wäre.

Ich danke den Mitarbeitern des allgemeinchirurgischen und hepatobiliären Labors im UKE, die mir vor allem bei der Ausführung der Immunhistochemie und bei technischen Problemen immer zur Seite standen.

Meinen Eltern, meinem Bruder und meinen Freunden danke ich für die motivierenden, beruhigenden Zusprüche, die für die Fertigstellung meiner Arbeit unbedingt nötig waren.

Meinem Freund gilt ein ganz besonderer Dank, da er mich mit seiner positiven Art, teils mit dem nötigen Nachdruck, immer sehr unterstützt hat.

9. Lebenslauf

10. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich diese Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

.....