

**Aus der Klinik für Chirurgie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. H.-P. Bruch**

**Vergleich der pKi-67 Protein- mit der pKi-67 mRNA-
Expression mittels Immunhistologie und Realtime
RT-PCR in kolorektalen Karzinomen**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Thomas Ihmann
aus Lübeck

Lübeck 2004



1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Rainer Broll
2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Johannes Gerdes

Tag der mündlichen Prüfung: 08.10.2004
Zum Druck genehmigt, Lübeck, den 08.10.2004

gez. Prof. Dr. med. Peter Dominiak
- Dekan der Medizinischen Fakultät -

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	1
1 EINLEITUNG.....	2
1.1 ALLGEMEINES	2
1.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE ASPEKTE ZUM KOLOREKTALEN KARZINOM.....	3
1.3 DAS KI-67 ANTIGEN.....	4
1.3.1 Charakterisierung von pKi-67	4
1.3.2 Funktion von pKi-67	6
1.3.3 Relevanz von pKi-67 in Hinblick auf die Prognose	9
1.4 POLYMERASEKETTENREAKTION.....	10
1.4.1 Quantitative PCR.....	10
1.4.2 Real-Time Quantitative PCR	12
1.4.3 Verwendung von Standards als Hilfsmittel zur Quantifizierung	13
1.5 FRAGESTELLUNG	15
2 PATIENTEN, MATERIAL & METHODEN	17
2.1 PATIENTEN.....	17
2.2 RNA ISOLIERUNG.....	17
2.3 REVERSE TRANSKRIPTION	20
2.4 AGAROSEGELELEKTROPHORESE	20
2.5 QUANTITATIVE PCR.....	22
2.5.1 Primerdesign für die Polymerasekettenreaktion.....	24
2.5.1.1 Primerdesign für das Zielgen pKi-67	24
2.5.1.2 Primer für Kontrollgen β -Aktin	26
2.5.2 PCR Parameter.....	26
2.6 IMMUNHISTOLOGIE.....	28
2.6.1 Allgemeines	28
2.6.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	28
2.6.3 Färbung des pKi-67 Antigens	29
2.6.4 Bestimmung des pKi-67 Markierungsindex.....	32
2.7 STATISTISCHE METHODEN	33
2.7.1 Überlebenszeitanalyse	33
2.7.1.1 Kaplan-Meier-Methode	34
2.7.1.2 Cox Regression	34
2.7.2 Berechnung der Signifikanzen.....	35

3	ERGEBNISSE.....	36
3.1	CHARAKTERISIERUNG DER PATIENTENGRUPPE	36
3.1.1	<i>Allgemeine Charakterisierung</i>	36
3.1.2	<i>Alters- und Geschlechtsverteilung</i>	36
3.1.3	<i>Charakterisierung mittels histopathologischer Parameter</i>	37
3.1.3.1	Charakterisierung mittels klinischer Parameter	39
3.2	BESTIMMUNG DER GRÖÖE DER WACHSTUMSFRAKTION	40
3.3	BESTIMMUNG DER PKI-67 mRNA.....	44
3.3.1	<i>Allgemeines</i>	44
3.3.2	<i>Expressionsstärke von pKi-67 mRNA im Vergleich zu β-Aktin.....</i>	44
3.3.3	<i>pKi-67 mRNA Gehalt.....</i>	45
3.4	ÜBERLEBENSZEITEN UND PKI-67 GEHALT	47
3.4.1	<i>Univariate Überlebenszeitanalysen</i>	48
3.4.2	<i>Überlebenszeitanalyse mittels Kaplan-Meier-Methode.....</i>	50
3.4.3	<i>Überlebenszeitanalysen mittels Cox-Regression.....</i>	53
4	DISKUSSION	55
4.1	UNTERSCHIEDLICHE MODELLE ZUR QUANTIFIZIERUNG VON mRNA.....	55
4.1.1	<i>Northern Blotting.....</i>	55
4.1.2	<i>Nuclease Protection Assays (NPA)</i>	55
4.1.3	<i>In-situ Hybridisierung (ISH).....</i>	56
4.1.4	<i>Methoden der quantitativen PCR.....</i>	56
4.1.4.1	Quantitative PCR ohne Standard.....	57
4.1.4.2	Quantitative PCR mit Standard	57
4.1.4.3	Quantitative kompetitive PCR.....	57
4.1.4.4	Echtzeitbestimmung.....	58
4.2	PROGNOSTISCHE FAKTOREN	59
4.2.1	<i>Prognostische Faktoren und ihre Anwendung bei Malignomen</i>	59
4.2.2	<i>Prognostische Faktoren bei kolorektalen Karzinomen</i>	61
4.2.3	<i>Verwendung von pKi-67 als prognostischer Faktor</i>	63
4.2.4	<i>pKi-67 Expression in kolorektalem Gewebe</i>	64
4.3	DISKUSSION DER EIGENEN ERGEBNISSE	66
4.3.1	<i>Beurteilung der Alters- und Geschlechtsverteilung.....</i>	66
4.3.2	<i>Beurteilung der 5-Jahres-Überlebenszeiten.....</i>	66
4.3.3	<i>Beurteilung der Methoden zur Quantifizierung</i>	67
4.3.4	<i>Beurteilung der Ergebnisse.....</i>	68
4.4	AUSBLICK.....	73

5	ZUSAMMENFASSUNG	74
6	CHEMIKALIENLISTE.....	75
6.1	NÄHRMEDIEN UND LÖSUNGEN	75
6.1.1	<i>Lösungen</i>	75
6.2	ANTIKÖRPER.....	76
6.3	PCR MATERIALIEN.....	76
6.4	CHEMIKALIEN UND GERÄTE.....	77
6.4.1	<i>Chemikalien</i>	77
6.4.2	<i>Geräte</i>	78
7	LITERATURVERZEICHNIS	79
8	ANHANG	94
8.1	ERHEBUNGSBOGEN FÜR KOLOREKTALE KARZIOME	94
9	DANKSAGUNG.....	97
10	LEBENS LAUF	98

Abkürzungsverzeichnis

μ	Mikro (10 ⁻⁶)	M	Molar
μl	Mikroliter (10 ⁻⁶)	Max.	Maximum
μm	Mikrometer (10 ⁻⁶)	mg	Milligramm (10 ⁻³)
°C	Grad Celsius	MIB	Molekulare Immunologie Borstel
A	Adenin	Min.	Minimum
APAAP	Alkalische-Phosphatase- Anti-Alkaline-Phosphatase	min	Minute
ARF	ADP Ribosylierungsfaktor	ml	Milliliter (10 ⁻³)
Bp	Basenpaare	mM	Millimolar
C	Cytosin	M-MLV RT	Moloney Mäuseleukämievirus Reverse Transkriptase
CCD	Charged Coupled Device	mRNA	Messenger RNA
cDNA	Komplementäre DNA	MW	Mittelwert
CEA	Carcino-embryonales Antigen	n	Nano (10 ⁻⁹)
cm	Zentimeter (10 ⁻²)	ng	Nanogramm
CT	PCR Zyklussschwellenwert	nm	Nanometer
dATP	Desoxyadenosintrisphosphat	NPA	Nuclease Protection Assay
dCTP	Desoxythymidintrisphosphat	OP	Operation
ddUTP	Dideoxyuridin-5'-Triphosphat	p	Irrtumswahrscheinlichkeit
DFC	dense fibrillary component	PCR	Polymerasekettenreaktion
DGTP	Desoxyguanosintrisphosphat	pKi-67	Ki-67 Protein
DIMDI	Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information	RNA	Ribonukleinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RT	Reverse Transkriptase
dNTP	Desoxynukleotidtrisphosphat	s	Sekunde
DTT	Dithiothreitol	SD	Standardabweichung
dTTP	2'-Deoxythymidin 5'-Tri- phosphat	SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Poly- acrylamid-Gel-Elektrophorese
E	Amplifikationseffektivität	SNOMED	Systematized nomenclature of Medicine
FAM	6-Carboxyfluoreszein	T	Thymidin
FRET	Förster-Resonanz-Energie- Transfer	TAMRA	6-Carboxytetramethyl rhodamin
G	Guanin	Taq	Thermus aquaticus
GTC	Guanidinium-Thiocyanat	TBS	TRIS-gepufferte Kochsalz- Lösung
HEX	Hexachloro-6- Carboxyfluoreszein	TET	Tetrachlor-6-Carboxyfluoreszein
Hind	Haemophilus influenzae DNA Endonuklease	TNM	Tumor, Nodus, Metastase
ICD	International classification of diseases	Tris	Tris-hydroxymethyl-l-aminoethan
ISH	<i>in-situ</i> -Hybridisierung	U	Units
JOE	2,7-Dimethoxy-4,5-Dichloro-6- Carboxyfluoreszein	UICC	Unio internationalis contra cancrum
kB	Kilobasen	UKSH-L	Universitätsklinikum Schleswig Holstein, Campus Lübeck
kD	Kilodalton	UNG	Uracil-N-Glycosylase
l	Liter	UV	Ultraviolett
log	Dekadischer Logarithmus	V	Volt
M	Milli (10 ⁻³)	WHO	Weltgesundheitsorganisation
		z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Allgemeines

Kolorektale Karzinome sind bei Frauen die zweithäufigste und bei Männern die dritthäufigste maligne Tumorerkrankung in Deutschland. Die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen wird für Männer auf über 24.000, für Frauen auf nahezu 28.000 geschätzt. Männer erkranken im Mittel mit 68,1 Jahren, Frauen mit 72,3 Jahren (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2002). Weltweit liegt der Anteil an den gesamten malignen Tumorerkrankungen, bei Frauen nach dem Mamma- und Bronchialkarzinom, bei Männern nach dem Prostata- und Bronchialkarzinom, bei ca. 9%. Die Inzidenz der kolorektalen Karzinome ist in den letzten 20 Jahren von 5 bis 15 auf etwa 15 bis 25 pro 100.000 angestiegen. Bei der Mortalität ist eine Abnahme aufgrund von intensiven Maßnahmen zur Früherkennung zu beobachten.

Risikofaktoren für maligne Darmtumore sind in der Ernährung zu finden, wobei eine hohe Kalorienaufnahme, die erhöhte Aufnahme von N-Nitrosaminen und der häufige Konsum von „rotem Fleisch“ (Rind, Schwein, Lamm) und tierischen Fetten eine Rolle spielen. Weitere Risikofaktoren sind mangelnde körperliche Bewegung, Rauchen, ein erhöhter Bierkonsum und eine Hypergastrinämie. Nicht-steroidalen Antiphlogistika (Cox II - Hemmer) und der Aufnahme von ballaststoffreicher Nahrung, Vitaminen (A, C, E), Selen und Calcium wird ein protektiver Effekt zugesprochen.

Die überwiegende Anzahl der Karzinome entstehen durch Genmutationen (siehe 1.2) im Rahmen der Adenom-Karzinom-Sequenz. Entzündliche Darmerkrankungen, andere Karzinome in der Anamnese oder eine genetische Disposition, z.B. familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), familiäre juvenile Polyposis, Peutz-Jehgers-, Gardner- und Turcot-Syndrom, hereditäres nichtpolypöses kolorektales Krebsyndrom (HNPCC-Syndrom), sind prädestinierende Faktoren, die das Tumorrisiko um ca. 10% erhöhen.

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

1.2 Molekularbiologische Aspekte zum kolorektalen Karzinom

Die Zellzahl in einem Gewebe wird bestimmt durch die Rate der Zellteilung (Proliferation), der Differenzierung und des Zelltodes (Apoptose, Nekrose). Unregelmäßigkeiten in einem dieser Prozesse stören die normale Kontrolle der Zellproduktion. Der programmierte Zelltod (Apoptose) ist ein physiologischer Prozeß, der für die Entfernung unerwünschter Zellen verantwortlich ist. In den letzten Jahren sind genetische Veränderungen entdeckt worden, die während der malignen Entartung entlang der Adenom-Karzinom-Sequenz auftreten. Dies sind im Einzelnen: Veränderungen der Methylierung des APC-Gens (Adenomatosis polyposis coli), des hMLH1- und hMSH2-Gens (humanes mutL / mutS Homologon), Punktmutationen im Codon 12 des K-ras-Onkogens (ein G-Protein), eine Deletion des Tumor-Suppressor-Gens DCC (deleted in colonic cancer) auf Chromosom 18q und eine Mutation des Tumor-Suppressor-Gens p53 auf Chromosom 17p. Die Veränderungen sind schematisch in Abbildung 1 dargestellt.

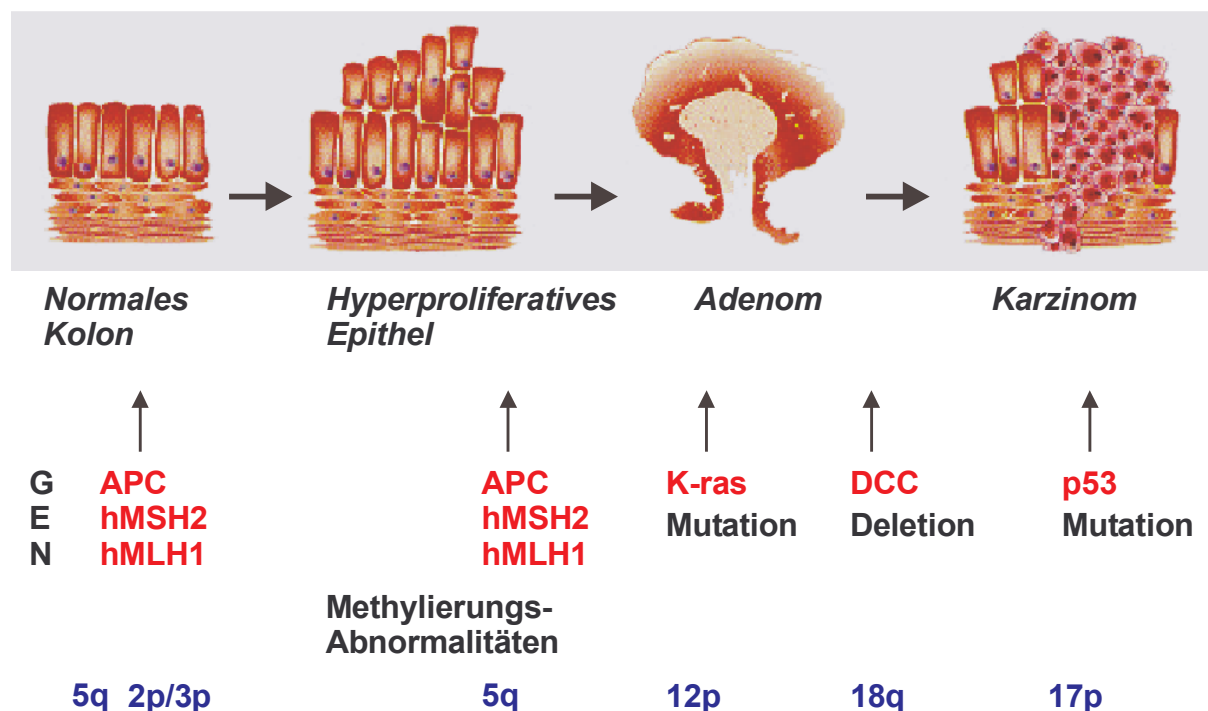


Abb. 1: Genetische Veränderungen entlang der Adenom-Karzinom-Sequenz mit Angaben zu Genen, Veränderungen und Chromosomenlokalisation (modifiziert nach Köhne, 2000)

1.3 Das Ki-67 Antigen

Das Antigen ist ein relativ großes Protein und wird als pKi-67 bezeichnet. Der ursprüngliche Antikörper Ki-67 war ein Prototyp für folgende Antikörper wie z.B. MIB-1 (Abkürzung für Molekulare Immunologie Borstel, Cattoretti et al., 1992), MIB-5 (Gerlach et al., 1997; Birner et al., 2001) und TEC-3 (Scholzen und Gerdes, 2000). Der monoklonale Antikörper Ki-67 wurde während der Suche nach spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen nukleäre Antigene von Hodgkin und Sternberg-Reed Zellen mittels Immunisierung von Mäusen gegen Hodgkinlymphomzellen entdeckt (Gerdes et al., 1983).

1.3.1 Charakterisierung von pKi-67

Ki-67 reagiert mit einem Antigen (pKi-67), das in den Nuklei von allen proliferierenden Zellen (Tumor- und Normalgewebe) vorhanden, in ruhenden Zellen jedoch nicht nachweisbar ist (Gerdes et al., 1984; Schrape et al., 1987; Bruno und Darzynkiewicz, 1992). Bei genaueren Analysen des Zellzyklus zeigte sich, daß die G₁-, S-, G₂- und M-Phase pKi-67 positiv, die G₀-Phase jedoch pKi-67 negativ ist (Gerdes et al., 1984, siehe Abbildung 2).

In einem Tumor – Xenograft Modell konnte gezeigt werden, daß der mit monoklonalen Antikörpern erhobene Markierungsindex exakt der Wachstumsrate entspricht (McCormick et al., 1993). pKi-67 hat eine relativ kurze Halbwertszeit von ungefähr 90 Minuten (Heidebrecht et al., 1996), so daß idealerweise nur aktuell wachsende Zellen das Antigen exprimieren.

Die Menge an nachweisbarem pKi-67 (siehe Abbildungen 2 und 4) nimmt von der S-Phase bis zur Metaphase zu (Scholzen und Gerdes, 2000). Mittels Durchflusssyztometrie konnte eine Verdopplung des Verhältnisses pKi-67 zu DNA festgestellt werden (Duchrow et al., 2001b).

pKi-67 ist strikt innerhalb des Zellkerns zu finden, jedoch verändert sich diese innernukleäre Lokalisation im Laufe des Zellzyklus drastisch. In der G₁-Phase ist pKi-67 in der nukleären Matrix lokalisiert, während der Mitose findet sich pKi-67 auf allen Chromosomen und in einer netzartigen Struktur, welche die Chromosome der Metaphase umgibt. Die netzartigen Strukturen könnten durch die Selbstbindungsfähigkeit von pKi-67 resultieren (Schmidt et al., 2003). In der Anaphase und Telophase nimmt die Intensität der pKi-67 Färbung schnell ab.

Kurzform unterscheidet sich durch ein fehlendes Exon 7 von der Langform. Beide Isoformen werden vom selben Gen codiert. Die aus diesen beiden Isoformen abgeleiteten pKi-67 Peptide haben ein Molekulargewicht von 320 und 359 kD. Innerhalb der pKi-67 Sequenz finden sich 16 repetitive Elemente, sogenannte „Ki-67 Repetitionen“. Alle Repetitionen liegen innerhalb des Exons 13, das 6845 bp lang ist (siehe Abbildung 3). Sie haben eine Homologie zwischen 43 und 62% auf Aminosäureebene und besitzen insgesamt neun Mal ein 66 bp langes „Ki-67 Motiv“ mit einer Homologie zwischen 72 und 100%. Dieses Motiv kodiert für das Epitop FKEL(F), das als Bindungsstelle für die monoklonalen Antikörper Ki-67, MIB-1 bzw. MIB-5 fungiert (Kubbutat et al., 1994). Das Epitop ist unter Säugetierarten stark konserviert, dies läßt eine wichtige Rolle für die Funktion des Proteins vermuten.

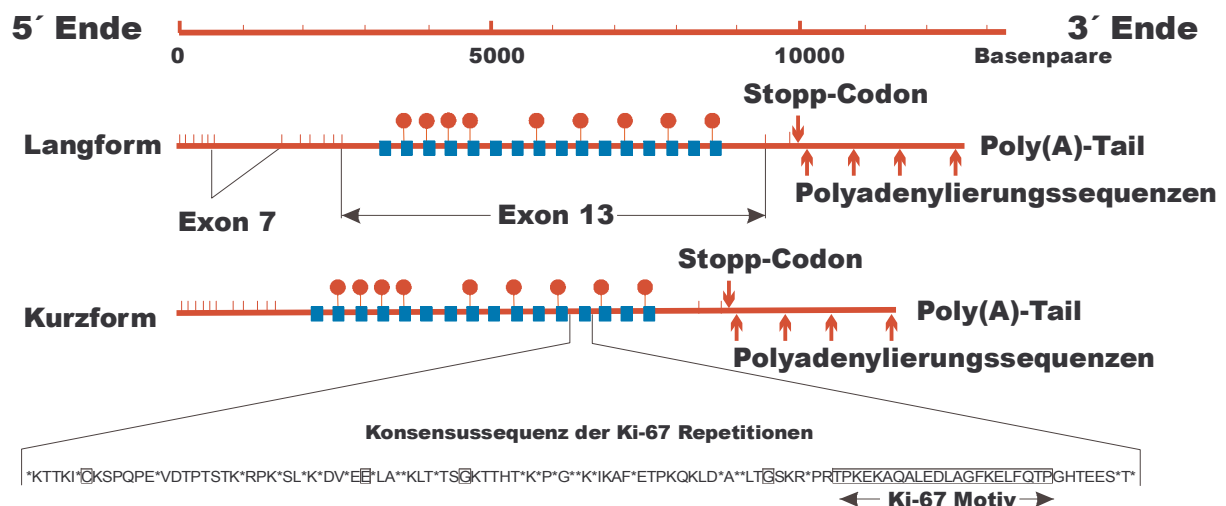


Abb. 3: Aufbau und Struktur der pKi-67 mRNA, oben die Langform, unten die Kurzform (modifiziert nach Duchrow et al., 1995)

1.3.2 Funktion von pKi-67

Verglichen mit der Vielzahl von Informationen über Struktur, Lokalisation und Regulation von pKi-67 ist über die Funktion des Proteins relativ wenig bekannt. Es ist für die Zellproliferation essentiell; die Antisense-Inhibition führt zur Akkumulation von Zellen in der G₁-Phase und zur Abnahme des ³H-Thymidineinbaus (Schlüter et al., 1993; Duchrow et al., 2001b). Aufgrund dieser Ergebnisse wird eine Regulation durch pKi-67 beim Übergang von der G₁- zur S-Phase und eventuell bei der Beendigung der S-Phase postuliert (Duchrow et al., 2001b).

Die wichtige Rolle von pKi-67 in der Zellzyklusregulation wird z.T. durch die repetitiven Elemente, die eine Vielzahl von Interaktionen mit anderen Proteinen besitzen, vermittelt. Vier wichtige Gruppen konnten als Interaktionspartner identifiziert werden: (1) Ribosomale Proteine, (2) DNA-Helikasen, (3) Zellzyklusproteine und (4) Signaltransduktionsproteine. Tabelle 1 gibt einen Überblick über diese Proteine und deren Funktionen.

Tab. 1: Mit pKi-67 interagierende Proteine und ihre Spezifikationen. Die linke Spalte listet die pKi-67 Bindungspartner auf, die mittlere Spalte beschreibt die jeweilige Funktion, die rechte Spalte listet die interagierende pKi-67 Domäne auf (modifiziert nach Schmidt et al., 2003)

Zellzyklusrelevante pKi-67 Bindungspartner	Funktion	Interagierende pKi-67 Domäne
Regulatorisches Zellzyklus Protein p95	Reparatur von DNA Doppelstrangbrüchen	Repeats (3R)
MCM2	DNA Replikationslizenzen Faktor	N-Terminus (N)
Pak2	Ser/Thr-Kinase	Repeats (3R)
Proteinphosphatase 2A (PPP2A), katalytische Untereinheit	Ser/Thr-Phosphatase	Repeats (3R)
S6 Kinase	Ser/Thr-Kinase	Repeats (3R)
Ran-bindendes Protein 7 (RanBP7 =RANBPM)	Beteiligt am Transport von Makromolekülen über die nukleäre Lamina	Repeats (3R)
Ran-bindendes Protein 9 (RanBP9)	Organisiert Zentromer mikrotubuli während der Mitose	N-Terminus (N)
Nukleolus assoziierte pKi-67 Bindungspartner	Funktion	Interagierende pKi-67 Domäne
Ribosomales Protein L6	Ribosomale Proteine	Repeats (3R)
Ribosomales Protein L12		Repeats (3R)
Ribosomales Protein L18		N-Terminus (N)
Ribosomales Protein L23		N-Terminus (N)/Repeats (3R)
Lamininrezeptor 1 (Lam R1)		N-Terminus (N)
Saures ribosomales Protein P0	Nukleäre Protein/Ser/Thr-Kinase Pre-mRNA Splicing	Repeats (3R)
Ribosomales Protein S11		N-Terminus (N)
Fibrillarin/casein Kinase II		Repeats (3R)
Survival motor neuron Protein 1 (SMN1)		Repeats (3R)
DNA-Struktur relevante pKi-67 Bindungspartner	Funktion	Interagierende pKi-67 Domäne
DEAD/H-box Polypeptid 1 (DDX1)	ATP-abhängige Helikasen	Repeats (3R)
Eukaryontischer Initiationsfaktor 4A (eIF4A)		Repeats (3R)
Reptin 52		Repeats (3R)
Clusterin		Repeats (3R)
Retinoblastoma bindendes Protein 7 (RBBP7)	Neuanordnung der Chromosome nach der Mitose	Repeats (3R)
Heterochromatin Protein 1 á (HP1Hs á)	Komponenten des Heterochromatins. Trägt zur Anlagerung der Chromosome an die innere nukleäre Membran bei	C-Terminus (C)
Heterochromatin Protein 1 ä (HP1Hs ä)		

Andere Autoren (Bridger et al., 1998) vermuten aufgrund der extranukleolären Lokalisation während der frühen G₁-Phase eine Rolle von pKi-67 in der Organisation von DNA. PKi-67 konnte im Bereich der dichten Keratinfilamente des Zellkerns (DFC – dense fibrillary component) lokalisiert werden (Kill, 1996). Dort findet die späte Prozessierung der ribosomalen RNA statt. Deshalb wird vermutet, daß pKi-67 eine essentielle Rolle in der Synthese der Ribosomen während der Zellteilung spielt. Diese These wird dadurch unterstützt, daß mittels Positronen-Emissionstomographie (PET) ein Zusammenhang zwischen Proteinsynthese und pKi-67 nachgewiesen

werden konnte (Plaat et al., 1999). Desweiteren wird vermutet, daß pKi-67 eine strukturelle Rolle innerhalb des Zellkerns einnimmt, da es an RNA und DNA bindet.

Die Funktion von pKi-67 wird durch den Phosphorylierungsstatus, der im Laufe des Zellzyklus zunimmt, reguliert. Auffällig ist eine starke Phosphorylierung, der sogenannte „phosphorylation shift“, am Übergang von der G2- zur M-Phase. Durch die Phosphorylierung werden die chemischen und physikalischen Eigenschaften, Sekundärstruktur, Bindungseigenschaften und Detektierbarkeit des Proteins durch MIB-1 verändert (Schmidt et al., 2003).

Genauere Erkenntnisse über die Funktion von pKi-67 sind Gegenstand der aktuellen Forschung, einen Überblick über den aktuellen Stand gibt Abbildung 4.

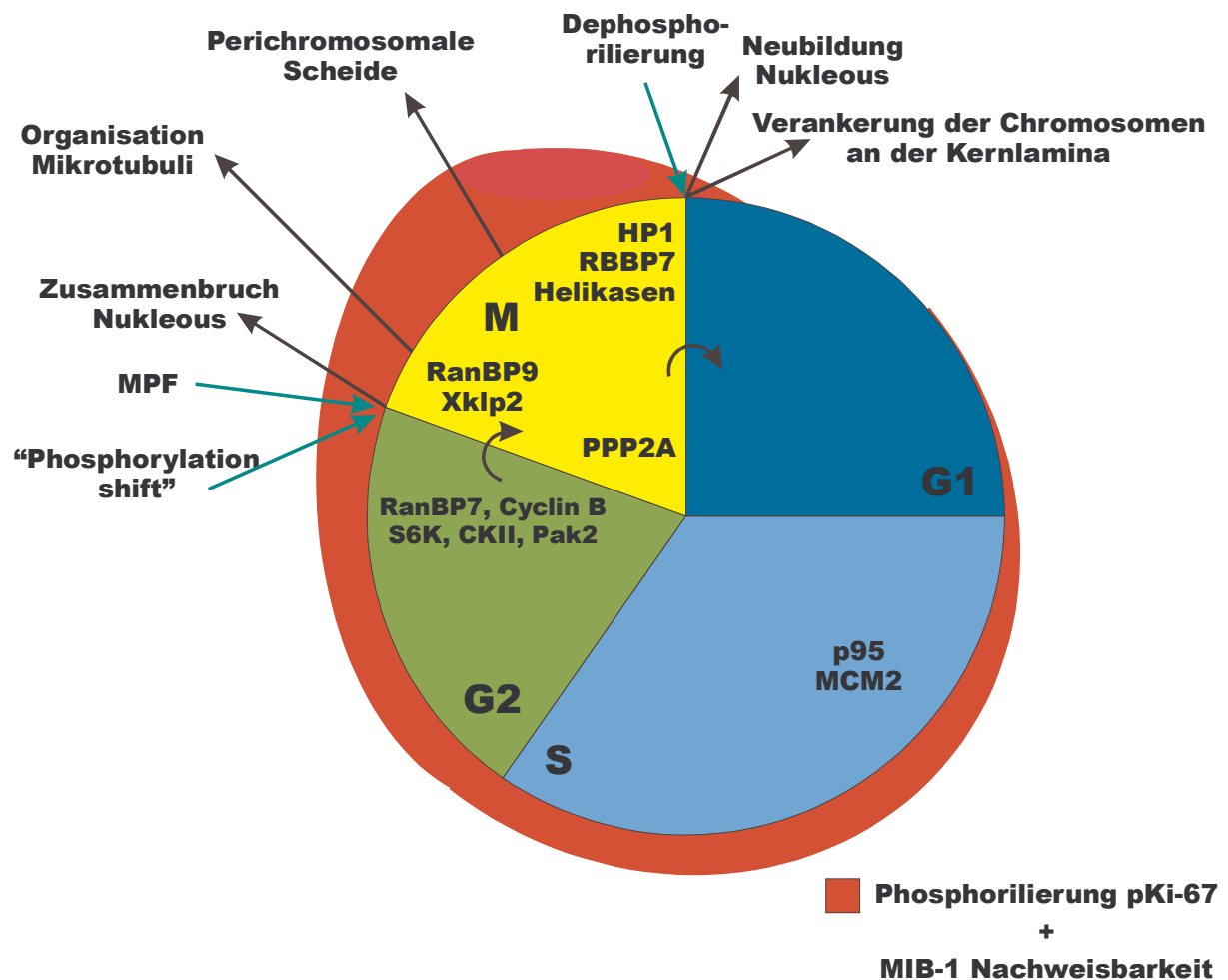


Abb. 4: Funktionsdiagramm von pKi-67 innerhalb des Zellzyklus. Das Diagramm zeigt mögliche Funktionen von pKi-67. Grüne Pfeile zeigen Einflüsse auf das pKi-67 Protein, Schwarze Pfeile zeigen durch pKi-67 verursachte Einflüsse auf die Zelle (modifiziert nach Schmidt et al., 2003)

1.3.3 Relevanz von pKi-67 in Hinblick auf die Prognose

Aufgrund aller genannten Eigenschaften haben sich monoklonale Antikörper gegen das Ki-67 Antigen bei der histopathologischen Bestimmung der Größe der Wachstumsfraktion in Gewebeproben von humanen Neoplasien etabliert. Diese Rate wurde bislang immunhistochemisch mit Hilfe des sogenannten pKi-67 Markierungsindex ermittelt. Dabei wird das Verhältnis der im Kern mit einem monoklonalem Antikörper, z.B. MIB-1 (Cattoretti et al., 1992), angefärbten Zellen in Prozent zu der Gesamtzahl der Zellen der jeweiligen Population (Tumorzellen) angegeben. Dieser Index ist in einer Vielzahl von retrospektiven und prospektiven Studien zu pKi-67 und Prognose untersucht worden. Bei vielen malignen Erkrankungen hat pKi-67 einen prognostischen Wert (Brown und Gatter, 2002). In Tabelle 2 werden 3 Gruppen unterschieden, welche sich durch die prognostische Aussagekraft von pKi-67 bei verschiedenen malignen Erkrankungen unterscheiden. Beim Mammakarzinom existiert z.B. eine Vielzahl von Studien mit signifikanten statistischen Korrelationen in bezug auf klinische Parameter und Überleben.

Tab. 2: Relevanz von pKi-67 in bezug auf die Prognose bei verschiedenen Tumorentitäten (modifiziert nach Brown und Gatter, 2002)

Tumorentität	Anzahl der Studien mit prognostischem Wert*	Anzahl der Studien ohne prognostischen Wert*
Gruppe 1 (>75% der Studien mit prognostisch positivem Wert von pKi-67)		
Mammakarzinom	23	1
Weichteiltumore	11	3
Bronchialkarzinom	10	2
Astrozytom	6	0
Gruppe 2 (25-75% der Studien mit prognostisch positivem Wert von pKi-67)		
Cervixkarzinom	5	6
Prostatakarzinom	15	7
Gruppe 3 (<25% der Studien mit prognostisch positivem Wert von pKi-67)		
Kolorektale Karzinome	2	10

*Prognostischer Wert basiert auf statistisch signifikanten Korrelationen zwischen pKi-67 Expression und erhobenen klinischen Parametern

1.4 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) ist eine Methode, um bestimmte DNA-Abschnitte mit Hilfe von sequenzspezifischen Primern (kurze Sequenz von Oligonukleotiden) *in vitro* so oft zu vervielfältigen, daß sie mit herkömmlichen Nachweismethoden detektierbar sind.

Die Polymerasekettenreaktion wurde in den achtziger Jahren (Mullis, 1990) entwickelt und ist heute als Standardmethode der Molekularbiologie nicht mehr wegzudenken.

Die PCR ist in drei sich wiederholende Abschnitte gegliedert: (1) Die Doppelstrang - DNA wird bei 94°C denaturiert, damit Einzelstrang - DNA vorliegt. (2) Die Anlagerung der Primer, das Primerannealing, erfolgt im Temperaturbereich von 40 - 60°C. Die Primer binden an beiden Strängen am 5'-Ende des zu amplifizierenden Bereichs und bilden mit ihren freiliegenden 3'-Enden den Startpunkt für die Polymerase. (3) Sie füllt bei 72°C die komplementären Nukleotide auf und synthetisiert so die identischen Tochterstränge. Die Vorgänge Denaturierung, Primerannealing und Extension stellen einen PCR - Zyklus dar. Durch Verwendung von thermostabilen DNA - Polymerasen (z.B. *Taq* aus *Thermus aquaticus*) können solche Zyklen direkt nacheinander in PCR Automaten durchgeführt werden.

1.4.1 Quantitative PCR

Mit Hilfe der Quantifizierung des PCR-Produktes kann indirekt auf die Anzahl der Ausgangs-Moleküle geschlossen werden. Unter idealen Bedingungen verdoppelt sich das Produkt pro Zyklus. Trägt man die Anzahl der Amplifikate gegen die Anzahl der Zyklen auf, erhält man eine exponentielle Funktion. Da es sich bei der PCR um eine Aneinanderreihung von einzelnen enzymatischen Reaktionen handelt, ist systembedingt eine Schwankungsbreite gegeben.

Die Vollständigkeit der Amplifikation hängt von der sogenannten Effektivität der PCR ab, ein Maß für den Anteil der tatsächlich replizierten DNA Moleküle. Die Effektivität ist normalerweise kleiner 100% und läßt sich mathematisch wie folgt beschreiben:

$$N = N_0 \cdot (1 + E)^n$$

Symbol-Erläuterung:

N = Menge des Produktes in Molekülen

n = Anzahl der PCR Zyklen

N₀ = Ziel-DNA Menge zu Beginn der PCR

E = Effektivität

Die Effektivität ist von folgenden Faktoren beeinflusst:

(1) von der Sequenz, die amplifiziert wird, (2) von der Sequenz der benutzten Primer, (3) von der Länge der amplifizierten DNA, (4) von möglichen Verunreinigungen im Ansatz, (5) vom pH-Wert, (6) von der Salzkonzentration, (7) von der Menge an Primern, Desoxy-Nukleotidtriphosphaten (dNTP) und *Taq*-Polymerase.

Experimentell wurde eine Streuung der Effektivität E zwischen 0,46 und 0,99 bei Amplifikation unterschiedlicher Gensequenzen ermittelt (Chelly et al., 1988; Wang et al., 1989; Choi et al., 1989). Bei wiederholter Amplifikation derselben Sequenz unter gleichen Bedingungen („tube-to tube variation“) lagen die Werte von E zwischen 0,8 und 0,99 (Wiesner, 1992).

Neben der Effektivität der Reaktion spielt der sogenannte „Plateau-Effekt“ der PCR eine Rolle. Die frühen Zyklen der PCR sind durch einen exponentiellen Anstieg von Zielsubstanz gekennzeichnet. Im weiteren Verlauf der PCR nimmt die Rate der Vervielfältigung soweit ab, bis es zu einem Plateau kommt und nur noch ein kleiner bzw. gar kein Anstieg von Zielsubstanz zu verzeichnen ist (siehe Abbildung 5).

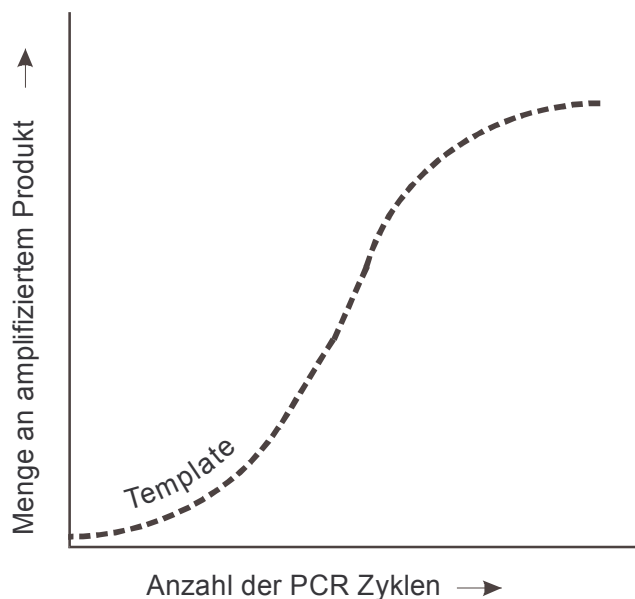


Abb. 5: Typischer Ablauf einer Polymerasekettenreaktion mit initialer exponentieller Phase und folgender Plateauphase (modifiziert nach Livak, 2000)

Eine Vielzahl von Faktoren tragen zu diesem Plateau-effekt bei: (1) Verbrauch von Reaktionssubstraten (dNTPs oder Primer), (2) Thermische Inaktivierung und abnehmende Konzentration von DNA Polymerase, (3) Inhibierung von Enzymaktivität durch Anstieg der Konzentration von Pyrophosphaten, (4) Reduktion der Denaturierungseffektivität, (5) Zerstörung von Produkten durch die 5'-3'-Exo-

nukleaseaktivität der *Taq*-DNA-Polymerase, (6) Inhibitorischer Effekt durch exogene Doppelstrang-DNA und endogene Amplikon-DNA auf die Aktivität der DNA Polymerase, (7) Sättigung des Enzyms mit Substrat – wenn zu viel Substrat vorhanden ist, kann die *Taq*-Polymerase nicht mehr alle Einzelstränge „bedienen“ (Kainz, 2000). Die meisten PCR Protokolle geben eine Zahl zwischen 30 und 50 Zyklen an, bis die Plateauphase erreicht wird.

1.4.2 Real-Time Quantitative PCR

Um die Problematik der Plateauphase zu umgehen, wurde das Echtzeitquantifizierungsverfahren entwickelt. Man unterscheidet zwischen der Endpunkt- und der Echtzeitbestimmung. Bei der Endpunktbestimmung betrachtet man die Menge an Produkt nach einer festgelegten Anzahl von PCR Zyklen. Im Gegensatz dazu ist das Prinzip bei der Quantifizierung mit Hilfe der PCR in Echtzeit durch Ermittlung der Zyklen bis zur ersten Detektion der Vervielfältigung des PCR Produktes gekennzeichnet. Dieser sogenannte „Threshold Cycle“ oder C_T -Wert ist jener PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Wie eine Arbeitsgruppe (Higuchi et al., 1993) zeigen konnte, erhält man eine Gerade, wenn man die Menge der Ziel-DNA zu Beginn der PCR logarithmisch gegen die C_T -Werte aufträgt.

Um die Anreicherung der PCR Produkte vor der Plateau-Phase untersuchen zu können, wurde die Echtzeit-PCR entwickelt. Diese beruht darauf, daß sich proportional zur Zahl der PCR-Amplifikate fluoreszierende Moleküle anreichern. Die Zunahme des Fluoreszenzlichtes kann in Echtzeit beobachtet und quantitativ ausgewertet werden (Lee et al., 1993; Livak et al., 1995). Dazu werden zwei fluoreszierende Farbstoffe, sogenannte „Reporter“ (to report, engl. - berichten) und „Quencher“ (to quench, engl. - löschen), mit einem für die Zielsequenz spezifischem Oligonukleotid verbunden und zur PCR dazugegeben. Das Oligonukleotid mit den beiden Farbstoffen, die so genannte *TaqMan*-Sonde, lagert sich an den zu amplifizierenden DNA-Strang an. Wenn beide Farbstoffe an das Oligonukleotid gebunden sind, wird die Emission des Reporter-Farbstoffs durch den Quencher-Farbstoff absorbiert; es ist keine Emission meßbar. Während des Extensionsschrittes jedes PCR Zyklus trennt die *Taq* DNA Polymerase durch ihre 5' -3' Nukleaseaktivität den Reporter-Farbstoff vom Oligonukleotid durch Hydrolyse (Holland et al., 1991). Sobald der Reporter-Farbstoff vom Quencher-Farbstoff getrennt ist, ist eine

Absorption durch die fehlende Nähe der Farbstoffe nicht mehr möglich und die Emission des Reporter-Farbstoffs kann registriert werden (siehe Abbildung 6). Dieser Effekt beruht vor allem auf dem Förster-Resonanz-Energie-Transfer - FRET (Förster, 1948; Lakowicz, 1988). Als Reporter-Farbstoffe werden z.B. FAM (6-Carboxyfluoreszein), TET (Tetrachlor-6-Carboxyfluoreszein), JOE (2,7-Dimethoxy-4,5-Dichloro-6-Carboxyfluoreszein) oder HEX (Hexachloro-6-Carboxyfluoreszein), als Quencher-Farbstoff wird TAMRA (6-Carboxytetramethylrhodamin) benutzt.

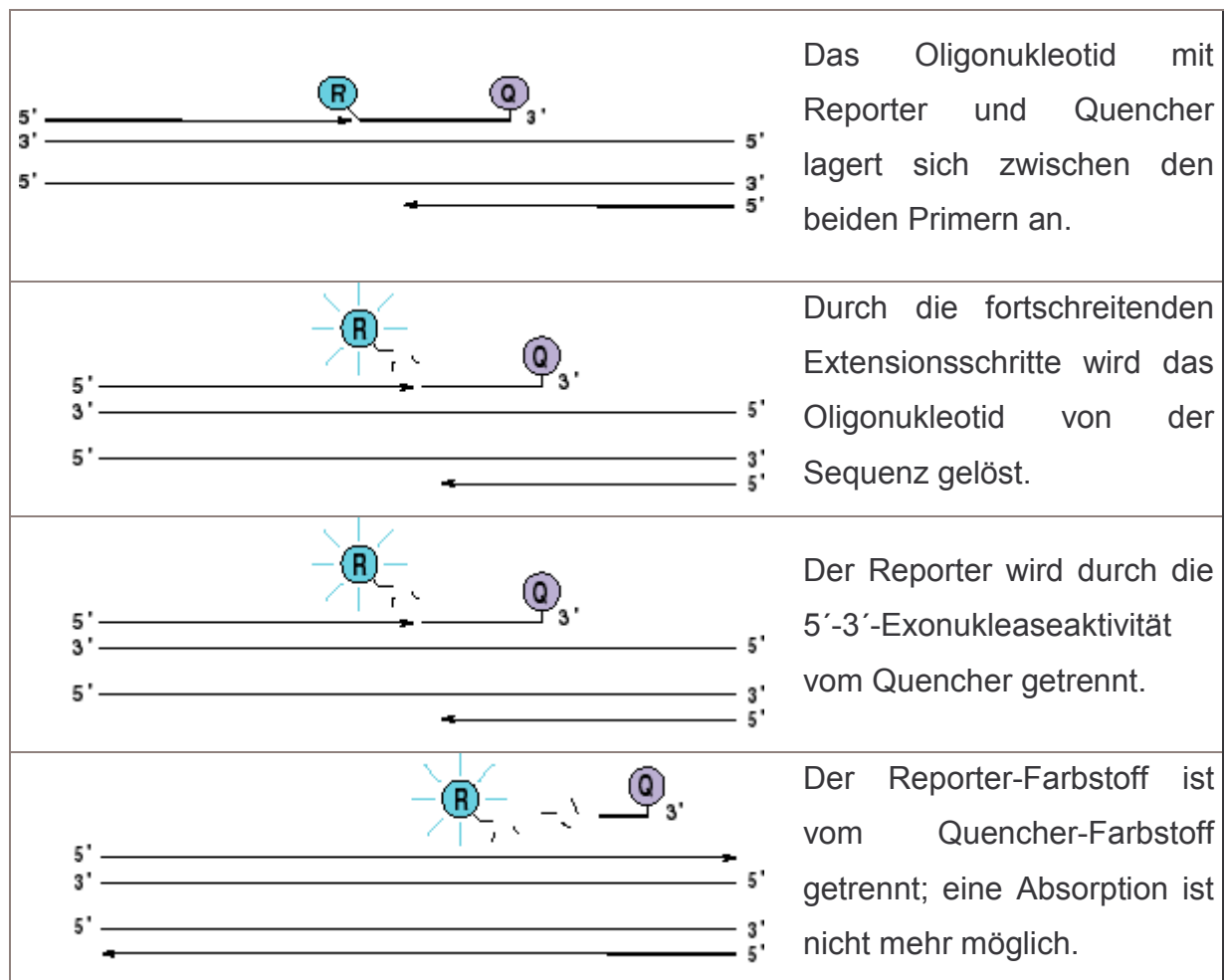


Abb. 6: TaqMan - Prinzip: Erst nach Abspaltung des Reporters (R) vom Quencher (Q) durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der *Taq*-Polymerase wird die Reporterfluoreszenz meßbar und zeigt die Synthese des spezifischen Zielstranges an (modifiziert nach Livak, 2000)

1.4.3 Verwendung von Standards als Hilfsmittel zur Quantifizierung

Die Tatsache der Effektivitätsschwankung selbst bei derselben Sequenz unter gleichen Bedingungen (siehe 1.4.1), die inkonstante Menge an Gesamt-RNA, die in

die reverse Transkriptionsreaktion eingegeben wurde, sowie die unterschiedliche Qualität der Gesamt-RNA, macht die Verwendung von sogenannten Standards notwendig, um Proben untereinander vergleichen zu können.

Es gibt zwei Arten von Standards, die für die quantitative PCR verwendet werden:

- (1) Transkripte, die natürlicherweise in der zu untersuchenden mRNA in konstanter Konzentration vorhanden sind (endogene Sequenzen),
- (2) von außerhalb zugeführte (exogene) Sequenzen.

Die Amplifikation der Standardsequenz erfolgt in der Regel durch ein zweites Primerpaar. Nach Abschluß der Reaktion wird die Menge des amplifizierten Targets ins Verhältnis gesetzt zur Menge des amplifizierten Standards und so auf das Verhältnis beider Sequenzen vor Reaktionsbeginn zurückgeschlossen.

Exogene Standards werden zusätzlich zum Reaktionsgemisch hinzugegeben. Notwendig ist eine zu amplifizierende Sequenz, die gleiche Primerbindungsstellen und eine gleiche Amplifikationseffektivität wie die Ziel-DNA besitzt, aber auf bestimmte Art und Weise von der Ziel-DNA unterscheidbar ist, z.B. durch eine Hind-III Schnittstelle. Damit konkurrieren beide Sequenzen während der Amplifikation um dieselben Primer.

Als endogener Standard wird oft ein sogenanntes „housekeeping“-Gen, z.B. β -Aktin, verwendet. Die Expression dieser Gene dient hauptsächlich der Aufrechterhaltung von Grundfunktionen der Zelle, wie z.B. Strukturproteine, regulatorische Proteine und Proteine für Zellatmung, Energieversorgung, Zellteilung (Wieland, 1997). Untersuchungen haben ergeben, daß sie in den meisten humanen Zellreihen gleich exprimiert werden (Rogers und McKenzie, 2002).

β -Aktin, ein glomeruläres Protein, ist Hauptbestandteil der Mikrofilamente einer Zelle und macht etwa 10 Prozent des Gesamtproteins einer Zelle aus. Jedes Aktinmolekül liegt als eine gefaltete Polypeptidkette mit 375 Aminosäuren vor. Man unterscheidet mindestens 7 verschiedene Aktin-Isoformen mit abweichender Aminosäuresequenz, die durch Antikörper identifiziert werden können. β -Aktin ist im Zytoskelett zu finden. Die Aktin-mRNA ist in spezifischen Regionen im Zytoplasma lokalisiert. β -Aktin und γ -Aktin unterscheiden sich in 4 Aminosäuren am Ende der Sequenz (Schiebler et al., 1996; Hill, 1999). „Housekeeping“-Gene werden typischerweise stärker exprimiert als die zu untersuchende Zielsequenz. Die Expressionsstärke wird in der Literatur in drei Klassen (hoch, mittel, niedrig) unterteilt (Bishop et al., 1974; Getz et al., 1975).

Tabelle 3 gibt einen Überblick über häufig als Standard verwendete Gene und deren Eigenschaften.

Tab. 3: Humane Gene, die als Standard verwendet werden können

Gen	Expressionsstärke	PCR Produktgröße (bp)
β -Aktin	hoch	275
γ -Aktin	mittel	449
Proteinphosphatase 1	niedrig	394
ARF 1	niedrig	336
ARF 3	niedrig	231
Ornithindecaboxylase	niedrig	381

1.5 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist es, einen Vergleich der quantitativen Bestimmung der pKi-67 mRNA mit dem immunhistologisch gewonnenen MIB-1 Markierungsindex in kolorektalen Karzinomen vorzunehmen.

Dazu mußte eine neue auf der Polymerasekettenreaktion basierende Methode zur quantitativen Bestimmung der pKi-67 mRNA Expression entwickelt und etabliert werden. Folgende Anforderungen werden an diese Methode gestellt.

- Die Methode sollte einen großen dynamischen Bereich haben.
- Der erforderliche Zeitaufwand sollte gering sein.
- Die Ergebnisse sollten schnell und einfach zu erhalten sein.
- Mit der Methode sollte es möglich sein, eine große Anzahl von Proben auf einmal zu quantifizieren.

Zusätzlich sollte die Hypothese überprüft werden, ob pKi-67 eine Relevanz in bezug auf die postoperative Prognose und klinische Parameter bei kolorektalen Karzinomen hat. Die Hypothese wurde vor Analysenbeginn definiert. Die Themenstellung basiert auf verschiedenen Beobachtungen, sowohl in der Literatur beschrieben (siehe 1.3.3) als auch aus Voruntersuchungen der gleichen Arbeitsgruppe, die einen Zusammenhang zwischen der pKi-67 Expression und der Prognose bei kolorektalen Karzinomen postulieren (Duchrow et al., 1998; Duchrow et al., 2001a). Diese These konnte jedoch bislang nur an einem relativ kleinem Patientenkollektiv und mit einer kurzen Nachbeobachtungszeit bestätigt werden. Der Großteil der Untersuchungen basiert zudem auf immunhistochemischen Methoden.

Zur Klärung der Hypothese sollte der Gehalt an pKi-67 mRNA mit dem immunhistologischen MIB-1 Markierungsindex in kolorektalen Karzinomen verglichen werden, mit der Fragestellung, ob der pKi-67 mRNA Gehalt eine zusätzliche Information liefert.

2 Patienten, Material & Methoden

2.1 Patienten

Das Patientenkollektiv dieser retrospektiven Untersuchung entstammt dem Tumornachsorgeregister der Klinik für Chirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, in dem Patienten mit einem kolorektalen Karzinom erfaßt werden. Aus diesem Kollektiv wurden nach dem Zufallsprinzip 118 Patienten ausgewählt, die zwischen Januar 1995 und Oktober 1998 aufgrund eines kolorektalen Karzinoms in der Klinik für Chirurgie operiert wurden, um an dem zugehörigen Material (in Formalin fixiertes und in Paraffin eingebettetes bzw. in flüssigem Stickstoff eingefrorenes Gewebe) die beschriebenen Untersuchungen durchzuführen.

Über die Patienten lagen zum Zeitpunkt der Abfrage die folgenden Daten vor: Alter des Patienten, Geschlecht des Patienten, prätherapeutische Symptome, Konzentration des Tumormarkers CEA im Serum, Angaben über eventuelle Doppeltumoren, Lokalisation des Tumors, Einteilung nach dem TNM System, UICC-Stadieneinteilung, histologische Angaben, Differenzierungsgrad nach WHO, Angabe über mögliche adjuvante Therapien, Radikalität der Operation, perioperative Komplikationen, Angabe über die Zeit bis zum Auftreten eines möglichen Rezidives, eines Zweitkarzinoms oder einer Metastase, Gesamtüberlebenszeit.

Sowohl im Rahmen der onkologischen Nachsorge in der Klinik, als auch durch Befragung der jeweiligen Hausärzte werden klinische Verlaufsangaben anhand eines Fragebogens (siehe Anhang) erhoben, so daß eine Nachbeobachtung der Patienten möglich ist. Die Erhebungen werden unter Berücksichtigung der Datenschutzrichtlinien in einer Computerdatenbank gespeichert.

2.2 RNA Isolierung

Das Material wurde der Tumorbank der Klinik für Chirurgie entnommen. Dieses war nach intraoperativer Entnahme des Tumors unverzüglich in das Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck gebracht worden. Dort war vom Pathologen jeweils ein Stück Tumorgewebe und makroskopisch tumorfreies Gewebe entnommen worden. Beide Proben sind sowohl unmittelbar post-operativ in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in der Tumorbank der Klinik für Chirurgie unter konstanten Bedingungen stabil gelagert, als auch für die

Immunhistologie formalinfixiert, in Paraffin eingebettet und ebenfalls im Labor aufbewahrt worden (siehe 2.6).

Von beiden Paraffinblöcken wurden mit Hämatoxylin-Eosin (siehe 2.6.2) gefärbte Kontrollschnitte hergestellt. Anhand dieser Schnitte wurde sichergestellt, daß in der Tumorprobe das Tumorgewebe überwog (> 90%) bzw. keine großen Nekroseareale vorhanden waren. In der Normalgewebeprobe durften mikroskopisch keine Tumorzellen vorhanden sein. Unter einer sterilen Werkbank wurde von dem stickstoffgekühltem Gewebestück mit einem ebenfalls in Stickstoff gekühlten Skalpell ein Teil abgeschnitten und weiterverarbeitet. Dabei durfte das Gewebe nicht auftauen, um zu verhindern, daß die RNA degradiert.

Die RNA Isolierung wurde mit dem QuickPrep® Micro mRNA Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Nr.035-00-19) exakt nach der Vorschrift des Herstellers durchgeführt (alle Reagenzien sind im Kit enthalten). Das Prinzip beruht auf einer Extraktion der mRNA durch Guanidinium-Thiocyanat (GTC), Bindung des poly(A)-Endes der mRNA an oligo(dT)-Zellulose und abschließender Elution der mRNA in MicroSpin Säulen in der Zentrifuge. Die Zellbestandteile aus dem Gewebe werden in Gegenwart einer hohen Konzentration von GTC gelöst. Dadurch wird die schnelle Inaktivierung von endogenen RNAsen sichergestellt. Der Extrakt wird dann dreifach mit Elutionsbuffer verdünnt, so daß eine GTC Konzentration entsteht, die auf der einen Seite eine effiziente Bindung zwischen dem poly(A)-Ende der mRNA Moleküle und der Oligo(dT) gebunden an Zellulose zuläßt, auf der anderen Seite aber immer noch eine komplette Inhibition der RNAsen aufrechterhält.

Der verdünnte Extrakt wird dann in ein Mikrozentrifugen Cup mit oligo(dT)-Zellulose gegeben. Nach einigen Minuten, in denen die poly(A)-mRNA an die oligo(dT)-Zellulose binden kann, wird das Cup mit hoher Geschwindigkeit (15.000 g) für 10 s zentrifugiert. Die oligo(dT)-Zellulose schlägt sich am Boden als Pellet nieder. Mehrmals wird der Überstand verworfen, das Pellet in Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach dem letzten Mal wird das resuspendierte Pellet mit oligo(dT)-Zellulose / poly(A)-mRNA Komplex auf eine MicroSpin Säule gegeben und somit die oligo(dT)-Zellulose in der Säule zurückgehalten und die poly(A)-mRNA mit Puffer ausgewaschen.

Arbeitsanleitung:

- 1 ml Aliquots von oligo(dt)-Zellulose in ein Cup für jeden Ansatz geben
- 100 mg Tumorgewebe in 0,6 ml Extraktionspuffer aufnehmen und mit einem mechanischen Homogenisator (Ultraturrax, Fa. Ika, Staufen, Deutschland) zu einer uniformen Lösung homogenisieren
- Probe mit 0,8 ml Elutionspuffer verdünnen und gründlich mischen
- Pro Probe 0,5 ml Elutionspuffer auf 65°C erwärmen und warmstellen
- Probe und Cup mit oligo(dt)-Zellulose bei höchster Geschwindigkeit (15.000 g) für 1 min zentrifugieren
- Überstand aus dem Cup mit oligo(dt)-Zellulose abpipettieren
- 1,5 ml der Probe in das Cup mit oligo(dt)-Zellulose geben und vorsichtig für 3 min mischen
- Probe bei höchster Geschwindigkeit (15.000 g) für 10 s zentrifugieren
- Überstand abpipettieren
- 1 ml des „High Salt“ Puffers zugeben und das Pellet resuspendieren
- Probe bei höchster Geschwindigkeit (15.000 g) für 10 s zentrifugieren
- Überstand abpipettieren
- 1 ml des „Low Salt“ Puffers zugeben und das Pellet resuspendieren
- Probe bei höchster Geschwindigkeit (15.000 g) für 10 s zentrifugieren
- Überstand abpipettieren
- Den letzten Waschvorgang wiederholen
- Verbleibendes Pellet in 0,3 ml „Low Salt“ Puffers lösen und auf die MicroSpin Säule in einem Reaktionsgefäß geben
- Probe bei höchster Geschwindigkeit (15.000 g) für 5 s zentrifugieren
- Die Säule entfernen und die Spülflüssigkeit im Reaktionsgefäß verwerfen
- Säule wieder einsetzen und 0,5 ml „Low Salt“ Puffers draufgeben
- Probe bei höchster Geschwindigkeit (15.000 g) für 5 s zentrifugieren
- Waschvorgang zweimal wiederholen
- Säule entfernen und in ein steriles Reaktionsgefäß einsetzen
- 0,2 ml des erwärmten Elutionspuffers auf die Säule geben
- Probe bei höchster Geschwindigkeit (15.000 g) für 5 s zentrifugieren
- Elutionsschritt ein zweites Mal wiederholen
- Säule entnehmen und Reaktionsgefäß mit enthaltener mRNA zur weiteren Verarbeitung auf Eis geben

2.3 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird die aus der Zelle isolierte poly(A)-mRNA mittels eines Enzyms, der reversen Transkriptase, sowie eines Primers, d.h. eines Oligonukleotids, z.B. des zum poly(A)-Teil der mRNA kompatiblen Oligo(dT)₁₂₋₁₈, in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Es wurde M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase) als Enzym verwendet (Kotewicz et al., 1985; Brown und Gatter, 1990).

Dieser Vorgang ist unspezifisch, die gesamte aus der Zelle isolierte poly(A)-mRNA wird umgeschrieben. Es entsteht ein Gemisch aus einer Vielzahl von cDNA, in dem auch die cDNA der zu untersuchenden mRNA enthalten ist.

Die gewonnene mRNA (siehe 2.2) wird nach folgender Arbeitsanleitung weiterverarbeitet:

- 1 µl Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer (Konzentration 500 µg/ml) in ein Reaktionsgefäß geben
- 5 µg Gesamt-RNA dazugeben
- 1 µl 10mm dNTP Mix dazugeben
- Auf 12 µl mit sterilem, destilliertem Wasser auffüllen
- Reaktionsansatz auf 65°C für 5 min erhitzen, danach auf Eis abkühlen
- Das Ganze kurz vortexen und anzentrifugieren
- 4 µl 5x First-Strand Puffer dazugeben
- 2 µl 0,1 M DTT dazugeben
- 1 µl Ribonuklease Inhibitor (RNase OUT, 40 units/µl) dazugeben
- 1 µl M-MLV RT dazugeben
- Ansatz bei 37°C für 50 min inkubieren
- Reaktion durch 15 min Erhitzen bei 70°C inaktivieren
- Reaktionsgefäß mit enthaltener cDNA zur weiteren Verarbeitung auf Eis geben

2.4 Agarosegelelektrophorese

Agarose, ein Polysaccharid aus roten Meeresalgen, ist ein lineares Polymer aus alternierend 1,3-verknüpften β-D-Galactopyranose- und 1,4-verknüpften 3,6-Anhydro-α-L-Galactopyranose-Resten. Agarose löst sich beim Erhitzen in Wasser und bildet beim Abkühlen ein Gel mit einer netzwerkartigen, dreidimensionalen

Struktur (mittlerer Porendurchmesser 150 nm). Je nach Größe der zu trennenden DNA-Moleküle werden Gele mit einer Agarosekonzentration von 0,3-2 % verwendet. Die üblicherweise verwendeten Elektrophoresekammern sind nach oben offen, sie werden mit einer ca. 60°C warmen Agaroselösung gefüllt. Für die Ausbildung der Probenauftragstaschen wird auf der Kathodenseite ein Gelkamm in die Lösung getaucht und fixiert. Nach dem Erstarren des Gels und Entfernen des Kamms wird in die Kammer Elektrophoresepuffer gefüllt, so daß das Gel vollständig mit Puffer überschichtet ist (*submarine* Elektrophorese). Die zu trennenden DNA-Proben werden in die Geltaschen eingefüllt und danach eine Spannung angelegt (ca. 5 - 10 V/cm Gellänge). Bei einem leicht alkalischen pH-Wert liegen die Phosphatreste der Nukleinsäure negativ geladen vor. Da bei Nukleinsäuren das relative Verhältnis zwischen Phosphatresten und Molekulargewicht und damit die relative Molekülladung konstant bleibt, ist die elektrophoretische Beweglichkeit von DNA-Molekülen durch ein Gelnetzwerk proportional zum Molekulargewicht (bzw. zur Anzahl der Basenpaare des Moleküls). Ähnlich der SDS-PAGE-Elektrophorese von Proteinen ergibt sich eine logarithmische Abhängigkeit der Wanderungsstrecke im Gel und der Molekülgröße. Durch Vergleich der Wanderungsstrecke einzelner DNA-Fragmente unbekannter Größe mit Fragmenten bekannter Basenpaaranzahl läßt sich die Größe der unbekannten DNA bestimmen. Der Nachweis von DNA (oder RNA) in einem Agarosegel erfolgt am einfachsten durch Ethidiumbromid, einem roten Farbstoff, der zwischen die Basenpaare der DNA interkaliert und in diesem Zustand sehr stark fluoresziert, während der in der Lösung befindliche Farbstoff nur sehr schwach fluoresziert. Die Fluoreszenzanregung erfolgt durch nahes UV-Licht (z.B. 302 nm), die Fluoreszenzemission ist im orange-roten Bereich des sichtbaren Lichts (509 nm) wahrnehmbar. Mit Ethidiumbromid lassen sich DNA-Banden von weniger als 20 ng nachweisen.

Das Agarosegel wird nach folgender Arbeitsanleitung hergestellt:

- 0,5 g Agarose in 50 ml TAE-Puffer geben
- Lösung kurz aufkochen lassen (in der Mikrowelle bei 600 W)
- Anschließend mit einem Magnetrührer auf 55°C abkühlen lassen
- 5 µl Ethidiumbromid zugeben, Flüssigkeit in eine Gelform mit Taschen-Platzhaltern gießen und bei Raumtemperatur erstarren lassen
- Gel in eine Elektrophoresekammer mit Puffer geben

- In die entstandenen Taschen 9 µl Probe und 1 µl Puffer mit Farbstoff geben, in die Kontrollspur zur Größenkontrolle 4µl Molekulargewichtsmarker VI, 5µl steriles Aqua bidest und 1 µl Puffer mit Farbstoff geben
- Deckel schließen, Spannung anlegen
- Nach 30 – 60 min Gel entnehmen und fotografieren

2.5 Quantitative PCR

Die gewonnene cDNA (siehe 2.3) wird zur Quantifizierung in die TaqMan PCR, die mit dem „Taq Man 7700 Sequence Detection System“ (Firma ABI PRISM, Foster City, USA) durchgeführt wird, gegeben. Bei dieser PCR wird *in vitro* mittels sequenzspezifischer Primer ein bestimmtes DNA-Fragment des Ansatzes amplifiziert und gleichzeitig quantifiziert (siehe 1.4.2). Die Quantifizierung erfolgte in Zusammenarbeit mit und in den Räumen der Firma Oncoscreen, Jena, Deutschland. Das „Taq Man 7700 Sequence Detection System“ ist in der Lage, während einer PCR fluoreszierende Signale zu detektieren und auszuwerten. Dazu besitzt es einen integrierten Thermozykler und Platz für gleichzeitig 96 Proben. Die Farbstoffe werden durch einen Laser zur Fluoreszenz angeregt. Das Laserlicht wird über fiberoptische Fasern zu jeder Probe geleitet. Verwendet werden spezielle PCR-Gefäße, sogenannte Cups, mit Deckeln hoher optischer Leitfähigkeit. Die emittierte Fluoreszenz wird dann durch die Faseroptik zurück zu einer CCD Kamera geleitet. Diese Kamera mißt alle 2-3 Sekunden die Emissionen in einem Bereich zwischen 520 nm und 660 nm. Über einen angeschlossenen Computer werden die Signale ausgewertet. Die Werte werden für jeden Zyklus gemittelt und dann gegen die Anzahl der Zyklen in einer Grafik aufgetragen.

Für jede neue Zielsequenz muß eine sogenannte Standardkurve erstellt werden, da die Quantifizierung der DNA-Menge nicht auf absoluten Mengen an PCR-Produkt beruht, sondern auf der Kinetik der PCR-Reaktion. Dafür nimmt man als Richtlinie den C_T -Wert, da zu diesem Zeitpunkt die Amplifikation exponentiell ist und es in dieser Phase der PCR-Reaktion keine limitierenden Faktoren der PCR gibt. Anhand einer Verdünnungsreihe werden bekannte Templatemengen amplifiziert, so daß man vergleichen kann, welchen C_T -Wert man bei welcher Templatemenge erhält. Daraus läßt sich dann die Standardkurve erstellen, anhand derer man aus einem bestimmten C_T -Wert auf eine Templatekonzentration schließen kann. Bei jedem PCR-Lauf wird die Standardkurve neu erstellt und zur Sicherheit mit älteren Standardkurven

verglichen. Ein typischer Real-Time PCR-Lauf und die daraus resultierende Standardkurve ist in den Abbildungen 7 und 8 dargestellt.

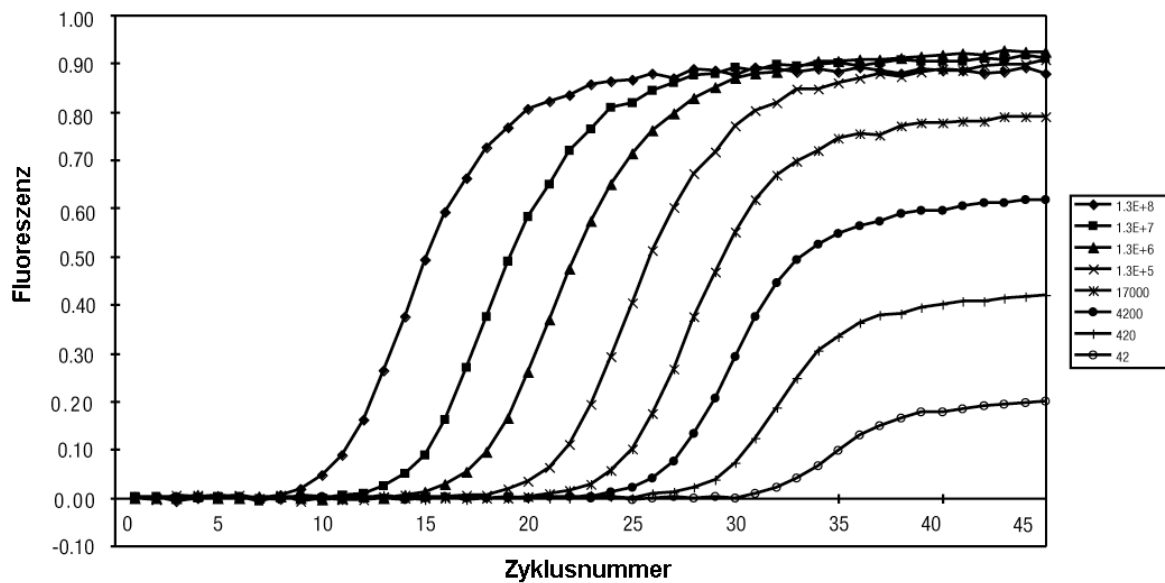


Abb. 7: Taq Man PCR einer Verdünnungsreihe: Bekannte Konzentrationen von der Zielsequenz werden amplifiziert und die Fluoreszenz gegen die Anzahl der Zyklen aufgetragen (modifiziert nach Livak, 2000)

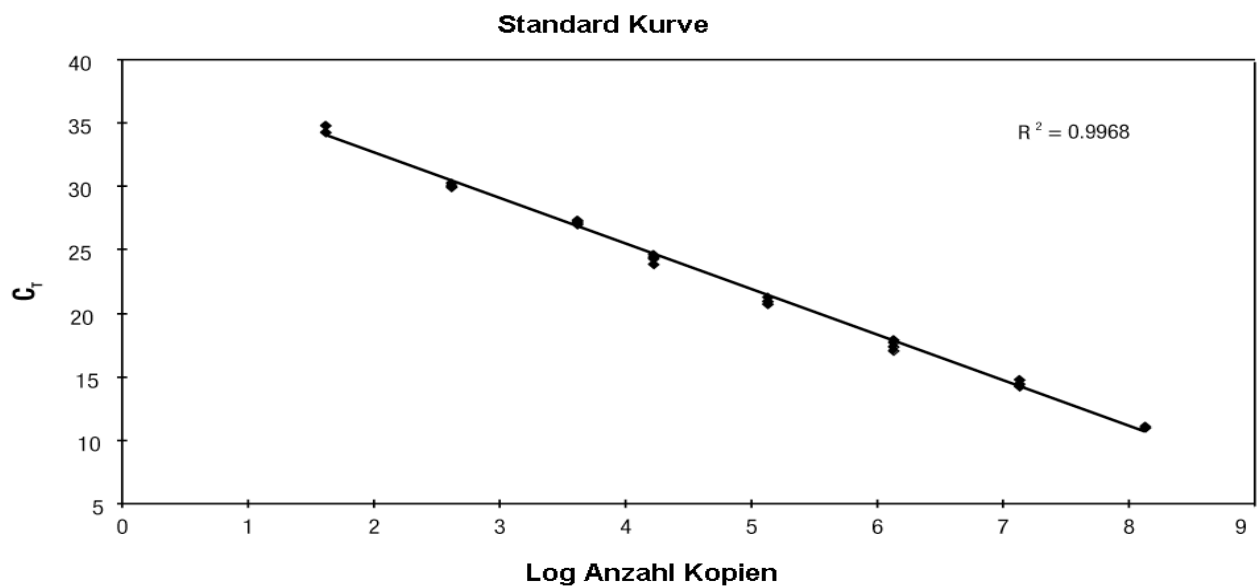


Abb. 8: Die C_T -Werte gegen die logarithmische Anzahl der Kopien aufgetragen ergeben die Standardkurve (modifiziert nach Livak, 2000)

2.5.1 Primerdesign für die Polymerasekettenreaktion

Ein Problem der PCR stellt die Kontamination mit genomischer DNA dar, das elegant dadurch umgangen werden kann, indem man mindestens einen der Primer so wählt, daß die Primer in unterschiedlichen Exons liegen. Wenn das dazwischen liegende Intron groß genug ist (>1 kb) spielt die PCR der genomischen DNA bei einer möglichen Kontamination praktisch keine Rolle. Für optimale PCR-Ergebnisse sollten die Primer folgende Eigenschaften erfüllen, um die Spezifität zu maximieren (PE Applied Biosystems, 1996):

(1) Länge der Primer von 15-30 Basenpaare, (2) GC-Gehalt bei 50 %, (3) Optimale Primer Konzentration im Bereich von 0,2 - 0,5 µm, (4) Vermeidung der Möglichkeit einer Primer-Dimer-Bildung, (5) Möglichst geringe Entfernung zum poly(A)-Teil bei Verwendung von poly-dT-Primern.

Die entsprechenden Sequenzen, die den obigen Anforderungen genügten, wurden über die zum TaqMan-System gehörende Primer-Generierungssoftware „Primer Express“ (Firma ABI PRISM, Foster City, USA) gefunden.

2.5.1.1 Primerdesign für das Zielgen pKi-67

Für den Nachweis des pKi-67 Gens wurde nach den oben beschriebenen Kriterien (siehe 2.5.1) ein Primerpaar gewählt, das die Exons 14 und 15 überbrückt. Für die TaqMan PCR wird zusätzlich eine Sonde benötigt, die zwischen den beiden Primern liegt (siehe 1.4.2).

Vorwärtsprimer KI9776F:

5' > AATTCAGACTCCATGTGCCTGAG < 3'

Rückwärtsprimer KI9925R:

5' > CTTGACACACACATTGTCCTCAGC < 3'

TaqMan Sonde KI9800T:

5' > (FAM) TCAAGAAAGACAAAAAGCCAGCCTGCAG (TAMRA) < 3'

Das resultierende PCR Produkt hat eine Länge von 150 Basenpaaren. Die Position der Primer und Sonde ist in Abbildung 9 dargestellt.

Vor-

```

9721 GCAGAAGAGT GCGAAGGTTC TCATGCAGAA TCAGAAAGGG AAAGGAGAAG CAGGAAATTC
      wärtsprimer      Sonde
9781 AGACTCCATG TGCCTGAGA T CAAGAAAGAC AAAAAGCCAG CCTGCAG CAA GCACTTTGGA
      Exongrenze Rückwärtsprimer
9901 GGCTGAGGAC AATGTGTGTG TCAAGAAAAAT AACAAACCAGA AGTCATAGGG ACAGTGAAGA
      ↑
9961 TATTTGACAG AAAAATCGAA CTGGGAAAAA TATAATAAAG TTAGTTTTGT GATAAGTTCT
  
```

Abb. 9: Ausschnitt eines Ki-67 Amplikons (Exon 14 und 15, Grenze markiert durch einen Pfeil) mit Position der Primer und Sonde

Anschließend wurde die Größenannahme anhand von cDNA und genomischer DNA aus HeLa - Zellen mit Hilfe einer herkömmlichen PCR überprüft. In der Gelelektrophorese (siehe Abbildung 10) zeigte sich wie erwartet keine Bande bei der Verwendung von genomischer DNA und eine Bande bei der Verwendung von cDNA.

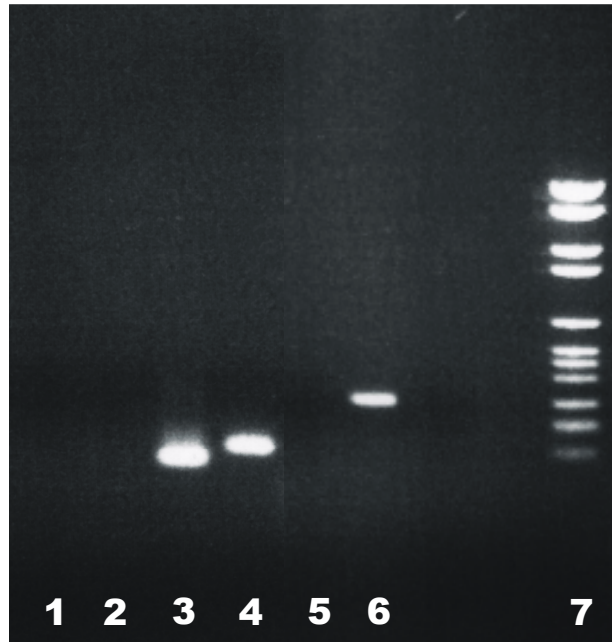


Abb. 10: Gelelektrophoresebild bei der Verwendung von genomischer DNA (1 – Exon 13/14, 2 – Exon 14/15, 5 – β_2 -Mikroglobulin), cDNA (3 – Exon 13/14, 4 – Exon 14/15, 6 – β_2 -Mikroglobulin) und Größenstandard (aus HeLa-Zellen isolierte genomische DNA wurde freundlicherweise von Dr. Duchrow, Lübeck, zur Verfügung gestellt)

2.5.1.2 Primer für Kontrollgen β -Aktin

Für das Kontrollgen (siehe 1.4.3) wurden die Primer aus dem Kit „TaqMan β -Aktin Control Reagents Nr. 401846“ exakt nach den Vorgaben des Herstellers (PE - Applied Biosystems, Foster City, USA) verwendet. Das resultierende PCR Produkt hat eine Länge von 294 Basenpaaren.

Vorwärtsprimer β -Aktin, Position: 2141-2165:

5' > TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA < 3'

Rückwärtsprimer β -Aktin, Position 2411-2435:

5' > CAGCGGAACCGCTCATTTGCCAATGG < 3'

TaqMan Sonde β -Aktin:

5' > (FAM) ATGCCC-X (TAMRA) -CCCCATGCCATCCTGCGTp < 3'

x zeigt ein Verbindungsarmnukleotid und p die Phosphorilisierung an. Die Position der Primer und Sonde ist in Abbildung 11 dargestellt.

Vorwärtsprimer				Sonde		
2141	TCACCCACAC	TGTGCCCATC	TACGA GGGGT	ATGCCCTCCC	CCATGCCATC	CTGCGT CTGG
2201	ACCTGGCTGG	CCGGGACCTG	ACTGACTACC	TCATGAAGAT	CCTCACCGAG	CGCGGCTACA
2261	GCTTCACCAC	CACGGCCGAG	CGGGAAATCG	TGCGTGACAT	TAAGGAGAAG	CTGTGCTACG
2321	TCGCCCTGGA	CTTCGAGCAA	GAGATGGCCA	CGGCTGCTTC	CAGCTCCTCC	CTGGAGAAGA
Rückwärtsprimer						
2381	GCTACGAGCT	GCCTGACGGC	CAGGTCATCA	CCATTGGCAA	TGAGCGGTTC	CGCTG

Abb. 11: Ausschnitt eines β -Aktin Amplikons (Exon 14/15) mit Position der Primer und Sonde

2.5.2 PCR Parameter

Das Prinzip der TaqMan PCR ist bereits in Kapitel 1.4.2 erklärt. Sie wurde exakt nach den Angaben des Herstellers PE - Applied Biosystems durchgeführt. Dazu wurde der Core-Reagent-Kit verwendet. Die Parameter der PCR sind Tabelle 4 zu entnehmen.

Tab. 4: Ablauf und Temperaturen der einzelnen PCR Schritte

Initialschritte	40 PCR Zyklen		Endschritt
	Denaturierung	Primerannealing und Extension	
2 min 50°C	15 s	1 min	andauernd
10 min 95°C	95°C	60°C	25°C

In diesem Protokoll werden die Schritte Primerannealing und Extension in einem Schritt zusammengefaßt und durchlaufen. Die Initialschritte sind zur Zerstörung theoretisch vorhandener Kopien aus vorausgehender PCR und zur Aktivierung des Enzyms TaqPolymerase notwendig (Pang et al., 1992). Die Zielsequenz der DNA enthält normalerweise Thymin. In den Kopien wird Thymin durch Uracil ersetzt. Die Uracil-N-Glycosylase (UNG - AmpErase®) zerstört am Anfang einer neuen Amplifikation alle vorhandenen Uracilverbindungen und damit die alten Kopien – erst nach Inaktivierung der AmpErase® im ersten Temperaturanstieg der PCR können die ersten neuen Kopien entstehen. Die zwei Minuten 50°C erzeugen eine optimale Aktivität der UNG. Durch den folgenden 95°C Schritt wird die Polymerase aktiviert und zugleich die UNG fast vollständig deaktiviert, jedoch sollte die Temperatur in den folgenden PCR Schritten über 55°C liegen, um eine Degradation der Amplifikate sicher zu verhindern. In einem Durchgang können 96 Proben zugleich untersucht werden. Aufgrund des notwendigen Standards (siehe 1.4.3) werden pro zu untersuchendem Material zwei einzelne Proben benötigt. Tabelle 5 gibt eine Arbeitsanweisung für die Erstellung des Mastermixs.

Tab. 5: Master Mix für 12 Ansätze der Ki-67 bzw. β -Aktin Quantifizierung

Substanz	Menge (μ l)	Zielkonzentration
Deionisiertes Wasser	207	-
10x TaqMan Buffer A	60	1 X
25 mM MgCl ₂	84	3,5 mM
DATP	12	200 μ M
DCTP	12	200 μ M
DGTP	12	200 μ M
DUTP	12	200 μ M
Ki-67 / β -Aktin Vorwärtsprimer	60	300 μ M

Tab. 5 (Fortsetzung)

Substanz	Menge (µl)	Zielkonzentration
Ki-67 / β -Aktin Rückwärtsprimer	60	300 nM
Ki-67 / β -Aktin-Sonde	60	200 nM
AmpliTaq Gold (5 U/µl)	3	0,025 µM
AmpErase UNG (1 U/µl)	6	0,01 µM

Den Mastermix in 12 Aliquots aufteilen, in ein PCR Cup geben und jeweils 5 µl von der gewonnenen cDNA hinzugeben. Das Gesamtvolumen beträgt 50 µl pro Cup. Anschließend das Cup in das Gerät einsetzen.

2.6 Immunhistologie

2.6.1 Allgemeines

Von jeder Tumorprobe wurde Tumor- und Normalgewebe formalinfixiert und in Paraffin eingebettet. Für die weitere immunhistochemische Bearbeitung (siehe 2.6.2 und 2.6.3) wurden von den Paraffinblöcken mehrere Schnitte von ca. 4 µm Dicke angefertigt und auf Superfrost - Objektträger (Firma Menzel, Braunschweig) aufgezogen. Die Objektträger wurden über Nacht bei 56°C getrocknet.

2.6.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Färbung mit Hämatoxylinlacken (Hämatein und Alaunsalze) und der Gegenfärbung Eosin ist eine der gebräuchlichsten histologischen Untersuchungsmethoden. Um optimale Ergebnisse bezüglich des pKi-67 Index und mRNA Gehalts zu erzielen, wurde vor weiterer Auswertung sowohl von jeder Tumorprobe als auch von jeder Normalgewebeprobe ein Kontrollschnitt mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. So wurde sichergestellt, daß in der Tumorprobe das Tumorgewebe überwog und in der Normalgewebeprobe mikroskopisch keine Tumorzellen vorhanden waren. Für den gesamten Färbeporgang wurde hochreinfiltrierte, entionisierte Wasser (Firma Millipore, Eschborn, Deutschland) verwendet.

Die Färbung wird nach folgender Arbeitsanleitung durchgeführt:

- Schnitte in Aqua dest. spülen
- Hämalan Gebrauchslösung 5-10 min einwirken lassen, bis die Kerne gut gefärbt sind (unter dem Mikroskop kontrollieren)

- Überschüssige Farblösung vom Objektträger ablaufen lassen und mit Aqua dest. spülen, bis das ablaufende Wasser farblos ist
- Schnitte in fließendem Leitungswasser auswaschen
- Schnitte schnell in ammoniakalisches Wasser bringen, bis sich die Objekte blau verfärbt haben
- Anschließend in fließendem Leitungswasser für 10-15 min auswaschen
- Schnitte für 5-10 min. in Eosinlösung verdünnt mit Aqua dest. 1+10 geben
- Spülen in Aqua dest.
- Danach mit Aquatex® und einem Deckglas versiegeln

Ansätze :

Eosinlösung: 1 g Eosin in 100 ml Wasser lösen.

Saures Hämalaun nach Mayer (Stammlösung): 1 g Hämatoxylin in 1000 ml Wasser lösen, dann genau 0,2 g Natriumjodat und 50 g reinen Kalialaun zugeben.

Hämalaun Gebrauchslösung: Zu 100 ml der Stammlösung werden 5 g Chloralhydrat und 0,1 g Zitronensäure zugefügt. Vor Gebrauch filtrieren.

ammoniakalisches Wasser: Zu 100 ml Wasser wird 1 Tropfen konz. Ammoniaklösung gegeben.

2.6.3 Färbung des pKi-67 Antigens

Bei dieser Färbung werden mittels des Antikörpers MIB-1, der gegen das pKi-67 Antigen (siehe 1.3) gerichtet ist, Zellkerne von proliferierenden Zellen gefärbt. Die Färbung erfolgt nach der „APAAP“ Methode (Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase). Bei dieser Methode wird der Primärantikörper über einen Sekundärantikörper, der aufgrund seiner Funktion als Brückenantikörper bezeichnet wird, an einen Komplex, bestehend aus anti-alkalischer Phosphatase - Antikörpern und dem Enzym alkalische Phosphatase, gebunden. Das zugehörige Schema ist in Abbildung 12 wiedergegeben.

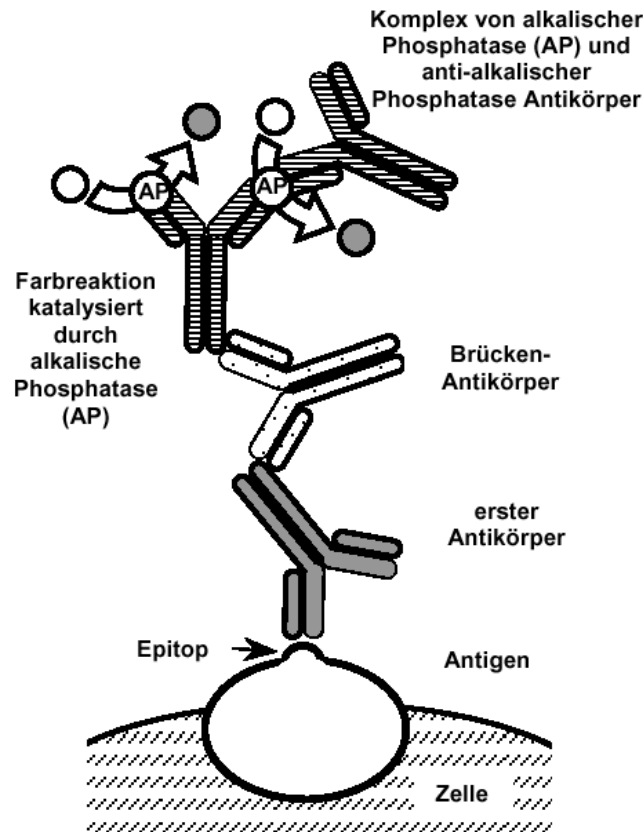


Abb. 12: Schematische Darstellung der APAAP Technik (modifiziert nach Sternfeld, 2002)

Im Fall der APAAP-Technik sind also die spezifischen Antigenbindungsstellen der anti-alkalischen Phosphatase-Antikörper durch die alkalischen Phosphatase-Moleküle abgedeckt. Der Sekundärantikörper wird im Überschuß zugegeben, damit eine seiner beiden identischen Bindungsstellen am konstanten Bereich des Primärantikörpers und die andere an derjenigen eines anti-alkalischen Phosphatase-Antikörpers des APAAP-Komplexes bindet. Damit der Sekundärantikörper zwei andere Antikörper gleichzeitig binden kann, müssen diese einen identischen Abschnitt aufweisen. Gewährleistet wird das dadurch, daß diese der gleichen Spezies entstammen und damit eine ähnliche konstante Region des Antikörpers aufweisen. Neben den oben beschriebenen Vorteilen der indirekten immunhistochemischen Technik bietet die APAAP-Technik zusätzlich die Möglichkeit, eine Färbung durch weitere Anlagerung von APAAP- Komplexen zu verstärken (Sternfeld, 2002). Als Positivkontrolle werden bei jeder Färbung zusätzlich zwei Schnitte von Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Tonsillengewebe gefärbt. Als Negativkontrolle wird eine Färbung ohne Primärantikörper (MIB-1) durchgeführt. Für den gesamten

Färbevorgang wurde hochreinfiltrierte, entionisiertes Wasser (Firma Millipore, Eschborn, Deutschland) verwendet.

Die Färbung wird nach folgender Arbeitsanleitung durchgeführt:

- Die ca. 4 µm dicken Tumorschnitte 5 min in Xylol entparaffinieren
- Danach für 10 min in 100%igem Aceton inkubieren
- Dann für 10 min in 70%iges Aceton
- Anschließend für 10 min in 40%iges Aceton
- Abschließend kurz in Wasser eintauchen
- In der Mikrowelle die nun entparaffinisierten Schnitte in Zitronensäurepuffer fünfmal für 5 min (25 min) bzw. viermal für 10 min (40 min) mit ca. 800 W erhitzen und im Becher abkühlen lassen
- Die Schnitte in einem großen Plastikbecher mit TBS Puffer spülen
- 30 min mit Primärantikörper inkubieren (200 µl pro Schnitt)
- 3x mit TBS Puffer spülen
- 30 min mit Sekundärantikörper inkubieren (200 µl pro Schnitt)
- 3x mit TBS Puffer spülen
- 30 min mit APAAP Komplex inkubieren (200 µl pro Schnitt)
- 3x mit TBS Puffer spülen
- Nochmals 15 min mit Sekundärantikörper inkubieren (200 µl pro Schnitt)
- 3x mit TBS Puffer spülen
- Farblösung ansetzen für 20 Schnitte:
- 3 Glasbehälter beschriften mit Levamisol, Natriumnitrit, Napthol-AS-BI-Phosphat
- 25 mg Natriumnitrit auf der Feinwaage abwiegen
- 62,5 mg Napthol-AS-BI-Phosphat auf der Feinwaage abwiegen
- 50 mg Levamisol auf der Feinwaage abwiegen
- 87,5 ml Entwicklungspuffer und 31,25 ml Propandiol mischen
- Das Levamisol dazu geben
- Zum Natriumnitrit 625 ml Wasser hinzugeben
- Zum Napthol-AS-BI-Phosphat 750 µl DMF geben
- Zum gelösten Natriumnitrit 250 µl Neufuchsin geben und 1 min warten
- Dann das Natriumnitrit in den Entwicklungspuffer geben
- Anschließend das Napthol-AS-BI-Phosphat in den Entwicklungspuffer geben
- Den pH-Wert auf 8,8 einstellen

- Anschließend 15 min mit dem APAAP Komplex inkubieren (200 µl pro Schnitt)
- 3x mit TBS Puffer spülen
- Anschließend die Objektträger für 20 min in eine Küvette mit APAAP Entwicklungslösung geben und auf dem Schütteltisch inkubieren
- 10 min wässern, 3-5 min in Hämatoxylin gegenfärben, erneut 10 min wässern
- Danach mit Aquatex® und einem Deckglas versiegeln

Verwendetes Material:

- TBS Puffer (pH 7,4-7,6): 1,8 g Tris/Base + 13,7 g Tris/Cl + 17,56 g NaCl ad 2 l H₂O
- Zitronensäurepuffer (pH 6,0): 2,1 g Zitronensäure-Monohydrat ad 1000 ml H₂O, pH Wert auf 6,0 einstellen
- Primärer Antikörper entspricht (MIB-1) Maus Antikörper in TBS Puffer 1:30 verdünnt
- Sekundärer Antikörper entspricht Kaninchen Anti-Maus Antikörper (Firma Dako, Hamburg, Deutschland, Z0259) 1:20 verdünnt: 400 µl Antikörper + 1000 µl Humanserum + 6600 µl fetales Kälberserum
- APAAP Komplex enthält intestinale alkalische Kälberphosphatase und monoklonale Anti-alkalische Mäusephosphatase (Firma Dako, Hamburg, Deutschland, D0651), verdünnt 1:50: 200 µl APAAP Komplex + 9800 µl fetales Kälberserum
- APAAP Entwicklungslösung
- 87,5 ml Entwicklungspuffer + 31,25 ml Propandiol
- Entwicklungspuffer: 8,7 g NaCl + 1,5 g Tris / HCl + 4,9 g Tris/Base ad 87,5 ml H₂O
- Propandiol: 21 g 2-Amino-3-methyl-1,3-propandiol (Firma Merck, Darmstadt) ad 1 l H₂O
- Aquatex® der Firma Merck, Darmstadt, Deutschland
- Hämatoxylin nach Mayer

2.6.4 Bestimmung des pKi-67 Markierungsindex

Anhand der mit dem monoklonalen Antikörper MIB-1 gefärbten Paraffinschnitte wurde nach folgendem, in der Literatur gängigem Verfahren, der pKi-67

Markierungsindex (auch als „staining index“ (SI), „staining score“ (SC) bzw. „labelling index“ (LI) bezeichnet) ermittelt.

Dazu wurden unter dem Mikroskop in drei unterschiedlichen Präparatbereichen bei einer Vergrößerung von 40 x 10 mit einem Raster von 10 x 10 Feldern alle Tumorzellen ausgezählt. Bei der Wahl der Bereiche wurde darauf geachtet, daß sie im Tumorzentrum lagen und keine großflächigen Nekrosen aufwiesen. Endothelzellen und inflammatorische Zellen wurden nicht mitausgezählt.

Mit dem monoklonalem Antikörper angefärbte Tumorzellen wurden als „positiv“, nicht angefärbte als „negativ“ gewertet. Insgesamt wurden pro Präparat mit Hilfe einer elektronischen Zählhilfe mindestens 1000 Zellen gezählt. Anschließend wurde der prozentuale Anteil der positiven Tumorzellen an der Gesamttumorzellzahl nach folgender Formel berechnet:

$$pKi - 67 \text{ Markierungsindex} = \frac{\text{Anzahl pKi - 67 positive Zellen}}{\text{Anzahl Zellen gesamt}} \cdot 100\%$$

Alle Auswertungen wurden ohne Kenntnis des pathologischen bzw. chirurgischen Ergebnisses durchgeführt.

2.7 Statistische Methoden

2.7.1 Überlebenszeitanalyse

Die Zielgröße Überlebenszeit meint die Länge des Intervalls, dessen Anfangspunkt durch ein spezielles Ereignis wie Operation oder Beginn einer Therapie gesetzt wird und dessen Ende das jeweilige Ereignis (Response = qualitative Änderung eines Attributes), z.B. Versterben, markiert. Überlebenszeitanalysen dienen dem Ziel der Aufdeckung des Zusammenhangs zwischen Wahrscheinlichkeit eines Responses in Abhängigkeit von der Zeit dazu.

Alle Patienten, die an der Studie für Überlebenszeitanalyse teilnehmen, unterliegen dem Risiko des Responses. Es ist jedoch für ein Individuum möglich, daß es aus der Studie ausscheidet, bevor der Response eingetreten ist, z.B. durch Verweigerung, Zusatztherapie, Umzug oder Ende der Studie. Individuen mit unvollständigen Daten bezeichnet man als zensierte Fälle. Diese unvollständigen Beobachtungen sollen weder wie vollständige, noch wie nicht vorhandene behandelt werden. Sie enthalten zweifelsfrei die Information über die untere Schranke, die der Betreffende erreicht hat. Die Methoden der Überlebenskurvenberechnung nehmen darauf Rücksicht. Alle Berechnungen zur Überlebenszeitanalyse (5-Jahresüberlebenszeiten, Kaplan-Meier-

Methode, Cox-Regression) wurden mit Hilfe des Statistikprogrammpaketes „SPSS“ Version 11.0 der Firma SPSS Incooperation, Chicago, USA erstellt.

2.7.1.1 Kaplan-Meier-Methode

Überlebenszeitanalysen wurden mittels der Kaplan-Meier-Methode (Kaplan und Meier, 1958) durchgeführt. Mit dieser Methode wird der geschätzte Verlauf der Überlebenszeitkurve durch eine fallende Treppenfunktion dargestellt. Durch die Teststatistik wird die Nullhypothese: „die Überlebenszeitkurven der Gruppen haben den gleichen Verlauf“ gegen die Alternativhypothese: „die Verläufe unterscheiden sich“ geprüft. Als zeitlicher Nullpunkt wurde der Zeitpunkt der primären Tumoroperation festgelegt. Als Überlebenszeit wurde die Zeit bis zum tumorbedingten Tod festgelegt. Das Kollektiv wurde zur Analyse der klinischen Verläufe in Abhängigkeit des pKi-67 Index und des pKi-67 mRNA Gehaltes in 3 Gruppen geteilt. Die Gruppen unterschieden sich durch das Vorliegen der Werte innerhalb des ersten, zweiten und dritten Drittels des Medians der Variablen. Die Signifikanztestung zwischen den einzelnen Gruppen wurde mit dem Log-rank-Test (zweiseitige Fragestellung) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte als univariate Analyse.

2.7.1.2 Cox Regression

Bei den meisten Krankheiten zeigt sich, daß die Prognose nicht von einem einzelnen Faktor, sondern von mehreren Faktoren abhängig ist. Um die Ergebnisse der zuvor erhobenen univariaten Analysen zu überprüfen, wurde das Cox-Regression-Modell verwendet (Cox, 1972). In diesem Modell wird für die Grundhazardfunktion keine spezielle Verteilung vorausgesetzt, sondern es wird eine unspezifizierte Funktion verwendet. Das Cox-Modell ist ein robustes Modell, in das mehrere (multivariat) zeitabhängige prognostische Faktoren (auch Kovariablen genannt) relativ leicht einbezogen werden können. Die grundlegende Funktion des proportionalen Hazardmodells ist die Berechnung bzw. Schätzung des relativen Risikos, wobei verschiedene prognostische Faktoren berücksichtigt werden können. Mit diesem Ansatz kann man gleichzeitig mehrere Faktoren hinsichtlich ihres Einflusses auf ein Zielereignis analysieren und die simultanen Effekte der einzelnen Faktoren in ihrem gemeinsamen Wirken zusammengefaßt beurteilen. Die multivariate Analyse der Zeit bis zum tumorbedingten Tod wurde sowohl durch einen Vorwärts- als auch Rückwärtseinschluß der Faktoren mit einem Einschlußkriterium der Irrtumswahrscheinlichkeit p kleiner oder gleich 0,05 und einem Ausschlußkriterium der

Irrtumswahrscheinlichkeit p größer 0,05 durchgeführt. Durch die Methode ist ein Vergleich mit etablierten prognostischen Faktoren möglich.

2.7.2 Berechnung der Signifikanzen

Die Berechnung der Signifikanzen für die Korrelation zwischen den erhobenen klinischen Parametern und den ermittelten Ki-67 Werten (mRNA-Gehalt und pKi-67 Index) wurde mit Hilfe des Statistikprogrammpaketes „SPSS“ Version 11.0 der Firma SPSS Incooperation, Chicago, USA durchgeführt.

Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit, die mittels „X²-Test“, „Log-Rank-Test“, „Pearson-Index“, „Kruskal-Wallis-Test“ bzw. „Wilcoxon-Test“ ermittelt wurden, kleiner oder gleich 0,05 wurde die Nullhypothesen „die Unterschiede bewegen sich im Rahmen zufälliger Schwankungen“ verworfen und die entsprechenden Alternativhypothesenb angenommen. Der „Kruskal-Wallis-Test“ ist eine Ausweitung des U-Testes von Mann und Whitney beim Vorliegen von mehr als zwei unabhängigen Stichproben und basiert auf einer gemeinsamen Rangreihe der Werte aller Stichproben (Bühl und Zöfel, 2000). Der Wilcoxon-Test (auch Gehan-Test genannt) vergleicht die Überlebensverteilung zwischen den vorhandenen Untergruppen hinsichtlich der Nullhypothese.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Patientengruppe

3.1.1 Allgemeine Charakterisierung

Von allen 118 Patienten, die in diese Untersuchung einbezogen wurden, lagen vollständige Datensätze vor. Die Patienten wurden zwischen 1995 und 1998 in der Klinik für Chirurgie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck (UKSH-L) operiert. 5 Patienten verstarben in einem Zeitraum von 30 Tagen nach der Operation aufgrund von postoperativen Komplikationen; wegen der nicht tumorbedingten Todesursache wurden diese Patienten nicht in die folgenden Auswertungen zur Überlebenszeit miteinbezogen.

3.1.2 Alters- und Geschlechtsverteilung

Zur Bestimmung des Alters der Patienten wurden die zum Zeitpunkt der Operation des Primärtumors vollendeten Lebensmonate herangezogen. Das Kollektiv bestand aus 65 Männern (55,1 %) und 53 Frauen (44,9 %), deren Alter zwischen 31 und 92 Jahren (MW=69,2 Jahre, SD=12,2 Jahre) lag. Einen genauen Überblick über die Alters- und Geschlechtsverteilung geben Abbildung 13 und Tabelle 6.

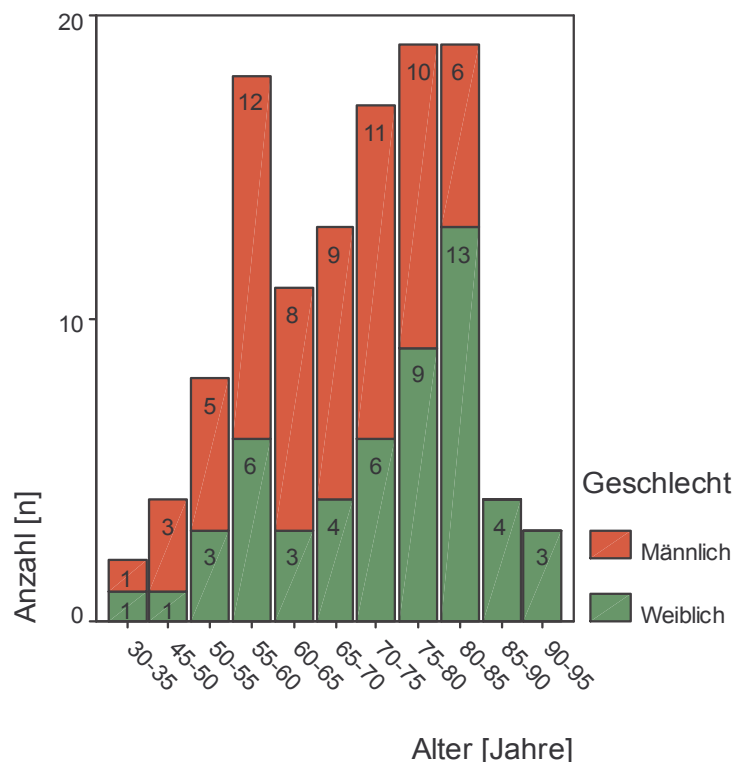


Abb. 13: Altersstruktur des Patientenkollektivs

Tab. 6: Übersicht über die Altersverteilung in Jahren

	Anzahl	Mittelwert	Standardabweichung	Median	Minimum	Maximum
Männer	65	66,2	10,8	67,4	31,6	84,3
Frauen	53	72,9	12,9	76,4	32,9	92,0
Insgesamt	118	69,2	12,2	70,5	31,5	92,8

3.1.3 Charakterisierung mittels histopathologischer Parameter

Die Gruppe der kolorektalen Karzinome setzt sich aus verschiedenen histologischen Entitäten zusammen, die häufigste ist das Adenokarzinom. In der Literatur schwanken die Angaben über den Anteil der Adenokarzinome zwischen 70 und 95 Prozent (Winkler und Braun, 1999; Renz-Polster, 2001). In unserer Patientenstichprobe lag der Anteil der Adenokarzinome bei 93,2%, die weitere histologische Aufschlüsselung findet sich in Tabelle 7.

Tab. 7: Histologie nach WHO – Weltgesundheitsorganisation (Jass JR, 1989)

Histologie	WHO Klassifikation	Häufigkeit	Prozent
Adenokarzinom	81403	110	93,2
Tubulovillöses Adenokarzinom	82633	1	0,8
Muzinöses Adenokarzinom	84803	2	1,7
Schleimproduzierendes adeno-papilläres Karzinom	84813	2	1,7
Siegelringkarzinom	84903	3	2,5

Das histologische Grading der Karzinome (G1 – G4) impliziert jeweils eine mit absteigender Differenziertheit einhergehende Zunahme der Malignität des Tumors. In Tabelle 8 wird die Häufigkeit der Differenzierungsgrade unserer Patientenstichprobe aufgezeigt.

Tab. 8: Histo-pathologisches Grading (Jass JR, 1989)

Grad	Definition	Häufigkeit	Prozent
GX	Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden	0	0
G1	Gut differenziert	2	1,7
G2	Mäßig differenziert	93	78,8
G3	Schlecht differenziert	23	19,5
G4	Undifferenziert	0	0

Das TNM System (Sobin und Wittekind, 1997; Wittekind und Wagner, 1997) bestimmt die anatomische Ausbreitung des Tumors und beruht auf der Feststellung

der drei Kategorien: T - Ausdehnung des Primärtumors; N – Fehlen oder Vorhandensein und Anzahl von regionären Lymphknotenmetastasen; M - Fehlen oder Vorhandensein von Fernmetastasen.

Durch Hinzufügen von Ziffern zu diesen drei Komponenten wird das Ausmaß der malignen Erkrankung angezeigt. Damit ist das System eine Art Kurzschrift mit mindestens 24 Möglichkeiten (4x3x2) zur Beschreibung der Ausdehnung eines malignen Tumors und in der Lage, eine Vielzahl von Zustandsbildern in kurzer und reproduzierbarer Form darzulegen; eine genaue Beschreibung des TNM Systems beim kolorektalen Karzinom gibt Tabelle 9.

Tab. 9: Einteilung nach dem TNM System (Wittekind und Wagner, 1997)

T-Kategorie	Definition	Häufigkeit	Prozent
Tis	Carcinoma in situ	0	0
T1	Tumor infiltriert Submukosa	3	2,5
T2	Tumor infiltriert Muskularis propria	17	14,4
T3	Tumor infiltriert durch die Muskularis propria in die Subserosa oder in nicht peritonealisiertes perikolisches oder perirektales Gewebe	75	63,6
T4	Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen und/oder perforiert das viszerale Peritoneum	23	19,5
N-Kategorie	Definition	Häufigkeit	Prozent
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen	58	49,2
N1	Metastasen in 1 bis 3 regionären Lymphknoten	29	24,6
N2	Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten	31	26,3
M-Kategorie	Definition	Häufigkeit	Prozent
M0	Keine Fernmetastasen	87	73,7
M1	Fernmetastasen	31	26,3

Die TNM Klassifikation stellt lediglich beschreibend ein Zustandsbild dar. Zu Zwecken der Vergleichbarkeit sind Stadieneinteilungen der kolorektalen Karzinome entwickelt worden. Am weitesten verbreitet für das Kolon- und Rektumkarzinom ist die Stadieneinteilung nach UICC (Wittekind und Wagner, 1997), die in Tabelle 10 dargestellt ist. Tabelle 11 gibt Auskunft über die R-Klassifikation, die das Ausmaß der operativ erreichten Radikalität beschreibt.

Tab. 10: Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms (Wittekind und Wagner, 1997)

Stadium	Definition			Häufigkeit	Prozent
	T	N	M		
0	Tis	N0	M0	0	0
I	T1	N0	M0	17	14,4
	T2	N0	M0		
II	T3	N0	M0	38	32,2
	T4	N0	M0		
III	jedes T	N1	M0	32	27,1
	jedes T	N2	M0		
IV	jedes T	jedes N	M1	31	26,3

Tab. 11: Operationsradikalität nach der R-Klassifikation

Einteilung	Definition	Häufigkeit	Prozent
R 0	Kein Resttumor	83	70,3
R 1	Mikroskopischer Resttumor	5	4,2
R 2	Makroskopischer Resttumor	30	25,4
R X	Nicht beurteilbar	0	0

3.1.3.1 Charakterisierung mittels klinischer Parameter

Aus Analysen von Krebsregistern (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2002) geht hervor, daß die häufigste Lokalisation der kolorektalen Karzinome das Rektum, gefolgt vom Sigma, ist. Tabelle 12 gibt Aufschluß über die Lokalisation im Studienkollektiv.

Tab. 12: Tumorlokalisationen nach ICD-9 (Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information - DIMDI, 1993)

Lokalisation	ICD-9 Code	Häufigkeit	Prozent
Flexura coli dextra	153.0	6	5,1
Colon transversum	153.1	4	3,4
Colon descendens	153.2	1	0,8
Sigma	153.3	25	21,2
Zaekum	153.4	14	11,9
Colon ascendens	153.6	16	13,6
Flexura coli sinistra	153.7	2	1,7
Rectosigmoider Übergang	154.0	6	5,1
Rectum	154.1	43	36,4
Analkanal	154.2	1	0,8

Studien (Torosian und Daly, 1991; Carl et al., 1993) haben belegt, daß bei kolorektalen Karzinomen der Tumormarker CEA (Carcino - Embryonales Antigen) eine stadienabhängige Erhöhung zeigt. Im Studienkollektiv waren bei 38,2% der Patienten erhöhte CEA Werte zu finden (siehe Tabelle 13). Da die Bestimmung des

CEA-Wertes im Rahmen der Nachsorge durch verschiedene Einrichtungen (z.B. Hausarzt, aufnehmende Klinik, nachsorgende Klinik) erfolgte, lagen nicht bei allen Patienten Angaben über den CEA-Gehalt im Serum vor.

Tab. 13: Verteilung des Tumormarkers CEA im Studienkollektiv

CEA	Häufigkeit	Prozent
nicht bestimmt	22	18,6
Normwert	46	39,0
erhöht	31	26,3
stark erhöht	14	11,9
nicht zu ermitteln	5	4,2

Postoperativ wurde aufgrund der Richtlinien zur Behandlung des kolorektalen Karzinoms unter Berücksichtigung von patientenindividuellen Gesichtspunkten entschieden, ob eine und welche adjuvante Therapie durchgeführt wird. Beim Rektumkarzinom ist eine kombinierte Radio-/Chemotherapie in den Stadien II und III Standard, beim Kolonkarzinom üblicherweise nur eine Chemotherapie im Stadium III (nachgewiesene Lymphknotenmetastasen). Eine genauere Übersicht über die durchgeführte adjuvante Therapie gibt Tabelle 14.

Tab. 14: Adjuvante Therapie im Studienkollektiv

Therapie	Häufigkeit	Prozent
Keine adjuvante Therapie	69	58,5
Nur Chemotherapie	25	21,2
Nur Radiatio	4	3,4
Kombinierte Radio-/Chemotherapie	20	16,9

3.2 Bestimmung der Größe der Wachstumsfraktion

Anhand der mit dem monoklonalen Antikörper MIB-1 gefärbten Paraffinschnitte wurde die Größe der Wachstumsfraktion durch Auszählen der positiven Tumorzellen und Ermittlung des Anteils an der Gesamtzahl der Tumorzellen bestimmt (siehe 2.6.1 und 2.6.4). In Abbildung 14 sind exemplarisch immunhistochemische Färbungen kolorektaler Karzinome mit niedrigem, mittlerem und hohem pKi-67 Index dargestellt.

pKi-67 Markierungsindex

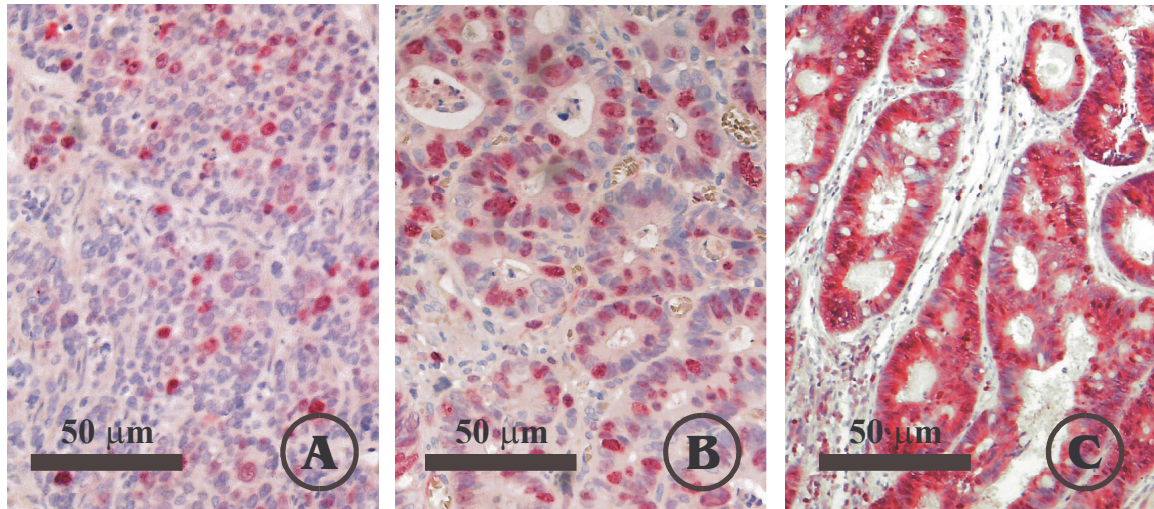


Abb. 14: MIB-1-Färbung (200-fache Vergrößerung) mit niedrigem (A), mittlerem (B), hohem (C) pKi-67 Index beispielhaft an Patientenproben-Nr. 273, 271 und 278 mit einem pKi-67 Markierungsindex von 18,1%, 37,6% bzw. 54,1%

Der durchschnittliche pKi-67 Index lag bei 38,3% (Min.= 10,3%; Max.= 66,4%; SD=13,2). Tabelle 15 gibt eine Übersicht der erhobenen Werte im Studienkollektiv.

Tab. 15: Darstellung der erhobenen Werte des Ki-67 Index (Mittelwerte)

Pat.-Nr.	MIB-1 %	Pat.-Nr.	MIB-1 %	Pat.-Nr.	MIB-1 %	Pat.-Nr.	MIB-1 %
72	33,8	130	51,2	208	36,8	254	30,1
74	31,3	131*	30,4	210	41,1	255	51,8
75	14,8	132	55,7	211	47,7	256	64,6
77	45,4	134	45,7	212	28,3	259	24,7
79	35,3	135	37,2	214	28,2	260	49,6
80*	39,3	137	31,1	215	37,5	261	64,2
83*	50,2	138	39,3	216	50,4	262	34,5
85	40,1	160	30,1	218	24,7	263	29,3
86	23,5	171	31,0	219	24,3	264	30,6
92	45,0	172	53,3	220	57,8	265	36,9
94	66,1	173	29,9	221	40,9	266	28,0
97	48,9	175	32,8	222	48,6	267	23,3
99	43,0	178	38,9	223	12,6	268	44,7
100	42,5	179	50,5	224	54,6	270	41,9
101	34,9	182	54,7	225	22,0	271	37,6
102	58,4	183	21,1	226	59,1	273	18,8
108	24,3	185	48,3	227	22,1	275	50,6
111	58,7	187	12,6	231	10,2	276	61,5
113	36,3	188	33,3	232	31,7	278	54,1

Tab. 15 (Fortsetzung)

Pat.-Nr.	MIB-1 %	Pat.-Nr.	MIB-1 %	Pat.-Nr.	MIB-1 %	Pat.-Nr.	MIB-1 %
116	34,3	189	22,6	234	32,9	279	36,5
118*	66,4	190	26,2	235	32,7	281	43,3
119	21,5	192	17,0	236	51,0	282	34,6
120	29,7	193	32,9	240	42,3	286	42,0
121	45,1	194	13,3	241	58,2	287	38,8
122	15,8	196	28,1	242	40,5	288	51,6
123	41,8	199	35,6	245	31,1	290	53,0
124	26,0	202	46,0	246	35,9	292	59,5
125	22,7	204	38,6	247	27,0	295	58,0
127	40,4	206	35,9	249	60,0		
129	16,7	207	41,5	252	36,6		

* Daten freundlicherweise von T. Ziemann (Duchrow et al., 1998; Ziemann, 2003) zur Verfügung gestellt

Mit dem Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest wurde die Hypothese der Normalverteilung überprüft. Für den pKi-67 Index lag eine Abweichung von der Normalverteilung mit $p=0,970$ ein deutlich nicht signifikanter p-Wert vor; damit wird die Normalverteilungsannahme aufrechterhalten, denn es spricht vorläufig nichts gegen diese Verteilung. Abbildung 15 zeigt ein Histogramm der pKi-67 Index Werte mit eingezeichneter Normalverteilungskurve.

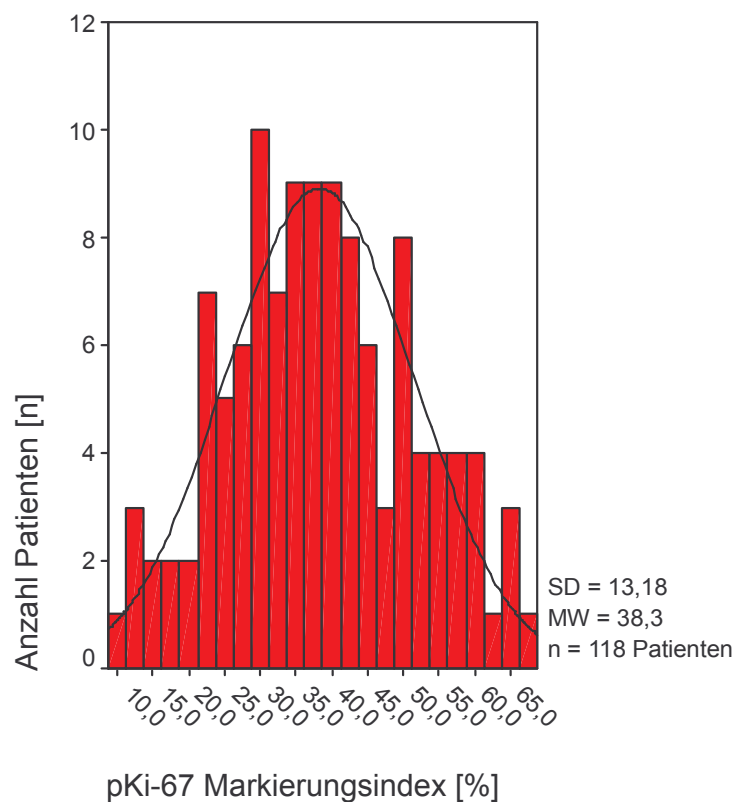


Abb. 15: Histogramm der pKi-67 Index Werte mit Normalverteilungskurve

Die Tabelle 16 gibt eine Übersicht über den pKi-67 Index im Studienkollektiv, gruppiert nach verschiedenen klinisch-pathologischen Parametern und die jeweils zugehörige berechnete Signifikanz in Bezug auf den pKi-67 Index. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ließ sich nicht finden.

Tab. 16: Übersicht über klinisch-pathologische Angaben und erhobenen pKi-67 Färbeindex

Klinisch-pathologische Befunde	Anzahl der Fälle	pKi-67 Färbeindex	Asymptotische Signifikanz Kruskal-Wallis-Test
Stadieneinteilung nach UICC			0,146
Stadium 1	17	38,6 ± 12,9	
Stadium 2	38	34,5 ± 13,6	
Stadium 3	32	39,8 ± 13,6	
Stadium 4	31	41,0 ± 11,7	
Ausdehnung des Primärtumors			0,366
T1	3	28,0 ± 16,3	
T2	17	41,8 ± 11,3	
T3	75	37,4 ± 13,2	
T4	23	39,9 ± 13,1	
Lymphknotenmetastasen			0,087
N0	58	35,9 ± 13,3	
N1	29	39,1 ± 11,5	
N2	31	41,9 ± 13,7	
Vorhandensein von Fernmetastasen			0,120
M0	87	37,3 ± 13,5	
M1	31	41,0 ± 11,7	
Radikalität			0,161
R0	83	37,0 ± 13,3	
R1	5	41,5 ± 15,1	
R2	30	41,3 ± 12,0	
Histologie nach WHO			0,341
Adenokarzinom	110	38,9 ± 12,6	
Tubulovillöses Adenokarzinom	1	10,2	
Muzinöses Adenokarzinom	2	30,2 ± 21,8	
Schleimproduzierendes adenopapilläres Karzinom	2	34,6 ± 6,6	
Siegelringkarzinom	3	31,1 ± 24,3	
Histo-pathologisches Grading			0,218
G1	2	26,2 ± 22,6	
G2	93	38,1 ± 12,7	
G3	23	40,0 ± 14,4	
Adjuvante Therapie			0,171
Keine adjuvante Therapie	69	36,5 ± 14,2	
Nur Chemotherapie	25	40,7 ± 11,4	
Nur Radiatio	4	32,4 ± 6,7	
Kombinierte Radio-/ Chemotherapie	20	42,7 ± 11,4	
Geschlecht			0,576
Männlich	65	38,7 ± 13,7	
Weiblich	53	37,8 ± 12,5	

3.3 Bestimmung der pKi-67 mRNA

3.3.1 Allgemeines

Zur Bestimmung des Ki-67 mRNA Gehalts in der entnommenen und in flüssigem Stickstoff gelagerten Tumorprobe wurde aus dem Gesamtkollektiv von 118 Patienten eine Subgruppe von 43 Patienten gebildet. Diese Subgruppe war in bezug auf die OP Radikalität (R0) und neoadjuvante bzw. adjuvante Radio- oder Chemotherapie homogen, um die Auswertung in bezug auf die Überlebenszeit nicht von vornherein zu beeinflussen.

In die Subgruppe wurden alle Patienten mit einem UICC-Stadium I bis III eingeschlossen, da diese Gruppe den größten Benefit von einer Verbesserung eines prognostischen Markers hat (Palmqvist et al., 1999). Die Einschlusskriterien lauteten wie folgt: Histologisch gesichertes kolorektales Karzinom, keine Fernmetastasen (M0), R0-Resektion, keine Chemotherapie oder Radiotherapie, Bereitschaft zu regelmäßigen Nachsorgeuntersuchungen. Ausschlusskriterien waren das Versterben innerhalb von 30 Tagen nach der Operation und Vorhandensein von Fernmetastasen, da diese a priori mit einer deutlich verkürzten Überlebenszeit einhergehen, somit eine Langzeitbeobachtung erschweren.

3.3.2 Expressionsstärke von pKi-67 mRNA im Vergleich zu β -Aktin

Um der Tatsache der PCR Effektivitätsschwankung zu begegnen (siehe 1.4.3), erfolgte die Quantifizierung relativ zu β -Aktin. In Abbildung 16 ist das Verfahren beispielhaft erläutert.

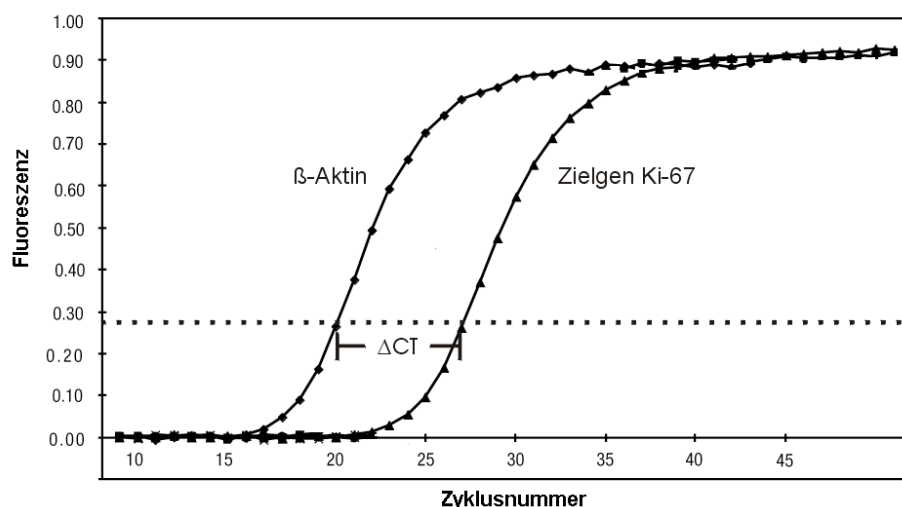


Abb. 16: Darstellung der TaqMan Kurven für pKi-67 und β -Aktin einer Tumorprobe zur Berechnung der relativen Expressionsstärke

Im obigen Beispiel beträgt der CT-Wert von β -Aktin 20,107, der CT-Wert des Zielgens pKi-67 26,484, damit ergibt sich eine Differenz, die als Δ CT-Wert bezeichnet wird, von 6,377 Zyklen. Die relative Expression des Zielgens berechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Expressionsniveau} = \frac{1}{2^{\Delta CT}} \cdot 100\% = \frac{1}{2^{6,377}} \cdot 100\% = 1,2\%$$

Das Zielgen pKi-67 hat damit im Beispiel ein Expressionsniveau von 1,2% des β -Aktins.

3.3.3 pKi-67 mRNA Gehalt

Der durchschnittliche pKi-67 mRNA Gehalt lag bei 0,1769 (Min.=0,01; Max.= 0,69; SD=0,1384). Tabelle 17 gibt einen Überblick über den pKi-67 mRNA Gehalt im Studienkollektiv.

Tab. 17: Darstellung der erhobenen Werte des pKi-67 mRNA Gehalts

Pat.Nr.	pKi-67 mRNA	Pat.Nr.	pKi-67 mRNA	Pat.Nr.	pKi-67 mRNA
74	0,043	138	0,020	225	0,236
80	0,370	173	0,172	227	0,093
86	0,282	178	0,469	231	0,257
90	0,072	179	0,059	236	0,070
100	0,076	182	0,256	245	0,083
101	0,317	187	0,185	252	0,088
105	0,022	189	0,064	254	0,108
108	0,283	190	0,103	259	0,126
113	0,205	192	0,183	260	0,051
118	0,081	193	0,155	261	0,385
119	0,687	194	0,051	265	0,032
122	0,365	199	0,196	266	0,129
124	0,168	207	0,141	282	0,263
127	0,283	210	0,106		
137	0,010	223	0,240		

Mit dem Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest wurde die Hypothese der Normalverteilung überprüft. Für den pKi-67 mRNA Gehalt lag eine Abweichung von der Normalverteilung mit $p=0,456$ ein deutlich nicht signifikanter p -Wert vor; damit wird die Normalverteilungsannahme aufrechterhalten, denn es spricht vorläufig nichts gegen diese Verteilung. Abbildung 17 zeigt ein Histogramm der pKi-67 mRNA Gehalte mit eingezeichneter Normalverteilungskurve.

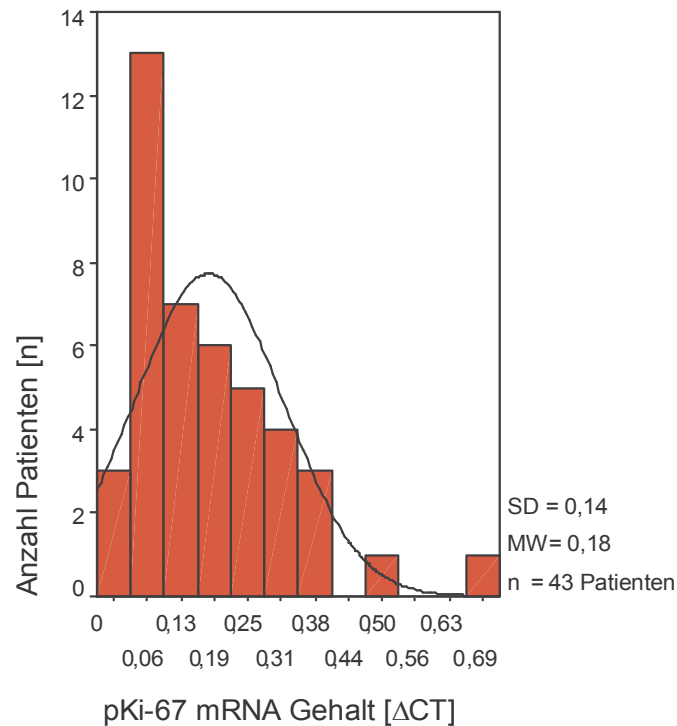


Abb. 17: Histogramm der pKi-67 mRNA Gehalte mit Normalverteilungskurve

Ein möglicher Zusammenhang zwischen dem pKi-67 Index und dem Gehalt an pKi-67 mRNA wurde mit der bivariaten Produkt-Moment-Korrelation nach Pearson überprüft. Es fand sich keine signifikante Korrelation (Korrelationskoeffizient -0,119; Signifikanz $p=0,457$). Abbildung 18 zeigt das dazugehörige Streudiagramm und die Anpassungsgerade.

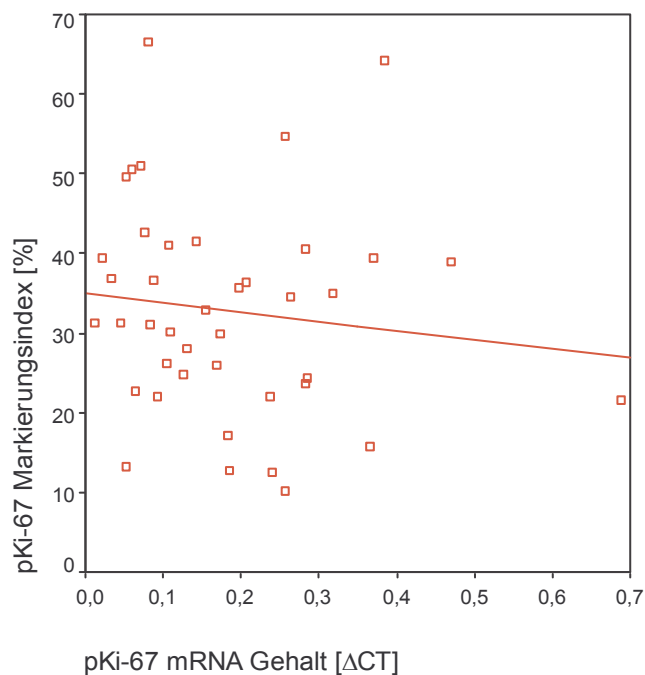


Abb. 18: Streudiagramm für pKi-67 mRNA Gehalt und pKi-67 Index

Die Tabelle 18 gibt eine Übersicht über den pKi-67 mRNA Gehalt im Studienkollektiv gruppiert nach verschiedenen klinisch-pathologischen Parametern und die jeweils zugehörige berechnete Signifikanz. Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede mit Bezug auf ein 5%-iges Signifikanzniveau in den klinisch-pathologischen Untergruppen im Hinblick auf den pKi-67 mRNA Gehalt finden.

Tab. 18: Übersicht über klinisch-pathologische Angaben und erhobenen pKi-67 mRNA Gehalt (Δ CT-Werte)

Klinisch-pathologische Befunde	Anzahl der Fälle	pKi-67 mRNA Gehalt	Asymptotische Signifikanz Kruskal-Wallis-Test
Stadieneinteilung nach UICC			0,397
Stadium 1	13	0,165 $\pm$ 0,109	
Stadium 2	25	0,175 $\pm$ 0,160	
Stadium 3	5	0,215 $\pm$ 0,093	
Stadium 4	0		
Ausdehnung des Primärtumors			0,507
T1	3	0,114 $\pm$ 0,127	
T2	10	0,180 $\pm$ 0,106	
T3	27	0,189 $\pm$ 0,153	
T4	3	0,110 $\pm$ 0,112	
Lymphknotenmetastasen			0,365
N0	38	0,171 $\pm$ 0,143	
N1	3	0,236 $\pm$ 0,112	
N2	2	0,183 $\pm$ 0,080	
Histologie nach WHO			0,494
Adenokarzinom	38	0,170 $\pm$ 0,142	
Tubulovillöses Adenokarzinom	1	0,257	
Muzinöses Adenokarzinom	0		
Schleimproduzierendes adenopapilläres Karzinom	2	0,271 $\pm$ 0,139	
Siegelringkarzinom	2	0,166 $\pm$ 0,103	
Histo-pathologisches Grading			0,474
G1	1	0,257	
G2	34	0,183 $\pm$ 0,144	
G3	8	0,138 $\pm$ 0,119	
Geschlecht			0,221
Männlich	24	0,199 $\pm$ 0,151	
Weiblich	19	0,148 $\pm$ 0,117	

3.4 Überlebenszeiten und pKi-67 Gehalt

Anhand der in der Klinik für Chirurgie, UKSH-L, vorhandenen Datenbank zu kolorektalen Karzinomen (siehe 2.1) wurde im Jahr 2003 eine Auswertung bezüglich der Überlebenszeiten im Studienkollektiv durchgeführt. Die Auswertung fand damit nach einem Minimum von 48 Monaten und einem Maximum von 93 Monaten (Mittelwert 70,5 Monate) nach der initialen tumorchirurgischen Operation statt. Die Nachbeobachtungszeit lag minimal bei 2 und maximal bei 92 Monaten (Mittelwert 41,2 Monate). Patienten, die während der Studie nicht mehr zu verfolgen waren (z.B. aus organisatorischen Gründen, Nichteinwilligung, Wegzug), wurden als zensiert

gewertet. Die 5-Jahres-Überlebensrate (60 Monate) im Gesamtkollektiv von 118 Patienten lag bei 46,2%, die mediane Überlebenszeit bei 40,0 Monaten.

Die 5-Jahres-Überlebensrate (60 Monate) der zur Untersuchung der pKi-67 mRNA gebildeten Subgruppe von 43 Patienten (siehe 3.3.1) lag bei 62,4%. Die mediane Überlebenszeit war bei Abschluß der Auswertungen höher als die bisher verstrichene Nachbeobachtungszeit von 85 Monaten; für eine genauere Aussage bezüglich der medianen Überlebenszeit muß bei dieser Subgruppe ein längerer Zeitraum abgewartet werden.

3.4.1 Univariate Überlebenszeitanalysen

Zunächst wurden univariate Analysen bezüglich der erhobenen pKi-67 mRNA Werte, pKi-67 Index, klinisch-pathologischen Angaben und der Überlebenszeit berechnet. Die Tabellen 19 und 20 geben einen Überblick über die Ergebnisse in den jeweiligen Studienkollektiven.

Im Gesamtkollektiv (siehe Tabelle 19) korrelierten mit Bezug auf ein 5%-iges Signifikanzniveau in der univariaten Analyse folgende Parameter mit der tumorbedingten Überlebenszeit: Stadieneinteilung nach UICC, Einteilung nach den Kategorien des TNM Systems (T, N, M), Radikalität der Operation, histopathologisches Grading. Nicht signifikant waren die Parameter Histologie, adjuvante Chemo- bzw. Strahlentherapie, Geschlecht, Alter und pKi-67 Index-Gruppierung mit der tumorbedingten Überlebenszeit korreliert.

Im pKi-67 mRNA Studienkollektiv (siehe Tabelle 20) korrelierten mit Bezug auf ein 5%-iges Signifikanzniveau in der univariaten Analyse die Parameter Ausdehnung des Primärtumors und pKi-67 mRNA-Gruppierung mit der tumorbedingten Überlebenszeit.

Tab. 19: 5-Jahres-Überlebensraten im Gesamt-Studienkollektiv (n=118 Patienten)

Klinisch-pathologische Befunde	Anzahl der Fälle	5-Jahres-Überlebensrate	Signifikanz nach Wilcoxon-Test
Stadieneinteilung nach UICC			<0,001
Stadium 1	17	81,9 %	
Stadium 2	38	57,1 %	
Stadium 3	32	52,0 %	
Stadium 4	31	6,4 %	
Ausdehnung des Primärtumors			<0,001
T1	3	100,0 %	
T2	17	81,4 %	
T3	75	46,5 %	
T4	23	13,0 %	
Lymphknotenmetastasen			<0,001
N0	58	63,5 %	
N1	29	48,2 %	

Tab. 19 (Fortsetzung)

Klinisch-pathologische Befunde	Anzahl der Fälle	5-Jahres-Überlebensrate	Signifikanz nach Wilcoxon-Test
N2	31	12,5 %	
Vorhandensein von Fernmetastasen			<0,001
M0	87	60,4 %	
M1	31	6,4 %	
Radikalität			<0,001
R0	83	62,1 %	
R1	5	20,0 %	
R2	30	6,6 %	
Histologie nach WHO			0,339
Adenokarzinom	110	46,1 %	
Tubulovillöses Adenokarzinom	1	100,0 %	
Muzinöses Adenokarzinom	2	0,0 %	
Adenopapilläres Karzinom	2	100,0 %	
Siegelringkarzinom	3	33,3 %	
Histo-pathologisches Grading			0,0366
G1	2	50,0 %	
G2	93	51,4 %	
G3	23	25,3 %	
Adjuvante Therapie			0,0856
Keine adjuvante Therapie	69	54,2 %	
Nur Chemotherapie	25	24,0 %	
Nur Radiatio	4	25,0 %	
Kombinierte Radio-/ Chemotherapie	20	50,0 %	
Geschlecht			0,8124
Männlich	65	44,5 %	
Weiblich	53	48,2 %	
Alter			0,1912
- 60	32	55,4 %	
60 - 70	24	54,1 %	
70 - 80	62	38,3 %	
pKi-67 Index			0,2425
Niedrig (0-22,3%)	13	46,1 %	
Mittel (22,3-44,6%)	67	52,0 %	
Hoch (44,6-100%)	38	36,7 %	

Tab. 20: 5-Jahres-Überlebensraten im pKi-67 mRNA Kollektiv (n=43 Patienten)

Klinisch-pathologische Befunde	Anzahl der Fälle	5-Jahres-Überlebensrate	Signifikanz nach Wilcoxon-Test
Stadieneinteilung nach UICC			0,2532
Stadium 1	13	76,9%	
Stadium 2	25	55,8%	
Stadium 3	5	57,1%	
Stadium 4	0		
Ausdehnung des Primärtumors			0,0500
T1	3	100,0%	
T2	10	70,0%	
T3	27	62,8%	
T4	3	0%	
Lymphknotenmetastasen			0,9780
N0	38	63,0%	
N1	3	66,6%	
N2	2	33,3%	
Histologie nach WHO			0,7137
Adenokarzinom	38	60,4%	
Tubulovillöses Adenokarzinom	1	100,0%	
Muzinöses Adenokarzinom	0		
Schleimproduzierendes adenopapilläres Karzinom	2	100,0%	
Siegelringkarzinom	2	50,0%	
Histo-pathologisches Grading			0,4790
G1	1	100,0%	
G2	34	64,5%	
G3	8	50,0%	

Tab. 20 (Fortsetzung)

Klinisch-pathologische Befunde	Anzahl der Fälle	5-Jahres-Überlebensrate	Signifikanz nach Wilcoxon-Test
Geschlecht			0,6613
Männlich	24	66,5%	
Weiblich	19	57,7%	
pKi-67 mRNA Gehalt			0,0332
Niedrig (0-22,3%)	14	35,7%	
Mittel (22,3-44,6%)	15	73,3%	
Hoch (44,6-100%)	14	77,9%	
pKi-67 Index			0,6518
Niedrig (0-22,3%)	13	61,1%	
Mittel (22,3-44,6%)	14	71,4%	
Hoch (44,6-100%)	14	57,1%	
Fehlende Werte	2		

3.4.2 Überlebenszeitanalyse mittels Kaplan-Meier-Methode

Die Überlebenszeitanalyse wurde zunächst als univariate Analyse mittels der Kaplan-Meier-Methode (siehe 2.7.1.1) durchgeführt. Die Gleichheit der Überlebensverteilungen wurde mittels des Log-rank-Tests statistisch überprüft (5%-iges Signifikanzniveau). Für die Analysen wurde das Studienkollektiv in Abhängigkeit sowohl des pKi-67 mRNA Gehaltes als auch des pKi-67 Markierungsindex in 3 Gruppen (1., 2. und 3. Drittel des Medians der Variablen) geteilt. Für den pKi-67 Markierungsindex ergab sich folgende Einteilung: 0 - 31,6%; 31,6% - 43,1%; 43,1% - 100%; für den pKi-67 mRNA Gehalt die Einteilung: 0 - 0,093; 0,093 - 0,236; 0,236 - 0,69.

Zunächst wurde die Überlebenszeitanalyse für den pKi-67 Index im Gesamtstudienkollektiv (n=118 Patienten, s. 3.1) durchgeführt. Die Überlebensfunktion ist in Abbildung 19 dargestellt.

Anschließend wurde eine Überlebenszeitanalyse sowohl für den pKi-67 Index als auch den pKi-67 mRNA Gehalt in der dafür gebildeten Subgruppe (n=43 Patienten, s. 3.3.1) durchgeführt. Die beiden Überlebensfunktionen sind in den Abbildungen 20 und 21 dargestellt.

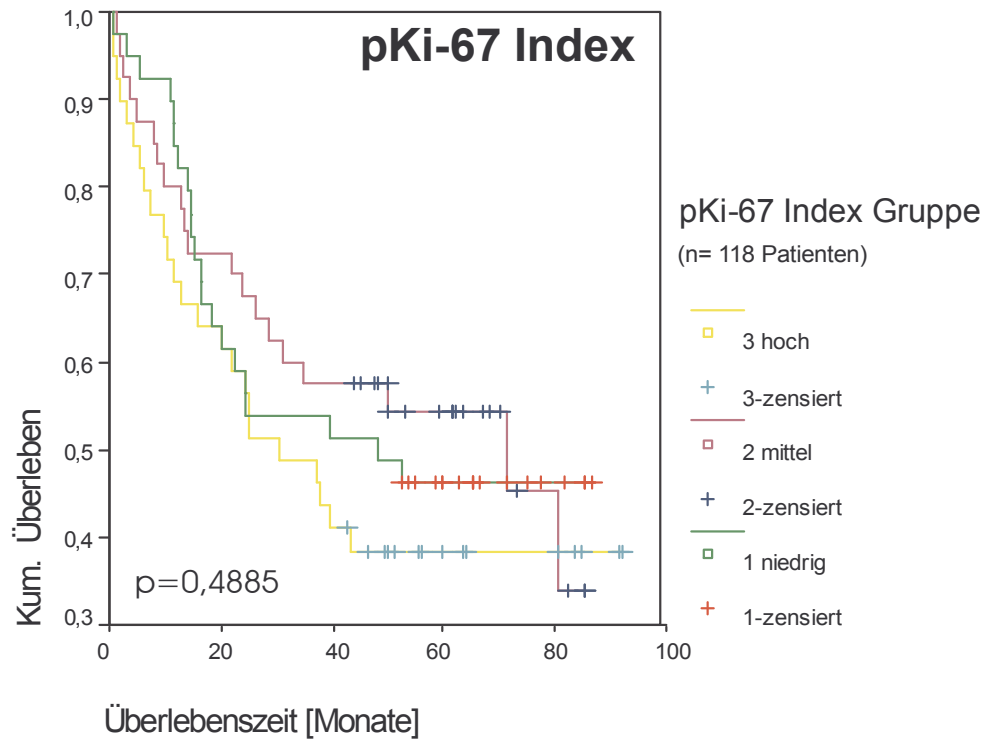


Abb. 19: Kaplan-Meier-Überlebensfunktion für den pKi-67 Index im Gesamtstudienkollektiv

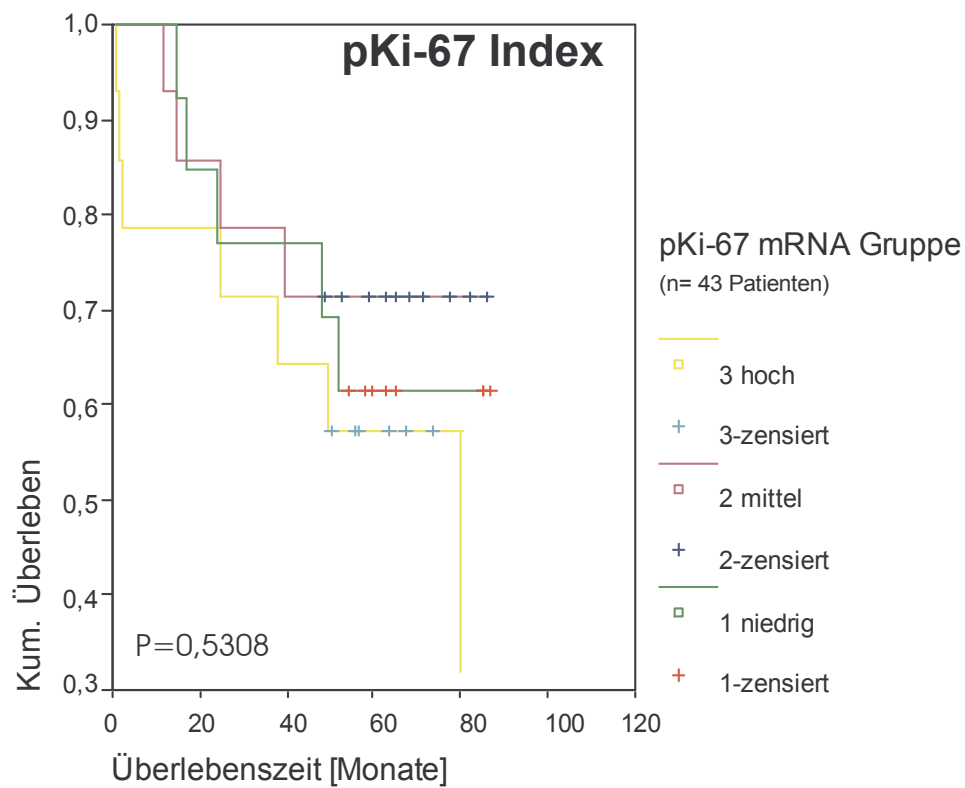


Abb. 20: Kaplan-Meier-Überlebensfunktion für den pKi-67 Index in der pKi-67 mRNA Studiengruppe

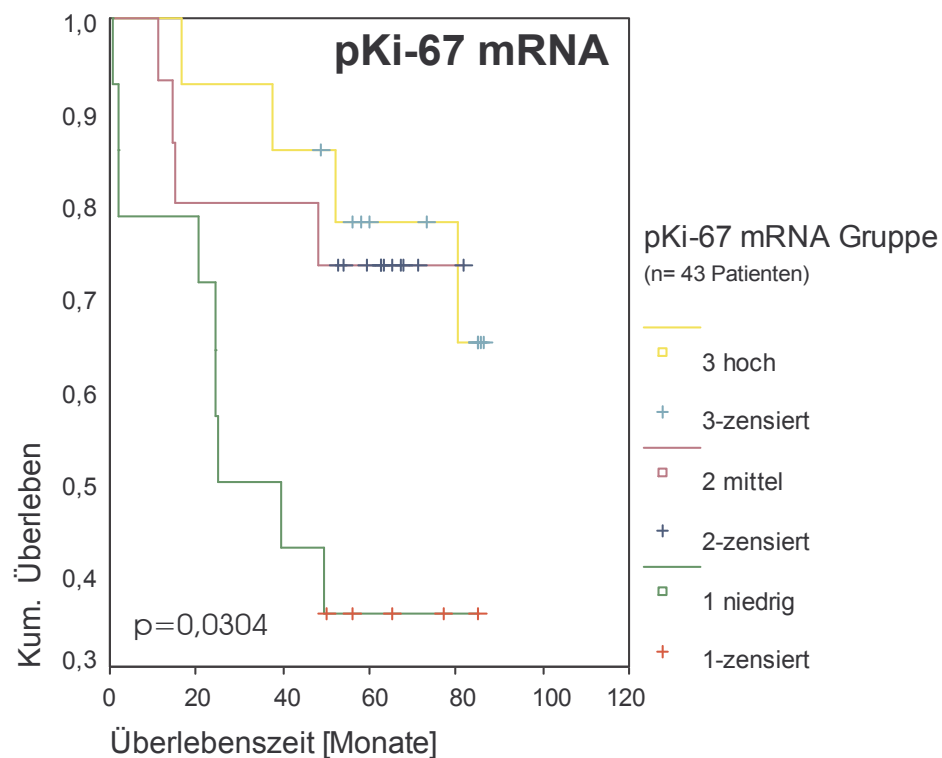


Abb. 21: Kaplan-Meier-Überlebensfunktion für den pKi-67 mRNA Gehalt in der pKi-67 mRNA Studiengruppe

Bezüglich der pKi-67 Markierungsindizes ließ sich weder im Gesamtstudienkollektiv noch in der mRNA Subgruppe ein signifikanter Überlebensvorteil zwischen den einzelnen Gruppen finden (siehe Abbildungen 19 und 20). Die Kurvenverläufe unterscheiden sich kaum. Auffällig war jedoch, daß in der pKi-67 mRNA Gruppe ein hoher mRNA Gehalt mit einer besseren Prognose vergesellschaftet war – im Gegensatz zur pKi-67 Markierungsindex Gruppe, in dieser entsprach ein hoher Markierungsindex tendenziell einer schlechteren Prognose. In der pKi-67 mRNA Subgruppe ließ sich eine signifikant bessere Überlebenszeit in den beiden Gruppen mit einem hohen bzw. mittlerem Gehalt an pKi-67 mRNA als in der Gruppe mit einem niedrigen Gehalt (siehe Abbildung 21) nachweisen. Durch den Log-rank-Test wurde ein p-Wert von 0,0304 für die gesamten empirischen Verteilungen zu den Überlebensfunktionen ermittelt; einen besonders hohen Einfluß hierzu tragen die beiden pKi-67 mRNA Gruppen „niedrig“ und „hoch“ bei, die sich deutlich in bezug auf die Überlebenszeit unterscheiden (siehe Abbildung 21).

3.4.3 Überlebenszeitanalysen mittels Cox-Regression

Um die Variablen, die am besten die in den Daten enthaltene natürliche Varianz erklären, selektieren zu können, werden die zuvor mittels univariater Analyse ermittelten Variablen als auch solche Variablen, von denen sich eine entsprechende Erklärung erhofft wird, als Kovariablen in die Cox-Regression (multivariate Analyse) eingeschlossen (siehe 2.7.1.2). Mit dieser Methode ist ein Vergleich mit etablierten Parametern, die einen Einfluß auf die Überlebenszeit haben (siehe 4.2.2), möglich. Im Studienkollektiv wurden der pKi-67 Index und der pKi-67 mRNA Gehalt mit folgendenden erhobenen Faktoren verglichen: Klassifikation nach den Einzelkomponenten des TNM Systems, UICC-Stadium, Histologie (nach WHO), histopathologisches Grading, präoperativer CEA-Spiegel, Durchführung einer adjuvanten Radio- bzw. Chemotherapie und Geschlecht. Im Gesamtkollektiv (Tabelle 21) korrelierten mit Bezug auf ein 5%-iges Signifikanzniveau in der multivariaten Analyse folgende Parameter signifikant mit der tumorbedingten Überlebenszeit: Tumorausbreitung (T-Kategorie), histo-pathologisches Grading und Radikalität der Operation. Im pKi-67 mRNA Studienkollektiv (Tabelle 22) korrelierten mit Bezug auf ein 5%-iges Signifikanzniveau in der multivariaten Analyse die Parameter Tumorausbreitung (T-Kategorie) und pKi-67 mRNA Gehalt mit der tumorbedingten Überlebenszeit. Während der Parameter Stadieneinteilung nach UICC in der univariaten Analyse eine prognostische Bedeutung besaß, konnte er in der multivariaten Analyse das geforderte Signifikanzniveau nicht erreichen. Eine Übersicht über die Ergebnisse geben die Tabellen 21 und 22.

Tab. 21: Multivariate Analyse der Überlebenszeit im Gesamt-Studienkollektiv (n=118 Patienten) mittels Coxregression

Variable	p	χ^2	Exp(B)
T-Kategorie	0,008	7,270	1,800
N-Kategorie	n.s.		
M-Kategorie	n.s.		
Operationsradikalität	< 0.001	36,678	2,141
Histo-pathologisches Grading	0,008	8,988	2,163
Tumorlokalisation	n.s.		
pKi-67 Index	n.s.		
Geschlecht	n.s.		
UICC Stadium	n.s.		
präoperativer CEA-Spiegel	n.s.		

Tab. 21 (Fortsetzung)

Variable	p	χ^2	Exp(B)
Histologie nach WHO	n.s.		
Adjuvante Radiatio	n.s.		
Adjuvante Chemotherapie	n.s.		
Kombinierte Radio-/Chemotherapie	n.s.		
Geschlecht	n.s.		

Tab. 22: Multivariate Analyse der Überlebenszeit im pKi-67 mRNA Kollektiv (n=43 Patienten) mittels Coxregression

Variable	p	χ^2	Exp(B)
pKi-67 mRNA Gruppe	0,017	4,822	0,458
T-Kategorie	0,028	6,209	2,937
N-Kategorie	n.s.		
Histo-pathologisches Grading	n.s.		
Tumorlokalisation	n.s.		
pKi-67 Index	n.s.		
UICC Stadium	n.s.		
präoperativer CEA-Spiegel	n.s.		
Histologie nach WHO	n.s.		
Geschlecht	n.s.		

4 Diskussion

In dieser Untersuchung wurde eine vergleichende Bestimmung der pKi-67 mRNA und des immunhistologischen MIB-1 Markierungsindex in kolorektalen Karzinomen vorgenommen. Zusätzlich sollte die Hypothese überprüft werden, ob pKi-67 eine Relevanz in bezug auf die postoperative Prognose und klinische Parameter bei kolorektalen Karzinomen hat.

4.1 *Unterschiedliche Modelle zur Quantifizierung von mRNA*

Es existieren eine Vielzahl von molekularbiologischen Methoden, die zur Charakterisierung und Quantifizierung von mRNA Expressionsmustern geeignet sind. Im folgenden wird ein Überblick über einige Methoden gegeben (Ambion Inc., 1999; Müller, 2001):

4.1.1 Northern Blotting

Die aus Zellen isolierte, denaturierte RNA wird zunächst der Größe nach durch eine Agarosegelelektrophorese (siehe 2.4) aufgetrennt, auf eine Nylonmembran als Trägermatrix transferiert und dort fixiert. Der Nachweis spezifischer RNA gelingt durch Hybridisierung mit markierten Sonden.

Die Analyse von mRNA über Northern Blotting ist die einfachste Methode zur Bestimmung der Fragmentgröße und zur Darstellung von Splice-Varianten. Voraussetzung für eine Quantifizierung ist die Integrität der RNA. Schon eine geringe Degradation verfälscht die Ergebnisse der Northern Blot Analyse. Zudem ist die Sensitivität im Vergleich mit der kompetitiven RT-PCR gering.

4.1.2 Nuclease Protection Assays (NPA)

Hier bindet eine markierte, ca. 100 - 400 bp große RNA-Sonde an die in Einzelsträngen vorliegende Ziel-RNA. Die übrigen, nicht gebundenen RNA-Sequenzen werden anschließend durch Nukleasen abgebaut, so daß nur die, durch Bindung mit der Sonde geschützte, Ziel-RNA übrig bleibt. Diese wird abschließend auf einem Polyacrylamidgel dargestellt.

Verglichen mit der Northern Blot Analyse ist sowohl die Sensitivität, als auch die maximale Detektionsmenge des NPA größer. Zudem wird die Reaktion nicht in dem Ausmaß durch teilweise Degradation der RNA gestört, da die Hybridisierung der Sonde meist nicht die komplette Sequenzlänge der Ziel-RNA betrifft. Der NPA eignet

sich vor allem zur gleichzeitigen Detektion verschiedener RNA-Sequenzen (unterschiedlicher Größe). Da die Sonde das RNA-Fragment zwar spezifisch, aber nicht in voller Länge bindet, können mit dem NPA nur schwer Aussagen über die genaue Länge der mRNA gemacht werden. Auch ist gerade bei Quantifizierungen die Spezifität der Bindung ein möglicher Nachteil der Reaktion, denn eine bis zu 400 bp große RNA-Sonde muß spezifisch sämtliche komplementäre Fragmente binden, um sie vor dem abschließenden Nukleasenverdau zu schützen.

4.1.3 *In-situ* Hybridisierung (ISH)

Bei der *in-situ* Hybridisierung ist es nicht erforderlich, RNA aus dem Gewebe zu extrahieren. Die Hybridisierung mit der Sonde findet direkt auf den Gewebeschnitten statt. Dazu werden die Gewebeproben zunächst formalinfixiert, in Paraffin eingebettet, geschnitten und auf Objektträger aufgezogen. Nach einer Reihe von Extraktionsschritten mit Lösungsmitteln werden die Schnitte rehydriert. Es folgt die Bindung der markierten Sonde an das Gewebe. Die Auswertung erfolgt je nach verwendeter Detektionsmethode durch Auszählen oder Messung von Fluoreszenz oder Radioaktivität.

In einer Studie (Duchrow et al., 1998; Duchrow et al., 2003) wurde bei 47 kolorektalen Karzinomen sowohl der MIB-1-Index (Mittelwert 42%) als auch der ISH-Index (Mittelwert 59%) bestimmt. In 68% der Fälle gab es eine gute Korrelation zwischen beiden Indizes, während in den restlichen Fällen eine deutliche Diskrepanz bestand. Es fiel auf, daß in dieser Gruppe 30% der Zellen sich positiv mit MIB-1 anfärben ließen, jedoch keine Expression von pKi-67 mRNA *in situ* zeigten. Genau diese Patienten hatten eine signifikante höhere Überlebensrate ($p=0,042$), so daß die Autoren vermuten, daß diese Zellen sich in einem Arrest des Zellzyklus befinden.

Die *in-situ* Hybridisierung ist relativ arbeitsintensiv. Zudem ist diese Methode nur wenig zur absoluten Quantifizierung geeignet. Sie läßt jedoch genaue Aussagen über die regionale Verteilung zu.

4.1.4 Methoden der quantitativen PCR

Das Ziel einer quantitativen PCR ist es, von der nach Amplifikation erhaltenen Menge an DNA-Molekülen auf die initial eingesetzte Konzentration rückschließen zu können. Zur Quantifizierung von PCR-Produkten wurden verschiedene Modelle entwickelt:

4.1.4.1 *Quantitative PCR ohne Standard*

Eine quantitative PCR ohne Verwendung von Standards muß gewisse Bedingungen erfüllen. Die Streuung der Effektivität E muß minimal sein; die Quantifizierung muß unbedingt vor Erreichen der Plateauphase erfolgt sein. Sind diese Voraussetzungen erfüllt, dann besteht zwischen dem Logarithmus von Ausgangskonzentration und Endkonzentration ein linearer Zusammenhang. Die Quantifizierung ohne Standard liefert allerdings nur relative, vergleichende Werte. Eine absolute Quantifizierung kann mit dieser Methode nicht durchgeführt werden.

4.1.4.2 *Quantitative PCR mit Standard*

Um eine mögliche Streuung der Effektivität E in die Quantifizierung einbeziehen zu können, werden interne Standardsequenzen mit amplifiziert, die entweder endogen bzw. exogen sein können (siehe 1.4.3). Durch Berechnung des Verhältnis von amplifiziertem Target zu amplifiziertem Standard, kann auf das Verhältnis beider Sequenzen vor Reaktionsbeginn zurückgeschlossen werden. Auch hier muß die Quantifizierung erfolgen, bevor die Reaktion die Plateauphase erreicht.

4.1.4.3 *Quantitative kompetitive PCR*

Um den Problemen von Endzeitbestimmungen zu begegnen wurden eine Reihe von quantitativen kompetitiven PCR Techniken entwickelt. Die kompetitive PCR verwendet eine exogene Sequenz als Standard. Notwendig ist eine zu amplifizierende Sequenz, die gleiche Primerbindungsstellen und eine gleiche Amplifikationseffektivität wie die Ziel-DNA besitzt, aber auf bestimmte Art und Weise von der Ziel-DNA unterscheidbar ist. Damit konkurrieren beide Sequenzen während der Amplifikation um dieselben Primer.

In einer Studie mit ähnlicher Fragestellung (Häsemeyer, 1999; Duchrow et al., 2001a) wurde z.B. ein Primer mit einer veränderten Base verwendet, so daß in der pKi-67 Antigen cDNA spezifischen Sequenz eine artifizielle Hind-III Schnittstelle resultierte. An dieser Schnittstelle kann in einem anschließenden Schritt das Hind-III-Enzym angreifen, die Produkte sind damit aufgrund ihrer Größe unterscheidbar. Anhand von 25 kolorektalen Karzinomen wurde sowohl der pKi-67 Index (Mittelwert 60%) als auch der pKi-67 mRNA-Gehalt (Mittelwert 0,88 amol) bestimmt. Die Autoren stellten fest, daß hohe Werte des Ki-67 Index ebenso hohe Werte des pKi-67 mRNA Gehaltes gegenüber standen. In Bereichen niedrigerer Konzentration zeigte sich

dieser Zusammenhang dagegen nicht so deutlich. Wurden die Patienten in Gruppen ober- beziehungsweise unterhalb des jeweiligen Medians eingeteilt, so ergaben sich für die Gruppen unterhalb der Grenzwerte jeweils signifikant bessere Überlebensraten sowohl für den Ki-67 Protein mRNA Gehalt ($p = 0,0003$) als auch für den Ki-67 Index ($p = 0,0035$).

Eine andere häufig benutzte Methode beruht auf unterschiedlicher Sequenzlänge von Ziel- und kompetitiver DNA, so daß in einer anschließenden Gelelektrophorese die Produkte unterscheidbar sind.

Eine bekannte Menge des Kompetitors wird zur Probe gegeben und zusammen mit der Probe in gleicher Reaktion vervielfältigt. Wenn die Amplifikationseffektivität E während der gesamten Reaktion konstant bleibt, ist auch die Rate Ziel-DNA zu Kompetitor konstant. Da die Menge des hinzugegebenen Kompetitors bekannt ist, kann man durch Bestimmung der Rate Ziel-DNA zu Kompetitor am Ende der Reaktion die Startmenge der Ziel-DNA berechnen.

Methoden der quantitativen PCR sind erfolgreich benutzt worden, um DNA und RNA zu quantifizieren. Der dynamische Bereich solcher Reaktionen ist eingeschränkt. Das optimale Verhältnis von Ziel-DNA zu kompetitiver DNA liegt zwischen 1:10 bis 10:1. Da naturgemäß die Menge der Ziel-DNA unbekannt ist, müssen oft mehrere Verdünnungen getestet werden, um ein optimales Verhältnis zu erreichen. Ein weiterer Nachteil besteht darin, daß bei Untersuchung einer neuen Sequenz erneut ein Kompetitor entwickelt werden muß. Dies bringt einen erheblichen Aufwand mit sich, da für jeden Kompetitor der Nachweis erbracht werden muß, daß die Effektivität von Ziel-DNA und Kompetitor gleich ist. Außerdem erfordert eine kompetitive PCR eine Bestimmung von Ziel-DNA und Kompetitor, was in der Regel weitere zeitaufwendige Bearbeitungsschritte nach der PCR erfordert.

4.1.4.4 Echtzeitbestimmung

Bei der Echtzeitbestimmung registriert man den frühesten Anstieg über die Nachweisgrenze, die C_T –Werte. Dieses macht eine Verwendung von Kompetitoren in der PCR unnötig. Der dynamische Bereich der PCR wird auf sechs Zehnerpotenzen vergrößert. Meßwerte können zu jedem beliebigen Zeitpunkt der PCR bestimmt werden, in der Regel nach jedem PCR Zyklus. Ein weiterer Vorteil entsteht dadurch, daß der Anstieg über die Nachweisgrenze noch in der exponentiellen Phase und nicht in der Plateauphase der PCR liegt. In der exponentiellen Phase hat noch kein

Verbrauch von PCR Komponenten stattgefunden. Bei Endpunktbestimmungen findet die Messung meist nach der exponentiellen Phase statt. Bereits eine kleine Reduzierung von Reagenzien kann einen drastischen Effekt auf die Menge des Endproduktes haben.

Die weitere Bearbeitung der Proben nach der PCR entfällt – der Zeitaufwand sinkt; hinzu kommt, daß ein Bearbeitungsschritt als mögliche Fehlerquelle entfällt. Das System minimiert die Gefahr der Kontamination zwischen verschiedenen Proben, weil es die Fluoreszenzsignale in Gefäßen mit optischen Deckeln beobachtet und so die Notwendigkeit des Öffnens entfällt.

Außerdem sind die C_T -Werte weniger sensitiv für Auswirkungen von inhibierenden Effekten auf die PCR. Ein Grund hierfür ist, daß die Messung von Anfang an, also noch in der exponentiellen Phase beginnt.

4.2 Prognostische Faktoren

4.2.1 Prognostische Faktoren und ihre Anwendung bei Malignomen

Für viele Tumorentitäten existieren konventionelle prognostische Faktoren, wie Tumorstadium und histologische Differenzierung, die Patientensubgruppen mit unterschiedlichen kumulierten 5-Jahres- und Langzeitüberlebensraten identifizieren. Das individuelle Risiko ist weiterhin schwer vorherzusagen – ist jedoch bedeutsam für den einzelnen Patienten, dessen Familie, eine individuelle Therapieplanung und die Forschung. Deshalb existieren eine Vielzahl von Bestrebungen, neue Parameter zu finden, die eine individualisierte Risikoeinschätzung ermöglichen. Diese Bestrebungen werden durch neue, gerade auch molekularbiologische Erkenntnisse auf dem Gebiet der Onkogenese gefördert (Kimura et al., 2000).

Ein zuverlässiger prognostischer Marker sollte robust, reproduzierbar, objektiv und übertragbar auf andere Labore sein. Die Möglichkeit der Quantifizierung ist entscheidend. Nicht-quantitative oder semiquantitative Methoden erscheinen ungeeignet. Die Verwendbarkeit des Markers muß für jede einzelne Tumorentität und Methode getestet werden (Hall und Going, 1999).

Es wird zwischen prädiktiven und prognostischen Faktoren unterschieden. Prognostische Faktoren sind objektive Eigenschaften, aus denen der Verlauf einer Erkrankung vorausgesagt werden kann; prädiktive Faktoren sind Indikatoren für das relative Ansprechen bzw. Nichtansprechen einer Erkrankung auf eine Behandlungsform (Hall und Going, 1999).

Desweiteren kann eine Einteilung in prospektive Studien, in die neu diagnostizierte Patienten eingeschlossen werden und für eine ausreichende Zeit nachbeobachtet werden, um Faktoren vergleichen zu können, und retrospektive Studien, in denen die Untersuchung an gelagerten Proben durchgeführt wird, getroffen werden. Bei den retrospektiven Studien besteht der Vorteil, daß Informationen über die mittlere bzw. längerfristige Nachbeobachtungszeit sofort zur Verfügung stehen, der Nachteil, daß klinische Informationen oft unvollständig sind (Simon und Altman, 1994).

Um eine gesteigerte Vergleichbarkeit mit gleichzeitiger Präzisierung der Aussage bei gegebener Komplexität der Studien zu erreichen, wird in der Literatur ein stufenweises Vorgehen bei der Etablierung von prognostischen Markern gefordert, analog zum Studiendesign in der pharmazeutischen Forschung (Simon und Altman, 1994; Hall und Going, 1999). Als weiteres Kriterium wird die Definition der Hypothese vor Beginn der Analysen empfohlen. Die Autoren schlagen eine Einteilung in 3 Phasen vor, eine genauere Übersicht gibt Abbildung 22.

Beobachtung

Biologisch, biochemisch, genetisch, klinisch



Phase I	Explorative Studien
Methodendefinition, Zusammenhang der Variablen mit diagnostischen Parametern und etablierten prognostischen bzw. prediktiven Daten	

Hypothese



Phase II	Retrospektive Testung der klinischen Anwendbarkeit
Analyse der Methode mittels statistisch relevanten Kohorten von gut definierten Patienten. Test der Hypothese, Definition von Grenzwerten. Validation anhand von weiteren Daten	

Klinische Forschung



Phase III	Prospektive Testung der klinischen Anwendbarkeit
Prospektive Definition der Methode in der klinischen Praxis, vorzugsweise in der Form von multizentrischen Studien	

Klinische Anwendung

Abb. 22: Schrittweises Vorgehen von initialer Beobachtung bis hin zur klinischen Anwendung (modifiziert nach Hall und Going, 1999)

Bei Karzinomen hängt die Prognose von der Tumormalignität und damit von der proliferativen Aktivität der Tumorzellen ab. Diese kann z.B. ein wichtiger Parameter

für die Entwicklung von Lebermetastasen sein (Nanashima et al., 1999). In weiteren Studien konnte gezeigt, daß bei Ansprechen auf Chemotherapie oder Strahlentherapie im Anschluß an die Therapie eine verringerte Proliferation resultierte (Plaat et al., 1999). Ein idealer Proliferationsmarker sollte zwei Bedingungen erfüllen (van Dierendonck et al., 1989): (1) Das Antigen wird in den Wachstumsphasen des Zellzyklus von allen Zellen exprimiert, (2) Der Übergang aus einem beliebigen Abschnitt des Zellzyklus in einen nicht-proliferativen Status wird durch ein rasches Verschwinden des Antigens gekennzeichnet. Einen solchen idealen Proliferationsmarker stellt die Mitose dar, d.h. Zellen, die sich in der Mitose befinden, unterscheiden sich histologisch von anderen Zellen. Der Mitose-Index läßt sich jedoch nur mit großem Aufwand ermitteln. Immunhistologische Proliferationsmarker sind einfacher in der praktischen Anwendung, aber in der Regel keine idealen Marker. So erfüllt pKi-67 zwar das Kriterium (1), aber es konnte gezeigt werden, daß pKi-67 in Zellen, die in der S-Phase blockiert wurden, über eine verlängerte Halbwertszeit von ca. 60 Stunden relativ stabil blieb (van Oijen et al., 1998). Kriterium (2) wäre damit in Zellzyklus-arretierten Zellen nicht erfüllt.

Der Proliferationsmarker zeigt an, ob sich eine Zelle *teilen wird*. Der Ausdruck „teilen wird“ bezeichnet ein Ereignis, das in der Zukunft liegt. Eine Aussage über das Potential der Zelle, sich zu teilen, ist jedoch keine definitive Aussage, daß sie sich auch teilen wird. In diesem Zusammenhang muß berücksichtigt werden, daß eine Zelle weiter proliferieren könnte, nachdem z.B. ein möglicher Block entfernt wurde. Zudem spiegeln Wachstumsraten nicht unbedingt die wahre Proliferationsrate wieder, da die Zeit für die Vervollständigung eines Zellzyklusses nicht bestimmt werden kann. Tumorwachstum ist das Ergebnis von Proliferation und Zellverlust. In der Praxis sollten solche Betrachtungen nicht als Nachteil betrachtet werden. Der pKi-67 Index basiert direkt auf einem physiologischen Parameter, der eine Rolle im Zellzyklus spielt. Deshalb könnte er einen Einblick in die Wachstumseigenschaften eines Tumors, das Ansprechen auf Medikamente und das Überleben eines Patienten geben (Scholzen und Gerdes, 2000).

4.2.2 Prognostische Faktoren bei kolorektalen Karzinomen

Prognostische Parameter erfüllen bei malignen Erkrankungen verschiedene Funktionen. Im Augenblick dienen die meisten Prognosefaktoren beim kolorektalen Karzinom dazu, den klinischen Verlauf des individuellen Patienten mit möglichst

hoher Wahrscheinlichkeit vorausszusagen und dementsprechend Subgruppen mit hohem Rezidivrisiko zu selektionieren, die in der Nachsorge besonders intensiv überwacht werden. Desweiteren können für adjuvante Therapiemodalitäten anhand verschiedener prognostischer Parameter Patientengruppen gezielt definiert werden, die von einer solchen Therapie profitieren. Etablierte prognostische Parameter des kolorektalen Karzinoms sind: Primäres Tumorstadium (z.B. nach UICC-,TNM-Klassifikation), Radikalität der Operation, spontane Tumorperforation, intraoperative Ruptur des Tumors, Einbruch in Lymph- oder Blutgefäße und präoperative CEA Spiegel (Compton et al., 2000; Schalhorn et al., 2001). Auch die Erfahrung des Chirurgen bzw. der behandelnden Klinik ist ein Prognosefaktor (Hermanek, Jr. et al., 1994). Mit dem Fortschritt auf dem Gebiet der Molekularbiologie sind neue Parameter untersucht worden, die nicht nur im Hinblick auf ihre prognostische Aussagekraft wertvoll sind, sondern vielmehr auch bezüglich der Information, die sie über die Biologie des individuellen Tumors geben können. Damit könnten sie jedoch auch Optionen für neue Therapiestrategien bieten, die sich an der von ihnen vermittelten tumorbiologischen Information orientieren. Beispiele für solche neueren Faktoren sind: nm23, c-src, uPA-System, bcl-2, MMP-1, c-fos/c-jun, c-ras, DCC (LOH 18q), p53 und disseminierte Tumorzellen (Allgayer et al., 2001). Eine Übersicht über prognostische Faktoren bei kolorektalen Karzinomen gibt Tabelle 23. Pki-67 ist in dieser Übersicht in der Kategorie III - Faktoren mit unklarem prognostischem Wert eingeordnet.

Tab. 23: Prognostische Faktoren des kolorektalen Karzinoms, College of American Pathologists (nach Compton et al., 2000)

Kategorie I	Faktoren mit etabliertem prognostischem Wert
	Tumorausbreitung, z.B. nach TNM-, Dukes-, Astler-Coller-Klassifikation
	Einbruch in Lymph- oder Blutgefäße
	Radikalität der Operation
	Präoperative CEA Spiegel
	Operateur/behandelnde Klinik
Kategorie IIA	Faktoren mit prognostischem Wert, die in weiteren Studien validiert werden müssen
	Histologisches Grading
	Radialer Tumorrandsstatus
	Tumorklassifikation nach neoadjuvanter Therapie
Kategorie IIB	Faktoren mit wahrscheinlich prognostischem Wert
	Histologische Typisierung
	Lymphatische Reaktion auf Tumor
	Mikrosatelliteninstabilität (hMLH1, hMSH2)
	Deletion bzw. Homozygotität des Tumor-Suppressor-Gens DCC
	Tumorrandskonfiguration

Tab. 23 (Fortsetzung)

Kategorie III	Faktoren mit unklarem prognostischem Wert
	DNA Gehalt Molekulare Marker Tumorsuppressorgene (LOH 1p/p53, LOH 8p, LOH 1p, LOH 5q) Onkogene (K-ras, c-myc), Apoptosegene (bcl-2, BAX) DNA Synthesegene (Thymidylatsynthase, Thymidinphosphatase) Transforming growth Faktor (TGF) und Epidermal growth Faktorrezeptor (EGF-R) Gene (TGF-, TGF-, c-erb-b/her2/neu, EGF-R), Cyclin-dependent Kinase-Inhibitorgene (p27, p21) Angiogenese-Gene (vascular endothelial growth factor) Adhäsionsmoleküle und Glykoproteine (CD44, E-cadherin, sialo-Tn Antigen) Matrixmetalloproteasen und Inhibitoren (Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator) Metastasen Suppressorgen (nm23-H1) Perineurale Invasion Mikrogefäß-Dichte Zellproteine und Carbohydrate Klasse I+II HLA Moleküle, CA 19–9, CA 72–4, Sialyl Lex, Sialosyl-Tn, Urokinase-Typ Plasminogenaktivator, Plasminogenaktivatorinhibitor 2, Glykoprotein 72, P-Glykoprotein, MUC-1, E-Cadherin, Integrine, Typ IV Kollagen, Laminin, Tenascin, Cytokeratin 20 Phospholipase C. Sekretorische Komponente von Immunglobulin A, Metallothionein, EGF-R, Gastrinrezeptor, Somatostatinrezeptoren Sucraseisomaltase, Cathepsin B, L, und D, Ferritin, CD44, Vitamin D Rezeptorprotein Peritumorale Fibrose Peritumorale inflammatorische Reaktion Neuroendokrine Differenzierung Proliferationsindizes (pKi-67, PCNA)
Kategorie IV	Faktoren ohne prognostischen Wert
	Tumorgroße Tumorkonfiguration

4.2.3 Verwendung von pKi-67 als prognostischer Faktor

Aufgrund seines Verhaltens im Zellzyklus (siehe 1.3.1) eignet sich pKi-67 zur Beschreibung der Wachstumsfraktion eines Tumors. Da die Wachstumsfraktion und damit der pKi-67 Index nur von der Zahl der proliferierenden Zellen abhängt, nicht aber von der Zeit, die Zellen für das Durchlaufen der intermitotischen Phasen des Zellzyklusses benötigen, ist die Wachstumsfraktion nicht immer allein ausreichend, um das Verhalten eines Tumors zu charakterisieren (Kubota et al., 1992; Scholzen und Gerdes, 2000). Dennoch konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, daß pKi-67 eine prognostische und z.T. auch eine prediktive Relevanz bei verschiedenen Tumorentitäten (z.B. Mammakarzinomen, Weichteiltumoren, Bronchialkarzinomen, Astrozytomen, Cervixkarzinomen und Prostatakarzinomen; siehe dazu auch 1.3.3) besitzt. In der Literatur werden verschiedene, in der Regel immunhistochemische Methoden zur Bestimmung des Gehalts von pKi-67 beschrieben. Jede Methode hat technische und theoretische Begrenzungen und muß deshalb neu validiert werden. In einer Studie konnte gezeigt werden, daß verschiedene Methoden zum Nachweis von pKi-67 reproduzierbare und vergleichbare Ergebnisse produzieren (Öfner et al., 1996).

4.2.4 pKi-67 Expression in kolorektalem Gewebe

Die Prognose bei kolorektalen Karzinomen wird bislang hauptsächlich aufgrund von konventionellen klinisch-pathologischen Angaben, wie der Stadieneinteilung nach UICC, die sich aus den Einzelfaktoren lokale Tumorausbreitung, Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen zusammensetzt, bzw. dem TNM-System und dem Differenzierungsgrad gestellt (Mairinger et al., 1999). Jedoch sind diese konventionellen klinisch-pathologischen Parameter nicht vollständig in der Lage aggressive Tumoren zu identifizieren, die von einer adjuvanten Therapie profitieren (Buglioni et al., 1999). Mit dem zunehmenden Verständnis über Veränderungen auf molekularbiologischer Ebene (siehe auch 1.2), wurde versucht, molekularbiologische Marker zu etablieren. Die Proliferationsaktivität ist ein solcher möglicher Marker und wurde bei kolorektalen Karzinomen in mehreren Untersuchungen durch verschiedene Methoden (z.B. Bestimmung der S-Phase Fraktion im Zellzyklus mittels Durchflußzytometrie, des titrierten Thymidineinbaus, von PCNA, des Bromodeoxyuridin-Einbaus und von pKi-67) bestimmt. Der Zusammenhang zwischen pKi-67 und postoperativer Prognose bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen wird in der Literatur kontrovers diskutiert (Nanashima et al., 1999; Brown und Gatter, 2002).

In der Literatur schwanken die Angaben zum Mittelwert des pKi-67-Index bei kolorektalen Karzinomen zwischen 25 und 60% abhängig von Patientenzahl, Materialaufarbeitung, verwendeten Antikörpern, Methode und Intensität der Färbung (Jansson und Sun, 1997, siehe auch Tabelle 24). Zudem waren auch Ein- bzw. Ausschlusskriterien bei der Patientenselektion uneinheitlich, z.B. (neo-)adjuvante Radio-/Chemotherapie, nichttumorbedingtes Versterben. Somit sind diese Studien in bezug auf prognostische Relevanz nur schwer zu vergleichen. Bei der überwiegenden Mehrzahl wurden immunhistochemische Methoden und damit der pKi-67 Index verwendet. Eine detaillierte Übersicht zu pKi-67 bei kolorektalen Karzinomen gibt Tabelle 24.

Tab. 24: Übersicht über klinische Untersuchungen zu pKi-67 und prognostischer Relevanz bei kolorektalen Karzinomen in der Literatur (IHC – Immunhistochemie, ISH – *In situ*-Hybridisierung, mRNA – mRNA Bestimmung)

Patienten-anzahl	pKi-67 Index [MW]	Methode	Prognostische Relevanz	Autoren
61	38,7%	IHC	Ja	Porschen et al. (1989)
62	37,3%	IHC	Nein	Hemming et al. (1992)
100	34,6%	IHC	Nein	Kubota et al. (1992)
44	28%	IHC	Nein	Baretton et al. (1996)
106	31,9%	IHC	Nein	Öfner et al. (1996)
255	<50% - 38% >50% - 62%	IHC	Nein	Jansson und Sun (1997)
30	58,97%	IHC	Nein	Kyzer und Gordon (1997)
171	25%	IHC	Nein	Buglioni et al. (1999)
33	<33% - 48,4% 33-66% - 22,6% >66% - 29%	IHC	Nein	De Jong et al. (1998)
51	59%/42%	IHC/ISH	Ja	Duchrow et al. (1998)
73	21,8%	IHC	Nein	Handa et al. (1999)
42	<10% - 24% 10-50% - 50% >50% - 14%	IHC	Nein	Mairinger et al. (1999)
27	44,0%	IHC	Nein	Nanashima et al. (1999)
56	43,7%/36,8%	IHC	Ja	Palmqvist et al. (1999)
110	50,6%	IHC	Ja	Kimura et al. (2000)
25	60%/0,88 amol	IHC/mRNA	Ja	Duchrow et al. (2001)
706	<20% - 11,4% 21-40% - 37,5% 41-60% - 41,6% 61-80% - 9% >81% - 0,5%	IHC	Ja	Allegra et al. (2003)
81	Negative - 2.4% <10% - 20.9% 10-30% - 43.2% >30% - 33.3%	IHC	Ja	Dziegel et al. (2003)

Ein Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse in der Literatur könnte das heterogene Verhalten von kolorektalen Karzinomen in bezug auf mehrere Parameter, inklusive Tumorzellproliferation sein (Palmqvist et al., 1999).

Das heterogene Verhalten konnte durch eine heterogene Expression von pKi-67 in kolorektalen Karzinomen belegt werden (Kimura et al., 2000; Brown und Gatter, 2002). Hinzu kommt, daß kolorektale Karzinome biologisch polarisierte Karzinome mit einer luminalen und einer invasiven Seite sind. In Untersuchungen konnte eine höhere proliferative Aktivität an der luminalen als an der invasiven Grenze mittels pKi-67 Expression gezeigt werden. Die Ursache ist nicht bekannt, es werden Einflüsse durch sekundäre Gallensäuren (v.a. lithocholische Säuren), Bakterien im

Darmlumen, kurzkettige Fettsäuren, Steroidderivate und zur OP-Vorbereitung verabreichte, reinigende Substanzen vermutet (Palmqvist et al., 1999).

4.3 Diskussion der eigenen Ergebnisse

4.3.1 Beurteilung der Alters- und Geschlechtsverteilung

Das Durchschnittsalter der untersuchten Patienten beträgt 68,8 Jahre und entspricht damit etwa dem vergleichbarer Untersuchungen anderer Autoren, so z.B. 59 Jahre (Brandao et al., 1985), 67,5 (Bohm et al., 1990) bzw. 69 Jahre (Chapuis et al., 1985). Beim Vergleich der Altersstrukturen ist die Geschlechtsverteilung zu berücksichtigen. In der vorliegenden Arbeit beträgt das Durchschnittsalter bei den Männern 66,5, bei den Frauen hingegen 73,1 Jahre. Ein ähnlicher geschlechtsspezifischer Altersunterschied von 6,6 Jahren liegt auch bei Untersuchungen anderer Autoren vor: 2,8 Jahre (Bohm et al., 1990), 3 (Chapuis et al., 1985) bzw. 4,2 Jahre (Boland et al., 2000). Das untersuchte Patientenkollektiv besteht zu 56,1% aus Männern und zu 43,9% aus Frauen. Ein ungefähr ausgeglichenes Verhältnis findet sich auch bei den meisten Kollektiven anderer Autoren, so z.B. von 44% zu 56% (Bohm et al., 1990) bzw. von 46% zu 54% (Boland et al., 2000). Damit kann das untersuchte Patientenkollektiv bezüglich Altersstruktur und Geschlechtsverteilung als repräsentativ angesehen werden. Jedoch ist zu berücksichtigen, daß Patienten mit kolorektalen Karzinomen im Mittel ein höheres Durchschnittsalter als Patienten mit anderen Tumorentitäten haben (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2002).

4.3.2 Beurteilung der 5-Jahres-Überlebenszeiten

Laut Robert-Koch-Institut (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2002), lag die relative 5-Jahres-Überlebensrate der kolorektalen Karzinome im Jahre 1999 für Männer bei 48% und für Frauen bei 51%. Die 5-Jahres-Überlebensrate lag vergleichbar in unserem Gesamtkollektiv bei 46,3% und in der pKi-67 mRNA Subgruppe bei 62,4%. Der deutliche Unterschied zwischen den zwei Gruppen ist in der Selektion der Patienten begründet (siehe 3.3.1). Diese wurde vorgenommen, um die Auswertung nicht von vornherein zu beeinflussen und bedeutet zugleich eine höhere Überlebenswahrscheinlichkeit. Aber auch innerhalb der homogenen pKi-67 mRNA Subgruppe fanden sich deutliche Unterschiede (siehe 3.4.1). Auffällig war, daß bei niedrigem pKi-67 mRNA Gehalt die 5-Jahresüberlebens-

rate (35,7 %) geringer war als bei mittlerem und hohem mRNA Gehalt (73,3 bzw. 77,9 %). Mögliche Gründe hierfür werden in Kapitel 4.3.4 diskutiert.

4.3.3 Beurteilung der Methoden zur Quantifizierung

Zur vergleichenden, quantitativen Bestimmung der pKi-67 mRNA und des pKi-67 Markierungsindex wurde eine TaqMan - Realtime - Polymerasekettenreaktion (siehe 1.4.2 und 2.5) etabliert. Eine solche Bestimmung der pKi-67 mRNA stellt eine objektivere, untersucherunabhängigere Methode dar als die Bestimmung mittels subjektiver Verfahren, wie z.B. Immunhistochemie, *in situ*-Hybridisierung oder semiquantitative Bestimmungen. Es handelt sich um ein nicht radioaktives (siehe 4.1.3) oder strahlenbelastendes Verfahren.

Im Vergleich zur konventionellen quantitativen RT-PCR hat die Real-Time PCR einen wesentlich größeren linearen, dynamischen Meßbereich von 10^7 (10^3 bei der konventionellen quantitativen RT-PCR, mit einem idealen Zielsequenz/Kompetitor Verhältnis von 10:1 bis 1:10). Bei der Real-Time PCR entfallen zudem notwendige zeitaufwendige Postamplifikationsschritte, wie z.B. bei Verfahren die einen ELISA (Duchrow et al., 2001a) beinhalten. Da in einem Arbeitsgang eine große Anzahl von Proben durch die Verwendung von Mikrotiterplatten (96 Proben pro Plate) quantifiziert werden können, ist der Zeitaufwand relativ gering. Inklusive Vorbereitung der Proben (Probenentnahme, RNA Isolierung, reverser Transkription und quantitativer PCR) ist ein Ergebnis innerhalb von 24 Stunden zu erhalten. Sie stellt daher eine sehr gut zur Automatisierung geeignete, sensitive und exakte Methode zur Quantifizierung dar. Ein weiterer Vorteil ist, daß weitere Oligonukleotide für andere Zielsequenzen mit dem gleichen Protokoll und universellem Mastermix für die Amplifizierung verwendet werden können. Ein weiterer Nachteil der immunhistochemischen Bestimmung der Proliferationsaktivität kann durch die quantitative RT-PCR beseitigt werden: Tumoren bestehen aus einem heterogenen Zellverband mit einer intratumoralen Variation. Durch Entnahme von ausreichend großen Gewebsstücken (>20 mg Gewebe) wird der Unterschied nivelliert (Duchrow et al., 2001a).

Insgesamt stellt die entwickelte Methode zur Quantifizierung der pKi-67 mRNA eine schnelle und zuverlässige Methode dar, die auch zur Quantifizierung der mRNA-Expression weiterer Gene verwendet werden kann. Zur Zeit bieten verschiedene Hersteller (z.B. ABI PRISM von PE-Applied Biosystems, Light Cycler® von Roche-

Diagnostics, iCycler® von BioRad, Mx4000® von Stratagene, Smart Cycler® System von Cepheid, Rotorgene® von Corbett Research) Real-time PCR-Geräte an.

Eine korrekte Normalisierung mittels eines Standards ist Voraussetzung für valide Ergebnisse. Für die RT-PCR wird bislang ein einziges Kontrollgen verwendet. Eine Literaturanalyse zeigte, daß dafür in mehr als 90% der Fälle eines der Gene β -Aktin, GAPD, 18S oder 28S rRNA verwendet wird (Suzuki et al., 2000; Vandesompele et al., 2002). Eine andere Studie konnte jedoch zeigen, daß bei Verwendung eines einzelnen Kontrollgens bei 25% der Fälle eine Schwankungsbreite mit dem Faktor 3, bzw. bei 10% mit dem Faktor 6,4 auftreten kann. Die Autoren entwickelten aus diesem Grunde eine Methode, die auf dem Mittelwert mehrerer Kontrollgene beruht und konnten, damit die Fehlerquelle deutlich reduzieren (Vandesompele et al., 2002). Unsere Quantifizierung bediente sich ebenfalls eines Kontrollgens (β -Aktin, siehe 1.4.3), ist damit absolut literaturkonform, jedoch möglicherweise ungenauer als die Verwendung mehrerer Kontrollgene

4.3.4 Beurteilung der Ergebnisse

Der in der Arbeit erhobene durchschnittliche pKi-67 Index lag bei 38,3% und befindet sich damit im in der Literatur angegebenen Bereich (siehe Tabelle 24). Für den pKi-67 mRNA Gehalt ist nur eine Voruntersuchung mittels ELISA bekannt (Duchrow et al., 2001a); wegen der unterschiedlichen Methodik ist kein direkter Vergleich möglich. In der vorliegenden Arbeit fand sich bei vergleichender Analyse keine signifikante Korrelation zwischen dem pKi-67 Index und dem Gehalt an pKi-67 mRNA. Bei der Untersuchung zweier anderer Gene (TS- und DPD-Gen) mit gleicher Methodik konnte eine solche Korrelation nachgewiesen werden (Kornmann et al., 2003), insofern sollten technische Unzulänglichkeiten keine Rolle spielen.

Als Ursache für eine Diskrepanz zwischen pKi-67 Index und mRNA Gehalt sind mehrere Erklärungsmodelle denkbar:

1.) Bei der Erhebung des pKi-67 Index wird ein gefärbter Zellkern unabhängig von der in ihm enthaltenen Menge an Ki-67 Antigen als positiv gewertet. Die in der Zelle für das Ki-67 Antigen kodierende Menge an mRNA bleibt dabei unberücksichtigt, ein als negativ gewerteter Zellkern könnte also trotzdem eine gewisse Menge an pKi-67 mRNA enthalten.

2.) Das Ki-67 Protein wird in allen aktiven Phasen des Zellzyklus (G_1 -, S-, G_2 -, M-Phase) exprimiert, damit auch in dem Fall eines G_1 /S oder G_2 /M Arrests. Dies konnte

durch eine Arbeitsgruppe an zellzyklusarretierten Osteosarkomzellen gezeigt werden (van Oijen et al., 1998). Deshalb sind nicht unbedingt alle Zellen, die das Antigen exprimieren, auch aktiv proliferierend. Die Bestimmung des pKi-67 Index würde auf ein schnelleres Tumorwachstum hinweisen als in der Realität der Fall. Auch für kolorektale Karzinome konnte dieses Phänomen gezeigt werden (Ziemann, 2003; siehe auch 4.1.3). Die Autoren vermuten einen Zellzyklusarrest und erklären die bessere Prognose dadurch, daß die Zellen, die noch in der Lage sind, den Zellzyklus zu blockieren, weniger maligne sind. Sie könnten für eine Radio- bzw. Chemotherapie stärker sensibel sein. Die Hypothese des Zellzyklusarrests kann auch für diese Untersuchung aufgestellt werden. Zwar fehlte eine Korrelation zwischen dem pKi-67 Index und mRNA Gehalt, jedoch fiel aufgrund des negativen Korrelationskoeffizienten auf, daß hohe pKi-67 Indizes tendenziell mit niedrigen mRNA Gehalt verbunden sind (siehe Abbildung 18). Das bedeutet, daß pKi-67 in den Tumorzellen dieser Patienten nachweisbar ist, obwohl keine de novo Synthese von pKi-67 stattgefunden hat. Bei einer Halbwertszeit des Proteins von normalerweise weniger als einer Stunde (siehe 1.3.1) ist dies aber praktisch nicht möglich. Da in Zellzyklus-blockierten Zellen die Halbwertszeit auf bis zu 60 Stunden ansteigt (van Oijen et al., 1998), ist es naheliegend zu vermuten, daß bei diesen Tumoren eine große Anzahl von Tumorzellen im Zellzyklus blockiert gewesen sei könnte.

3.) Die Funktion von pKi-67 wird durch den Phosphorylierungsstatus moduliert. Die Phosphorylierung bewirkt eine Änderung der chemischen Eigenschaft und Ladung des pKi-67 Moleküls (MacCallum und Hall, 1999; Schmidt et al., 2003). Eine Veränderung bezüglich der Bindung und Nachweisbarkeit durch den pKi-67 Antikörper MIB-1 konnte nachgewiesen werden (siehe dazu auch 1.3.1 und Abbildung 2). Die MIB-1 Intensität läßt rapide nach, wenn die Zelle die Mitose verläßt (Endl und Gerdes, 2000). Gerade in solchen Phasen könnte die Erhebung des pKi-67 Markierungsindex ungenau sein.

4.) Eine weitere Ungenauigkeit des MIB-1 Antikörpers kann durch eine Überexpression des Ki-67 Motivs entstehen. Diese kann dazu führen, daß der Nachweis des Antigens durch den MIB-1 Antikörper nicht gelingt. Eine solche Überexpression führt zudem dazu, daß die Wachstumsblockade in den Tumorzellen aufrechterhalten wird (Schmidt et al., 2002).

5.) Theoretisch ist denkbar, daß die pKi-67 Expression auf Transkriptions- bzw. Translationsebene zusätzlich reguliert ist. Für eine solche Regulation sind jedoch laut aktuellem Stand keine Literaturergebnisse bekannt.

Der alleinigen Bestimmung des immunhistochemischen Index stehen grundlegende, theoretische molekularbiologische Überlegungen entgegen. Um die Proliferationsrate nicht falsch einzuschätzen, sollten zusätzliche Antikörper benutzt werden (Schmidt et al., 2002). Oben aufgeführte Probleme könnten teilweise durch die Bestimmung der pKi-67 mRNA umgangen werden.

Insgesamt ist zu berücksichtigen, daß die zur Verfügung stehende Gruppe mit 43 Patienten relativ klein ist. Für den pKi-67 Index ließ sich keine signifikante Relevanz in bezug auf die Überlebenszeit zeigen. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit der uneinheitlichen Bewertung des pKi-67 Index beim kolorektalen Karzinom in der Literatur (siehe 1.1.1). Eine mögliche Ursache könnte das durchschnittlich höhere Alter bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen im Vergleich zu anderen Tumorentitäten sein (siehe 4.3.1). Hierdurch könnte die insgesamt mögliche Nachbeobachtungszeit begrenzt sein. Im Gesamtkollektiv korrelierten lediglich die Parameter Stadieneinteilung nach UICC (univariat), Einteilung nach den Komponenten des TNM Systems (univariat & multivariat), Radikalität der Operation (univariat & multivariat) signifikant zur Prognose. Es leuchtet ein, daß die Tumorausbreitung beschreibenden Parameter mit der Überlebenszeit korrelieren, da bei höheren Tumorstadien und nichtmöglicher Resektion in sano potentiell maligne Zellen im Organismus verbleiben. Die Prognose der Tumorkrankheit korreliert mit der Infiltration des Karzinoms in die Darmwand und seiner Ausdehnung in benachbarte Strukturen, dem Ausmaß des Lymphknotenbefalls und dem Auftreten von Fernmetastasen. Diese Parameter sind in der Literatur beschrieben (siehe 4.2.2). In den klinisch-pathologischen Untergruppen der Gesamtgruppe (siehe 3.2) gab es keinen signifikanten Unterschied.

Die ermittelte pKi-67 mRNA Gruppierung korrelierte im entsprechenden Studienkollektiv sowohl univariat als auch multivariat signifikant mit der Überlebenszeit. Weitere signifikante Parameter waren die Ausdehnung des Primärtumors (univariat & multivariat). Die möglichen Ursachen wurden im vorherigen Absatz anhand des pKi-67 Index bereits diskutiert.

Es fiel auf, daß Patienten mit einem hohen Gehalt an pKi-67 mRNA eine bessere Prognose als solche mit einem niedrigen Gehalt hatten. Dieses Ergebnis erscheint

zunächst gegensätzlich zur Erwartung, da bei anderen Tumorentitäten in der Regel eine hohe Proliferationsaktivität mit einem aggressiveren Tumorverhalten und damit einer schlechteren Prognose einhergeht. Bei kolorektalen Karzinomen ist der Zusammenhang zwischen Zellproliferation und Prognose schwieriger zu beurteilen (Palmqvist et al., 1999). Die Ergebnisse der Studien, die eine prognostische Relevanz für pKi-67 bei kolorektalen Karzinomen zeigen, sind widersprüchlich und beruhen außerdem in der Mehrzahl der Fälle auf der Erhebung des pKi-67 Index. Während Kimura et al. (2000) und Duchrow et al. (1998, 2001) zeigen konnten, daß die kolorektalen Karzinome mit einer hohen pKi-67 Expression eine schlechtere Prognose haben, postulierten Palmqvist et al. (1999), Allegra et al. (2003) und Dziel et al. (2003), daß Fälle mit einer niedrigen pKi-67 Expression eine schlechtere Prognose haben. Die biologische Ursache, warum hohe pKi-67 mRNA Werte mit einer besseren Prognose einhergehen, ist unklar und bedarf weiterer Untersuchungen. Eine mögliche Erklärung könnte sein, daß eine niedrige Tumorzellproliferation mit Arealen von geringerer Differenzierung korreliert (Taniyama et al., 1993; Taniyama et al., 1996). Verminderte Proliferationsraten in diploiden Karzinomen gingen signifikant mit einer erhöhten Anzahl von Lymphknotenmetastasen einher. Eine weitere mögliche Ursache könnte im Zusammenhang zwischen Apoptose und Proliferation liegen: Tumorzellen mit einer hohen Proliferationsaktivität könnten durch eine Imbalanz zwischen „pro-apoptotischen“ und „anti-apoptotischen“ Signalen eine größere Wahrscheinlichkeit besitzen, in die Apoptose einzutreten als Zellen mit einer niedrigen Proliferationsaktivität (Evan, 1997; Palmqvist et al., 1999).

Ein weiteres Erklärungsmodell berücksichtigt, daß es durch das Karzinom zur Immunantwort gegen Tumorzellen kommen kann (sogenannte Host-versus-Tumor-Reaktion). Diese besteht im wesentlichen aus einer Infiltration des Tumors durch Lymphozyten (Ropponen et al., 1997). Durch die Aufarbeitung eines Gewebeblocks und RNA Isolierung (siehe 2.2) werden nicht nur Tumorzellen, sondern auch andere Zellen erfaßt. Da Ki-67 ein ubiquitär vorkommendes Gen ist, könnte ein hoher Gehalt an pKi-67 mRNA somit einer hohen Aktivität von tumorinfiltrierenden Lymphozyten und damit einem prognostischen Vorteil entsprechen.

Nachteil der pKi-67 mRNA Bestimmung ist, daß es schwierig ist, den zellulären Ursprung der mRNA zu ermitteln. Alle aktiv proliferierenden Zellen könnten zum Signal beitragen. Bei sorgfältiger Auswahl der Tumorproben (siehe 2.2) sollte der

Anteil an Nicht-Tumorzellen sehr gering sein und damit quantitativ nicht ins Gewicht fallen. Dieser Nachteil könnte zudem durch die sogenannte lasergestützte Mikrodissektion beseitigt werden. Mit diesem Verfahren können Zellen aus morphologisch definierten Bereichen isoliert werden. Dazu wird das entnommene Gewebe fixiert, mit einem Mikrotom geschnitten und auf einen Objektträger aufgezogen. Die Schnitte können dann mit den in der Histologie üblichen Färbemethoden (z. B. Hämatoxylin-Eosin) weiter behandelt werden, um die Identifikation und Begutachtung unter dem Mikroskop zu erleichtern. Mit Hilfe der lasergestützten Mikrodissektion können dann gezielt einzelne Zellen aus solchen histologischen Schnittpräparaten isoliert werden. Die dabei eingesetzte Technologie des Laserskalpell/Laserkatapults erlaubt sowohl das Schneiden als auch den Transport der Zellen nur mit Hilfe von Laserlicht. Das Zellmaterial wird so berührungslos und kontaminationsfrei in ein Auffanggefäß überführt und kann dann in die PCR gegeben werden. So wäre eine gezieltere Auswahl von Tumorzellmaterial möglich (Lahr, 2002).

Kritisch zu bewerten ist sicherlich die relativ geringe Fallzahl im pKi-67 mRNA Studienkollektiv und die Beschränkung auf R0-resizierte, nicht neoadjuvant bzw. adjuvant radio- oder chemotherapierte Patienten. Diese Selektion erfolgte zum einen, um die Auswertung in bezug auf die Überlebenszeit nicht durch inhomogen therapierte Patienten von vornherein zu beeinflussen, zum anderen, da diese Gruppe den vermutlich größten Benefit von der Verwendung besserer prognostischer Marker hat. Auch die Nachbeobachtungszeit mit einem Mittelwert von 41,2 Monaten läßt noch keine endgültigen Rückschlüsse zu. Die Korrelation zu klinischen Parametern mittels Quantifizierung der pKi-67 mRNA könnte in einer größeren Studie mit längerer Nachbeobachtungszeit, höherer Fallzahl und unterschiedlichen TNM-Stadien noch einmal untersucht werden – gerade im Hinblick auf die uneinheitliche Bewertung von pKi-67 beim kolorektalen Karzinom in der Literatur. Die erhobenen Daten könnten damit in einer höheren Phase des schrittweisen Übergangs von der initialen Beobachtung zu klinischer Anwendung (siehe Abbildung 22) verifiziert werden, z.B. durch Planung einer klinischen Studie und den Vergleich mit weiteren etablierten, prognostischen Parametern.

4.4 Ausblick

Durch die vergleichende Analyse des pKi-67 mRNA Gehalts und des pKi-67 Markierungsindex konnten weitere interessante Einblicke in molekularbiologische Eigenschaften von pKi-67 beim kolorektalem Karzinom gewonnen werden.

Die für die vorliegende Arbeit entwickelte Methode zur Quantifizierung der pKi-67 mRNA stellt eine schnelle und zuverlässige Methode dar, die auch zur Quantifizierung der mRNA-Expression weiterer Gene verwendet werden kann. Desweiteren könnte die Quantifizierung der pKi-67 mRNA in anderen Bereichen, wie Diagnostik (z.B. als Parameter für das Entartungsrisiko bei Colitis ulcerosa), Forschung (z.B. Medikamentenforschung und Wundheilungsforschung) und Therapieplanung (z.B. Entscheidung für bzw. gegen Chemotherapie oder Radiatio), eingesetzt werden.

5 Zusammenfassung

pKi-67 ist ein Antigen, das in allen aktiven Phasen des Zellzyklus (G_1 -, S-, G_2 -, M-Phase) nicht jedoch in ruhenden Zellen (G_0 -Phase) nachgewiesen werden kann.

In dieser retrospektiven Studie wurde ein Vergleich der quantitativen Bestimmung der pKi-67 mRNA mit dem immunhistologisch gewonnenen MIB-1 Markierungsindex in kolorektalen Karzinomen vorgenommen. Zusätzlich wurde die Hypothese überprüft, ob pKi-67 eine Relevanz in bezug auf die postoperative Prognose und klinische Parameter bei kolorektalen Karzinomen hat. In diese Studie wurden 118 Patienten eingeschlossen, die zwischen 1995 und 1998 aufgrund eines kolorektalen Karzinoms in der Klinik für Chirurgie, UKSH-L, operiert wurden. Der pKi-67 Markierungsindex von allen zugehörigen Tumorproben wurde bestimmt. Zusätzlich wurde der pKi-67 mRNA Gehalt der Proben einer homogenen Subgruppe des Studienkollektivs ($n=43$) mit Hilfe der Realtime PCR quantifiziert.

In der Datenauswertung fand sich keine signifikante Korrelation zwischen dem pKi-67 Index und dem Gehalt an pKi-67 mRNA, jedoch fiel aufgrund des negativen Korrelationskoeffizienten auf, daß hohe pKi-67 Indizes tendenziell mit niedrigen mRNA Gehalt verbunden sind. Somit ist pKi-67 in den Tumorzellen dieser Patienten nachweisbar, obwohl keine de novo Synthese von pKi-67 stattgefunden hat. Bei einer Halbwertszeit des Proteins von weniger als einer Stunde ist dies aber praktisch nicht möglich. In Zellzyklus-blockierten Zellen steigt die Halbwertszeit auf bis zu 60 Stunden an. Wir nehmen an, daß bei diesen Tumoren eine große Anzahl von Tumorzellen im Zellzyklus blockiert gewesen sein könnte.

Für den pKi-67 Index ließ sich keine signifikante Relevanz in bezug auf die Überlebenszeit zeigen. Im Gegensatz korrelierte der ermittelte Gehalt an pKi-67 mRNA im Studienkollektiv signifikant mit der Überlebenszeit. Dabei hatten Patienten mit einem hohen Gehalt an pKi-67 mRNA eine signifikant bessere Prognose als solche mit einem niedrigen Gehalt.

Weitere signifikante Parameter waren die Radikalität der Operation, die Stadieneinteilung nach UICC sowie die Invasionstiefe des Tumors, der Nachweis von Lymphknotenmetastasen und eine Fernmetastasierung. Die für die vorliegende Arbeit entwickelte Methode zur Quantifizierung der pKi-67 mRNA stellt eine schnelle und zuverlässige Methode dar, die auch zur Quantifizierung der mRNA-Expression weiterer Gene verwendet werden kann.

6 Chemikalienliste

6.1 Nährmedien und Lösungen

Das zur Herstellung von Lösungen verwendete *aqua bidest* wurde einer Ultrafiltrationsanlage der Fa. Millipore (Bedford, MA, USA) entnommen. Alle Puffer und Stammlösungen wurden im Autoklaven bei 121 °C über 20 min behandelt.

6.1.1 Lösungen

Proben-Puffer (10x):

TAE-Puffer mit 50% (v/v) Glycerin

+ 0,1% (w/v) Bromphenolblau

+ 0,1% (w/v) Xylencyanol (optional)

TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer):

40 mM Tris-Base

+ 2 mM EDTA, mit Essigsäure auf pH 8,0 titrieren

TE-Puffer:

10 mM Tris-HCL

1 mM EDTA, auf pH 8,0 titrieren

10 x Tricine-Puffer (Ponce und Micol, 1992):

15 ml Tricine (=300 mM; Fa. Sigma, Deisenhofen)

+ 0,5 ml $MgCl_2$ (=20mM)

+ 175 μ l 2-Mercapto-Ethanol (~=50mM)

+ 5 ml Gelatine 0,1%ig

+ 5 ml Thesit (=Polyoxyethylen-9-Lauryl-Ether, Fa. Sigma, Deisenhofen) 10%ig, pH 8,9 aqua bidest ad 50ml, mit NaOH auf einen pH von 8,4 titrieren

6.2 Antikörper

Primärantikörper

MIB-1 pKi-67 isospezifischer monoklonaler Antikörper wurde freundlicherweise von Prof. Dr. J. Gerdes aus der Abteilung für Immunologie und Zellbiologie, Forschungszentrum Borstel, zur Verfügung gestellt

Sekundärantikörper:

Biotinylierter Ziege Anti-Maus-Kaninchen-Antikörper Nr. K0492 der Firma DAKO, Glostrup, Dänemark

6.3 PCR Materialien

QuickPrep® Micro mRNA Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Nr.035-00-19)

TaqMan β -Aktin Control Reagents Nr. 401846 (PE - Applied Biosystems, Foster City, USA)

Core-Reagent-Kit

Thymin

Uracil-N-Glycosylase (UNG - AmpErase®)

Uracil-N-Glycosylase (UNG - AmpErase®)

Polymerase

β -Aktin

10x TaqMan Buffer A

25 mM $MgCl_2$

dGTP

dATP

dUTP

Ki-67 / β -Aktin Vorwärtsprimer

Ki-67 / β -Aktin Rückwärtsprimer

Ki-67 / β -Aktin-Sonde

AmpliTaq Gold (5 U/ μ l)

AmpErase UNG (1 U/ μ l)

CDNA

Primer-Generierungssoftware „Primer Express“

6.4 Chemikalien und Geräte

6.4.1 Chemikalien

Alle Chemikalien und Geräte deren Hersteller nicht im Text aufgeführt sind und die zur Grundausstattung eines Labors gehören, entstammen den Firmen Boehringer, Mannheim; Merck, Darmstadt; Roth. Karlsruhe; Sigma-Aldrich, Deisenhofen:

4µl Molekulargewichtsmarker VI

Aceton (in verschiedenen Konzentrationen)

Agarose

Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkaline-Phosphatase

APAAP Entwicklungslösung

Aquatex®

Entwicklungspuffer

Ethidium-Bromid

Fetales Kälberserum

Hämatoxylin

Humanserum

Intestinale alkalische Kälberphosphatase

Levamisol

Monoklonale Anti-alkalische Mäusephosphatase (Firma Dako, Hamburg, Deutschland, D0651)

NaCl

Napthol-AS-BI-Phosphat

Natriumnitrit

Neufuchsin

Paraffin

Propandiol

Tris/Base

Tris/Cl

Xylol

Zitronensäure-Monohydrat

Zitronensäurepuffer

6.4.2 Geräte

Agarose-Gelelektrophoresekammern der Firma Labortechnik Fröbel GmbH, Wasserburg am Bodensee

Mikroskop Modell ZEISS Axioplan der Firma Carl Zeiss, Oberkochen

Mikrowellengerät der Firma Siemens, Berlin

PCR-Gerät Modell DNA Thermal Cycler TC1/ Perkin Elmer der Firma Applied Biosystems, Weiterstadt

„Taq Man 7700 Sequence Detection System“, hergestellt von der Firma ABI PRISM, Foster City, USA

Photodokumentationsanlage Modell MWG Multi D der Firma MWG Biotech,

Photometer Model Spectrophotometer DU 640 der Firma Beckmann, München

Sterile Werkbänke Model Class II Type A/B3 der Firma Naire, Plymouth, GB (Vertrieb durch Firma Zapf Instrumente, Sarstedt) und Model BSB 4A der Firma GELAIRE Flow Laboratories GmbH, Meckenheim

UV-Transluminator der Firma Labortechnik Fröbel GmbH, Wasserburg am Bodensee

Zentrifugen Modell BIOFUGE 22R der Firma Andreas Hettich Zentrifugen und Apparatebau. Tuttlingen

Ultraturrax

Magnetrührer

Elektronisches Zellenzählgerät der Firma Tecnomara, Zürich

7 Literaturverzeichnis

Allegra CJ, Paik S, Colangelo LH, Parr AL, Kirsch I, Kim G, Klein P, Johnston PG, Wolmark N, Wieand HS: Prognostic Value of Thymidylate Synthase, Ki-67, and p53 in Patients With Dukes' B and C Colon Cancer: A National Cancer Institute-National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Collaborative Study. *J Clin Oncol* 21, 241-50, 2003

Allgayer H, Heiss M, Höfler H: Neue Prognosefaktoren bei gastrointestinalen Tumoren. *MANUAL Gastrointestinale Tumoren*. München: Tumorzentrum München, 215-43, 2001

Ambion Inc.: Strategies for Detecting mRNA - Northern blotting, Nuclease Protection Assays, In Situ hybridization, and RT-PCR.
<http://www.ambion.com/techlib/tn/63/631.html> 1-6, 1999

Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland: Krebs in Deutschland - Häufigkeiten und Trends, 3. Aufl., Riegelsberg, Braun Druck, 2002

Baretton GB, Diebold J, Christoforis G, Vogt M, Muller C, Dopfer K, Schneiderbanger K, Schmidt M, Lohrs U: Apoptosis and immunohistochemical bcl-2 expression in colorectal adenomas and carcinomas. Aspects of carcinogenesis and prognostic significance. *Cancer* 77, 255-64, 1996

Birner P, Ritzi M, Musahl C, Knippers R, Gerdes J, Voigtlander T, Budka H, Hainfellner JA: Immunohistochemical Detection of Cell Growth Fraction in Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Murine Tissue. *Am J Pathol* 158, 1991-96, 2001

Bishop JO, Morton JG, Rosbash M, Richardson M: Three abundance classes in HeLa cell messenger RNA. *Nature* 250, 199-204, 1974

Bohm B, Nouchirvani K, Hucke HP, Stock W: Einfluß von Alter und Geschlecht auf Lokalisation, Tumorstadium und Prognose von kolorektalen Karzinomen. *Med Klin* 85, 586-90, 1990

Boland CR, Sinicrope FA, Brenner DE, Carethers JM: Colorectal cancer prevention and treatment. *Gastroenterology* 118, S115-S128, 2000

Brandao O, Sobrinho-Simoes MA, Serrao D, Moutinho-Ribeiro M, Azevedo C: Prognosis in colorectal carcinoma. A reassessment of the pathologist's role. *Pathol Res Pract* 180, 506-10, 1985

Bridger JM, Kill IR, Lichter P: Association of pKi-67 with satellite DNA of the human genome in early G1 cells. *Chromosome Res* 6, 13-24, 1998

Brown DC, Gatter KC: Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology* 17, 489-503, 1990

Brown DC, Gatter KC: Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology* 40, 2-11, 2002

Bruno S, Darzynkiewicz Z: Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell Prolif* 25, 31-40, 1992

Buglioni S, D'Agnano I, Cosimelli M, Vasselli S, D'Angelo C, Tedesco M, Zupi G, Mottolese M: Evaluation of multiple bio-pathological factors in colorectal adenocarcinomas: independent prognostic role of p53 and bcl-2. *Int J Cancer* 84, 545-52, 1999

Bühl A, Zöfel P: SPSS Version 10 - Einführung in die moderne Datenanalyse unter Windows, München, Addison Wesley Verlag, 2000

Carl J, Bentzen SM, Norgaard-Pedersen B, Kronborg O: Modelling of serial carcinoembryonic antigen changes in colorectal cancer. *Scand J Clin Lab Invest* 53, 751-55, 1993

Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schluter C, Galle J, Gerdes J: Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB-1 and MIB-3) detect proliferating cells in microwave- processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 168, 357-63, 1992

Chapuis PH, Dent OF, Fisher R, Newland RC, Pheils MT, Smyth E, Colquhoun K: A multivariate analysis of clinical and pathological variables in prognosis after resection of large bowel cancer. *Br J Surg* 72, 698-702, 1985

Chelly J, Kaplan JC, Maire P, Gautron S, Kahn A: Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissue. *Nature* 333, 858-60, 1988

Choi YW, Kotzin B, Herron L, Callahan J, Marrack P, Kappler J: Interaction of *Staphylococcus aureus* toxin "superantigens" with human T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 8941-45, 1989

Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR, Hammond ME, Henson DE, Hutter RV, Nagle RB, Nielsen ML, Sargent DJ, Taylor CR, Welton M, Willett C: Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 124, 979-94, 2000

Cox D: Regression Models and Life-Tables. *J R Stat Soc* 34, 187-220, 1972

De Jong KP, Stellema R, Karrenbeld A, Koudstaal J, Gouw AS, Sluiter WJ, Peeters PM, Slooff MJ, De Vries EG: Clinical relevance of transforming growth factor alpha, epidermal growth factor receptor, p53, and Ki67 in colorectal liver metastases and corresponding primary tumors. *Hepatology* 28, 971-79, 1998

Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information - DIMDI: ICD-9: Internationale Klassifikation der Krankheiten, Verletzungen und Todesursachen (ICD) in der Fassung der vom Bundesministerium für Gesundheit herausgegebenen 9. Revision, 9. Aufl., Köln, Verlag W. Kohlhammer, 1993

Duchrow M, Häsemeyer S, Broll R, Bruch HP, Windhövel U: Assessment of proliferative activity in colorectal carcinomas by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). *Cancer Invest* 19, 588-96, 2001a

Duchrow M, Schlüter C, Gerdes J: Molekularbiologische Charakterisierung des Proliferations-assoziierten Ki-67 Proteins. *Focus MUL* 4, 219-25, 1994

Duchrow M, Schlüter C, Key G, Kubbutat MH, Wohlenberg C, Flad HD, Gerdes J: Cell proliferation-associated nuclear antigen defined by antibody Ki-67: a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *Arch Immunol Ther Exp Warsz* 43, 117-21, 1995

Duchrow M, Schmidt MH, Zingler M, Anemüller S, Bruch HP, Broll R: Suppression of cell division by pKi-67 antisense-RNA and recombinant protein. *Cell Physiol Biochem* 11, 331-38, 2001b

Duchrow M, Ziemann T, Stofa A, Bruch HP, Windhövel U, Broll R: In situ-Hybridisierung und Immunhistologie des proliferationsassoziierten Ki-67 Antigens an kolorektalen Karziomen. *Acta Chir Austriaca* 147, 44-45, 1998

Duchrow M, Ziemann T, Windhovel U, Bruch HP, Broll R: Colorectal carcinomas with high MIB-1 labelling indices but low pKi67 mRNA levels correlate with better prognostic outcome. *Histopathology* 42, 566-74, 2003

Dziegel P, Forgacz J, Suder E, Surowiak P, Kornafel J, Zabel M: Prognostic significance of metallothionein expression in correlation with Ki-67 expression in adenocarcinomas of large intestine. *Histol Histopathol* 18, 401-7, 2003

Endl E, Gerdes J: The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function. *Exp Cell Res* 257, 231-37, 2000

Evan G: Cancer--a matter of life and cell death. *Int J Cancer* 71, 709-11, 1997

Fonatsch C, Duchrow M, Rieder H, Schluter C, Gerdes J: Assignment of the human Ki-67 gene (MK167) to 10q25-qter. *Genomics* 11, 476-77, 1991

Förster T: Intermolecular energy migration and fluorescence. *Ann Phys* 2, 55-75, 1948

Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H: Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133, 1710-1715, 1984

Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H: Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 31, 13-20, 1983

Gerlach C, Golding M, Larue L, Alison MR, Gerdes J: Ki-67 immunoexpression is a robust marker of proliferative cells in the rat. *Lab Invest* 77, 697-98, 1997

Getz MJ, Birnie GD, Young BD, MacPhail E, Paul J: A kinetic estimation of base sequence complexity of nuclear poly(A)-containing RNA in mouse Friend cells. *Cell* 4, 121-29, 1975

Hall PA, Going JJ: Predicting the future: a critical appraisal of cancer prognosis studies. *Histopathology* 35, 489-94, 1999

Handa K, Yamakawa M, Takeda H, Kimura S, Takahashi T: Expression of cell cycle markers in colorectal carcinoma: superiority of cyclin A as an indicator of poor prognosis. *Int J Cancer* 84, 225-33, 1999

Häsemeyer S: Vergleichende Bestimmung der Tumorphiliferationsrate mittels quantitativer PCR und Immunhistochemie des Ki-67-Antigens an kolorektalen Karzinomen. Med. Diss. Lübeck, 1999

Heidebrecht HJ, Buck F, Haas K, Wacker HH, Parwaresch R: Monoclonal antibodies Ki-S3 and Ki-S5 yield new data on the 'Ki-67' proteins. *Cell Prolif* 29, 413-25, 1996

Hemming AW, Davis NL, Kluftinger A, Robinson B, Quenville NF, Liseman B, LeRiche J: Prognostic markers of colorectal cancer: an evaluation of DNA content, epidermal growth factor receptor, and Ki-67. *J Surg Oncol* 51, 147-52, 1992

Hermanek P, Jr., Wiebelt H, Riedl S, Staimmer D, Hermanek P: Studiengruppe Kolorektales Karzinom (SGK RK): Langzeitergebnisse der chirurgischen Therapie des Colonkarzinoms. *Chirurg* 65, 287-97, 1994

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R: Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 11, 1026-30, 1993

Hill M: Research Background- Cytoskeleton.
<http://anatomy.med.unsw.edu.au/cbl/research/cytoskeleton/cytoskeleton.htm> 1-3, 1999

Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH: Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 7276-80, 1991

Jansson A, Sun XF: Ki-67 expression in relation to clinicopathological variables and prognosis in colorectal adenocarcinomas. *APMIS* 105, 730-734, 1997

Jass JR SL: Histological typing of intestinal tumours. *WHO, International histological classification of Tumours*. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag, 1989

Kainz P: The PCR plateau phase - towards an understanding of its limitations. *Biochim Biophys Acta* 1494, 23-27, 2000

Kaplan K, Meier P: Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 53, 457-81, 1958

Kill IR: Localisation of the Ki-67 antigen within the nucleolus. Evidence for a fibrillarin-deficient region of the dense fibrillar component. *J Cell Sci* 109, 1253-63, 1996

Kimura T, Tanaka S, Haruma K, Sumii K, Kajiyama G, Shimamoto F, Kohno N: Clinical significance of MUC1 and E-cadherin expression, cellular proliferation, and angiogenesis at the deepest invasive portion of colorectal cancer. *Int J Oncol* 16, 55-64, 2000

Köhne CH: Internistische Onkologie - Kolorektale Karzinome. <http://www.uni-rostock.de/fakult/medfak/kim/hema/V000211A.PDF> 12, 2000

Kornmann M, Schwabe W, Sander S, Kron M, Strater J, Polat S, Kettner E, Weiser HF, Baumann W, Schramm H, Hausler P, Ott K, Behnke D, Staib L, Beger HG, Link KH: Thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase

mRNA expression levels: predictors for survival in colorectal cancer patients receiving adjuvant 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res* 9, 4116-24, 2003

Kotewicz ML, D'Alessio JM, Driftmier KM, Blodgett KP, Gerard GF: Cloning and overexpression of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase in *Escherichia coli*. *Gene* 35, 249-58, 1985

Kubbutat MH, Key G, Duchrow M, Schluter C, Flad HD, Gerdes J: Epitope analysis of antibodies recognising the cell proliferation associated nuclear antigen previously defined by the antibody Ki-67 (Ki-67 protein). *J Clin Pathol* 47, 524-28, 1994

Kubota Y, Petras RE, Easley KA, Bauer TW, Tubbs RR, Fazio VW: Ki-67-determined growth fraction versus standard staging and grading parameters in colorectal carcinoma. A multivariate analysis. *Cancer* 70, 2602-9, 1992

Kyzer S, Gordon PH: Determination of proliferative activity in colorectal carcinoma using monoclonal antibody Ki67. *Dis Colon Rectum* 40, 322-25, 1997

Lahr G: Molekulare Methoden in der klinischen Diagnostik auf dem Vormarsch. *Innovation* 12, 2002

Lakowicz JR: Principles of frequency-domain fluorescence spectroscopy and applications to cell membranes. *Subcell Biochem* 13:89-126., 89-126, 1988

Lee LG, Connell CR, Bloch W: Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res* 21, 3761-66, 1993

Livak KJ: Quantitation of DNA/RNA Using Real-time PCR Detection.

www.abiprism.com , 2000

Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K: Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 4, 357-62, 1995

MacCallum DE, Hall PA: Biochemical characterization of pKi67 with the identification of a mitotic-specific form associated with hyperphosphorylation and altered DNA binding. *Exp Cell Res* 252, 186-98, 1999

Mairinger T, Happacher R, Gabl C, Hoffmann Y, Ofner D, Schmid KW, Gschwendtner A: Mean weighted nuclear volumes in colonic adenocarcinomas. Evaluation of prognostic significance. *Anal Quant Cytol Histol* 21, 194-200, 1999

McCormick D, Yu C, Hobbs C, Hall PA: The relevance of antibody concentration to the immunohistological quantification of cell proliferation-associated antigens. *Histopathology* 22, 543-47, 1993

Müller V: Entwicklung einer kompetitiven PCR zur Quantifizierung der mRNA von TGF-beta-1 und LTBP-1 in Fettspeicherzellen der Leber von Rattus norvegicus. Med. Diss. Marburg, 2001

Mullis KB: Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin (Paris)* 48, 579-82, 1990

Nanashima A, Yamaguchi H, Shibasaki S, Sawai T, Yasutake T, Tsuji T, Nakagoe T, Ayabe H: Proliferation of hepatic metastases of colorectal carcinoma: relationship to primary tumours and prognosis after hepatic resection. *J Gastroenterol Hepatol* 14, 61-66, 1999

Öfner D, Grothaus A, Riedmann B, Larcher P, Maier H, Bankfalvi A, Schmid KW: MIB-1 in colorectal carcinomas: its evaluation by three different methods reveals lack of prognostic significance. *Anal Cell Pathol* 12, 61-70, 1996

Palmqvist R, Sellberg P, Oberg A, Tavelin B, Rutegard JN, Stenling R: Low tumour cell proliferation at the invasive margin is associated with a poor prognosis in Dukes' stage B colorectal cancers. *Br J Cancer* 79, 577-81, 1999

Pang J, Modlin J, Yolken R: Use of modified nucleotides and uracil-DNA glycosylase (UNG) for the control of contamination in the PCR-based amplification of RNA. *Mol Cell Probes* 6, 251-56, 1992

PE Applied Biosystems: TaqMan PCR Reagent Kit - Protocol, 1. Aufl., Foster City, USA, 1996

Plaat B, Kole A, Mastik M, Hoekstra H, Molenaar W, Vaalburg W: Protein synthesis rate measured with L-[1-11C]tyrosine positron emission tomography correlates with mitotic activity and MIB-1 antibody-detected proliferation in human soft tissue sarcomas. *Eur J Nucl Med* 26, 328-32, 1999

Porschen R, Lohe B, Hengels KJ, Borchard F: Assessment of cell proliferation in colorectal carcinomas using the monoclonal antibody Ki-67. Correlation with pathohistologic criteria and influence of irradiation. *Cancer* 64, 2501-5, 1989

Renz-Polster H: Dünn- und Dickdarm. In: Braun J, Renz-Polster H. *Basislehrbuch Innere Medizin*. München Jena: Urban & Fischer Verlag, 539-97, 2001

Rogers B and McKenzie D: Control RT-PCR Primers for Human Gene Transcripts with Varying Abundance. http://www.stratagene.com/vol11_3/p100-102.htm 100-102, 2002

Ropponen KM, Eskelinen MJ, Lipponen PK, Alhava E, Kosma VM: Prognostic value of tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) in colorectal cancer. *J Pathol* 182, 318-24, 1997

Schalhorn A, Siebeck M, Bumm R, Gross M, Günther B, Heiss M, Huber F, Lamerz R, Lau-Werner U, Lersch C, Roder J, Sackmann M, Sander R, Stieber P, Waldner H, Weber B, Wiebecke B, Zoller W: Kolonkarzinome. *MANUAL Gastrointestinale Tumoren*. München: Tumorzentrum München, 215-43, 2001

Schiebler TH, Junqueira L, Carneiro J: Histologie, 4. Aufl., Berlin, Heidelberg, New York, Springer Verlag, 1996

Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD, Gerdes J: The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous

nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol* 123, 513-22, 1993

Schmidt MH, Broll R, Bruch HP, Böglar O, Duchrow M: The proliferation marker pKi-67 organizes the nucleolus during the cell cycle depending on Ran and cyclin B. *J Pathol* 199, 2003

Schmidt MH, Broll R, Bruch HP, Duchrow M: The proliferation marker pKi-67 becomes masked to MIB-1 staining after expression of its tandem repeats. *Histochem Cell Biol* 118, 415-22, 2002

Scholzen T, Gerdes J: The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182, 311-22, 2000

Schrape S, Jones DB, Wright DH: A comparison of three methods for the determination of the growth fraction in non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Cancer* 55, 283-86, 1987

Simon R, Altman DG: Statistical aspects of prognostic factor studies in oncology. *Br J Cancer* 69, 979-85, 1994

Sobin L, Wittekind C: TNM-Classification of Malignant Tumours, 5. Aufl., New York Chichester Weinheim Brisbane Singapore Toronto, Wiley-Liss, 1997

Sternfeld T: Die Bedeutung der Angiogenese für den Krankheitsverlauf des kolorektalen Karzinoms. Med. Diss. Berlin, 2002

Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR: Control selection for RNA quantitation.

Biotechniques 29, 332-37, 2000

Taniyama K, Sasaki N, Wada S, Sasaki M, Miyoshi N, Nakai H, Kodama S, Nakatsuka H, Tahara E: Comparison of proliferative activities and metastases

between two subtypes classified at the deeply infiltrating sites of colorectal

moderately differentiated adenocarcinomas. *Pathol Int* 46, 195-203, 1996

Taniyama K, Suzuki H, Matsumoto M, Hakamada K, Toyama K, Tahara E:

Relationships between nodal status and cell kinetics, DNA ploidy pattern and

histopathology of the deeply infiltrating sites in colorectal adenocarcinoma. *Acta*

Pathol Jpn 43, 590-596, 1993

Torosian MH, Daly JM: An evaluation of the clinical usefulness of CEA in colorectal cancer. *Oncology (Huntingt)* 5, 41-44, 1991

van Dierendonck JH, Keijzer R, van de Velde CJ, Cornelisse CJ: Nuclear distribution of the Ki-67 antigen during the cell cycle: comparison with growth fraction

in human breast cancer cells. *Cancer Res* 49, 2999-3006, 1989

van Oijen MG, Medema RH, Slootweg PJ, Rijksen G: Positivity of the proliferation marker Ki-67 in noncycling cells. *Am J Clin Pathol* 110, 24-31, 1998

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A,

Speleman F: Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by

geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3, 34.1-34.11, 2002

Wang AM, Doyle MV, Mark DF: Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 9717-21, 1989

Wieland S: Genexpression. Grundlagen und Pathogenese. *Dtsch Med Wochenschr* 122, 1457-60, 1997

Wiesner RJ: Direct quantification of picomolar concentrations of mRNAs by mathematical analysis of a reverse transcription/exponential polymerase chain reaction assay. *Nucleic Acids Res* 20, 5863-64, 1992

Winkler R, Braun BJ: Kolon und Rektum. In: Schumpelick V, Bleese NM, Mommsen U. *Chirurgie*. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag, 811-59, 1999

Wittekind C, Wagner G: TNM-Klassifikation maligner Tumoren, 5. Aufl., Berlin Heidelberg New York, Springer-Verlag, 1997

Ziemann T: Nachweis der Ki-67 mRNA und Protein Expression durch in situ Hybridisierung und Immunhistochemie beim kolorektalen Karzinom. Med. Diss. Lübeck, 2003

8 Anhang

8.1 Erhebungsbogen für kolorektale Karzinome

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT LÜBECK Klinik für Chirurgie

COLORECTALE CARCINOME

ERST- UND FOLGEERHEBUNG

PATIENT

Name: _____

Vorname: _____

Geburtsdatum : _____._____._____

Geschlecht: ☐ männlich ☐ weiblich

Anschrift : _____

HAUSARZT

Anschrift : _____

Aufnahmedatum _____._____._____

☐ Ersterhebung
☐ auswärts

☐ Folge Nummer _____

Anlaß

1 ☐ Primärtumor / Folgeop
4 ☐ Nebenbefund / Resttumor

2 ☐ Zweitca. / erneut.Tumor
5 ☐ sonstiges

3 ☐ Notfall
9 ☐ Anlaß unbekannt

Prätherapeutische Symptome

☐ Anämie
☐ occultes Blut im Stuhl
☐ sichtbares Blut im Stuhl
☐ Schleimabg. a. d. Darm
☐ Beschw. beim Stuhlgang
☐ Obstipation

0 ☐ nein
☐ Diarrhoe
☐ Stuhlinkontinenz
☐ Gewichtsverlust
☐ Schmerzen
☐ Übelkeit/Erbrechen
☐ Ileus; Subileus

1 ☐ ja
☐ gyn. Symptome
☐ urolog. Symptome
☐ B-Symptomatik
☐ Tastbefund
☐ sonstiges

9 ☐ unb.

Symptomdauer _____

CEA präoperativ

1 ☐ Norm

0 ☐ nicht bestimmt
2 ☐ erhöht

9 ☐ nicht zu ermitteln
3 ☐ stark erhöht

Doppeltumor

0 ☐ nein
1 ☐ selbes Organ
2 ☐ anderes Organ

1 ☐ synchron
2 ☐ metachron

1 ☐ Dünndarm
2 ☐ Genitale
3 ☐ Leber
4 ☐ Niere
5 ☐ Blase

6 ☐ Magen
7 ☐ Lunge
8 ☐ Oesophagus
9 ☐ Mamma
10 ☐ Gehirn

11 ☐ Weichteile
12 ☐ Pankreas
13 ☐ mehrere
14 ☐ sonstiges

Tumorlokalisation

Präther. TNM-Klassifikation	T	N	M
-----------------------------	---	---	---

Fernmetastasen

- ☐ Leber
- ☐ Ovar
- ☐ Peritoneum

- ☐ Pleura
- ☐ Lymphknoten
- ☐ Knochen

- ☐ Lunge
- ☐ Dünndarm
- ☐ Gehirn
- ☐ sonstiges

Histologie aus PE _____ / _____

Grading _____

Karnofsky-Index _____ %

Begleiterkr. / Risikofaktoren

- allg. Begleiterkrankungen
- Familienanamnese positiv

- 0 ☐ nein
☐ Colitis ulcerosa / M. Crohn
☐ exogene Risikofaktoren

- 1 ☐ ja 9 ☐ unb.
n ☐ Polypsis/Pseudomelan. coli
☐ sonstiges

Präop. Zusatztherapie

- Chemotherapie
- Radiatio
- Immuntherapie

- 0 ☐ nein
☐ Hyperthermie
☐ Kryochirurgie
☐ Lasertherapie

- 1 ☐ ja 9 ☐ unb.
☐ Polypektomie
☐ symptomatische Therapie
☐ sonstige Therapie

Op-Grund

- 1 ☐ elektiv
2 ☐ Not-Op bei Blutung

- 3 ☐ Not-Op bei Ileus
4 ☐ Not-Op bei Perforation
5 ☐ Not-Op bei Peritonitis

- 7 ☐ Not-Op and. Ursache
6 ☐ sonstiges

Operationsart

☐ maschinelle Naht

_____ cm Resektionsrand

Opérateur

Eingriffswertigkeit

- 1 ○ radikal

- 2 ☐ palliativ mit Tumorres.
- 3 ☐ palliativ ohne Tumorres.

- 4 ☐ probatorisch
5 ☐ sonstiges

- 0 O RO

- 1 O R1

- 2 O R2

Histologie _____ / _____

T C N C M C

Grading _____

Lymphknotenbefall _____ / _____

UICC-Stadium _____

Stadium Lebermetas. _____

Fernmetastasen

- ☐ Leber
☐ Ovar
☐ Peritoneum

- ☐ Pleura
☐ Lymphknoten
☐ Knochen

- ☐ Lunge
☐ Dünndarm
☐ Gehirn
☐ sonstiges

Komplikationen

- ☐ Abszeß
☐ Anastom.insuffizienz
☐ AP-Komplikationen
☐ Blutung
☐ Fistel
☐ Ileus/Subileus
☐ Pankreatitis
☐ Peritonitis
☐ Platzbauch
☐ Sepsis
☐ Wundheilungsstörungen
☐ sonst. lokale Kompl.

- 0 ☐ nein
☐ Apoplex
☐ Fieber
☐ hepatisch
☐ Herzinfarkt
☐ Kardial
☐ Embolie
☐ neuropsych.
☐ Pneumonie
☐ pulmonal
☐ renal
☐ Thrombose
☐ urologisch

- 1 ☐ ja
☐ MOV
☐ sonstiges

9 ☐ unb.☐ Exitus

Reeingriff

0 ☐ nein1 ☐ ja9 ☐ unb.

_____._____._____

_____._____._____

_____._____._____

Entlassungsform1 ☐ entlassen2 ☐ verlegt3 ☐ verstorben**Entlassungsdatum**

_____._____._____

Weitere postop. Therapie

- ☐ Chemotherapie
☐ Radiatio
☐ Immuntherapie
☐ Hyperthermie

- 0 ☐ nein
☐ Kryochirurgie
☐ Lasertherapie
☐ symptomat. Therapie
☐ sonstige Therapie

- 1 ☐ ja
☐ AP-/Ileostoma-Rückverlag.
 am _____
☐ sonstige OP

9 ☐ unb.**Studie**

Nachsorgetermin

_____._____._____

9 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Hans-Peter Bruch

danke ich für die Möglichkeit, in der Klinik für Chirurgie meine Dissertation zu schreiben, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie für die Zurverfügungstellung von Klinikressourcen.

Herrn Prof. Dr. med. Rainer Broll

möchte ich ganz herzlich für die freundliche Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung danken.

Herrn Dr. rer. nat. Michael Duchrow

bin ich für die ausgezeichnete Betreuung meiner Arbeit und die Einarbeitung in die Thematik und Methodik sehr dankbar.

Herrn Prof. Dr. sc. nat. Detlef Behnke, Dr . rer. nat. Peter Häusler und Dr . rer. nat. Wolfgang Schwabe

der Fima Oncoscreen, Jena, danke ich für die Möglichkeit der Quantifizierung und die ausgezeichnete Zusammenarbeit und Unterstützung.

Frau Claudia Killaitis, Dokumentationsassistentin der Klinik für Chirurgie, UKSH-L,
danke ich für die Bereitstellung der Patientendaten

Frau Gisela Grosser-Pape, Frau Regina Kaatz , Frau Vera Grobleben und Frau Elke Gheribi

danke ich für die freundliche Unterstützung bei den im Labor anfallenden Arbeiten.

Frau Katrin Ihmann

bin ich für die Korrektur in sprachlicher Hinsicht sehr dankbar

Schließlich bedanke ich mich ganz herzlich bei meiner Ehefrau **Frau Katja Ihmann**
und meinen **Eltern** für ihre Unterstützung

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Thomas Ihmann
geboren	am 05. Februar 1974 in Lübeck
Familienstand	verheiratet

Schulbildung

1980 - 1984	Grundschule Lambertischule Aurich
1984 - 1986	Orientierungsschule Waldschule Egels
1986 - 1993	Gymnasium Ulricianum Aurich

Zivildienst

1993 - 1994	CVJM (Christlicher Verein junger Menschen) in Emden
-------------	---

Studium

1994	Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
Herbst 1996	Ärztliche Vorprüfung
Herbst 1997	1. Staatsexamen
09/1997 - 12/1999	Praktische Durchführung der Arbeit
Herbst 1999	2. Staatsexamen
Frühjahr 2001	3. Staatsexamen

Ärztliche Weiterbildung

06/2001 - 11/2002	AiP Medizinische Klinik II+III, UK-SH, Campus Lübeck
01/2003 -	Assistenzarzt, Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie, St.-Elisabeth-Klinik, Saarlouis

Publikationsliste

06/2004	Ihmann T, Liu J, Schwabe W, Häusler P, Behnke D, Bruch HP, Broll R, Windhövel U, Duchrow M: High level mRNA quantification of proliferation marker pKi-67 is correlated with favourable prognosis in colorectal carcinoma. <i>J Cancer Res Clin Oncol</i> , http://dx.doi.org/10.1007/s00432-004-0612-5 , 9/2004
---------	---