Aus dem Institut für Pathologie
(Direktor: Prof. Dr. med. Roland Moll)
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit
der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie
(Direktor Prof. Dr. med. J. Fass)
und dem Institut für Pathologie
(Direktor Prof. Dr. med. J. Rüschoff)
des Klinikums Kassel

Gewebeexpression von Pyrrolin-5-Carboxylat-Reductase: Ein durch Proteomics detektierter potentieller Tumormarker für das kolorektale Karzinom

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Kia Homayounfar

aus Göttingen

Marburg, 2006

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

am 19.01.2006

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. Bernhard Maisch

Referent: Prof. Dr. med. Josef Rüschoff

Korreferent: PD Dr. med. Berthold Gerdes

Meiner Tochter Minou

Abkürzungsverzeichnis

AFP	Alpha-Fetoprotein
ATP	Adenosintriphosphat
CEA	Carcino-embryonales Antigen
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSP	Disease specific protein
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
HNPCC	Hereditäres nicht-polypöses colorektales Carcinom
IHC	Immunhistochemie
KRK	Kolorektales Karzinom
MIC-1	Makrophagen-inhibierendes Zytokin 1
NADP	Nicotinamid-Adenin Dinucleotid-Phosphat
NMP22	Nukleäres Matrix Protein 22
NSE	Neuron-spezifische Enolase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
P5CR	Pyrroline-5-Carboxylat-Reductase
RNA	Ribonukleinsäure
SAGE	serial analysis of gene expression
SCLC	small cell lung cancer
TMA	Tissue-Mullti-Array

Inhaltsverzeichnis

Seite

1. Einleitung 7
1.1. Thema 7
1.2. Epidemiologie 7
1.3. Ausbreitung und Therapieprinzipien 8
1.4. Molekulargenetik 9
1.5. Diagnostik 12
1.5.1. Klinische Untersuchung und Endoskopie 12
1.5.2. Tumormarker 14
1.6. Prognosefaktoren 15
1.7. Tumorbank Klinikum Kassel 18
1.8. Proteomics 19
1.9. Pyrrolin-5-Carboxylat-Reductase (P5CR) 21
1.10. Fragestellung 24

2. Material und Methoden 25
2.1. Proteomanalysen 25
2.1.1. Tumorgewebebank und –asservierung 25
2.1.2. Durchführung der Proteomanalysen 25
2.2. Gewebeproben für die immunhistochemischen PROC-Analysen 26
2.3. Immunhistochemie 27
2.3.1. Reagenzien 27
2.3.2. Lösungen 28
2.3.3. Vorbereitung 28
2.3.4. Färbevorgang 29
2.3.5. Mikroskopische Untersuchung und Bewertung 30

3. Ergebnisse 32
3.1. Ergebnisse der Proteomanalysen 32
3.2. Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen 33
3.2.1. Kolon 33

3.2.1.1. Kolonkarzinom 33
3.2.1.2. Kolonadenom 37
3.2.2. Tissue-Multi-Array (TMA) 41
3.2.2.1. Urothel 42
3.2.2.2. Kolon 43
3.2.2.3. Lunge 43
3.2.2.4. Prostata 45
3.2.2.5. Pankreas 46
3.2.2.6. Mamma 47
3.2.2.7. Melanom 47
3.2.3.. Anfärbung spezieller Tumorentitäten 48
3.2.3.1. Pankreas 48
3.2.3.2. Sarkome 49
3.2.3.3. Neuroendokrine Tumore 50

4. Diskussion 52
4.1. Proteindetektion und Antikörpergeneration 52
4.2. Validität der Ergebnisse 52
4.3. Nachweis von P5CR mittels des Antikörpers im Tumorgewebe 53
4.4. Spezifität der Antikörperreaktion für das kolorektale Karzinom 54
4.5. Eignung von P5CR als Proliferationsmarker. 55
4.6. Eignung von P5CR als Screening-Parameter 55
4.7. Weiterführende Untersuchungen 56
4.7.1. Bedeutung von Serummarkerkonzentrationen 56
4.7.2. Pharmakologische Hemmung von P5CR 58

5. Zusammenfassung 60

6. Literaturverzeichnis 62

7. Anhang 71
Lebenslauf 71

Verzeichnis der akademischen Lehrer 73
Danksagung 74
Ehrenwörtliche Erklärung 75

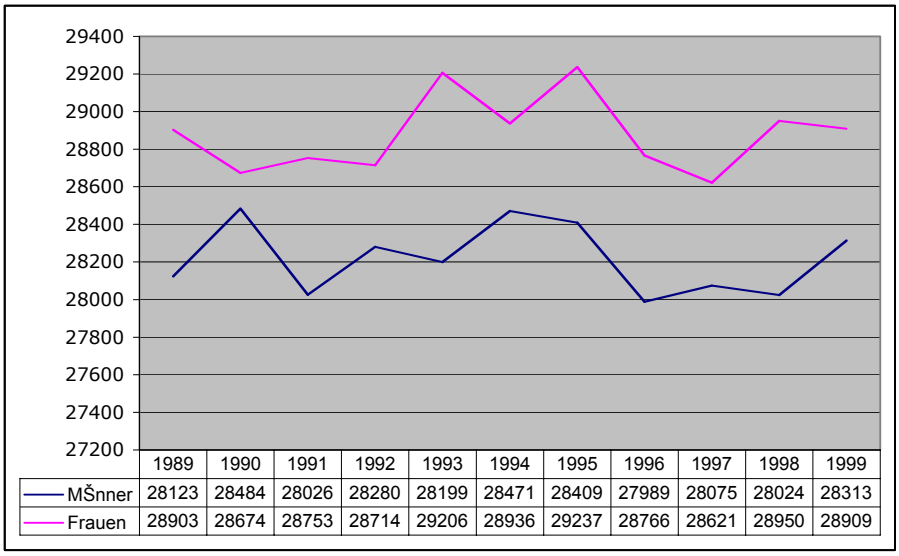
1. Einleitung

1.1. Thema

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der immunhistochemischen Nachweisbarkeit des in kolorektalen Tumorgeweben erhöht exprimierten Enzyms Pyrrolin-5-Carboxylat-Reductase (P5CR) und seiner Eignung als Screening-Biomarker für die Früherkennung des kolorektalen Karzinoms.

1.2. Epidemiologie

Das kolorektale Karzinom (KRK) gehört in den westlichen industrialisierten Ländern zu den häufigsten Malignomen. In den Vereinigten Staaten von Amerika ist es die dritthäufigste Karzinom-assoziierte Todesursache: Die geschätzte Zahl an Neuerkrankungen lag für das Jahr 2002 bei 148.300, die geschätzte Zahl begründeter Todesfälle bei 56.600 für beide Geschlechter gemeinsam (JEMAL et al. 2002). Dabei ist insgesamt ein leichter Abwärtstrend der Mortalität zu verzeichnen (Tabelle 1).



	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999
MŠnner	28123	28484	28026	28280	28199	28471	28409	27989	28075	28024	28313
Frauen	28903	28674	28753	28714	29206	28936	29237	28766	28621	28950	28909

Tab 1: Aufgezeichnete Zahl der Todesfälle aufgrund eines kolorektalen Karzinoms in den USA (JEMAL et al., 2002)

Mögliche Ursachen sind Verbesserungen der chirurgischen Technik und der adjuvanten Nachbehandlung, Änderung der Ernährungsgewohnheiten und Optimierung der Frühdiagnostik mit Hilfe von Screeningprogrammen (SANT et al. 1995).
Die entsprechenden Zahlen für Deutschland liegen bei etwa 60.000 Neuerkrankungen pro Jahr (RÜSCHOFF et al. 2004) und 30.000 Todesfällen pro Jahr (STATISTISCHES BUNDESAMT 1998). Bei der Inzidenz lag im Jahr 2000 die Bundesrepublik Deutschland an der Spitze der europäischen Länder (MICHELI et al. 2002 und FERLAY et al. 2001).

Die Wahrscheinlichkeit, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken, wächst mit dem Alter erheblich an. Während sie in der Gruppe der 0-39jährigen bei 0,07% für Männer und 0,06% für Frauen liegt, steigt sie in der Gruppe der 60-79jährigen auf 4,0% für Männer und 3,03% für Frauen. Die Wahrscheinlichkeit im Laufe des Lebens an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken liegt bei 5,88% für Männer und 5,55% für Frauen (JEMAL et al. 2002). 7% der Patienten erkranken innerhalb von 25 Jahren an einem Zweittumor (MUTO et al. 1975).

Aus diesen Zahlen wird deutlich, dass der Prävention, frühzeitigen Diagnostik und bestmöglichen Therapie nicht nur aus medizinischer Sicht ein hoher Stellenwert einzuräumen ist, sondern dass hier auch ein großes sozioöknomisches Interesse bestehen muss.

1.3. Ausbreitung und Therapieprinzipien

Als Kolonkarzinome gelten Tumoren, deren aboraler Rand bei der Messung mit dem starren Rektoskop mehr als 16 cm von der Anokutanlinie entfernt ist; Rektumkarzinome sind solche, bei denen diese Distanz weniger als 16 cm beträgt (FIELDING et al. 1991). Von einem Karzinom wird ausdrücklich erst dann gesprochen, wenn bereits atypische epitheliale Formationen in die Submukosa infiltriert sind (DEUTSCHE KREBSGESELLSCHAFT 2002). Die Unterscheidung zwischen Kolon- und Rektumkarzinom ist von entscheidender

Bedeutung für die Therapie und Prognose: das Rektumkarzinom verhält sich aufgrund seiner lymphatischen Ausbreitungswege anders als das Kolonkarzinom; die lokoregionäre Rezidivquote wird in der Literatur mit 5-20 % für das Kolonkarzinom (ROUGIER und NEOPTOLEMOS 1997) und bis zu 40 % für das Rektumkarzinom (KAPITEIJN et al. 1998) angegeben. Die Therapie ist ebenfalls entscheidend von der Lokalisation des Malignoms abhängig: während beim Kolonkarzinom die chirurgisch-onkologische Resektion als wesentliches Verfahren angewandt und bei positivem Lymphknotenbefall eine adjuvante Chemotherapie durchgeführt wird, werden beim lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom im Tumorstadium cT4 und nach den neuesten Empfehlungen auch im Stadium cT3 neoadjuvante Radio-/Chemotherapiekonzepte durchgeführt mit anschließender onkologischer Resektion und adjuvanter Nachbehandlung (SCHMIEGEL et al. 2004).
Bei den lokal begrenzten low-grade-Tumoren im Stadium cT1 kann beim Rektumkarzinom auch eine lokale chirurgische Resektion durchgeführt werden; die korrekte Therapieplanung und technische Durchführung haben einen entscheidenden Einfluß auf die lokoregionäre Rezidivrate.

Das kolorektale Karzinom gilt als chemoresistenter Tumor. Bei der Monotherapie mit 5-Fluorouracil zeigen sich Ansprechraten bis etwa 15% (BLEIBERG, 1996), die unter Modifikation des Applikationsschemas bis 30% gesteigert werden konnten. Allerdings fanden ADENIS et al. (1993) in einer Analyse von 9 Studien, in denen 5-Fluorouracil als Bolus oder Kurzinfusion verabreicht wurde, eine toxizitätsbedingte Mortalität von 2,5%.

1.4. Molekulargenetik

In den letzten Jahren wurden enorme Fortschritte im Verständnis der Genese des kolorektalen Karzinoms gemacht. Dabei spielen vor allem die Ergebnisse der molekularen Onkologie eine große Rolle, die gezeigt haben, dass es sich bei einem Karzinom um eine Erkrankung mit abnormer Genexpression handelt, die durch scheinbar unreguliertes Zellwachstum, gestörte Zelldifferenzierung

und Zelltod (Apoptose) sowie Invasions- und Metastasierungspotential gekennzeichnet ist (BERGERS und BENJAMIN, 2003).

Es muss unterschieden werden zwischen dem sporadisch auftretenden kolorektalen Karzinom, vererbten polygenetischen und den hereditären Typen, deren häufigste Formen das hereditäre nicht-polypöse kolorektale Karzinom (HNPCC) und die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) sind (LYNCH und DE LA CHAPELLE, 2003). Eine prozentuale Verteilung ist in Abbildung 1 wiedergegeben.

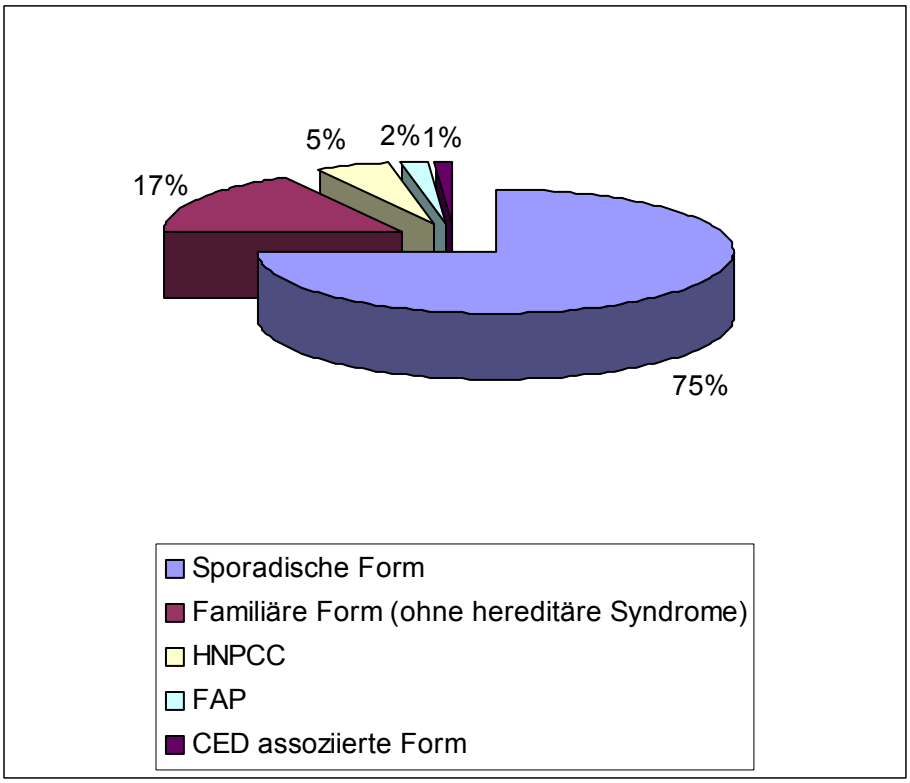


Abb.1: Genetik des kolorektalen Karzinoms
(SHELTON und WONG, 1998)

Die Genese des sporadischen kolorektalen Karzinoms ist multifaktoriell. Exogene Faktoren wie fett- und fleischreiche Ernährung werden angeführt (WORLD CANCER RESEARCH FUND, 1997). Darüber hinaus gilt eine langjährige Colitis ulcerosa, vor allem aber eine genetische Disposition als Risikofaktor (EKBOM et al., 1990).

Mehrere Entstehungswege sind für das sporadisch auftretende kolorektale Karzinom identifiziert: der bedeutendste wird gemeinsam durch zwei Theorien beschrieben:

1. die Adenom-Karzinom-Sequenz modifiziert nach FEARON und VOGELSTEIN (1990) und
2. die Zwei-Treffer-Hypothese nach KNUDSON (1975)

Das sporadische kolorektale Karzinom entsteht vorwiegend aus dysplastischen adenomatösen Polypen, welche aufgrund multipler Mutationen eine karzinomatöse Entartung erfahren. Dieser Prozess erfolgt über einen Zeitraum von 5-15 Jahren (MUTO et al. 1975). In diesem Zeitraum akkumulieren in den Epithelzellen genetische Schäden, die letztlich die Umwandlung einer Normalzelle zunächst in eine Adenom- und dann in eine Karzinomzelle bewirken.
Bei der Entstehung des Kolonkarzinoms werden vor allem sogenannte Tumorsuppressorgene ausgeschaltet. Diese sind in erster Linie das Adenomatosis poliposis coli (APC), das deleted in colon cancer (DCC) sowie das p53 Gen. Erst wenn beide Genallele defekt sind, fällt nach KNUDSON die tumorsupprimierende Genwirkung aus und die Zellen beginnen unkontrolliert zu wachsen, sterben nur verzögert ab und entwickeln die Fähigkeit des infiltrierenden und metastasierenden Wachstums. Gleichzeitig treten in den Tumorzellen gröbere chromosomale Schäden (Aneuploidie, Chromosomengewinne und –verluste, Strukturanomalien) auf, so dass dieser Karzinomentstehungsweg auch als Pathway der chromosomalen Instabilität (CIN) bezeichnet wird (KULLMANN 2003), welchem etwa 80% der Kolonkarzinome folgen.
Abzugrenzen sind solche Karzinome, bei denen nur diskrete DNA-Schäden auftreten, vornehmlich in den sogenannten Mikrosatelliten, einfach repetitiven DNA-Sequenzen. Ursache sind Ausfälle in Mismatchrepair Genen (vor allem MSH2 und MLH1). Dieser Weg der Kolonkarzinomentstehung wird als Mikrosatelliteninstabilitäts (MSI)-Pathway bezeichnet und liegt ca. 15% der

Kolonkarzinome zugrunde. Etwa jedes 10. dieser Malignome folgt einem autosomal dominanten Erbgang und ist Teil des hereditären nichtpolypösen Kolonkarzinom (HNPCC) Syndroms.
Auch für das Pankreaskarzinom konnte in neueren Untersuchungen der letzten Jahre die schrittweise Entstehung durch zunehmende genetische und morphologische Alterationen nachgewiesen werden; dieser Entstehungsweg weist Ähnlichkeiten mit den Veränderungen beim kolorektalen Karzinom auf. Genetische Veränderungen des Pankreasgangepithels auf dem Weg zum Adenokarzinom betreffen u.a. die Gene Her-2/neu, K-ras, p16, p53, DPC4 und BRCA2 (WELZEL et al., 2003). Die als Vorstufen des Karzinoms gewerteten, proliferativen epithelialen Läsionen in den Pankreasdrüsengängen werden – gemäß der neuen WHO-Klassifikation – als pankreatische intraepitheliale Neoplasie (PanIN) bezeichnet; vier Grade werden unterschieden: die PanIN-1A sind flache epitheliale Läsionen mit hochaufgebauten Zellen; die rund bis oval geformten Nuklei sind basal angeordnet und es findet sich supranukleär reichlich Muzin. Bei der PanIN-1B findet sich eine papilläre oder basal pseudostratifizierte Architektur der Läsion; darüber hinaus gleicht sie der PanIN-1A. Bei der PanIN-2 zeigen sich nukleäre Atypien, zum Beispiel vergrößerte Kerne, Polaritätsverlust oder Hyperchromasie. Mitosen sind selten, aber wenn vorhanden nicht luminal lokalisiert und nicht atypisch. Bei der PanIN-3 zeigen sich in das Lumen ragende Zellknospen, luminale Nekrosen, prominente Nuklei und atypische Mitosen (HRUBAN et al., 2001). Die PanIN-3 stellt die letzte Stufe vor dem Karzinom dar.

1.5. Diagnostik

1.5.1. Klinische Untersuchung und Endoskopie

Es ist zu konstatieren, dass derzeit die diagnostischen Möglichkeiten hinsichtlich der Früherkennung des kolorektalen Karzinoms unzureichend sind: Seit 1977 ist die Screening-Untersuchung mittels Stuhltestung auf okkultes, aus dem entarteten Gewebe stammendes Blut, zusammen mit der digitalen

Austastung des Rektums Teil des gesetzlichen Früherkennungsprogramms und das am weitesten verbreitete Diagnostikum. Bei den gebräuchlichen Testverfahren, wie z.B. dem Hämoccult©, werden mit Guaiakharz imprägnierte Filterpapierstreifen verwendet. Dabei kommt es durch die Pseudoperoxidaseaktivität des Hämoglobins nach Zugabe von Wasserstoffperoxid zu einer Blaufärbung des Guaiakharzes. Diese Untersuchung weist bei hoher Spezifität eine nur geringe Sensitivität von 40% auf. Es sind daher mindestens drei aufeinander folgende Stuhlgänge zu untersuchen. Durch den konsequenten Einsatz der Stuhltestung auf okkultes Blut kann die Mortalität des kolorektalen Karzinoms um bis zu 23% gesenkt werden (TOWLER et al. 1998). Dies ist vor allem auf die Früherkennung zurückzuführen, nicht jedoch auf eine Senkung der Karzinominzidenz. Allerdings nahmen 1990 nur 14,1% der anspruchsberechtigten Männer und 34,0% der anspruchsberechtigten Frauen an dem Früherkennungsprogramm teil (ROBERT-KOCH-INSTITUT 1998).

Die Koloskopie ist als invasives Verfahren international akzeptierter Goldstandard zur Karzinomfrühdiagnostik, jedoch mit einer geringen Patientenakzeptanz verbunden. Dies spiegelt sich in der Beteiligung an der gesetzlichen Früherkennung wider (POX et al. 2002). Die Sensitivität der Koloskopie liegt jedoch deutlich über der des Stuhltests; zudem bietet sie die Möglichkeit der simultanen Intervention. Bei konsequenter Polypektomie kann eine bis zu 90%ige Senkung der Karzinominzidenz erreicht werden (WINAWER et al 1993 und CHEN et al. 2003). Dies hat zu entsprechenden Empfehlungen der medizinisch-wissenschaftlichen Fachgesellschaften (SCHMIEGEL et al. 2004) und zur Aufnahme der Koloskopie in das gesetzliche Früherkennungsprogramm ab dem 55. Lebensjahr geführt.

1.5.2. Tumormarker

Tumormarker sind auf ein Malignom hinweisende Biomoleküle, meist Zucker-Protein-Moleküle, die entweder von Tumoren selbst gebildet werden, oder deren Bildung in anderen Zellen von Tumoren angeregt wird.
Es werden folgende Gruppen unterschieden:

a) onkofetale Antigene (Beispiel: Carcino-embryonales Antigen – CEA, alpha-Fetoprotein – AFP),

b) ektopisch gebildete Hormone (Beispiel: Calcitonin beim kleinzelligen Bronchialcarcinom) oder

c) vom Tumor gebildete Hormone, Enzyme oder Proteine (Beispiel: Bence-Jones-Proteine, Neuron-spezifische Enolase – NSE).

Tumormarker sind in Geweben oder Körperflüssigkeiten bei Vorhandensein einer malignen Erkrankung quantitativ nachweisbar und erfüllen idealer Weise folgende Kriterien:

- Eignung zum Screening
- Hohe Aussagefähigkeit über Tumorprogredienz und –stadium (Korrelation der Serumkonzentration mit der Tumormasse)
- Möglichkeit der Früherkennung über sensitive, standardisierte und reproduzierbare Bestimmungsmethoden
- Hohe Spezifität und Sensitivität hinsichtlich der zu detektierenden Erkrankung
- Kosteneffektivität

Viele der bekannten Tumormarker lassen sich für die Verlaufsbeobachtung bei bekanntem Tumorleiden heranziehen, sind aber hinsichtlich ihres Screening-Potentials unzureichend (POON et al. 2001). Ausnahmen bilden das alpha-

Fetoprotein (AFP) beim hepatocellulären Carcinom und das Prostata-spezifische Antigen (PSA) beim Prostatacarcinom.

Beim kolorektalem Karzinom wird grundsätzlich im Rahmen der prätherapeutischen Diagnostik der Tumormarker CEA bestimmt. Postoperativ sollte bei erreichter Tumorfreiheit ein Abfall des CEA verzeichnet werden; im Rahmen der Tumornachsorge spricht ein erneuter Anstieg des CEA für ein Rezidiv oder eine Metastasierung. Die Bestimmung des CEA ist somit nicht aus prognostischer Sicht, sondern zur Verlaufsbeobachtung Bestandteil der Tumornachsorge, welche gemäß der Leitlinie der Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlich-medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) durchgeführt wird (SCHMIEGEL et al. 2004).

Der Nachweis von Mutationen des Gens K-ras, der auch anhand von Stuhlproben möglich ist, könnte zukünftig als Vorsorgeuntersuchung genutzt werden. Systematische Untersuchungen zum Wert dieser Screeningmethode stehen noch aus (POX et al., 2002).

1.6. Prognosefaktoren

Die Prognose des kolorektalen Karzinoms ist von mehreren Faktoren abhängig: In der prospektiven Beobachtungsstudie von HERMANEK et al. (1994) konnte in multivariater Analyse der Daten von 1157 Patienten mit solitärem Erstkarzinom des Kolons nachgewiesen werden, dass das Tumorstadium einen unabhängigen Prognosefaktor darstellt (Abbildung 2).

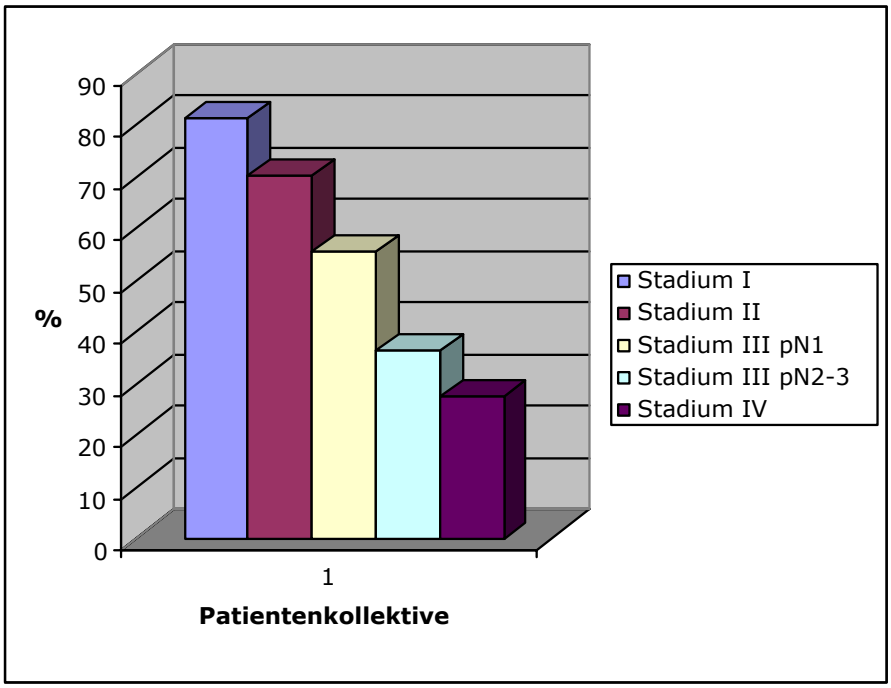


Abb. 2: 5-Jahres-Überlebensrate nach Kolonkarzinom abhängig vom UICC-Stadium. (HERMANEK et al., 1994)

Es muss betont werden, dass die Tumorresektion unter kurativer Intention (R0-Resektion) sicher der wichtigste Prognosefaktor ist: Die 5-Jahres-Überlebensrate nach R0-Resektion beträgt 62,8% im Vergleich zu 2,6% bei R1 oder R2-Resektionen (Abbildung 3). Dabei bezeichnet R0 die Residualtumorfreiheit unter Einbeziehung des regionalen Lymphabflussgebietes. R1- (mikroskopischer Tumorrest) und R2-Resektionen (makroskopischer Tumorrest) müssen als palliative Resektionen bezeichnet werden (SIEWERT und FINK, 1992)

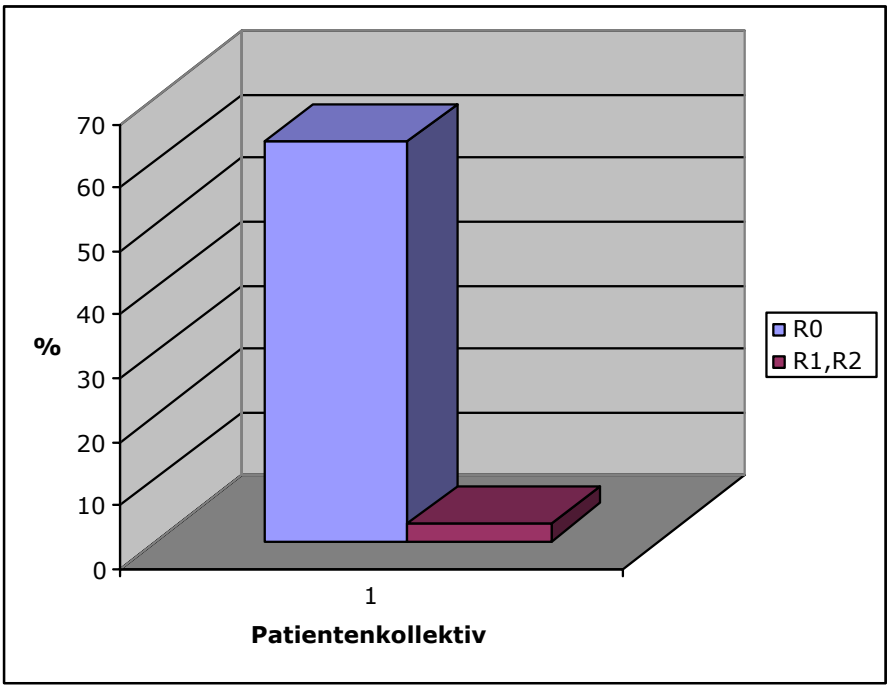


Abb. 3: 5-Jahres-Überlebensrate des Kolonkarzinoms abhängig vom Resektionsergebnis (HERMANEK et al., 1994)

Einzelne Studien konnten bei Patienten mit kolorektalem Karzinom eine prognostische Bedeutung für das CEA darstellen: TUROLDO et al. (2003) konnten in Untersuchungen an 512 operierten Patienten ein verbessertes Langzeitüberleben für jene Patientengruppe ermitteln, die präoperativ ein normales CEA aufgewiesen hatte. Bei Anwendung eines Scores aus den acht Parametern Tumorinvasion, Lymphknotenstatus, Metastasierung, CEA-Level, Differenzierungsgrad, Resektabilität, Lokalisation und Bluttransfusion, konnten KAMA et al. (2003) ebenfalls ein prognostisches Potential nachweisen.

Neben den klassischen Tumormarkern wird heute nach molekularen prognostischen Parametern mit großer Intensität gesucht. Diese dienen dazu, den klinischen Verlauf des individuellen Patienten mit möglichst hoher Wahrscheinlichkeit vorherzusagen. Darüber hinaus besteht die Hoffnung, Patientengruppen gezielt zu identifizieren, die von einer spezifischen Therapie profitieren. Aktuelle Studien haben die folgenden biologischen und molekularen

Parameter als potentiell prognostisch relevant in Bezug auf das kolorektale Karzinom erkannt (ALLGAYER et al. 2001):

uPA-System	c-src (Intrazelluläre Signaltransduktion)
MMP-1 (Matrix-Metalloproteinase)	bcl-2 (Tumorsuppressorgen)
c-ras (Intrazelluläre Signaltransduktion)	c-fos (Transkriptionsfaktor)
p53 (Tumorsuppressorgen)	DCC (Tumorsuppressorgen)
nm23 (Tumorsuppressorgen)	Disseminierte Tumorzellen

Im Urokinase-Typ-Plasminogen-Aktivator (uPA)-System führt die von der Serinprotease uPA vermittelte Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin u.a. zur Aktivierung von Kollagenasen und damit zur Zerstörung von Basalmembranen. Es gilt als sicher, dass zukünftig nicht ein einzelner Parameter zur Stratifizierung von Patienten herangezogen werden kann, sondern dass ein definiertes Muster aus mehreren Parametern die Zuordnung eines Patienten zu einem Therapiekonzept bestimmt.

1.7. Tumorbank Klinikum Kassel

Die rasante Entdeckung sowohl potentiell verwertbarer Biomarker als auch chemischer Therapieansätze erzeugt einerseits seitens der Forschung einen besonderen Bedarf an kurzfristig zugänglichen Gewebeproben in großer Menge; andererseits entsteht ein berechtigtes Interesse der Patienten an der Asservierung ihres Tumorgewebes, um neue Therapiekonzepte auf ihre spezielle Wirksamkeit austesten zu können.
Vor diesem Hintergrund entstand die Stiftung PATH (www.stiftungpath.org). Sie unterhält im Patientinnenauftrag eine Tumorgewebebank für Mammakarzinomgewebe, so dass nach Entwicklung neuer Therapien eigenes Tumorgewebe zur Prüfung der Therapiewirksamkeit vorliegt. Die Gewebe werden derzeit an drei Kooperationskliniken (Universitätsklinikum Augsburg, Universitätsklinikum Marburg und Klinikum Kassel) im Rahmen der Operation entnommen und fraktioniert: nach der Routinediagnostik wird das

Tumorgewebe in zwei gleiche Teile aufgetrennt. Ein Teil wird für die Patientinnen exklusiv aufbewahrt, den anderen Teil spenden sie der Stiftung PATH für Forschungszwecke. Die Proben werden an allen Kooperationskliniken nach einheitlichen strengen Qualitätsstandards (gemäß Good Clinical Practice) verarbeitet und bei –152 Grad Celsius eingefroren. Bei diesen tiefen Temperaturen kann das Gewebe für mehr als zehn Jahre ohne Qualitätsverlust gelagert werden.
Um derartig hochwertige Gewebeproben auch von anderen Tumorentitäten für eigene Forschungszwecke asservieren zu können, wurde am Klinikum Kassel die Einrichtung einer umfangreichen Tumorbank realisiert. Die Patienten wurden ausführlich darüber aufgeklärt und willigten ein, dass das ihnen aus diagnostischen oder therapeutischen Gründen entnommene Gewebe nach Abschluß der zur Behandlung notwendigen Untersuchungen nicht verworfen, sondern in der Tumorbank asserviert wurde. Zusätzlich wurden Serum- sowie teilweise auch Urinproben unter strenger Einhaltung einer lückenlosen Kühlkette asserviert.
Das in der vorgelegten Arbeit untersuchte Marker-Protein wurde anhand derartiger Gewebeproben als möglicher Tumormarker entdeckt.

1.8. Proteomics

Unter Proteomics wird ein Verfahren verstanden, welches die Bestimmung aller Proteine, die von einem Genom zu einem definierten Zeitpunkt und in einem gegebenen Kontext abgerufen werden (Proteom), ermöglicht. Grundlage dieser Technologie ist die Annahme, dass in Wachstumszuständen, bei Veränderungen in der Lebensumwelt, bei genetischen Manipulationen und besonders auch im Zustand der Krankheit ein im Vergleich zum Zustand der Gesundheit verändertes Proteom vorliegt (Abbildung 4), dieses somit dynamisch ist. Proteomics ermöglicht dabei im Vergleich zu bisherigen Technologien die Bestimmung einer Vielzahl an Proteinen zur gleichen Zeit (HAUBITZ et al., 2004).

Je nach Zielsetzung werden drei Kategorien unterschieden: Expressions-Proteomics, Funktions-Proteomics und Struktur-Proteomics. Bei der auch hier angewandten Expressions-Proteomics-Technologie werden drei Verfahren kombiniert: zweidimensionale Gelelektrophorese, Massenspektrometrie und Bioinformatik, entsprechend den drei Arbeitsschritten: Protein-Isolation, -Quantifizierung und –Identifikation (HABERMANN, 2001).

Ziel dieser Untersuchungen ist die Identifikation sogenannter „disease specific proteins“ (DSP), die nur im krankhaften Zustand exprimiert werden und somit als diagnostische Marker nutzbar sind. Als spezielle Untergruppe gelten Screening-Marker, die bei noch fehlender Klinik, zum Beispiel im Frühstadium eines kolorektalen Karzinoms, die Diagnose ermöglichen.

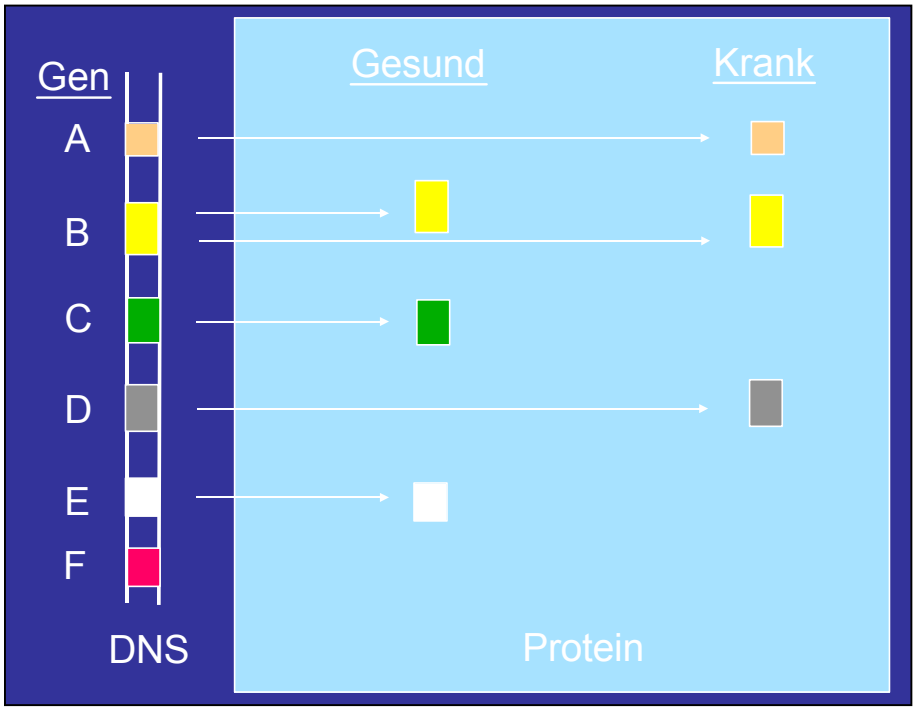


Abb.4: Unterschiedliches Proteom im Zustand Gesund und Krank

1.9. Pyrrolin-5-carboxylat-Reductase (P5CR)

In früheren Arbeiten (HERZFELD und GREENGARD, 1980) wurde bereits eine erhöhte enzymatische Aktivität von Pyrrolin-5-Carboxylat-Reductase in Kolon- und Bronchialkarzinomen gefunden. Allerdings wurde das Protein nicht selbst nachgewiesen, sondern lediglich die Enzymaktivität. Damit blieb unklar, ob Isoenzyme für die unterschiedliche Regulierung in Tumor- und Normalgewebe verantwortlich sind.

Im Rahmen der hier vorgelegten Proteomanalysen konnte die Pyrrolin-5-Carboxylat-Reductase selbst nachgewiesen werden und zwar nur im Tumor und nicht im Normalgewebe, was auf eine Hochregulierung des Proteins hinweist.

Pyrrolin-5-Carboxylat-Reductase (EC 1.5.1.2) ist ein cytosolisches Enzym aus der Klasse der Oxidoreduktasen und agiert an der CH-NH-Gruppe von Donatoren (International Union of Biochemistry and Molecular Biology). Anhand von CGH-Analysen konnte gezeigt werden, dass das Enzym beim Menschen von einem einzelnen Gen (PROC_human) auf Chromosom 17 codiert wird (DOUGHERTY et al. 1992). Pyrrolin-5-Carboxylat-Reductase katalysiert den letzten Schritt der Synthese der nicht-essentiellen Aminosäure Prolin aus delta-1-Pyrrolin-5-Carbonsäure, nachdem diese über einen spezifischen Carrier ins Cytosol transportiert wurde (Abbildung 5) (FLYNN et al. 1989, DONALD et al. 2001). Dabei entstehendes NADP+ wird in den Hexosemonophosphat-Weg eingeschleust (PHANG et al. 1982). Am lentikulären System konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass die Stimulation des Hexosemonophosphat-Wegs über die Pyrrolin-5-Carboxylat-Reductase-abhängige Reduktion zu Prolin erfolgt (SHIONO et al. 1985). Der Hexosemonophosphat-Weg hat seine Bedeutung unter anderem in der Synthese von Pentosen für die Nucleotid- und Nucleinsäure-Biosynthese (LÖFFLER und PETRIDES, 1998).

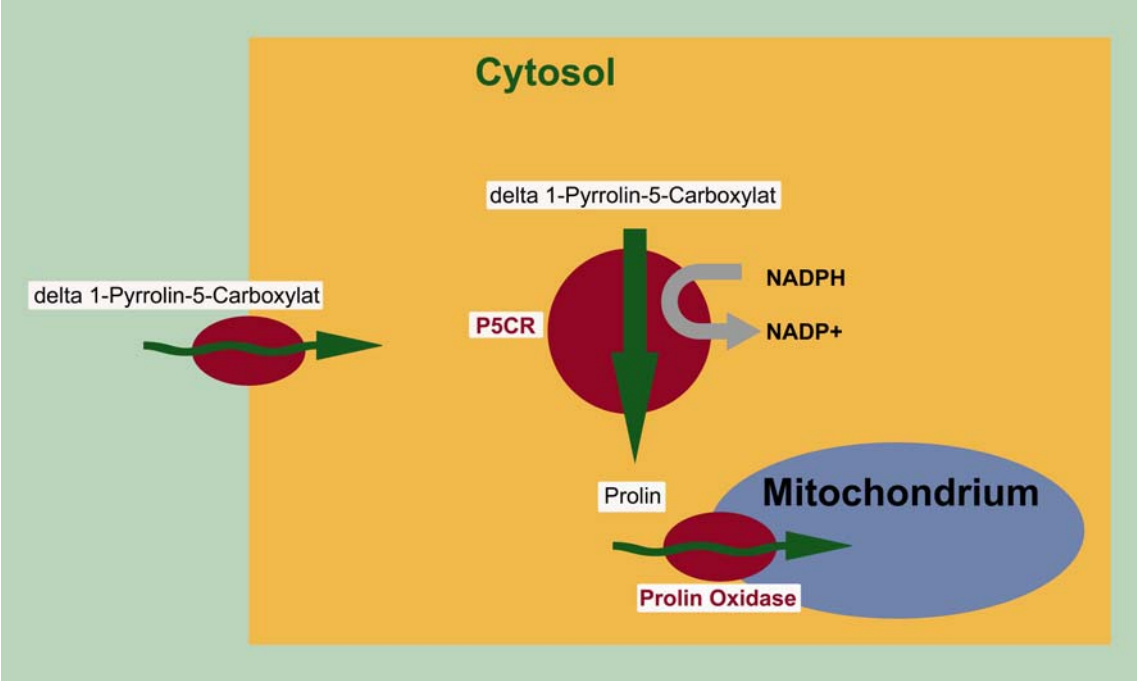


Abb.5: Cytosolische Reduktion von P5CR zu Prolin

Pyrrolin-5-Carboxylat-Reductase ist ein nahezu ubiquitäres Enzym und konnte sowohl in Bakterien, Hefen, höheren Pflanzen, Tieren als auch beim Menschen nachgewiesen werden (ARAL und KAMOUN 1997, FUJII et al. 2002). An humanen Fibroblasten konnte eine wichtige Funktion in der Kollagenbiosynthese nachgewiesen werden (MILTYK und PALKA, 2000). Untersuchungen an Arabidopsis thaliana haben eine gewebespezifische Pyrrolin-5-Carboxylat-Reductase-Aktivität gezeigt (HARE und CRESS 1996, VERBRUGGEN et al. 1993), wobei im Zustand osmotischen Stresses einerseits und in Geweben mit hoher Proliferationsrate andererseits eine signifikant höhere Prolinakkumulation, verursacht sowohl durch eine Steigerung der Prolinsynthese als auch eine Hemmung der Prolinoxidation, zu beobachten war (VERBRUGGEN et al. 1993, HUA et al. 1999). Darüber hinaus konnte an Jungschweinen (SAMUELS et al. 1989) ebenso wie an Ratten (HERZFELD und RAPER 1976) eine altersabhängige Pyrrolin-5-Carboxylat-Reductase-Aktivität beobachtet werden: im Intestinum der Jungschweine ließ sich mit zunehmendem Alter eine kontinuierliche Zunahme der Enzymaktivität nachweisen.

Bei ihren Untersuchungen an Kolonkarzinomen haben HERZFELD und GREENGARD (1980) zudem zwei Isoformen der Pyrrolin-5-Carboxylat-Reductase nachgewiesen: eine kältestabile und eine kältelabile, wobei im Kolonkarzinom die Konzentration der kältelabilen Fraktion signifikant höher war im Vergleich zum Normalgewebe. Bei der kältestabilen Fraktion zeigte sich kein Unterschied.
In menschlichen Erythrozyten ist Pyrrolin-5-Carboxylat-Reductase das einzige nachweisbare Enzym des Prolinstoffwechsels. Dementsprechend besteht seine Funktion nicht in der Proteinsynthese, sondern in der Generation oxidativen Potentials in Form von $NADP^+$. Im Unterschied zu anderen Geweben, zum Beispiel Fibroblasten zeigt sich daher auch keine Prolin-abhängige Feedback-Hemmung der Enzymaktivität (YEH et al., 1981). Ob es sich bei der Pyrrolin-5-Carboxylat-Reductase in Erythrozyten und Fibroblasten um durch unterschiedliche Genexpression generierte Isoenzyme oder um ineinander umwandelbare Formen handelt, konnte bisher nicht geklärt werden.

Prolin wird über die an der inneren Membran des Mitochondriums lokalisierte Prolinoxidase zu delta-1-Pyrrolin-5-Carboxylat oxidiert. Dabei wird ATP generiert. In kolorektalen Zelllinien ist die p53-abhängige Initiation der Apoptose mit einer Induktion des Genes, welches für die Prolinoxidase codiert, verbunden (DONALD et al. 2001). Dabei führt die Induktion des Prolin/delta-1-Pyrrolin-5-Carboxylat-Stoffwechselweges über die bereits beschriebene Stimulation des Hexosemonophosphatweges zu einem vergrößerten Nukleotidpool und nachfolgender Aktivierung von Apoptose-induzierenden Kaspasen (MAXWELL et al., 2000)

1.10. Fragestellung

Ausgehend von den bisherigen Kenntnissen sollen in der vorgelegten Arbeit folgende Fragestellungen untersucht werden:

1. Ist der im Rahmen der eingesetzten Proteomanalytik etablierte Antikörper gegen Pyrrolin-5-Carboxylat-Reductase in der Lage, das Enzym in den Gewebeschnitten des Kolonkarzinoms eindeutig zu detektieren? Ist das Ergebnis spezifisch – was limitiert die Aussagekraft?
2. Welche Bedeutung hat der Nachweis der Pyrrolin-5-Carboxylat-Reductase in adenomatösen Vorläuferläsionen des kolorektalen Karzinoms, in Vorläuferläsionen des duktalen Pankreaskarzinoms sowie in extra-intestinalen Tumoren?
3. Erfüllt das Enzym Pyrrolin-5-Carboxylat-Reductase die Anforderungen eines Proliferations- oder Tumormarkers und kann somit aus dem immunhistochemischen Nachweis ein diagnostischer Vorteil/Sreening generiert werden?

2. Material und Methoden

2.1. Proteomanalysen

2.1.1. Tumorgewebebank und –asservierung

Sämtliche Patienten, die in der Zeit vom 01.01.2001 bis 31.12.2003 in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie am Klinikum Kassel mit der Verdachtsdiagnose eines kolorektalen Karzinoms zur chirurgischen Primärtherapie aufgenommen wurden, erhielten eine ausführliche ärztliche Aufklärung über die Einrichtung der Tumorgewebebank und die mit einer Teilnahme an dem Projekt verbundenen Konsequenzen. Nur Patienten, von denen vor dem geplanten operativen Eingriff eine schriftliche Einverständniserklärung vorlag, wurden für das Projekt berücksichtigt.
Präoperativ wurden Serum- und Urinproben abgenommen und umgehend nach Entnahme gekühlt. Nach der Bearbeitung wurden die Proben bei –80 Grad Celsius asserviert.
Bei der Gewebeasservation wurde derart vorgegangen, dass nach Feststellung der Ischämiezeit das tumortragende Resektat nativ in ein spezielles, dem Operationstrakt angegliedertes pathologisches Labor verbracht und dort sofort bearbeitet wurde. Nach Entfernung der für die Routinediagnostik notwendigen Anteile wurden die Gewebeproben in gefrorenem Zustand bei –80 Grad Celsius eingelagert, um eine Proteolyse zu vermeiden.

Auf diese Weise wurden 23 Gewebeproben von Resektatgeweben für die weiteren Proteomanalysen gewonnen.

2.1.2. Durchführung der Proteomanalysen

Die Proteomics-Untersuchungen wurden von der Fa. ROCHE Diagnostics durchgeführt:
Zunächst erfolgte die Extraktion der Proteinfraktion aus dem Gewebe. Im Rahmen der Prä-Analytik wurden dann die bekannten Proteinanteile extrahiert. Es folgte die Separation der verbliebenen Proteine anhand ihres

Molekulargewichtes und isoelektrischen Punktes mittels 2D-Gelelektrophorese. Aus den entstehenden spots wurden Proben gestochen und diese in Peptide gespalten. Die Peptide wurden massenspektroskopisch analysiert und ihre Massenverteilung bestimmt. Mittels Datenbankanalyse wurden die zugrunde liegenden Proteine identifiziert. Anhand eines Vergleichs der Proteinmuster aus Tumor- und Normalgewebe ließen sich tumorspezifische Proteine entdecken. Aus den Proteinen, die vorwiegend im Tumorgewebe nachweisbar waren, wurde die Pyrrolin-5-Carboxylat-Reductase identifiziert und nachfolgend ein Antikörper gegen dieses Enzym hergestellt.

2.2. Gewebeproben für die immunhistochemischen PROC-Analysen

Die 23 Kolonkarzinom-Gewebeproben für die Antikörperuntersuchungen sind identisch mit den Geweben, die für die Proteomanalysen zur Verfügung standen. Alle weiteren Gewebeproben stammen aus den Gewebearchiven des Pathologischen Institutes am Klinikum Kassel:

- 11 Gewebeproben von Kolonadenomen mit Dysplasiegrad 1, die im Rahmen von Biopsien gewonnen wurden
- 11 Gewebeproben von Kolonadenomen mit Dysplasiegrad 2, die im Rahmen von Biopsien gewonnen wurden
- 11 Gewebeproben von Kolonadenomen mit Dysplasiegrad 3, die im Rahmen von Biopsien gewonnen wurden
- 5 Gewebeproben des Pankreas
- 10 Gewebeproben unterschiedlicher Sarkome
- 10 Gewebeproben unterschiedlicher neuroendokriner Tumore

Zudem wurde ein Tissue Multi Array mit 15 unterschiedlichen Tumorentitäten und korrespondierendem Normalgewebe angefertigt, der eine effektive Anfertigung vieler Färbungen ermöglichte; die Diskrepanzen zwischen Anzahl der Tumorgewebe und der Normalgewebe ist darauf zurückzuführen, dass nicht immer alle Proben auswertbar waren:

- Urothel: 37 Tumorgewebe, 22 Normalgewebe

- Kolon: 27 Tumorgewebe, 28 Normalgewebe
- Lunge (SCLC): 7 Tumorgewebe, 4 Normalgewebe
- Lunge (Plattenepithelkarzinom): 9 Tumorgewebe, 10 Normalgewebe
- Lunge (Adenokarzinom): 11 Tumorgewebe, 13 Normalgewebe
- Lunge (bronchoalveoläres Karzinom): 1 Tumorgewebe, 2 Normalgewebe
- Lunge (grosszelliges Karzinom): 2 Tumorgewebe, kein Normalgewebe
- Mamma (ErbB2 positiv): 7 Tumorgewebe, 9 Normalgewebe
- Mamma (ErbB2 negativ): 9 Tumorgewebe, 9 Normalgewebe
- Mamma (medulläres Karzinom): 5 Tumorgewebe, 2 Normalgewebe
- Mamma (muzinöses Karzinom): 3 Tumorgewebe, 4 Normalgewebe
- Malignes Melanom (nod.): 10 Tumorgewebe, 11 Normalgewebe
- Malignes Melanom (sup.): 8 Tumorgewebe, 6 Normalgewebe
- Pankreas: 30 Tumorgewebe, 18 Normalgewebe
- Prostata: 28 Tumorgewebe,15 Normalgewebe

2.3. Immunhistochemie

2.3.1. Reagenzien

Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4), Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4), Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Citronensäure-Monohydrat ($C_6H_8O_7$), Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Trinatriumcitratdihydrat ($C_6H_5O_7Na_3$), Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Tween 20, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
HSA Humanes Serumalbumin, Fa. Dianova, Hamburg, Deutschland

Polyklonales Kaninchen-Rohserum gegen PROC_human (Tier K2342, Titer ca. 1:83.000, 3. Abnahme nach 12 Wochen Immunisierung), Fa. ROCHE Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland

Präpariertes polyklonales Kaninchen IgG ausgehend vom oben aufgeführten Rohserum (AK 142_1, c=16,0mg/ml, 100mM K-Phosphat pH 8,0)), Fa. ROCHE Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland

2.3.2. Lösungen

Phosphate Buffered Saline (PBS)-Puffer pH 7,4

12,4g KH_2PO_4 + 43,1g Na_2HPO_4 x $2H_2O$ + 42,5g NaCl in 5l Aqua dest. lösen, mit 1M NaOH auf pH 7,4 einstellen.

Phosphate Buffered Saline (PBS)-Puffer pH 7,4 mit Tween

12,4g KH_2PO_4 + 43,1g Na_2HPO_4 x $2H_2O$ + 42,5g NaCl in 5l Aqua dest. lösen, mit 1M NaOH auf pH 7,4 einstellen. 2,5ml Tween 20 zufügen.

10mM Citratpuffer pH 6,0

21,01g $C_6H_8O_7$ x $2H_2O$ in 1000ml Aqua dest. lösen = 0,1M Zitronensäure = Stammlösung A

29,41g $C_6H_5O_7Na_3$ x $2H_2O$ in 1000ml Aqua dest. lösen = 0,1M Natriumcitrat = Stammlösung B

9ml Stammlösung A + 41ml Stammlösung B mit 450ml Aqua dest. auf 500ml auffüllen.

2.3.3. Vorbehandlung

Für die Untersuchung wurden etwa 4µm dicke Schnitte auf silanisierte Objektträger gezogen und anschließend für 30 Minuten bei 60^0 und über Nacht bei 38^0 Celsius getrocknet. Es folgte die Entparaffinierung der Schnitte. Dazu wurden die Objektträger zwei mal 5 Minuten in Xylol überführt, anschließend zwei mal 5 Minuten in Aceton und danach zwei mal 5 Minuten in Aqua dest. getaucht. Danach erfolgte die Steamervorbehandlung. Dafür wurden die Objektträger Bauch an Bauch in einer Plastikküvette mit 10ml Citrat-Puffer pH 6,0 30 Minuten behandelt und anschließend über 30 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Objektträger wurden nachfolgend mit Aqua dest. abgespült. Zur Blockierung endogener Peroxidasen wurden die Objektträger bei Raumtemperatur für 20 Minuten in ein 0,3%iges H_2O_2-Methanol-Bad getaucht und nachfolgend mit Aqua dest. abgespült. Sodann

wurden die Objektträger für 5 Minuten in PBS-Puffer pH 7,4 getaucht und anschließend wurden zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen an geladenen Kollagen- und weiteren Bindegewebselementen für 60 Minuten 100µl 10% HSA in PBS-Puffer pH 7,4 auf die Schnitte gegeben, da in ersten Versuchen eine erhebliche Hintergrundfärbung die Interpretation beeinträchtigte.

2.3.4. Färbevorgang

Die weiteren Inkubationen des Färbevorgangs wurden mit Hilfe des Tecan-Immunostainer Genesis RSP 200 unter Verwendung der En Vision+-Methode (Fa. DAKO) durchgeführt (Abbildung 6).

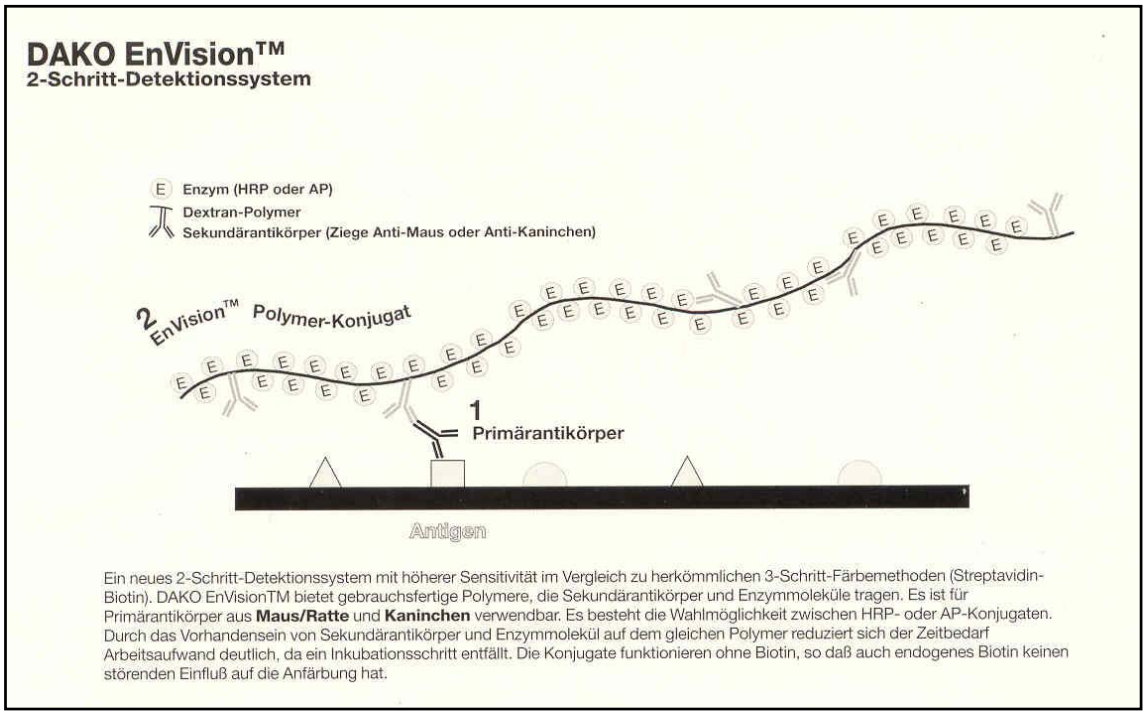


Abb. 6: En Vision+-Methode, Fa. DAKO

Die Blockierlösung wurde abgekippt und die Schnitte für 4 Stunden mit 120µl Primärantikörper (PROC_human, Fa. ROCHE) inkubiert, der zuvor mit Antibody Diluent (Fa. DAKO) 1: 5000 verdünnt wurde. Parallel wurde eine IgG-Kontrolle mit Rabbit Immunoglobulin Fraction (Fa. DAKO) mit gleicher Proteinmenge durchgeführt. Die Inkubation wurde nach Ablauf der Zeit mit 100µl Tween-PBS-

Puffer pH 7,4 gestoppt. Danach wurden die Objektträger zunächst 7 Minuten mit 1400µl Tween-PBS-Puffer pH 7,4 gespült.
Sodann erfolgte die Inkubation mit 120µl En Vision HRP anti rabbit (Fa. DAKO). Nach 30 Minuten wurde die Inkubation mit 100µl PBS-Puffer pH7,4 mit Tween gestoppt. Anschließend wurden die Objektträger erneut 7 Minuten mit 1400µl Tween-PBS-Puffer pH 7,4 gespült. Danach wurden die Objektträger mit 120µl DAB-Chromogen, ChemMate (Fa. DAKO – Ansatz: DAB Chromogen und Substratpuffer Fa. DAKO, Verdünnung: 1:50) inkubiert. Nach nun 10 Minuten wurde die Inkubation abermals mit 100µl PBS-Puffer pH7,4 mit Tween gestoppt. Anschließend wurden die Objektträger erneut 7 Minuten mit 1400µl Tween-PBS-Puffer pH 7,4 gespült. Abschließend wurde noch in Aqua dest. gespült.

Die Objektträger wurden zur Gegenfärbung für 10 Sekunden in Harris Hämatoxilin (Fa. Merck) überführt und 5 Minuten in warmem Wasser gebläut. Es folgten das Eindecken mit Pertex (Fa. Medite) und die mikroskopische Begutachtung.

Nachdem der befundende Pathologe, Herr Dr. med. Manfred Hofmann, einen Vorteil in den Färbungen mit aufgereinigtem Serum gesehen hatte, wurde für alle weiteren Färbungen nur noch dieses Reagenz verwandt.

2.3.5. Mikroskopische Untersuchung und Bewertung

Sämtliche Präparate wurden durch Herrn Dr. med. Manfred Hofmann, Oberarzt des Pathologischen Instituts am Klinikum Kassel, histopathologisch begutachtet und anschliessend die immunhistochemische Färbung bewertet. Für die Phänotypisierung wurden folgende Parameter erfasst:

a) Gewebekompartiment:

- Tumor
- Tumornahes Gewebe (innerhalb desselben Gesichtsfeldes bei 200facher Vergrößerung)

- Tumorfernes Gewebe (außerhalb desselben Gesichtsfeldes bei 200facher Vergrößerung)
- Andere Zellen/Zellverbände

b) Lokalisation der Anfärbung:

- Zytoplasma
- Kern

c) Färbungsgrad:

- Keine Anfärbung (IHC 0)
- Leichte Anfärbung (IHC 1+)
- Mittlere Anfärbung (IHC 2+)
- Starke Anfärbung (IHC 3+)

War aufgrund der Präparatbeschaffenheit ein Gewebekompartiment nicht vorhanden, wurde die Bezeichnung n.d. (= nicht detektiert) vergeben.

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse der Proteomanalysen

Bei der Auftrennung der aus den Resektaten gewonnenen Proteinfraktionen mittels 2D-Gelelektrophorese konnte bei genauem Vergleich der Gele von Tumorgeweben und korrespondierenden Normalgeweben eine ungleiche Verteilung der spots nachgewiesen werden (Abbildung 7).

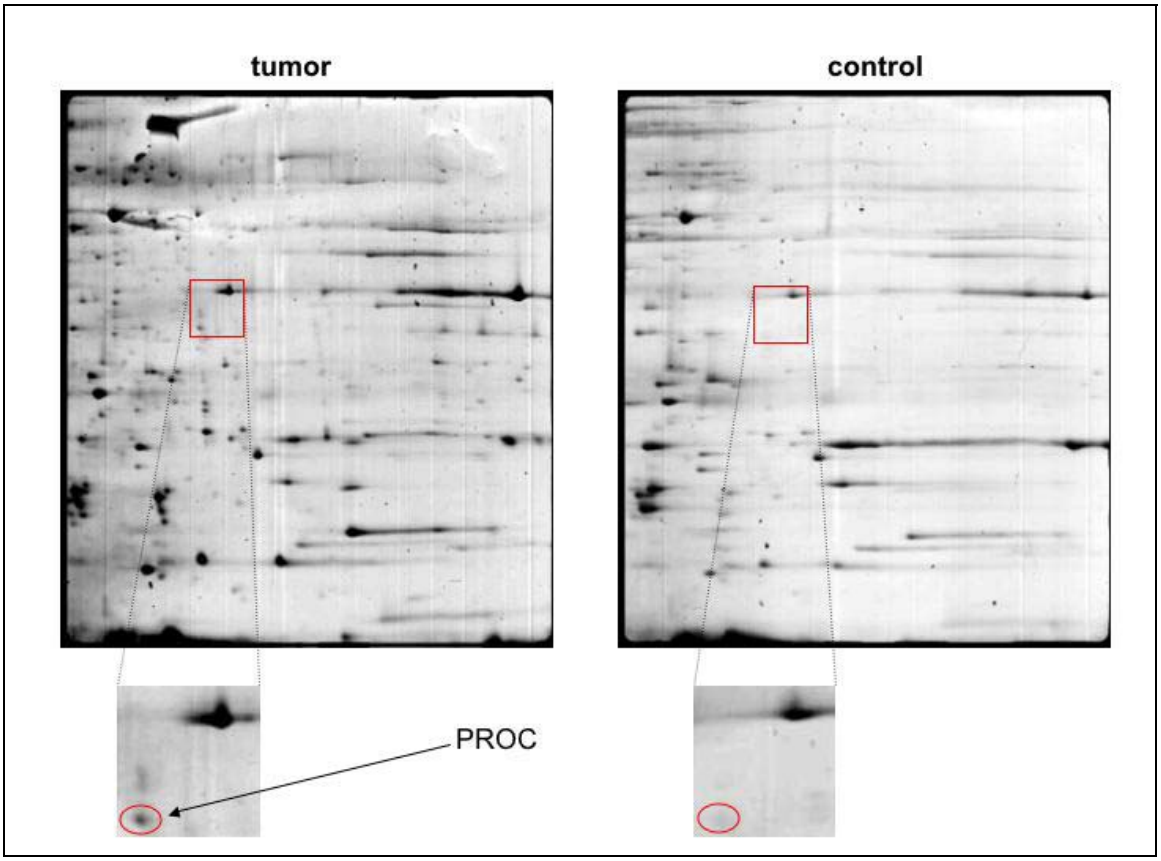


Abb.7: 2D-Gelelektrophorese von Tumor- und Normalgewebe

Die nachfolgenden Proteomics-Untersuchungen konnten zeigen, dass es sich bei einem dieser spots um das Protein Pyrrolin-5-Carboxylat-Reductase, welches von dem Gen proC codiert wird, handelt. Zur weiteren Validierung des Proteomics-Ergebnisses wurde zunächst ein Antikörper gegen Pyrrolin-5-Carboxylat-Reductase entwickelt und ein Western Blot von drei Gewebeproben angefertigt (siehe Abbildung 8). Hier konnten die Ergebnisse bestätigt werden:

Es zeigte sich im Kolonkarzinomgewebe eine deutliche Hochregulierung der Pyrrolin-5-Carboxylat-Reductase im Vergleich zum Normalgewebe desselben Patienten.

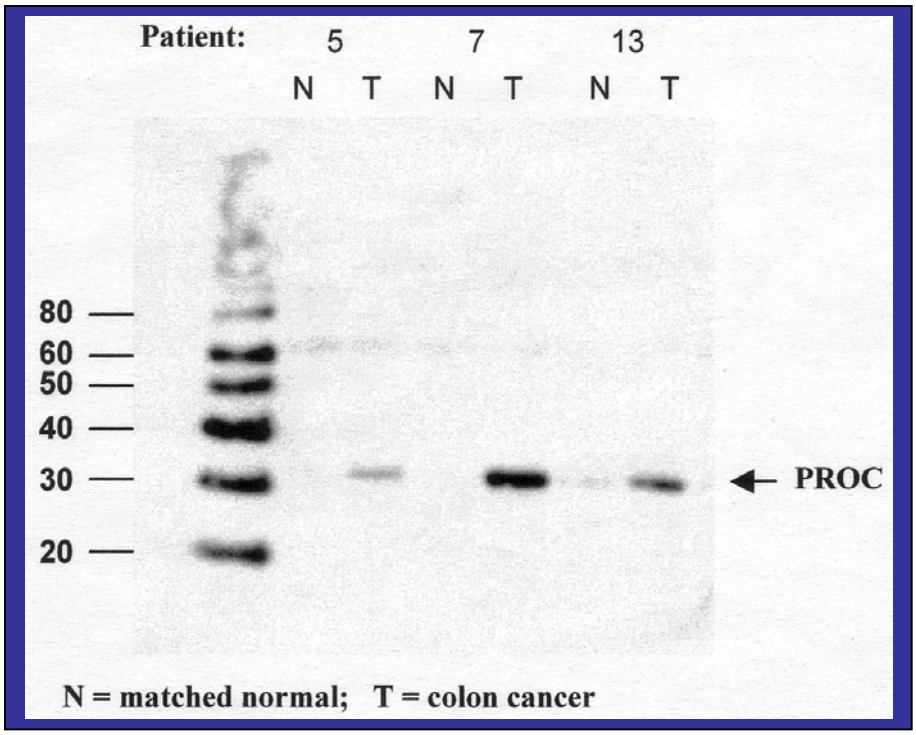


Abb.8: Western Blot mit Darstellung der Bande PROC im Tumorgewebe, Fa. ROCHE Diagnostics

3.2. Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen

3.2.1. Kolon

3.2.1.1. Adenokarzinom

Zunächst erfolgte die Untersuchung der histologisch als Adenokarzinome des Kolons diagnostizierten Resektate aus dem Tumorbankprojekt: Tabelle 3 zeigt eine Übersicht der Färbeergebnisse.
Bei Zusammenfassung der Ergebnisse ergibt sich die in Tabelle 2 dargestellte Verteilung:

Gewebe	IHC 3+ (n)	IHC 2+ (n)	IHC 1+ (n)	IHC 0 (n)	nd (n)
Karzinom	22	1	0	0	0
tumornah	0	9	10	0	4
tumorfern	0	2	7	4	10

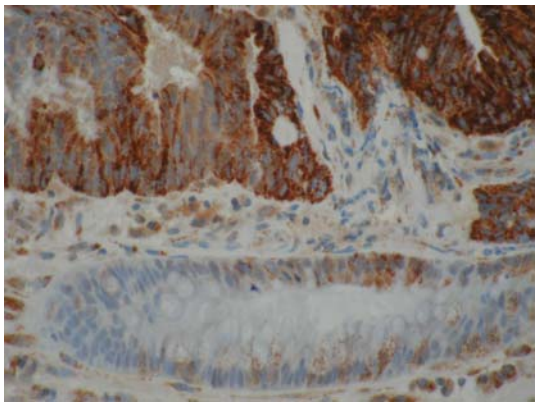
Tab. 2: Zusammenfassung der immunhistochemischen Färbung an 23 Adenokarzinomen des Kolons (Resektate)

Auffällig ist dabei, dass lediglich im Tumorgewebe der Färbegrad IHC 3+ erreicht wird und nicht in den angrenzenden beziehungsweise entfernteren Normalepithelien. In 22 von 23 untersuchten Fällen wird im Adenokarzinom der Färbegrad IHC 3+ erreicht, dies entspricht 95,7 Prozent.
Zwischen den tumornahen und tumorfernen Anteilen ergab sich kein Unterschied.

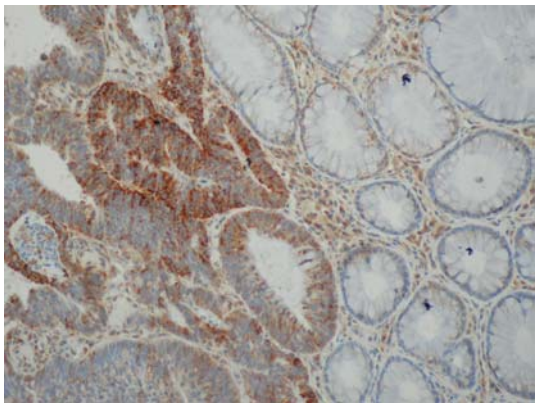
Exemplarisch werden in Abb. 9a-f die unterschiedlichen Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen an Gewebeschnitten von Kolonkarzinom-Resektaten dargestellt.
Besonders auffällig war, dass es neben der Anfärbung der epithelialen Zellen des Kolons auch zur Anfärbung von Ganglienzellen des vegetativen Nervensystems in der Wandung des Kolons (Abb. 9f) sowie von lymphatischen Zellen kam.
Die Anfärbung war in allen Gewebsarten im Zytoplasma lokalisiert.

Studien-probe	ICH Anfärbegrad Tumorgewebe	IHC Anfärbegrad tumornahes Gewebe	IHC Anfärbegrad tumorfernes Gewebe
Darm 01	2+	1+	0
Darm 02	3+	1+	1+
Darm 03	3+	2+	1+
Darm 04	3+	nd	nd
Darm 05	3+	2+	1+
Darm 06	3+	1+	1+
Darm 07	3+	2+	2+
Darm 08	3+	2+	2+
Darm 09	3+	nd	nd
Darm 10	3+	2+	1+
Darm 11	3+	1+	nd
Darm 12	3+	nd	nd
Darm 13	3+	1+	0
Darm 14	3+	2+	1+
Darm 15	3+	1+	1+
Darm 16	3+	nd	nd
Darm 17	3+	2+	0
Darm 18	3+	2+	0
Darm 19	3+	1+	nd
Darm 20	3+	1+	nd
Darm 21	3+	1+	nd
Darm 22	3+	1+	nd
Darm 23	3+	2+	nd

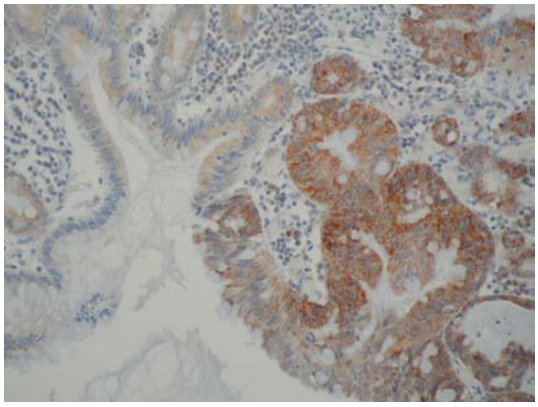
Tab. 3: Immunhistochemische Färbeergebnisse der Resektatgewebe. (PROC 1:5000, EnVision, DAB)



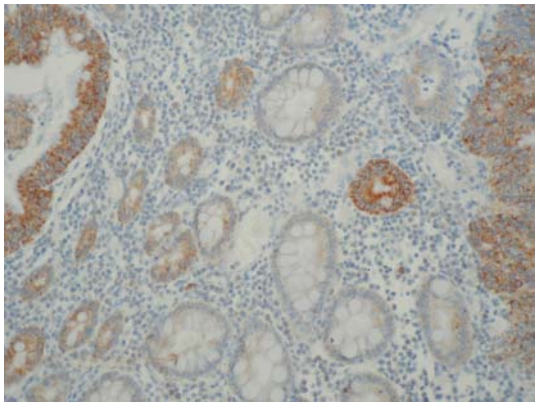
a) proC-Färbung, 200x. IHC 3+ Anfärbung des Karzinoms im oberen Bildanteil; partielle IHC 2+ Anfärbung einer Normal-Drüse tumornah. *Studienprobe Darm 06*



b) proC-Färbung, 200x. Starke Anfärbung der karzinomatösen Drüsenanteile und nicht angefärbte, Normal-Drüsen.
Studienprobe Darm 06



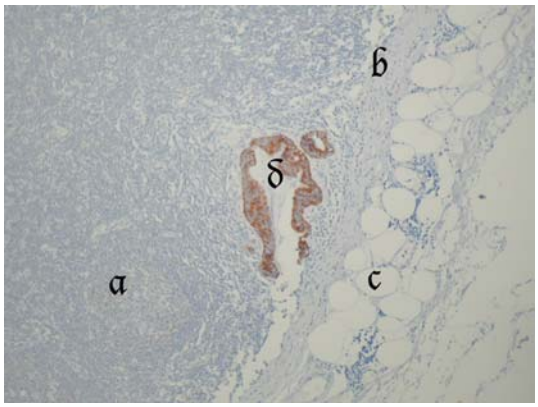
c) proC-Färbung, 40x. Saubere Unterscheidung von karzinomatösen Drüsen und Normal-Drüsen anhand der Färbung.
Studienprobe Darm 08



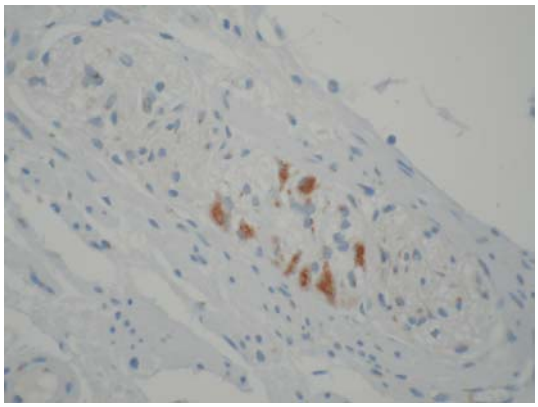
d) proC-Färbung 40x. Identifikation der karzinomatösen Drüsen.
Studienprobe Darm 08

Abb. 9a-d: Immunhistochemische Färbungen einzelner Kolonkarzinome

(PROC 1:5000, EnVision, DAB)



e) proC-Färbung, 200x. Darstellung einer d) Lymphknotenmetastase (IHC 3+) mit a) Lymphfollikel, b) Kapsel und c) umliegendem Fettgewebe.
Studienprobe Lymphknoten 01



f) proC-Färbung, 200x. Darstellung von Ganglienzellen des vegetativen Nervensystems (ICH 3+)
Studienprobe Darm 02

Abb. 9e: Immunhistochemische Färbungen einzelner Kolonkarzinome (Fortsetzung) sowie von Ganglienzellen (f) (PROC 1:5000, EnVision, DAB)

3.2.1.2. Kolonadenom

Nachdem in Karzinomgeweben der Nachweis von Pyrrolin-5-Carboxylat-Reductase mittels des vorliegenden Antikörpers gelungen war, wurden nachfolgend Kolonadenome unterschiedlichen Dysplasiegrades, die im Rahmen von koloskopischen Untersuchungen gewonnen worden waren, untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. 7 dargestellt. Bei der Zusammenfassung der Ergebnisse ergibt sich die in Tab. 4-6 dargestellte Verteilung:

Gewebe	IHC 3+ (n)	IHC 2+ (n)	IHC 1+ (n)	IHC 0 (n)	nd (n)
Adenom	11	0	0	0	0
tumornah	1	0	10	0	0
tumorfern	0	0	0	0	11

Tab. 4: Zusammenfassung der immunhistochemischen Färbung an 11 Adenomen D1 des Kolons (Biopsien)

In 100 Prozent der Fälle zeigte sich in den Adenomen mit Dysplasiegrad 1 ein starker Anfärbungsgrad IHC 3+. Im Umgebungsgewebe wurde hingegen in 91 Prozent nur ein Anfärbungsgrad IHC 1+ erkannt. Aufgrund der bioptischen Gewinnung lag lediglich tumornahes Gewebe vor.

Gewebe	IHC 3+ (n)	IHC 2+ (n)	IHC 1+ (n)	IHC 0 (n)	nd (n)
Adenom	10	1	0	0	0
tumornah	0	2	9	0	0
tumorfern	0	0	0	0	11

Tab. 5: Zusammenfassung der immunhistochemischen Färbung an 11 Adenomen D2 des Kolons (Biopsien)

Bei den Adenomen mit Dysplasiegrad 2 zeigte sich eine ähnliche Verteilung: in 91 Prozent zeigte sich im Adenom ein Anfärbungsgrad IHC 3+ und im umgebenden Gewebe in 81,8 Prozent ein Anfärbungsgrad IHC 1+.

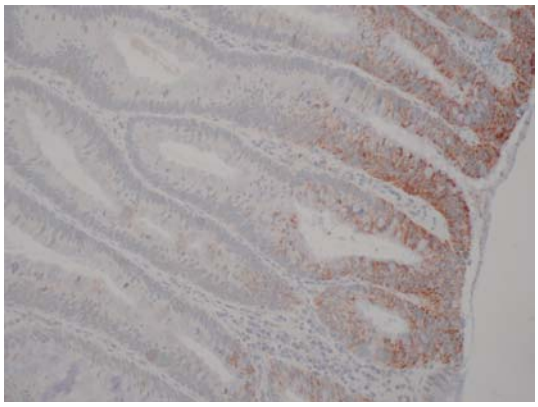
Gewebe	IHC 3+ (n)	IHC 2+ (n)	IHC 1+ (n)	IHC 0 (n)	nd (n)
Adenom	11	0	0	0	0
tumornah	0	3	8	0	0
tumorfern	0	0	2	0	9

Tab. 6: Zusammenfassung der immunhistochemischen Färbung an 11 Adenomen D3 des Kolons (Biopsien)

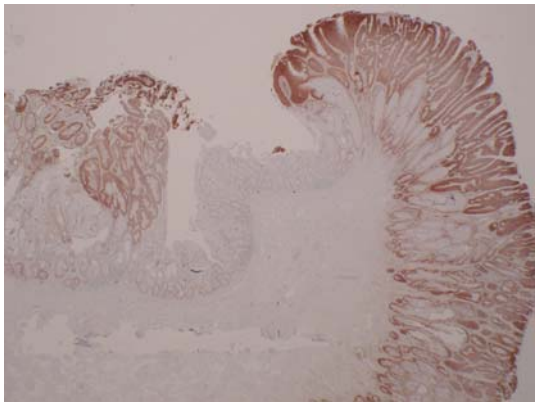
Bei den Adenomen mit Dysplasiegrad 3 fand sich in 100 Prozent ein Anfärbungsgrad IHC 3+ im Adenom und in 72,7 Prozent ein Anfärbungsgrad IHC 1+ im Umgebungsgewebe.
Auffallend ist, dass in einem der 33 Adenome der Anfärbungsgrad IHC 3+ im Umgebungsgewebe detektiert wurde.

Studien-probe	IHC Anfärbegrad Tumorgewebe	IHC Anfärbegrad tumornahes Gewebe	IHC Anfärbegrad tumorfernes Gewebe
Adenom D1 01	3+	3+	nd
Adenom D1 02	3+	1+	nd
Adenom D1 03	3+	1+	nd
Adenom D1 04	3+	1+	nd
Adenom D1 05	3+	1+	nd
Adenom D1 06	3+	1+	nd
Adenom D1 07	3+	1+	nd
Adenom D1 08	3+	1+	nd
Adenom D1 09	3+	1+	nd
Adenom D1 10	3+	1+	nd
Adenom D1 11	3+	1+	nd
Adenom D2 01	3+	1+	nd
Adenom D2 02	2+	1+	nd
Adenom D2 03	3+	1+	nd
Adenom D2 04	3+	2+	nd
Adenom D2 05	3+	1+	nd
Adenom D2 06	3+	1+	nd
Adenom D2 07	3+	2+	nd
Adenom D2 08	3+	1+	nd
Adenom D2 09	3+	1+	nd
Adenom D2 10	3+	1+	nd
Adenom D2 11	3+	1+	nd
Adenom D3 01	3+	1+	1+
Adenom D3 02	3+	1+	nd
Adenom D3 03	3+	1+	nd
Adenom D3 04	3+	1+	nd
Adenom D3 05	3+	1+	nd
Adenom D3 06	3+	1+	nd
Adenom D3 07	3+	1+	nd
Adenom D3 08	3+	2+	1+
Adenom D3 09	3+	2+	nd
Adenom D3 10	3+	1+	nd
Adenom D3 11	3+	2+	nd

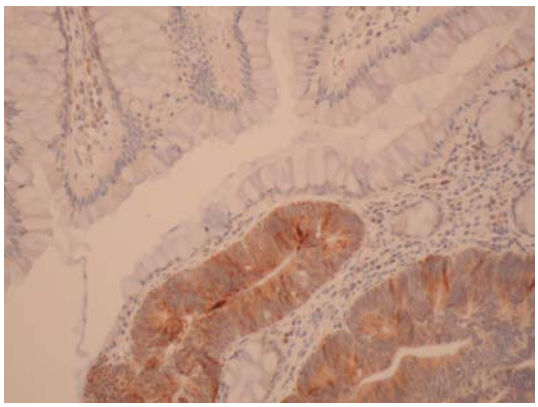
Tab. 7: Immunhistochemische Färbeergebnisse der Adenome (Biopsate) (PROC 1:5000, EnVision, DAB)



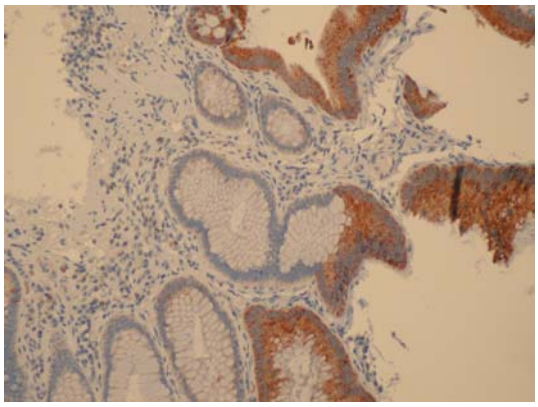
a) proC-Färbung, 200x. Adenom D1: Die Anfärbung ist entsprechend des Entstehungswegs der dysplastischen Veränderung luminal am stärksten.
Studienprobe Adenom D1 09



b) proC-Färbung, 40x. Adenom D1: Gut erkennbar ist die Verlagerung der Proliferationszone; die Dysplasie beginnt luminal.
Studienprobe Adenom D1 03

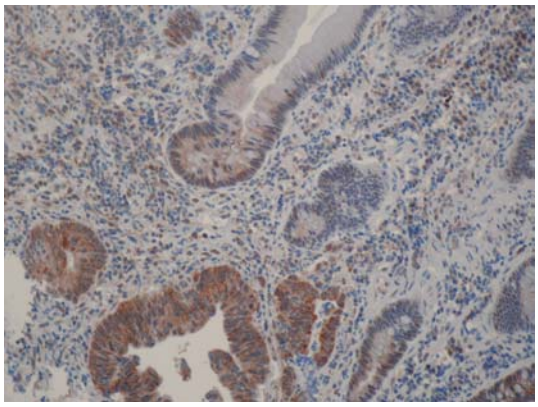


c) proC-Färbung, 200x. Adenom D3: die Färbung weist eine gute Trennschärfe zum Normalgewebe auf.
Studienprobe Adenom D3 01



d) proC-Färbung, 200x. Adenom D3: die bereits dysplastischen Areale der Drüsen lassen sich von den unveränderten Arealen differenzieren.
Studienprobe Adenom D3 02

Abb. 10a-d: Immunhistochemische Färbung von Kolonadenomen unterschiedlichen Dysplasiegrades (Biopsien) (PROC 1:5000, EnVision, DAB)



e) proC-Färbung, 200x. Adenom D3: Übergang in ein invasives Karzinom. *Studienprobe Adenom D3 10*

Abb. 10e: Immunhistochemische Färbung von Adenomen unterschiedlichen Dysplasiegrades (Biopsien) – Fortsetzung (PROC 1:5000, EnVision, DAB)

3.2.2. Tissue-Multi-Array (TMA)

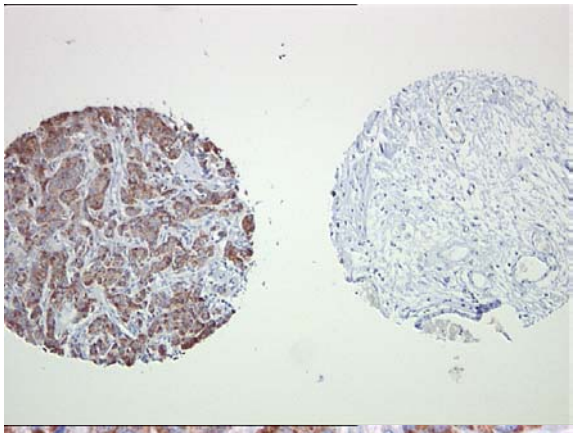
Gewebe		n	IHC 3+ (n)	IHC 2+ (n)	IHC 1+ (n)	IHC 0 (n)
Urothel	Tumor	37	8	18	10	1
	Normal	22	0	1	0	21
Colon	Tumor	27	25	1	1	0
	Normal	28	1	8	9	10
Lunge SCLC	Tumor	7	5	2	0	0
	Normal	4	0	0	0	4
Lunge Plattenepithel-Ca	Tumor	9	5	4	0	0
	Normal	10	0	1	0	9
Lunge Adeno-Ca	Tumor	11	6	5	0	0
	Normal	13	0	0	1	12
Lunge Bronchoalv.-Ca	Tumor	1	1	0	0	0
	Normal	2	0	2	0	0
Lunge Grosszell.-Ca	Tumor	2	1	1	0	0
	Normal	0	0	0	0	0
Mamma ErbB2 pos.	Tumor	7	5	2	0	0
	Normal	9	0	0	1	8
Mamma ErbB2 neg.	Tumor	9	5	3	1	0
	Normal	9	0	0	1	8
Mamma Medulläres Ca	Tumor	5	4	1	0	0
	Normal	2	1	0	0	1
Mamma Muzinöses Ca	Tumor	3	1	2	0	0
	Normal	4	0	1	0	3
Malignes Melanom nod.	Tumor	10	6	3	1	0
	Normal	11	1	1	2	7
Malignes Melanom sup.	Tumor	8	7	0	0	1
	Normal	6	0	0	2	4

Pankreas	Tumor	30	13	12	5	0
	Normal	18	1	2	7	8
Prostata	Tumor	28	21	6	1	0
	Normal	15	0	3	8	4

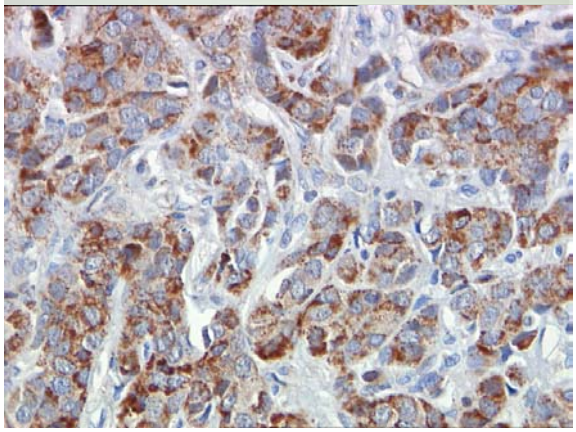
Tab. 8: Immunhistochemische Färbeergebnisse des TMA
(PROC 1:5000, EnVision, DAB)

3.2.2.1. Urothel

Bei den untersuchten Harnblasenkarzinomen zeigte sich eine inhomogene Verteilung der Anfärbungsgrade in den Karzinomen, die korrespondierenden Normalgeweben waren in 21 von 22 Fällen (95,5%) nicht angefärbt (Abb. 11a-c).

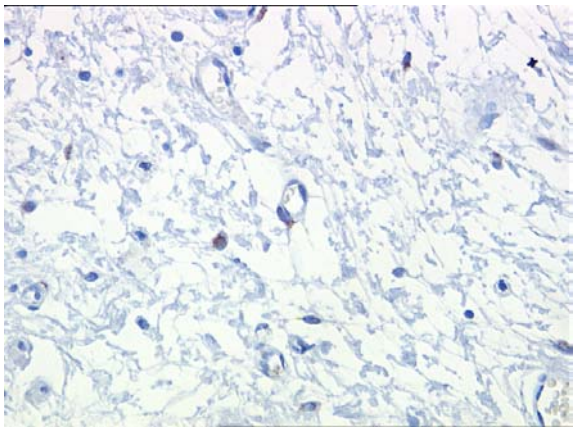


a) proC-Färbung, 10x. Links Urothelcarcinom, Rechts korrespondierendes Normalgewebe
Studienprobe TMA 3a und 3b



b) proC-Färbung, 200x. Darstellung des unter a) gezeigten Urothelkarzinoms. Es zeigt sich eine starke homogene Anfärbung (IHC 3+) im Tumorgewebe.
Studienprobe TMA 3a

Abb. 11a: Immunhistochemische Färbung an Urothelgewebe
(PROC 1:5000, EnVision, DAB)



c) proC-Färbung, 200x. Im korrespondierenden Normalgewebe (Stroma) färben sich nur einzelne lymphatische Zellen an.
Studienprobe TMA 3b

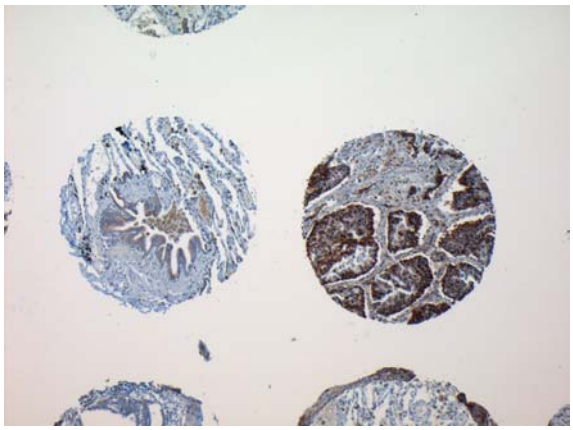
Abb. 11b-c: Immunhistochemische Färbung an Urothelgewebe (Fortsetzung) (PROC 1:5000, EnVision, DAB)

3.2.2.2. Kolon

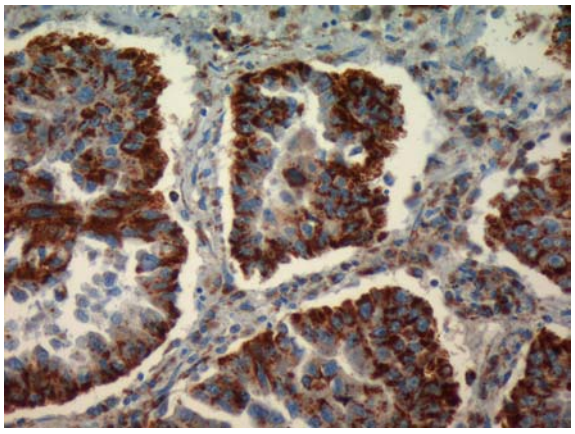
In den Kolonkarzinomgeweben fand sich bei 25 von 27 Schnittpräparaten ein Anfärbungsgrad IHC 3+ entsprechend 92,6% der Fälle, während bei den Normalgeweben nur in einem der Fälle der Anfärbungsgrad IHC 3+ erreicht wurde.

3.2.2.3. Lunge

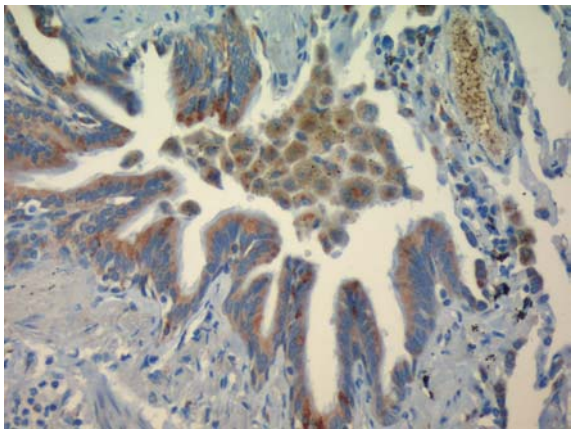
Auffällig war auch die Verteilung bei den Bronchialkarzinomen. Die kleinzelligen Bronchialkarzinome zeigten in 100% der Fälle einen Anfärbungsgrad IHC 3+ oder IHC 2+ während diese Anfärbungsgrade in den Normalgeweben in keinem Fall erreicht wurden. Die Plattenepithel- und Adenokarzinome erreichten ebenfalls in 100% der Fälle einen Anfärbungsgrad IHC 3+ oder IHC 2+, während bei den korrespondierenden Normalgeweben in 90% bzw. 92,3% lediglich ein Anfärbungsgrad IHC 1+ erreicht wurde (Abb. 12a-c).



a) proC-Färbung, 10x. Links normales Lungenparenchym, rechts Adenokarzinom.
Studienprobe TMA 83a und 83b



b) proC-Färbung, 200x. Inhomogene Anfärbung des Adenokarzinoms.
Studienprobe TMA 83b

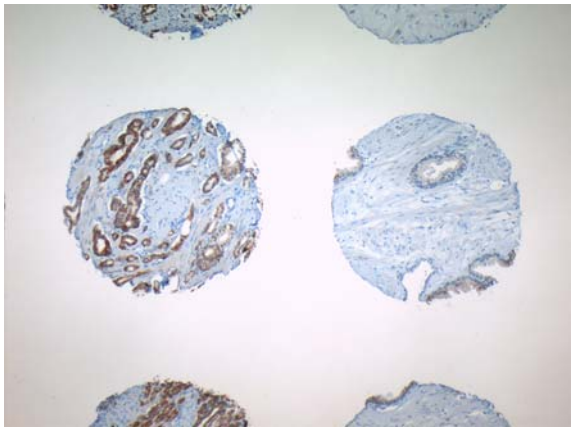


c) proC-Färbung, 200x. Im korrespondierenden Normalgewebe kommen lediglich vereinzelte lymphatische Zellen zur Anfärbung.
Studienprobe TMA 83a

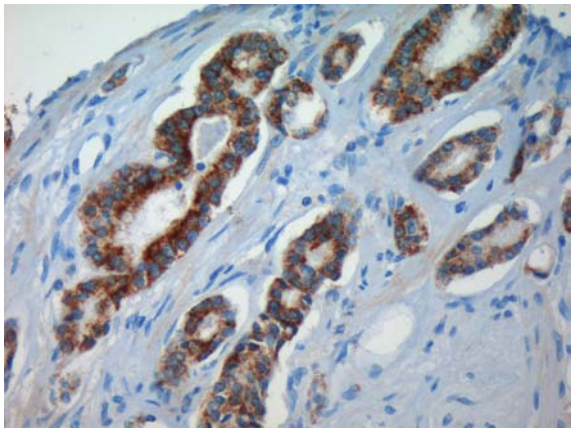
Abb. 12a-c: Immunhistochemische Färbung von Lungengeweben (PROC 1:5000, EnVision, DAB)

3.2.2.4. Prostata

Auch beim Prostatakarzinom fand sich in den Karzinomgeweben eine Tendenz zu einer stärkeren Anfärbungen im Gegensatz zu dem korrespondierenden Normalgewebe (Abb. 13a-c und 14a-c): während von den 28 Karzinomgeweben 21 einen Anfärbungsgrad IHC 3+, entsprechend 75%, zeigten und nur bei einer Probe (3,6%) ein Anfärbungsgras IHC 1+ detektiert wurde, wurde bei den Normalgeweben der Anfärbungsgrad IHC 3+ nicht erreicht. Bei acht Proben zeigte sich der Anfärbungsgrad IHC 1+ (53,3%) sowie bei weiteren vier Proben der Anfärbungsgrad IHC 0 (26,7%).

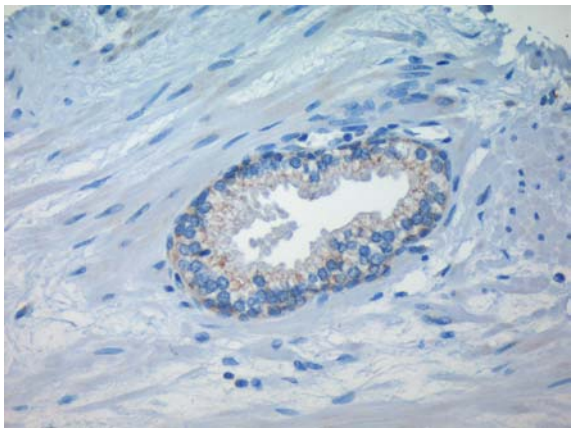


a) proc-Färbung, 10x. Rechts Normalgewebe, links Prostata-karzinom
Studienprobe TMA 190b und 190a



b) proC-Färbung, 200x. Starke Anfärbung (IHC 3+) im Prostatakarzinom.
Studienprobe TMA 190b

Abb. 13a-b: Immunhistochemische Färbung von Prostatagewebe (PROC 1:5000, EnVision, DAB)

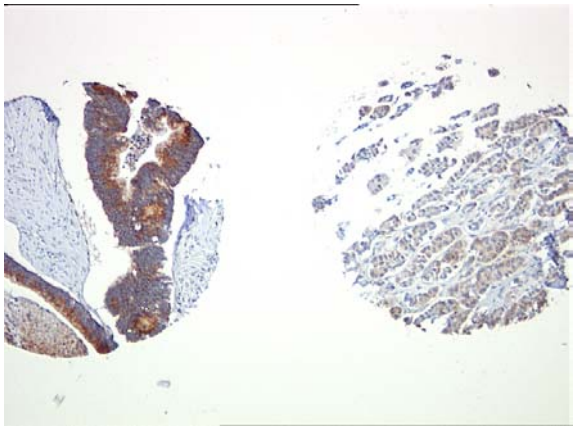


c) proC-Färbung, 200x. Keine Anfärbung im normalen Prostatagewebe.
Studienprobe TMA 190a

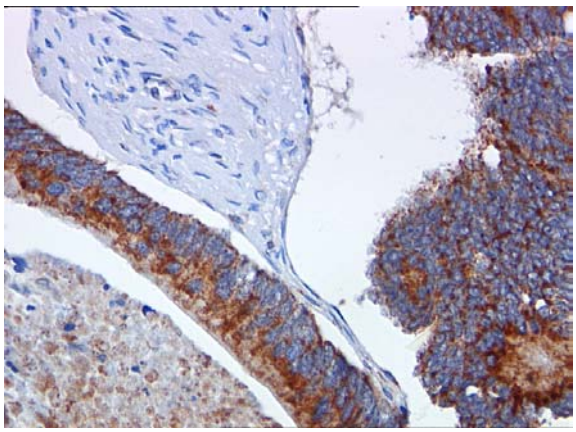
Abb. 13c: Immunhistochemische Färbung von Prostatagewebe (Fortsetzung) (PROC 1:5000, EnVision, DAB)

3.2.2.5. Pankreas

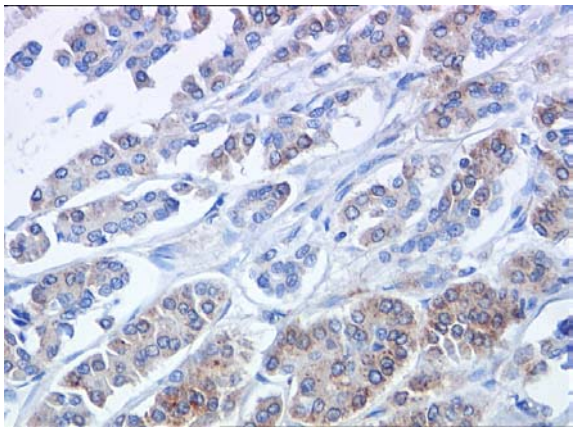
Bei den Pankreaskarzinomgeweben zeigte sich in 25 von 30 Fällen eine Anfärbung IHC 2+ oder IHC 3+ (83,3%). Bei den Normalgeweben fand sich in 15 von 18 Fällen eine Anfärbung IHC 1+ oder IHC 0 (83,3%).



a) proC-Färbung, 10x. Links Pankreaskarzinom, rechts Normalgewebe
Studienprobe TMA 166a und 166b



b) proC-Färbung, 200x. Starke homogene Anfärbung des Pankreaskarzinoms.
Studienprobe TMA 166a



c) proC-Färbung, 200x. Schwache Anfärbung des Normalgewebes.
Studienprobe TMA 166b

Abb. 14a-c: Immunhistochemische Färbung von Pankreasgewebe (PROC 1:5000, EnVision, DAB)

3.2.2.6. Mamma

Bei den ErbB2 positiven Mammageweben zeigten sich nur im Tumor die Anfärbungsgrade IHC 3+ und IHC 2+, während in den korrespondierenden Normalgeweben nur die Anfärbungsgrade IHC 1+ und IHC 0 auftraten. Bei den ErbB2 negativen Mammageweben zeigte sich eine ähnliche Verteilung; lediglich eine Tumorgewebeprobe wies auch den Anfärbungsgrad IHC 1+ auf.
Bei den Proben von medullären Karzinomen der Mamma wurden ebenfalls im Tumorgewebe nur die Anfärbungsgrade IHC 3+ und IHC 2+ beobachtet; im korrespondieren Normalgewebe fand sich bei nur zwei Proben eine mit dem Anfärbungsgrad IHC 3+ und eine zweite mit IHC 0. Bei den Proben von muzinösen Karzinomen der Mamma wurde der Anfärbungsgrad IHC 3+ auch nur im Tumorgewebe erreicht.

3.2.2.7. Melanom

Bei den Melanomen zeigte sich insgesamt eine inhomogene Verteilung. Jedoch konnte auch hier bei den Tumorgeweben ein höherer Anteil an stärkeren Anfärbungen beobachtet werden, im Vergleich zu den korrespondierenden Normalgeweben, welche vorwiegend die Anfärbungsgrade IHC 1+ und IHC 0 erreichten.

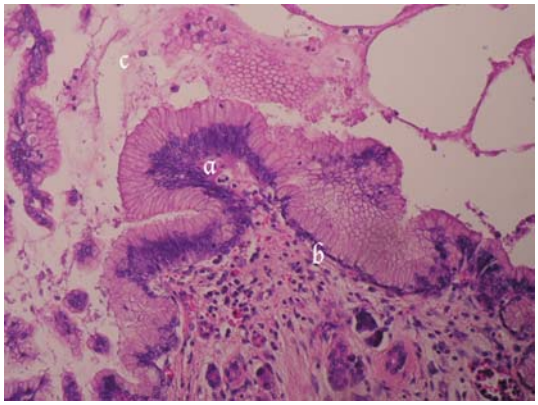
3.2.3. Anfärbung spezieller Tumorentitäten

3.2.3.1. Pankreas

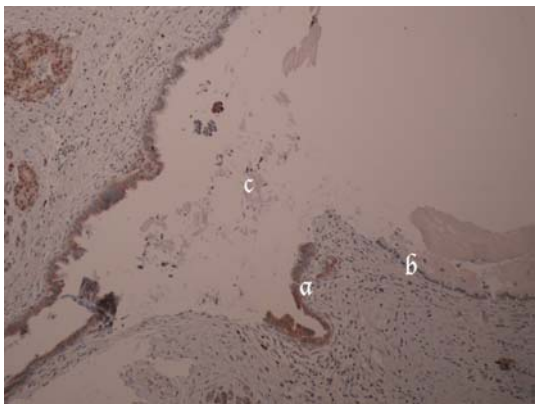
Nachdem sich bereits in den Pankreaskarzinomgeweben eine stärkere Anfärbung als im Normalgewebe gezeigt hatte, wurden auch Färbungen an pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN) unterschiedlicher Grade durchgeführt (Tabelle 9).

Studienprobe	Histologie	IHC Anfärbegrad
Pankreas 01	PanIN 3	3+
Pankreas 02	PanIN 3	3+
Pankreas 03	PanIN 1	3+
Pankreas 04	PanIN 1	1+
Pankreas 05	Akute Pankreatitis	3+

Tab. 9: Immunhistochemische Färbungen an Pankreasgeweben (PROC 1:5000, EnVision, DAB)

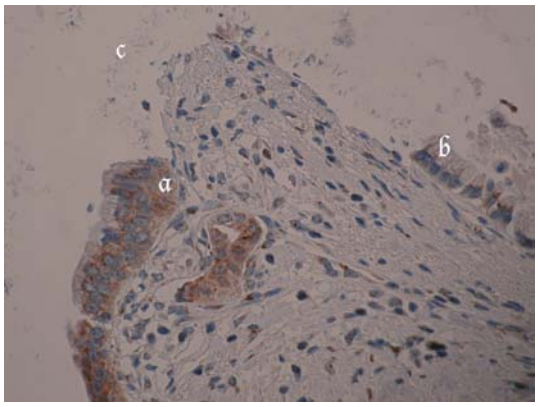


a) HE-Färbung, 200x
Pankreasgang (c) mit normalem Gangepithel (b) und pankreatischer intraepithelialer Neoplasie Grad 3 (a). *Studienprobe Pankreas 02*



b) proC-Färbung, 40x
Pankreasgang (c) mit normalem Gangepithel (b) und pankreatischer intraepithelialer Neoplasie Grad 3 (a). *Studienprobe Pankreas 02*

Abb. 15a-b: HE-Färbung (a) und proc-Färbung (b) an PanIN 3-Geweben (PROC 1:5000, EnVision, DAB)



c) proC-Färbung, 200x

Pankreasgang (c) mit normalem Gangepithel (b) und pankreatischer intraepithelialer Neoplasie Grad 3 (a). *Studienprobe Pankreas 02*

Abb. 15c: proc-Färbung an PanIN 3-Geweben (PROC 1:5000, EnVision, DAB)

3.2.3.2. Sarkome

Die morphologische Unterscheidung zwischen Sarkomen und Karzinomen kann in Einzelfällen anhand der routinemäßig durchgeführten HE-Färbung schwierig sein. Es wurden daher auch proc-Färbungen an Sarkomen durchgeführt, um einen Vorteil gegenüber der HE-Färbung zu evaluieren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10. dargestellt.

Studienprobe	Histologie	IHC Anfärbegrad
Sarkom 01	Neurogenes Sarkom	3+
Sarkom 02	GIST (Magen)	3+
Sarkom 03	GIST (Colon)	3+
Sarkom 04	Leiomyosarkom (Colon)	1+
Sarkom 05	Neurogenes Sarkom	2+
Sarkom 06	GIST (Rezidiv)	3+
Sarkom 07	GIST (Magen)	1+
Sarkom 08	Liposarkom	3+
Sarkom 09	Leiomyosarkom (Thoraxwand)	3+
Sarkom 10	Leiomyosarkom (Mamma-Metastase)	2+

Tab. 10: Immunhistochemische Färbungen an Sarkomen (PROC 1:5000, EnVision, DAB)

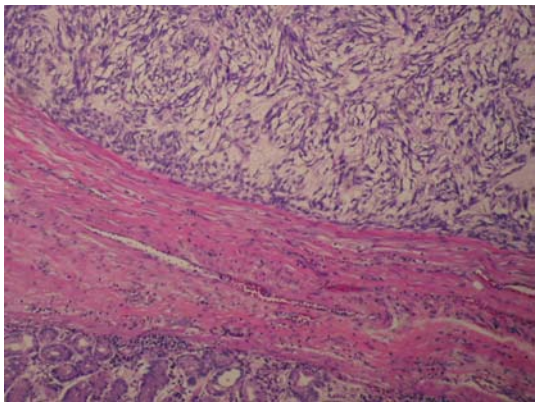


Abb. 16a) HE-Färbung, 200x
Gastointestinaler Stromatumor des Magens. *Studienprobe Sarkom 02*

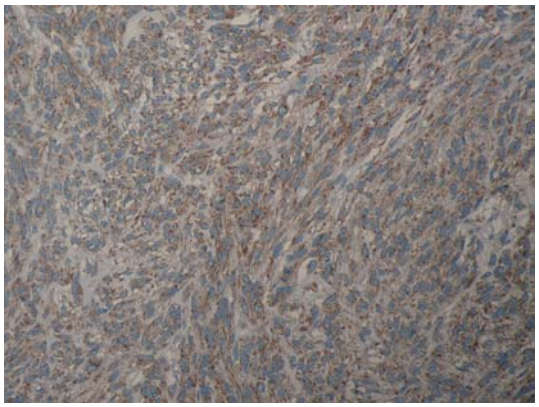


Abb. 16b) proC-Färbung, 200x
Gastointestinaler Stromatumor des Magens. *Studienprobe Sarkom 02*

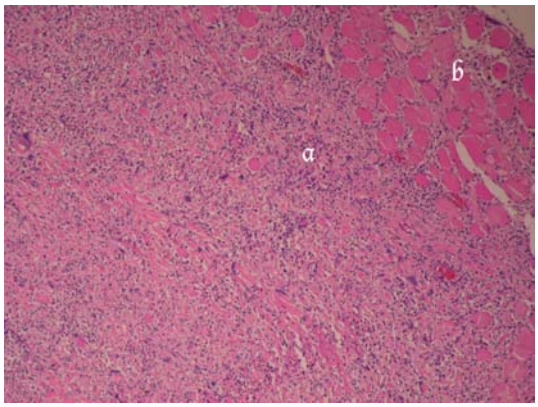


Abb. 16c) HE-Färbung, 200x
Leiomyosarkom (a) und Muskel (b). *Studienprobe Sarkom 09*

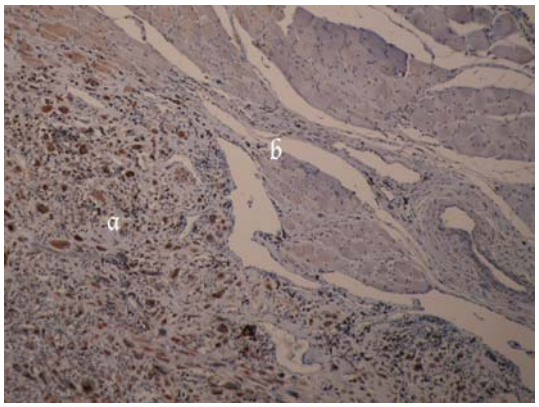


Abb. 16d) proC-Färbung, 200x
Leiomyosarkom (a) und Muskel (b). *Studienprobe Sarkom 09*

3.2.3.3. Neuroendokrine Tumoren (NET)

In mehreren Präparaten hatte sich eine starke Anfärbung von Ganglienzellen gezeigt, so dass abschließend auch neuroendokrine Tumoren mit proC gefärbt wurden (Tab. 11, Seite 51).

Studienprobe	Gewebe	IHC Anfärbungsgrad
NET 01	Dünndarm	3+
NET 02	Dickdarm	3+
NET 03	Lungenmetastase	3+
NET 04	Bronchus	3+
NET 05	Dünndarm	2+
NET 06	Dünndarm	3+
NET 07	Phäochromozytom	1+
NET 08	Dünndarm	3+
NET 09	Duodenum	3+
NET 10	Dickdarm	3+

Tab. 11: Immunhistochemische Färbungen an neuroendokrinen Tumoren (PROC 1:5000, EnVision, DAB)

Mit Ausnahme des Phäochromozytoms sowie einer Dünndarm-Studienprobe zeigte sich bei alle neuroendokrinen Tumoren eine deutliche Anfärbung ICH 3+.

4. Diskussion

4.1. Proteindetektion und Antikörpergeneration

Mit unterschiedlichen Verfahren werden derzeit Biomarker gesucht, die bei der Diagnose und Verlaufsbeobachtung von Tumoren eine frühzeitige und gezielte Therapieplanung ermöglichen sollen: RNA-Profiling mittels „serial analysis of gene expression“ (SAGE), DNA-Microarrays, Immunisierungen mit Tumorgewebe. Einen systematischen und umfassenden Ansatz stellt das Proteomics-Verfahren dar, wenngleich auch dieser Ansatz mit Einschränkungen verbunden ist. Mittels Proteomics-Analyse konnte zum Beispiel von der Fa. Matritech (www.matritech.com) das Protein NMP22 identifiziert werden, welches beim Blasenkarzinom hochreguliert ist und nun mittels eines speziell entwickelten Serumtests bestimmt werden kann.
In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der vorhandene Antikörper in der Lage ist, immunhistochemisch das Enzym Pyrrolin-5-Carboxylat-Reductase in verschiedenen Geweben und Tumorentitäten zu detektieren.

4.2. Validität der Ergebnisse

Die Immunhistochemie erlaubt im Gegensatz zur histologischen Färbung, bei denen Gewebestrukturen mit gleichen physikalischen oder chemischen Eigenschaften abgebildet werden können, die Darstellung von Zellen mit gleichen funktionellen Eigenschaften oder gleicher Histogenese über die Reaktion spezifischer Antigene.
Die zugrunde liegende Methode unterliegt jedoch einem erheblichen Fehlerpotential: Bereits im Rahmen der Präanalytik sind zahlreiche systematische und zufällige Fehler bei der Herstellung der Blöcke und Schnitte möglich, welche die Präzision der Ergebnisse deutlich beeinflussen. Darüber hinaus können sich Formalinfixierung und Entparaffinierung auf das Färbeergebnis auswirken.

Die Immunhistochemie ermöglicht eine qualitative aber nur semiquantitative Bewertung der Proteinexpression und deren zelluläre Lokalisation über eine visuell orientierte Skala. Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sind damit einer gewissen Variabilität unterworfen.
Durch Anwendung eines standardisierten Protokolls für sämtliche Schritte der Färbung sowie Mitführung von Negativ- und geeigneten Positiv-Kontrollen wurde versucht, die methodenbedingte Fehlerrate zu minimieren. Die Varianz in der subjektiven Interpretation des Färbegrades wurde durch unabhängige dreifache Bewertung und anschließende Bildung des Mittelwertes reduziert.

4.3. Nachweis von Pyrrolin-5-Carboxylat-Reductase im Tumorgewebe mittels des vorhandenen Antikörpers

Bereits 1980 gelang in Studien der Arbeitgruppe um HERZFELD und GREENGARD der Nachweis, dass in Adenokarzinomen des Kolons die Aktivität einzelner Enzyme mehrfach höher ist als in Normalgewebe. Als signifikant erhöht ($p<0,01$) konnte die Pyrrolin-5-Carboxylat-Reductase erkannt werden. Dabei ließen sich zwei Isoenzyme differenzieren: eine kältelabile und eine kältestabile Form. Die Aktivität der kältestabilen Isoform war im Kolonkarzinom nur unwesentlich höher als im Normalgewebe.
Die Enzymmessungen nach der spektroskopischen Methode von LOWRY et al. (1951), die auf einer Amid-abhängigen Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} beruhen, zeigten außerdem, dass die Enzymkonzentration in gering differenzierten Adenokarzinomen deutlich höher lag als in gut differenzierten Adenokarzinomen.
Für Routineuntersuchungen stellt das von HERZFELD et al. (1980) gebrauchte Nachweisverfahren einen deutlich zu hohen Aufwand dar. Nachdem die Untersuchungen mittels Proteomics und Western Blot die Pyrrolin-5-Carboxylat-Reductase erneut als deutlich überexprimiertes Enzym in kolorektalen Tumoren nachgewiesen hatten, wurde mit Unterstützung der Fa. Roche Diagnostics GmbH der vorliegende Antikörper generiert.
Immunhistochemisch konnte das Enzym in allen Tumorgeweben nachgewiesen werden. Darüber hinaus fand sich insbesondere in den kolorektalen

Tumorgeweben aber auch in den anderen Tumorgeweben eine stärkere Anfärbung im Tumor im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe, entsprechend einer höheren Enzymkonzentration. Die Anfärbung fand sich im Kolon, aber auch in den anderen Geweben stets im Zytoplasma.
Anhand unserer Untersuchungen konnte nicht geklärt werden, ob die Antikörperreaktion an beiden Isoformen des Enzyms stattfindet.

4.4. Spezifität der Antikörperreaktion für das kolorektale Karzinom

Die Pyrrolin-5-Carboxylat-Reductase ist ein nahezu ubiquitär vorkommendes Enzym (FUJII et al. 2001). Wir führten zur Beurteilung der Spezifität die Färbungen an einem Tissue-Micro-Array durch. Die Ergebnisse belegen deutlich, dass bei allen dargestellten Tumorentitäten die Anfärbung im Tumorgewebe intensiver war als im Normalgewebe. Somit liegt keine Spezifität für das kolorektale Karzinom vor. Dies führt zu zwei Schlussfolgerungen:

- Selbst wenn im Tumorgewebe die Enzymaktivität der Pyrrolin-5-Carboxylat-Reductase erhöht ist und dies auch zu einer Erhöhung der Serumkonzentration an Pyrrolin-5-Carboxylat-Reductase führen würde, könnte ein Rückschluß auf die Lokalisation des Primärtumors nicht erfolgen.
- Selbst wenn spezifisches kolorektales Gewebe, zum Beispiel aus Stuhluntersuchungen, gewonnen würde, könnte aufgrund der erhobenen Färbeergebnisse an Adenomen (siehe 4.5.) nach immunhistochemischer Färbung mit proC nicht auf ein Karzinom geschlossen werden.

In Einzelfällen stellt die Differenzierung zwischen schlecht differenzierten Karzinomen und Sarkomen eine diagnostische Schwierigkeit für den Pathologen dar. Die Anfärbungen der Sarkome haben jedoch keinen signifikanten Unterschied im Anfärbungsgrad zu den kolorektalen Karzinomen ergeben, so dass auch hier die proC-Färbung keine Vorteile bringt.

Die Proteinbiosynthese sowie die DNA-/RNA-Biosynthese sind im Zellwachstum deutlich erhöht. Dies gilt ganz besonders für die

Tumorentstehung und das Tumorwachstum (GOLF, 2001). Die Pyrrolin-5-Carboxylat-Reductase nimmt über die Bereitstellung von NADP+ für die Nukleinsäuresynthese eine zentrale Stellung bei der Proliferation ein. Dies erklärt den Nachweis des Enzyms in allen Tumorgeweben.

4.5. Eignung von Pyrrolin-5-Carboxylat-Reductase als Proliferationsmarker

p53 induziert den Reduktions/Oxidations-Stoffwechsel kontrollierende Gene und führt über oxidativen Stress zum Mitochondrienschaden.
Es kommt zur Ausschüttung von Caspasen, welche die Apoptose triggern.

Die p53-Mutation stellt in der Adenom-Karzinom-Sequenz nach FEARSON und VOGELSTEIN den Übergang in das invasive Karzinom dar. Während die Prolinoxidase von einem p53 induzierten Gen kodiert wird (DONALD et al., 2001), wird die Synthese der Pyrrolin-5-Carboxylat-Reductase nicht über diese Kaskade getriggert.
Speziell zur Beantwortung der Frage, ob sich die Enzymaktivität in der Entwicklung vom Adenom zum Karzinom verändert, wurden die Färbeversuche an unterschiedlichen Dysplasiegraden des Kolonadenoms durchgeführt. Bereits in den frühen Dysplasiestadien D1 zeigte sich ein starker Anfärbungsgrad IHC 3+ bei 100 Prozent der untersuchten Gewebe. Da sich in allen Untersuchungen stets eine stärkere Anfärbung im dysplastischen Gewebe im Vergleich zum Normalgewebe gezeigt hatte, ist somit davon auszugehen, dass die für die verstärkte Expression verantwortliche Reaktion spätestens am Anfang der Adenom-Karzinom-Sequenz auftreten muss. Somit ist eine Eignung der Pyrrolin-5-Carboxylat-Reductase als Proliferationsmarker nicht gegeben.

4.6. Eignung von Pyrrolin-5-Carboxylat-Reductase als Screening-Parameter

Einzelne Anfärbungen von zum Beispiel entzündlich veränderten Geweben haben ebenfalls eine starke Anfärbung IHC Grad 3+ gezeigt. Dies erklärt sich abermals über die gesteigerte Stoffwechselaktivität auch in inflammatorischen

Geweben. Dementsprechend ist die Eignung von Pyrrolin-5-Carboxylat-Reductase als Screening-Parameter ebenfalls nicht gegeben.

4.7. Weiterführende Untersuchungen

Wenngleich die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen keinen signifikanten Unterschied in der immunhistochemischen Anfärbung diverser Tumorentitäten mit einem Antikörper gegen Pyrrolin-5-Carboxylat-Reductase gezeigt haben, so sind dennoch zwei Fragestellungen zur Bedeutung der Pyrrolin-5-Carboxylat-Reductase bei Tumorpatienten offen geblieben:

- Zeigt sich – getriggert durch tumorbiologische Zellvorgänge wie beim Prostata-spezifischen Antigen – an der Serumkonzentration der Pyrrolin-5-Carboxylat-Reductase eine Möglichkeit zur Tumordiagnostik auf?
- Bietet der signifikante Konzentrationsunterschied zwischen Normal- und dysplastischen Geweben einen Ansatzpunkt für eine pharmakologische oder gentherapeutische Therapie?

4.7.1. Bedeutung von Serummarkerkonzentrationen

Das Prostata-spezifische Antigen (PSA) ist ein sowohl vom gesunden Prostataepithel als auch vom Prostatakarzinom produziertes, androgen-reguliertes Glykoprotein aus der Gruppe der Gewebe-Kallikreine. Diese stellen eine Subgruppe der Serin-Proteasen dar, deren codierende Gene auf Chromosom 19q13.4 lokalisiert sind (YOUSEF et al., 2003). Das PSA hat als Tumormarker einen hohen Stellenwert in der Diagnostik des Prostatakarzinoms (DIAMANDIS 1998).

PSA wird über ein Proenzym (proPSA) im Prostataepithel synthetisiert. Nach Abspaltung der N-terminalen sieben Aminosäuren entsteht in den Drüsengängen der Prostata aus proPSA das aktive Enzym. Nach Diffusion in die Blutbahn wird aktives PSA zügig durch Proteaseinhibitoren, vornehmlich alpha1-Antichmotrypsin gebunden. In den Drüsengängen wird ein Teil des aktiven PSA durch Proteolyse inaktiviert und zirkuliert nach Übertritt in die Blutbahn als freies PSA.

Im Prostatakarzinom finden sich unterschiedliche, enzymatisch inaktive, abgeschnittene Formen des PSA, welche im Vergleich zum aktiven PSA noch über ein bis fünf Aminosäuren am N-terminalen Ende verfügen und eine genauere Detektion des Karzinoms ermöglichen (Mikolajczyk et al., 2004).

PRETLOW et al. (1991) konnten zeigen, dass in resezierten Prostatakarzinomgeweben signifikant niedrigere PSA-Konzentration zu verzeichnen sind im Vergleich zu resezierten benignen Prostatahyperplasien. MAGKLARA et al. (2000) konnten mittels immunfluorometrischer Analysen zeigen, dass im Karzinomgewebe sogar eine signifikant niedrigere PSA-Konzentration zu verzeichnen ist im Vergleich zum umliegenden Normalgewebe der selben Patienten.

PSA kann Lys-Plasminogen zu biologisch aktiven Angiostatin-artigen Fragmenten umwandeln. In vitro-Studien haben nachgewiesen, dass diese Fragmente in der Lage sind, die Proliferation von humanen Endothelzellen mit der gleichen Effizienz wie Angiostatin - einem potenten Inhibitor von Angiogenese, Tumorwachstum und Metastasierung - zu inhibieren (HEIDTMANN et al., 1999)

Untersuchungen von STEGE et al. (2000) an 179 Patienten mit Prostatakarzinom haben einen Zusammenhang zwischen Tumorstadium, Gewebe-PSA-Level und Prognose aufzeigen können: Patienten mit einem Gewebe-PSA-Level < 0,192μg PSA/μg DNA hatten zu 93%, Patienten mit einem Gewebe-PSA-Level von 0,193-1,171μg PSA/μg DNA zu 15% und Patienten mit einem Gewebe-PSA-Level von >1,172μg PSA/μg DNA zu 0% im Beobachtungszeitraum eine Progression ihre Tumorleidens.

Die trotz erniedrigter PSA-Genexpression erhöhten PSA-Serumlevel bei Patienten mit Prostatakarzinom erklären sich über die tumorbiologischen Veränderungen des Drüsenkörpers: Der Verlust an Basalzellen, Basalmembran und die Zerstörung der Drüsenarchitektur resultieren sowohl in einer verminderten luminalen Verwertung des proPSA zu aktivem PSA und vor allem von aktivem PSA zu inaktivem PSA, als auch in einem im Vergleich zum Normalgewebe höheren proPSA-Austritt aus der Zelle. Es kommt daher zu einem Anstieg von proPSA – teilweise in den karzinomtypischen

abgeschnittenen Formen – und gebundenem PSA im Serum (BALK et al., 2003).
Am PSA lässt sich somit deutlich aufzeigen, dass Untersuchungen an nur einem Gewebetyp bzw. –kompartiment keinen sicheren Aufschluß über die potentielle Eignung eines Proteins als Tumormarker geben können.

Übertragen auf das hier untersuchte Enzym Pyrroline-5-Carboxylate-Reductase bedeutet dies, dass möglicherweise anhand von Konzentrationsanalysen im Serum eine Diskrimination zwischen Kolonadenom und Kolonkarzinom getroffen werden kann, weil karzinomtypische Organveränderungen, die einen erhöhten Übertritt des Enzyms erlauben, im Adenom noch nicht eingetreten sind.
BUCKHAULTS et al. (2001) haben mittels serieller Genexpressionsanalysen (SAGE) an gutartigen und malignen Kolorektalgeweben vor allem ein Protein, das Makrophagen-inhibierende Zytokin (MIC-1), identifiziert, welches die Kriterien für einen Tumormarker erfüllt und auch im Serum von Patienten mit kolorektalem Karzinom nachgewiesen werden konnte. Obwohl weitere Untersuchungen und insbesondere klinische Tests notwendig sind, wird durch diese Forschungsergebnisse der grundsätzliche Ansatz über Genexpressionsanalysen bzw. Proteomanalysen Markerkandidaten zu identifizieren und anschließend mittels Serumuntersuchungen zu validieren, bestätigt.

4.7.2. Pharmakologische Hemmung der Pyrrolin-5-Carboxylat-Reductase

In diploiden Zellen gibt es für jedes Gen zwei Allele. Diese Allele codieren für zwei unterschiedliche Polypeptidketten, welche unter günstigen Bedingungen gelelektrophoretisch voneinander getrennt werden können. Die Genprodukte dieser Allele können zum Beispiel unterschiedliche Substratumsatzraten oder Aktivitätszustände haben. Polypeptide, die durch unterschiedliche Allele des gleichen Genorts codiert werden, sind Alloenzyme.
Isoenzyme sind genetische Duplikationen im haploiden Genom. Die Genorte können auf einem Chromosom liegen oder auf mehrere verteilt sein. Die Genprodukte dieser Pseudoallele sind Isoenzyme, deren Vorkommen in der

Regel auf bestimmte Organe oder Entwicklungsstadien beschränkt ist. Die chemische und räumliche Differenzierung der Isoenzyme kann im Einzelfall schwierig sein. Da Isoenzyme bei ähnlicher oder identischer Spezifität eine unterschiedliche Molekularstruktur aufweisen, ist der Western-Blot häufig als Technik zur Diskremination einsetzbar.
Untersuchungen an infarzierten Rattenmyokardien haben gezeigt, dass die unterschiedlichen Isoenzyme der Proteinkinase C zu verschiedenen Zeitpunkten hochreguliert werden (SIMONIS et al., 2002). An kortikalen Neuronen konnte die Proteinkinase C-epsilon als bei dem durch oxidativen Stress induzierten Stoffwechselweg zum Zelltod hauptsächlich involvierte Isoform identifiziert werden (JUNG et al., 2004).

Der in dieser Untersuchung zur Anwendung gebrachte Antikörper scheint an beiden, von HERZFELD und GREENGARD (1980) beschriebenen Isoenzymen der Pyrrolin-5-Carboxylat-Reductase zu binden, wobei aufgrund der genannten Arbeiten vermutet werden kann, dass die im Vergleich zum Normalgewebe stärkere Anfärbung im Tumorgewebe auf die kältelabile Form zurückzuführen ist. Die pathophysiologische Bedeutung dieser Hochregulation besteht möglicherweise in der Stimulation des Hexosemonophosphat-Weges.

Weiterführende Untersuchungen sind notwendig, welche die Molekularstruktur des kältelabilen Isoenzyms der Pyrrolin-5-Carboxylat-Reductase entschlüsseln. Anschließend könnte an kolorektalen Tumorzellreihen der Effekt einer pharmakologischen Hemmung untersucht werden.
Darüber hinaus sind gentherapeutische Strategien zur Modulation der Pyrrolin-5-Carboxylat-Reductase-Aktivität denkbar: Kowalski et al. (2001) haben im Zusammenhang mit der Modulation von Chemoresistenzen unterschiedlicher Zellinien einen Ansatz beschrieben, bei welchem Ribozyme – spezifische riboendonukleolytische RNA-Moleküle – gegen die Transkripte von resistenzassoziierten Genen konstruiert werden, um die Transkripte zu inaktivieren.

5. Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom stellt mit ca. 60.000 Neuerkrankungen und etwa 25.000 tumorassoziierten Todefällen pro Jahr in Deutschland eine der häufigsten Tumorentitäten dar. Wenngleich in den letzten Jahren mit der Einführung der totalen mesorektalen Exzision, neuer Chemotherapeutika und neoadjuvanter Therapiealgorithmen große Fortschritte in der Behandlung des kolorektalen Karzinoms sowohl aus chirurgischer als auch aus internistisch-onkologischer Sicht gemacht worden sind, ist bisher kein molekularer Marker gefunden worden, der mit hoher Sensitivität und Spezifität Screeninguntersuchungen ermöglicht.

Die Genese des sporadischen kolorektalen Karzinoms ist multifaktoriell und bei ca. 80% der Fälle auf die Ausschaltung sogenannter Tumorsuppressorgene zurückzuführen; wenn beide Genallele defekt sind, fällt die tumorsupprimierende Genwirkung aus und die Zellen beginnen unkontrolliert zu wachsen, sterben nur verzögert ab und entwickeln die Fähigkeit des infiltrierenden und metastasierenden Wachstums. Dabei treten größere chromosomale Schäden auf, so dass dieser Entstehungsweg auch an Pathway der chromosomalen Instabilität (CIN) bezeichnet wird. In 15% der Fälle treten DNA-Schäden in sogenannten Mikrosatelliten auf, so dass dieser Entstehungsweg als Mikrosatelliteninstabilitäts-Pathway (MSI) benannt wird.

Mit großer Intensität wird heute nach neuen Tumor-Markerproteinen und prognotischen Parametern gesucht. Die seit einigen Jahren zur Verfügung stehende Proteomics-Technologie erlaubt die Analyse aller zu einem definierten Zeitpunkt vorliegenden Proteine einer Zelle. Der Vergleich der Proteinmuster von Tumorzellen mit denen von normalen Zellen ermöglicht die Identifizierung von Markerkandidaten.

In der vorliegenden Arbeit wurde durch Protemics-Untersuchungen an 23 Kolonkarzinomresektaten das Enzym Pyrrolin-5-Carboxylat-Reductase,

welches den letzten Schritt in der Prolinsynthese katalysiert, als potentieller Marker für das kolorektale Karzinom identifiziert.
Der daraufhin hergestellt Antikörper wurde zum immunhistochemischen Nachweis der Pyrrolin-5-Carboxylat-Reductase in den Kolonkarzinomgeweben, aber auch in 33 adenomatösen Vorläuferläsionen verwandt. Zudem wurden 219 Gewebeproben unterschiedlicher extra-intestinaler Tumoren mit korrespondierenden Normalgeweben mit dem Antikörper gefärbt.

Der Nachweis von Pyrrolin-5-Carboxylat-Reductase in Kolonkarzinomen gelang mit Hilfe des vorhandenen Antikörpers. Der Nachweis war jedoch nicht spezifisch für das kolorektale Karzinom, sondern fand sich in vielen Tumoren und Geweben mit vermehrter Stoffwechselaktivität.
Grundsätzlich fand sich in den dysplastischen und neoplastischen Geweben eine stärkere Expression als im Normalgewebe, verbunden mit einem höheren immunhistochemischen Anfärbungsgrad in der proC-Färbung.

Aufgrund der mangelnden Spezifität konnte ein Vorteil weder für die Qualität der Diagnostik noch der Therapie des kolorektalen Karzinoms gesehen werden. Allenfalls in Grenzfällen, zum Beispiel in der Unterscheidung normaler versus dysplastischer Melanozyten, könnte die Färbung einen diagnostischen Vorteil darstellen.

Weiterführende Untersuchungen zum Nachweis von Pyrrolin-5-Carboxylat-Reductase im Serum von Tumorpatienten sowie Untersuchungen zur pharmakologischen Hemmung des kältelabilen Isoenzyms in Tumorzellreihen sind notwendig.

6. Literaturverzeichnis

Adenis A., Bonneterre J., Pion J.M., Degardin M., Horner D., Unexpected fatal toxicity related to low dose leucovorin with 5-fluorouracil treatment in metastatic colorectal cancer, Ann Oncol 1993; 4:174-175

Allgayer H., Heiss M.M., Höfler H., Neue Prognosefaktoren beim gastrointestinalen Karzinom, MANUAL Gastrointestinale Tumoren 2001by Tumorzentrum München

Aral B., Kamoun P., The proline biosynthesis in living organisms, Amino Acids 1997; 13: 189-217

Balk S.P., Ko Y.-J., Bubley G.J., Biology of Prostate-Specific Antigen, J Clin Oncol 2003; 21(2): 383-391

Bares R., Fass J., Truong S., Buell U., Schumpelick V., Radioimmunoscintigraphy with 111In labelled monoclonal antibody fragments (F(ab´)2 BW 431/31) agaoinst CEA: radiolabelling, antibody kinetics, and distribution, findings in tumour and non-tumour patients, Nucl Med Commun 1989; 10: 627-641

Bergers G., Benjamin L.E., Tumorigenesis and the angiogenic switch, Nature reviews 2003; 3:401-410

Bleiberg H., Role of chemotherapy for advanced colorectal cancer: new opportunities, Semin Oncol 1996; 23(Suppl 3): 42-50

Bourne J.A., Handbuch I der Immunperoxidase-Färbemethoden, DAKO Corporation

Buckhaults P., Rago C., St. Croix B., Romans K.E., Saha S., Zhang L., Vogelstein B., Kinzler K.W., Secreted and cell surface genes expressed in benign and malignant colorectal tumors, Cancer Res 2001; 61: 6996-7001

Chen C.D., Yen M.F., Wang W.M., Wong J.M., Chen T.H., A case-cohort study for the disease natural history of adenoma-carcinoma and de novo carcinoma and surveillance of colon and rectum after polypectomy: implication for efficacy of colonoscopy, Br J Cancer 2003; 88(12): 1866-73

D´Amico S., Gerday C., Feller G., Structural Determinants of Cold Adaption and Stability in a Large Protein, J Biol Chem 2001; 276(28): 25791-96

Deutsche Krebsgesellschaft: Kurzgefasste Interdiziplinäre Leitlinien 2002, 3. Auflage 2002

Dorn-Beineke A., Tumormarker – Begriffsdefinition, 2000 http://www.ma.uni-heidelberg.de/inst/ikc

Donald S.P., Sun X.-Y., Hu C.-A. A., Yu J., Mei J.M., Valle D., Phang J.M., Proline Oxidase encoded by p53-induced Gene-6 catalyzes the Generation of Proline-dependent Reaktive Oxigen Species, Cancer Res 2001; 61: 1810-1815

Dougherty K.M., Brandriss M.C., Valle D., Cloning human pyrroline-5-carboxylate reductase cDNA by complementation in Saccharomyces cerevisiae, J Biol Chem 1992; 267(2): 871-5

Ekbom A., Helmick C., Zack M., Adami H.O., Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study, N Engl J Med 1990; 323: 1228-1232

Fass J., Die Wundheilungsstörung in der Chirurgie des colo-rectalen Carcinoms – Eine multifaktorielle Computeranalyse, Langenbecks Arch Chir 1985; 367: 63-73

Fass J., Bares R., Reinarzt R., Braun J., Hauptmann B., Schumpelick V., Die Radioimmunszintimetrie zur intraoperativen Lymphknotendiagnostik beim colorektalen Karzinom, Langenbecks Arch Chir 1993; 378: 115-120

Fearon E.R., Vogelstein B., A genetic model for colorectal tumorigenesis, Cell 1990; 61(5): 759-67

Ferlay J., Bray F., Pisani P., Parkin D.M., GLOBOCAN 2000: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, IARCPress Lyon 2001; http://wwwdep.iarc.fr/globocan/globocan.html

Fielding L.P., Arsenault P.A., Chapuis P.H., Dent O., Gathringht B., Hardcastle J.D., Hermanek P., Jass J.R., Newland R.C., Clinicopathological staging for colorectal cancer: an International Documentation System (IDS) and an International Comprehensive Anatomical Terminology (ICAT), J Gastroenterol Hepatol 1991; 6(4): 325-44

Fleming G.A., Hagedorn C.H., Granger A.S., Phang J.M., Pyrroline-5-

carboxylate in human plasma, Metabolism 1984; 33(8):739-42

Flynn M.P., Martin M.C., Moore P.T., Stafford J.A., Fleming G.A., Phang J.M., type II hyperprolinaemia in a pedigree of Irish travellers, Arch Dis. Child. 1989; 64: 1699-1707

Fujii T., Mukaihara M., agematu H., Tsunekawa H., Biotransformation of L-Lysine to L-Pipecolic Acid Catalyzed by L-Lysine 6-Aminotransferase and Pyrroline-5-carboxylate Reductase, Biosci. Biotechnol. Biochem. 2003; 66(3): 622-27

Golf S.W., Über die Bedeutung von Magnesium bei der Tumorgenese, J Mineralstoffw 2001; 8(2): 33-43

Habermann A.B., Advances in expression proteomics technology, Spectrum, Drug Discovery and Design 2001, Decision Resources Inc.

Hagedorn C.H., Phang J.M., Catalytic transfer of hybride ions from NADPH to oxygen by the interconversions of proline and delta 1-pyrroline-5-carboxylate, Arch Biochem Biophys. 1986; 248(1): 166-74

Hare P.D., Cress W.A., Tissue-specific accumulation of transcript encoding delta1-pyrroline-5-carboxylate reductase in Arabidopsis thaliana, Plant Growth Regulation 1996; 19: 249-256

Haubitz M., Fliser D., Haller H., Proteomanalyse – eine neue Perspektive für die klinische Diagnostik, Dtsch Arztebl 2004; 101(21): 1514-1517

Heidtmann H.-H., Nettelbeck D.M., Mingels A., Jäger R., Welker H.-G., Kontermann R.E., Generation of angiostatin-like fragments from plasminogen by prostate-specific antigen, Br J Cancer 1999; 81: 1269-1273

Hermanek jr. P., Wiebelt H., Riedl S., Staimmer D., Hermanek P., Langzeitergebnisse der chirurgischen Therapie des Kolonkarzinoms, Ergebnisse der SGKRK, Chirurg 1994; 65: 287-97

Herzfeld A., Legg M.A., Greengard O., Human colon tumors: enzymic and histological characteristics, Cancer 1978; 42(3): 1280-3

Herzfeld A., Mezl V.A., Knox W.E., Enzymes metabolizing delta1-pyrroline-5-carboxylate in rat tissues, Biochem J 1977; 166(1): 95-103

Herzfeld A., Greengard O., Enzyme activities in human fetal and neoplastic

tissues, Cancer 1980; 46(9): 2047-54

Herzfeld A., Raper S.M., Enzymes of ornithine metabolism in adult and developing rat intestine, Biochim Biophys Acta 1976; 428(3): 600-10

Hruban R.H., Adsay N.V., Albores-Saavedra J., Compton C., Garrett E.S., Goodman S.N., Kern S.E., Klimstra D.S., Kloppel G., Longnecker D.S., Luttges J., Offerhaus G.J., Johan A., Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions, Am J Surg Pathol 2001; 25(5): 579-586

Hua X., van de Cotte B., Van Montagu M., Verbruggen N., A 69bp fragment in the pyrroline-5-carboxylate reductase FEBS Letters 1999; 458: 193-6

Huber L.A., Is proteomics heading in the wrong direction? Nature Reviews 2003; 4: 74-80

International Union of Biochemistry and Molecular Biology, http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb

Jain R.K., Tumor angiogenesis and accessibility: role of vascular endothelial growth factor, Seminars in Oncology 2002; 29(6) Supp.16: 3-9

Jemal A., Thomas A., Murray T. Thun M., Cancer Statistics 2002, CA Cancer J Clin 2002;52: 23-47

Jung Y.S., Ryu B.R., Lee B.K., Mook-Jung I., Kim S.U., Lee S.H., Baik E.J., Moon C.H., Role of PKC-epsilon in neuronal death induced by oxadative stress, Biochem Biophys Res Commun 2004; 320(3): 789-794

Kama N.A., Kologlu M., Reis E., Doganay M., Atli M., Dolapci M., A prognostic score for colorectal carcinomas, Hepatogastroenterology 2003; 50(53): 1356-1361

Kapiteijn E., Marijnen C.A.,Colenbrander A.C., Klein Kranenbarg E., Steup W.H., van Krieken J.H., van Houwelingen J.C., Leer J.W., van de Velde C.J., Locan recurrence in patients with rectal cancer diagnosed between 1988 and 1992: A population-based study in the west Netherlands, Eur J Surg Oncol 1998; 24: 528-535

Kenklies J., Ziehn R., Fritsche K., Pich A., Andreesen J.R., Proline biosynthesis from l-ornithine in Clostridium sicklandii: purification of delta 1-pyrroline-5-carboxylate reductase, and sequence and expression of the encoding

gene, proC, Microbiology 1999; 145: 819-26

Kowalski P., Wichert A., Hom P.S:, Dietel M., Lage H., Selection and charaterization of a high-activity ribozyme directed against the antineoplastic drug resistance-associated ABC-transporter BCRP/MXR/ABCG2, Cancer Gene Ther 2001; 8(2): 185-192

Krebsinformationsdienst des Deutschen Krebsforschungszentrums Heidelberg, Tumormarker, http://www.krebsinformation.de/body_tumormarker.html

Kullmann F., Karzinogenese und hereditäre Kolonkarzinome, Internist 2003; 44: 254-267

Lane D.P., p53, guardian of the genome, Nature 1992; 358:15-16

Lengauer C., Kinzler K.W., Vogelstein B., Genetic instabilities in human cancers, Nature 1998; 396: 643-649

Löffler G., Petrides P.E., Biochemie und Pathobiochemie, 6. Auflage Springer Verlag Berlin 1998

Lowry O., Rosenbrough A., Farr A., Randall R., J Biol Chem 1951; 193: 265

Lynch H.T., de la Chapelle A., Hereditary colorectal cancer, N Engl J Med 2003; 348(10): 19-32

Magklara A., Scorilas A., Stephan C., Kristiansen G.O., Hauptmann S., Jung K., Diamandis E.P., Decreased concentrations of prostate-specific antigen and human glandular kallikrein 2 in malignant versus nonmalignant prostatic tissue, Urology 2000; 56: 527-532

Maxwell S.A., Davis G.E., Differential gene expression in p53-mediated apoptosis-resistant vs. Apoptosis-sensitive tumor cell lines, Proc Natl Acad Sci 2000; 97(24): 13009-13014

Maxwell S.A., Rivera A., Proline oxidase induces apoptosis in tumor cells, and ist expression is frequently absent or reduced in renal carcinomas, J Biol Chem 2003; 278(11): 9784-9789

Micheli A., Mugno E., Krogh V. et al and the EUROPREVAL Working Group, Cancer prevalence in European registry areas, Ann Oncol 2002; 13(6): 840-865

Mikolajczyk S.D., Catalona W.J., Evans C.L., Linton H.J., Millar L.S., Marker K.M., Katir D., Amirkhan A., Rittenhouse H.G., Proenzyme forms of

prostate-specific antigen in serum improve the detection of prostate cancer, J Clin Chem 2004; 50: 1017-1025

Miltyk W., Palka J.A., Potential role of pyrrolin-5-carboxylate in regulation of collagen biosynthesis in cultured human skin fibroblasts, Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 2000; 125(2): 265-271

Misener S.R., Walker V.K., Complementation cloning and characterization of the pyrroline 5-carboxylate reductase gene from Drosophila melanogaster, Biochem Genet 2001; 39(1-2): 15-31

Muto T., Bussey H.J.R., Morson B.C., The evolution of cancer of the colon and rectum, Cancer 1975; 36: 2251-70

Naish S.J., Handbuch II immunchemischer Färbemethoden, DAKO Corporation

Offit K., Genetic prognostic markers for colorectal cancer, N Engl J Med 2000; 342: 124-125

O´Riordan S., Baker A.J., Sherwood R.A., Isoenzyme characterization in isolated elevation of alkaline phosphatase after liver transplantation in children, Transplantation 2002; 74(7): 1030-1034

Phang J.M., Downing S.J., Yeh G.C., Smith R.J., Williams J.A., Hagedorn C.H., Stimulation of the hexosemonophasphate-pentose pathway by pyrroline-5-carboxylat-reductase in cultured cells, J Cell Physiol. 1982; 110(3): 255-61

Polyak K., Xia Y., Zweier J.L., Kinzler K.W., Vogelstein B., A model for p53-induced apoptosis, Nature 1997; 389: 300-305

Poon T. C. W., Johnson P.J., Proteome analysis and its impact on the discovery of serological tumor markers, Clinica Chimica Acta 2001; 313: 231-239

Pox C., Schulmann K., Schmiegel W., Konventionelles und molekulares Screening (Stuhltests), Internist 2002; 44: 287-293

Pretlow T.G., Pretlow T.P., Yang B., Kaetzel C.S:, Delmoro C.M., Kamis S.M., Bodner D.R., Kursh E., Resnick M.I., Bradley E.L. jr., Tissue concentrations of prostate-specific antigen in prostatic carcinoma and benign prostatic hyperplasia, Int J Cancer 1991; 49(5): 645-649

Puig-La Calle J., Guillem J.G., Genetics, Screening and Chemprevention, in: Modern Management of Cancer of the Rectum (R.A. Audisio, J.G.

Geraghty und W.E. Longo eds.) Springer Verlag Berlin 2002

Reifferscheid M., Fass J., Hartung R., Mittermayer Ch., Besondere Aspekte des Rechtscoloncarcinoms, Langenbecks Arch Chir 1987; 371: 193-200

Reinartz J.J., Cancer Genes, The Molecular Basis of Human Cancer (W.B. Coleman und G. J. Tsongalis eds.), Humana Press Inc., Totowa, NJ

Robert-Koch-Institut, Entwicklung der Überlebensraten von Krebspatienten in Deutschland, 1999

Romanello M., Padoan M., Franco L., Veronesi V., Moro L., D´Andrea P., Extracellular NAD(+) induces calcium signaling and apoptosis in human osteoblastic cells, Biochem Biophys Res Commun 2001; 285(5): 1226-31

Rougier P., Neoptolemos J.P., The need for a multidisciplinary approach in the treatment of advanced colorectal cancer: A critical review from a medical oncologist and surgeon, Eur J Surg Oncol 1997; 23: 385-396

Rüschoff J., Roggendorf B., Brasch F., Mathiak M., Aust D.E., Mueller W., Poremba C., Kloor M., Keller G., Muders M., Blasenbreu-Vogt S., Rümmele P., Müller A., Büttner R., Molekularpathologische Diagnostik beim erblichen Dickdarmkarzinom – Empfehlungen und Resultate aus dem Verbundprojekt der Deutschen Krebshilfe „Krebsvorsorge und Krebsfrüherkennung beim Familiären Dickdarmkrebs“, Pathologe 2004; 25(3): 178-192

Samuels S.E., Acton K.S., Ball R.O., Pyrroline-5-Carboxylate Reductase and Prolin Oxidase Activity in the Neonatal Pig, J. Nutr. 1989; 119: 1999-2004

Schmiegel W., Pox C., Adler G., Fleig W., Folsch U.R., Fruhmorgen P., Graeven U., Hohenberger W., Holstege A., Junginger T., Kuhlbacher T., Porschen R., Propping P., Riemann J.F., Sauer R., Sauerbruch T., Schmoll H.J., Zeitz M., Selbmann H.K., S3-Guidelines Conference „Colorectal Carcinoma“ 2004, Z Gastroenterol 2004; 42(10): 1129-77

Schulz T., Degen G., Foth H., Kahl R., Kramer P.-J., Lilienblum W., Schrenk D., Schweinfurth H., Zur Bedeutung von genetischen Polymorphismen von Fremdstoff-metabolisierenden Enzymen in der Toxikologie, Umweltmed Forsch Prax 2002; 7(4): 232-246

Scriver C.R., Disorders of proline and hydroxyproline metabolism, in: The Metabolic basis of inhertied disease (J.B. Stanbury, J.B. Wyngaarden und D.S. Fredrickson, eds.) McGraw-Hill Book Company, New York 1978

Shelton A.A., Wong W.D., Colorectal cancer, in: J.L. Cameron, Current surgical therapy, sixth edition, Mosby, St. Louis Missouri, 1998

Shiono T, Kador P.F., Kinoshita J.H., Stimulation of the Hexose Monophosphate Pathway by Pyrroline-5-Carboxylat-Reductase in the Lens, Exp. Eye Res. 1985; 41: 767-775

Siewert J.R., Fink U., Multimodale Therapiekonzepte bei Tumoren des Gastrointestinaltraktes, Chirurg 1992; 63(4): 242-250

Simonis G., Honold J., Schwarz K., Braun M.U., Strasser R.H., Regulation of the isoenzymes of protein kinase C in the surviving rat myocardium after myocardial infarction: distinct modulation for PKC-alpha and for PKC-delta, Basic Res Cardiol 2002; 97(3): 223-231

Slade N., Storga-Tomic D., Birkmayer G.D., Pavelic K., Pavelic J., Effect of extracellular NADH on human tumor cell proliferation, Anticancer Res 1999; 19(6B): 5355-60

Statistisches Bundesamt, Gesundheitsbericht für Deutschland 1998

Stege R., Grande M., Carlström K., Tribukait B., Pousette A., Prognostic significance of tissue prostate-specific antigen in endocrine-treated prostate carcinomas, Clin Cancer Res 2000; 6: 160-165

Sugiyama H., Kashihara N., Makino H., Yamasaki Y., Ota Z., Reactive oxygen species induce apoptosis in cultured human mesangial cells, J Am Soc Nephrol 1996; 7(11): 2357-63

Towler B., Irwig L., Glaziou P., Kewenter J., Weller D., Silagy C., A systematic review of the effects of screening for colorectal cancer using the faecal occult blodd test, hemoccult, BMJ 1998; 317: 559-565

Turoldo A., Balani A., Scaramucci M., Pistan V., Roseano M., Liguori G., Preoperative CEA: prognostic significance in colorectal carcinomas, Tumori 2003; 89(4 Suppl.): 95-97

Verbruggen N., Villarroel R., Van Montagu M., Osmoregulation of a Pyrroline-5-Carboxylate reductase Gene in Arabidopsis thaliana, Plant Physiol 1993;

103: 771-781

Vogelstein B., Fearon E.R., Hamilton S.R., Kern S.E:, Preisinger A.C., Leppert M., Nakamura Y., White R., Smits A.M., Bos J.L., Genetic alterations during colorectal-tumor development, N Engl J Med 1988; 319: 525-32

Wang T.-L., Rago C., Silliman N., Ptak J., Markowitz S., Willson J.K.V., Parmigiani G., Kinzler K.W., Vogelstein B., Velculescu V.E., Prevalence of somatic alterations in the colorectal cancer cell genome, Proc Natl Acad Sci 2002; 99(5): 3076-3080

Wakabayashi Y., Tissue-selective expression of enzymes of arginine synthesis, Curr Opin Clin Nutr Metab Care 1998; 1(4): 335-339

Welzel T.M., Vick C., Reiser M., Göke B., Pankreaskarzinom: Präzisierung der Diagnostik zur weiteren Therapieplanung, Chirurg 2003; 74: 171-182

Winawer S.J., Zauber A.G., Ho M.N., O´Brien M.J., Gottlieb L.S., Sternberg S.S., Waye J.D., Schapiro M., Bond J.H., Panish J.F. et al., Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Poly Study Workgroup, N Engl J Med. 1993; 329(27): 1977-81

World Cancer Research Fund – American Institute for Cancer Research, Washington DC, Food, nutrition and the prevention: a global perspective, 1997

Yeh G.C., Harris S.C., Phang J.M., Pyrrolin-5-Carboxylat-Reductase in human erythrocytes, J Clin Invest 1981; 67: 1042-46

Yu J., Zhang L., Hwang P.M., Rago C., Kinzler K.W., Vogelstein B., Identification and classification of p53-regulated genes, Proc Natl Acad Sci 1999; 96(25): 14517-14522

LEBENSLAUF

Persönliche Daten

Kia Homayounfar

Geburtsdatum: 07. Juli 1972 in Göttingen

verheiratet, eine Tochter

Anschrift: Kia Homayounfar
Rosdorfer Weg 11a
37073 Göttingen

Arbeitsstelle

Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie
Direktor: Prof. Dr. med. J. Faß
Klinikum Kassel GmbH
Mönchebergstrasse 41-43
34125 Kassel

Ausbildung

29.5.1991	Abitur am Hainberg-Gymnasium Göttingen
9.9.1992	Immatrikulation an der Georg-August-Universität Göttingen im Fach Humanmedizin
28.9.1994	Physikum
1.3.-31.3.1995	Famulatur am Univ.-Klinikum Göttingen, Abt. Röntgendiagnostik

19.9.1995	Erstes Staatsexamen
5.2.-1.3.1996	Famulatur am Univ.-Klinikum Göttingen, Abt. Unfallchirurgie
15.7.-16.8.1996	Famulatur am Univ.-Klinikum Wien, Abt. Neonatologie
19.8.-13.9.1996	Famulatur am Univ.-Klinikum Göttingen, Abt. Unfallchirurgie
10.3.-21.3.1997	Famulatur am Univ.-Klinikum Göttingen, Abt. Kardiologie
20.3.1998	Zweites Staatsexamen
20.4.-9.8.1998	Wahltertial am NLKH Tiefenbrunn, Abt. Psychosomatik
10.8.-29.11.1998	Internistisches Tertial am Univ.-Klinikum Göttingen, Abt. Kardiologie, Gastroenterologie und Onkologie
30.11.98-21.3.99	Chirurgisches Tertial am Univ.-Klinikum Göttingen, Abt. Thorax-Herz- und Gefäßchirurgie sowie an der Medical School der University of Wisconsin-Madison, U.S.A., Division General Surgery and Transplant Surgery
4.5.1999	Drittes Staatsexamen
1.9.99-28.2.2001	Arzt im Praktikum an o.g. Klinik
1.3.2001	Approbation als Arzt, seither Assistenzarzt an o.g. Klinik
1.1.2003	Mitglied der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie
4.5.2005	Facharzt für Chirurgie

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen/Herren

in Göttingen:

Brunner
Christ
Dalichau
Dunkelberg
Feldmann
Gottschalk
Hasenfuss
Henning
Herken
Hustert
Jungermann
Knabe
Knepel
Kochen
König
Kuhn
Markakis
Nagel
Neumann
Oestmann
Pohlmeier
Post
Quentin
Radzun
Richter
Rickmann
Ringert
Rüther
Saternus
Schmidt
Schröter
Stalder
Steiner
Thomssen
Tröhler
Zeeck

in Madison:

Mack
Sollinger

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Jürgen Fass und Herrn Prof. Dr. med. Josef Rüschoff für die Überlassung des Themas und Herrn Prof. Dr. med. Josef Rüschoff insbesondere für die herzliche Aufnahme in seinem Institut. Die Begeisterung für das Fach Pathologie war in jeder Begegnung spürbar und hat merklich abgefärbt.

Herrn Dr. rer. nat. Thomas Henkel dank ich für die visionären und engagierten Diskussionen und die freundliche Betreuung in seinem Team. Diese Begegnung hat einen großen Einfluss auf meine Vorstellung von wissenschaftlicher (Team)arbeit ausgeübt.

Frau Dr. rer. nat. Gabriele Westphal danke ich sehr für die stete Unterstützung sowohl bei der Herstellung der Schnitte und immunhistochemischen Färbungen wie auch bei der Aneignung wissenschaftlicher Arbeitstechniken.

Herrn Dr. med. Manfred Hofmann gilt mein spezieller Dank für die intensive freundschaftliche Begleitung und Beratung, seine fundierte Unterstützung bei der Befundung der Präparate und die ständige Motivation.

Für die tatkräftige Unterstützung im immunhistochemischen Labor danke ich stellvertretend für alle technischen Assistentinnen Frau Herma Bergbauer.

Ein herausragender Dank gilt aber meiner Familie, allen voran meinen Eltern und meiner Frau Nicole. Mit viel Liebe, Zeit und Geduld haben sie mich immer begleitet, unterstützt, angespornt und mir den Weg zu dieser Arbeit ermöglicht.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Gewebeexpression von Pyrrolin-5-Carboxylat-Reductase: Ein durch Proteomics detektierter potentieller Tumormarker für das kolorektale Karzinom“ in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie sowie im Institut für Pathologie der Klinikum Kassel GmbH unter Leitung von Herrn Professor Dr. med. Jürgen Fass und Herrn Professor Dr. med. Josef Rüschoff mit Unterstützung durch Frau Dr. rer. nat. Gabriele Westphal, Herrn Dr. med. Manfred Hofmann sowie Herrn Dr. rer nat. Thomas Henkel ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Göttingen, den 01. August 2005