

**Chirurgische Klinik des Bundeswehrkrankenhaus Ulm
Akademisches Krankenhaus der Universität Ulm
Ltd. Arzt: Dr. med. R. Steinmann**

**Klinische Bedeutung des quantitativen Nachweises
disseminierter Tumorzellen in Lymphknoten mittels real-
time Polymerase-Kettenreaktion bei Patienten mit
kolorektalem Karzinom**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

vorgelegt von
Markus Schöne
geboren in Albstadt-Ebingen

2005

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: PD Dr. Christian Willy

2. Berichterstatter: PD Dr. Susanne Gansauge

Tag der Promotion: 20.01.2006

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	2
2	Einleitung	4
	2.1 Kolorektale Karzinome	4
	2.2 Molekularbiologische Diagnostik	9
	2.3 Fragestellung und Zielsetzung.....	12
3	Material und Methoden	13
	3.1 Material.....	13
	3.2 Methoden.....	16
	3.3 Statistik	26
4	Ergebnisse	28
	4.1 Patientenkollektiv.....	28
	4.2 Tumordaten	29
	4.3 molekularbiologische Ergebnisse	32
	4.4 Patientenbezogene Ergebnisse.....	38
5	Diskussion.....	44
	5.1 Diskussion der Methodik.....	44
	5.2 Diskussion der Ergebnisse	51
6	Zusammenfassung	59
7	Literaturverzeichnis	61
8	Danksagung.....	68

1 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
μ	mikro (10^{-6})
A.	Arteria
Aa.	Arteriae
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
c	centi (10^{-2})
C	Konzentration
C ₀	initiale Konzentration
°C	Grad Celsius
°C/sec	Grad Celsius pro Sekunde
ca.	circa
CEA	Carcinoembryonic Antigen
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
CK	Zytokeratin (Cytokeratin)
CK20	Zytokeratin 20 (Cytokeratin 20)
CP	crossing point
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonuclein acid)
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
E	Amplifikationskoeffizient
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde(n)
histo+/histo-	histopathologisch positiv/negativ
HNPCC	hereditary non-polyposis colorectal cancer
H ₂ O	Wasser
Hrsg.	Herausgeber
IHC	Immunohistochemie
l	Liter
LED	Licht emittierende Diode
m	Meter oder milli (10^{-3})
M	Stadium der Fernmetastasierung

mol. mRNA	molekularbiologisch Boten-RNA (messenger RNA)
n	nano (10^{-9})
N	histopathologisches Stadium des Lymphknotenbefalls
N _{CK20}	molekularbiologisches Stadium des Lymphknotenbefalls
neg	negativ
OD	optische Dichte
p	piko (10^{-12})
Pat.Nr.	laufende Patientenummer
PBGD	Porphobilinogen-Desaminase
PC	Personal Computer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
pos	positiv
QRT-PCR	quantitative real-time PCR
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonuclein acid)
sec	Sekunde(n)
S.	Seite
t	Zeit (time)
T	Ausdehnungsstadium des Primärtumors
Taq	Thermus aquaticus
Temp.	Temperatur
Tis	Tumor oder Carcinoma in situ
u. a.	und andere oder unter anderem
UICC	Union International Contre le Cancer (International Union Against Cancer)
X	histopathologisch nicht beurteilbar
z. B.	zum Beispiel

2 Einleitung

2.1 Kolorektale Karzinome

2.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das kolorektale Karzinom ist weltweit die vierthäufigste Krebskrankheit bei beiden Geschlechtern [42]. In Deutschland erkrankten im Jahr 1998 etwa 57000 Menschen, das kolorektale Karzinom ist somit die häufigste Krebsart in Deutschland. Es ist im Jahr 2000 sowohl bei Männern mit 11217 Todesfällen als auch bei Frauen mit 15329 Todesfällen altersstandardisiert die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache [3]. Die Inzidenz ist in Europa in den letzten zwanzig Jahren von 10-15 auf 15-25 Fälle pro 100.000 Einwohner angestiegen. Nur 5 % der Patienten sind jünger als 43 Jahre. Der Häufigkeitsgipfel liegt um das 65. Lebensjahr [22]. Die Ätiologie der Erkrankung ist unbekannt. Neben genetischen Veränderungen und familiären Faktoren spielen bestimmte Vorerkrankungen in Risikogruppen für die Karzinomentstehung eine Rolle [2,35]. Zu den beeinflussbaren, gesicherten Risikofaktoren gehört der Konsum von Alkohol und Tabak, zudem scheint der in hochentwickelten Ländern ballaststoffarmen, an Fleisch und tierischen Fetten reichen Nahrung eine Bedeutung zuzukommen [16,68]. Patienten mit autosomal-dominant vererbter familiärer adenomatöser Polyposis (FAP) haben das höchste Erkrankungsrisiko [11]. Ein erhöhtes Risiko besteht weiterhin in Familien mit dem Lynch-Syndrom (hereditary non-polyposis colorectal cancer, HNPCC) [55]. Auch Patienten mit Colitis ulcerosa weisen ein deutlich erhöhtes Karzinomrisiko auf [8]. Beim Morbus Crohn ist ebenfalls von einem erhöhten kolorektalen Karzinomrisiko auszugehen, dieses ist jedoch im Vergleich zur Colitis ulcerosa noch unzureichend charakterisiert, möglicherweise aber geringer [4].

2.1.2 Einteilung

Als Kolonkarzinome gelten Tumoren, die im Kolon lokalisiert sind und deren aboraler Rand bei der Messung mit dem starren Rektoskop mehr als 16 cm von der Anokutanlinie entfernt ist. Als Rektumkarzinome gelten Tumoren, deren aboraler Rand bei dieser Messung 16 cm oder weniger von der Anokutanlinie entfernt liegen. Von Karzinom wird hier ausschließlich gesprochen, wenn atypische epitheliale Formationen in die Submukosa infiltriert sind. Nicht einbezogen sind sogenannte Mukosakarzinome sowie intraepitheliale Karzinome, bei denen keine Metastasierung erfolgt und die durch lokale Abtragung im Gesunden ausreichend behandelt werden [10].

2.1.3 Pathologie und Tumorausbreitung

Kolorektale Adenokarzinome befinden sich zu 40-50 % im Rektum, die übrigen 50-60 % im Kolon. Von den Kolonkarzinomen finden sich ca. 25 % im Colon ascendens und Zökum, 50 % im Sigma sowie weitere 25 % im übrigen Kolon [22]. Das Kolonkarzinom breitet sich lokal in das parakolische Fettgewebe, daneben über die Lymphbahnen und bei Einbruch in die Gefäße auf hämatogenem Wege aus. Die Metastasierung eines Kolonkarzinoms läuft vorzugsweise lymphogen ab [20], wobei die lymphatischen Abflusswege des Kolons der arteriellen Versorgung entlang der Arteria (A.) ileocolica, A. colica dextra, den beiden Ästen der A. colica media und dem kurzen Stamm der A. mesenterica inferior mit der A. colica sinistra und den Arteriae (Aa.) sigmoideae entsprechen [10]. Die Ausbreitung eines Rektumkarzinoms findet zunächst ebenfalls auf lymphogenem [20], bei Einbruch in die Blutgefäße auch auf hämatogenem Metastasierungswege, sowie über Tumorzellnester im perirektalen Fettgewebe statt [10]. Der Lymphabfluss verläuft dann über die A. rectalis superior zur A. mesenterica inferior hin und über die Aa. rectales inferiores zur seitlichen Beckenwand über die Iliaca-interna-Gefäße. Nur bei sehr tiefem Tumorsitz und Infiltration in die Levatorebene oder bei nach proximal blockiertem Lymphabfluss erfolgt die Metastasierung nach distal und inguinal, wie beim Analkarzinom [28]. Die Leber stellt das erste Metastasierungsorgan dar, zweithäufigster Metastasierungsort ist die Lunge. Im

Vergleich zum Kolonkarzinom treten Lungenmetastasen beim Rektumkarzinom häufiger auf (Lymphabstrom über Aa. rectales inferior). Es folgen in der Häufigkeit Skelettmetastasen und Befall von Nebennieren und Gehirn. Bei fortgeschrittenem Tumor kann auch eine peritoneale Tumoraussaat vorliegen [21].

2.1.4 Klassifikation und Stadieneinteilung

Die Klassifikation der kolorektalen Karzinome hängt ab von der Tumorgroße bzw. -ausbreitung, der Invasion benachbarter Strukturen, der Infiltration von Lymphknoten, sowie dem Vorhandensein von Fernmetastasen. Ein sehr exaktes und klinisch angewandtes Stagingssystem ist die Einteilung nach dem TNM-System der UICC (Union Contre le Cancer) sowie die zugehörige Stadiengruppierung. Als regionäre Lymphknoten werden dabei alle perikolischen, perirektalen sowie diejenigen Lymphknoten, die entlang den Aa. ileocolica, colica dextra, colica sinistra, colica media, mesenterica inferior, rectalis superior und iliaca interna liegen, bezeichnet. Die Tabellen 1-3 zeigen die TNM-Klassifikation kolorektaler Tumoren, Tabelle 4 die gültige Stadiengruppierung der UICC [62].

Tabelle 1: T-Kategorien: histopathologische Stadieneinteilung nach Ausdehnung des Primärtumors.

verwendete Abkürzungen: T = Stadium der Ausdehnung des Primärtumors; X = histopathologisch nicht beurteilbar; Tis = Tumor oder Carcinoma in situ

T	Ausdehnung Primärtumor
TX	Primärtumor nicht beurteilbar
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor infiltriert Submukosa
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert die Muscularis propria hindurch in die Subserosa oder in nicht peritonealisiertes perikolisches oder perirektales Gewebe
T4	Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen und/oder perforiert das viszerale Peritoneum

Tabelle 2: N-Kategorien: histopathologische Stadieneinteilung nach Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen und deren Anzahl.

verwendete Abkürzungen: N = Stadium des Lymphknotenbefalls; X = histopathologisch nicht beurteilbar

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

Tabelle 3: M-Kategorien : Stadieneinteilung nach Vorhandensein von Fernmetastasen und deren Anzahl.

verwendete Abkürzungen: M = Stadium der Fernmetastasierung; X = histopathologisch nicht beurteilbar

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

Tabelle 4: Stadiengruppierungen kolorektaler Karzinome nach der UICC, eingeteilt nach den jeweiligen T-, N- und M-Kategorien.

verwendete Abkürzungen: UICC = Union Contre le Cancer; T = Ausdehnungsstadium des Primärtumors; N = Stadium des Lymphknotenbefalls; M = Stadium der Fernmetastasierung;

Stadiengruppierung nach UICC			
Stadium	T	N	M
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1,T2	N0	M0
Stadium II	T3,T4	N0	M0
Stadium III	jedes T	N1,N2	M0
Stadium IV	jedes T	jedes N	M1

2.1.5 Therapeutisches Vorgehen und Prognose

Die kurative Operation erfolgt durch die En-bloc-Resektion des tumortragenden Darmabschnittes, sowie der systematischen regionären Lymphadenektomie [14,60]. Für das weitere therapeutische Vorgehen ist die histopathologische Beurteilung und Stadieneinteilung maßgebend. Bei Patienten mit Tumorinfiltration der Lymphknoten (N1-N2, UICC Stadium III-IV) beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate 30-55 %, während bei Patienten ohne Lymphknoteninfiltration (N0, UICC Stadium I und II) die 5-Jahres-Überlebensrate bei 70-80 % liegt und somit eine deutlich bessere Prognose auffällt [28,44]. Die systematische regionäre Lymphadenektomie, als zentraler Bestandteil der Therapie des kolorektalen Karzinoms, wird also nicht nur in therapeutischer sondern auch in diagnostischer Zielsetzung durchgeführt [28]. In diagnostischer Hinsicht dient die Lymphadenektomie der Prognoseeinschätzung und der Indikationsstellung zu adjuvanten Therapieverfahren. Da das individuelle Rezidivrisiko durch die in der Klinik eingesetzten Stagingverfahren derzeit nicht bestimmt werden kann, erfolgt die Entscheidung über eine adjuvante Therapie mit Hilfe statistisch gewonnener Prognosewerte [40], wobei bei R0-resezierten Patienten ohne Fernmetastasen (M0), Lymphknotenmetastasen als stärkster prognostischer Faktor gelten [32,67]. Aus diesem Grunde wird für Patienten mit nachgewiesenen Lymphknotenmetastasen (T1-T4 N1-N2; UICC Stadium III) außerhalb von Studien die Durchführung einer adjuvanten Therapie empfohlen. Bei Patienten mit einem Kolonkarzinom im UICC-Stadium I (T1-T2 N0 M0) oder -Stadium II (T3-T4 N0 M0), bei denen also histopathologisch keine Lymphknotenmetastasen nachweisbar sind, hingegen gilt, wie auch beim Rektumkarzinom im Stadium I, eine adjuvante Therapie als nicht indiziert [53,67]. Dennoch entwickeln 20-30 % der Patienten mit histopathologisch tumorfreen Lymphknoten eine Rezidivkrankung [28,44]. In dieser Patientengruppe werden daher prognostische Marker benötigt, um Patienten mit einem hohen Rezidivrisiko, die möglicherweise von einer adjuvanten Therapie profitieren, zu erkennen.

2.2 Molekularbiologische Diagnostik

2.2.1 Grundlagen

Dem derzeitigen klinischen Standard entspricht die Erhebung des Lymphknotenstatus durch histopathologische Beurteilung des fixierten Gewebes. Dabei zeigt sich allerdings, dass einzelne oder wenige, so genannte disseminierte Tumorzellen, die keine Strumareaktion des Lymphgewebes hervorrufen, mit dieser Methode häufig nicht detektierbar sind. In den letzten Jahren wurden verschiedene molekularbiologische und immunohistochemische Techniken um disseminierte Tumorzellen in Lymphknoten nachzuweisen beschrieben [13,33,41,45]. Die Vermutung, dass diese disseminierten Tumorzellen oder Mikrometastasen für Rezidiverkrankungen bei Patienten mit histopathologisch tumorfreien Lymphknoten verantwortlich sind, wird diskutiert, konnte aber bisher in verschiedenen Studien noch nicht eindeutig nachgewiesen werden [40,54,66].

2.2.2 Zytokeratine

Zytokeratine sind epithelspezifische Proteine und gehören zur heterogenen Gruppe der Intermediärfilamente, die gewebespezifische Zytoskelettfilamente vereint. Die Aufgabe der Intermediärfilamente ist die Aufrechterhaltung der inneren Stabilität und Struktur der Zellen. Derzeit gibt es 20 verschiedene Zytokeratine (CK) unterschiedlichen Molekulargewichts, die am Aufbau der Zytokeratinfilamente beteiligt sind. Je nach Laufverhalten in der Gelelektrophorese und ihrem isoelektrischen Punkt werden diese in zwei Subfamilien unterteilt: Eine saure Subfamilie (Typ I), der die Zytokeratine 9 bis 20 angehören, und eine neutral-basische Subfamilie (Typ II), zu der die Zytokeratine 1 bis 8 gehören [9]. Die Zytokeratinfilamente bilden im Zytoplasma ein um die Zellen lokalisiertes Netzwerk. Mit Hilfe von Desmosomen entstehen zellübergreifende Strukturen. Zytokeratine haben ausschließlich mechanische Aufgaben, indem sie den einzelnen Zellen und auch den Zellverbänden Zugfestigkeit und Stabilität verleihen [17,52]. Zwei Eigenschaften sind für die diagnostische Eignung dieser

Proteingruppe von entscheidender Bedeutung. Erstens ist die Zusammensetzung der Zytokeratinfilamente nicht in allen Epithelien identisch, sondern hängt vom Epitheltyp und dessen Differenzierung ab. Dadurch entstehen für jeden Epitheltyp charakteristische Formen der Zytokeratinexpression, die bezüglich Intensität und Auftreten der Zytokeratinproteine variieren. Zweitens bleibt das Expressionsmuster der Zytokeratine beim Übergang von normalem zu malignem Wachstum von Epithelzellen unverändert. Die relativ spezifische Expression von Zytokeratinen in epithelialen Geweben und die Bewahrung dieser Zellspezifität, auch nach maligner Transformation, erklären die Bedeutung dieser Proteingruppe für die molekularbiologische Forschung [37-39].

2.2.3 Zytokeratin 20

Das Zytokeratin 20 (CK20) wurde als neues Polypeptid charakterisiert. CK20 besitzt eine Molmasse von 46000 Basenpaaren (bp), sein isoelektrischer Punkt liegt bei pH 6,1. CK20 wird in erster Linie in den Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes, dem Urothel und den Merkelzellen exprimiert [34]. Die CK20-Expression konnte bei verschiedenen Tumoren epithelialen Ursprungs und in deren Metastasen nachgewiesen werden, besonders beim kolorektalen Karzinom. Hier wird CK20 in mehr als 90 % der Fälle, unabhängig von Differenzierungsgrad und Metastasierung, gefunden [34]. Folglich liegen eine Vielzahl von Studien vor, die CK20-spezifischen Untersuchungsansätzen beschreiben, um disseminierte Tumorzellen im Blut [6,12,59], in Lymphknoten [13,33,45] und im Knochenmark [50] von Patienten mit kolorektalem Karzinom nachzuweisen. Die prognostische Bedeutung CK20-positiver Lymphknoten-Mikrometastasen wurde allerdings nur in wenigen Studien untersucht [27,31,45]. Vielmehr werden die Spezifität, aufgrund des Nachweises von CK20-Expression in Geweben nicht-kolorektalen Ursprungs, sowie die Sensitivität der beschriebenen Nachweismethoden kontrovers diskutiert [25,51,56].

2.2.4 Immunohistochemie

Disseminierte kolorektale Karzinomzellen können in Lymphknoten immunohistochemisch nachgewiesen werden. Die Sensitivität liegt bei einer Nachweisquote von etwa einer Tumorzelle in 10^5 - 10^6 mononukleären Zellen [24]. Aufgrund widersprüchlicher Ergebnisse und nicht ausreichender Quantifizierbarkeit bleibt die prognostische Relevanz der immunohistochemischen Tumorzell-detektion in Lymphknoten jedoch umstritten.

2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Durch die Einführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in die molekularbiologische Diagnostik steht eine neue Möglichkeit zur Verfügung, disseminierte Tumorzellen in Lymphknoten nachzuweisen [24]. Grundlage ist die Detektion eines Markergens, welches in der Tumorzelle, nicht aber in Lymphknoten exprimiert wird. In dieser Studie wurde der Nachweis über die quantitative Bestimmung von Messenger-Ribonukleinsäure (mRNA) gewählt, welches für das epitheliale Filamentprotein CK20 codiert. Die PCR-Technik ist einer Automatisierung und damit Standardisierung der einzelnen Arbeitsschritte gut zugänglich und es besteht die Möglichkeit, bei der Untersuchung von Lymphknoten multiple Gefrierschnitte zusammen zu analysieren [15]. Einige Studien beschrieben PCR-Methoden zur Untersuchung von Lymphknoten. Während zunächst durch rein qualitative Methoden zwar Zusammenhänge zwischen disseminierten Tumorzellen und dem Nachweis spezifischer Marker aufgezeigt werden konnten, führten vor allem eine nicht ausreichende Sensitivität und die große Variabilität der Ergebnisse, verursacht durch uneinheitliche PCR-Protokolle, zu Diskussionen [13,29,50]. Durch Weiterentwicklung der Methode und im weiteren durch Kombination von Immunohistochemie und PCR, konnten bessere Ergebnisse erzielt und deutliche Hinweise für einen Zusammenhang mit dem weiteren Krankheitsverlauf aufgezeigt werden [31,45]. In den letzten Jahren wurde ein quantitatives real-time Polymerase-Kettenreaktion-System (QRT-PCR) entwickelt [63]. Die quantitative real-time PCR stellt eine moderne Technologie

dar, die im molekularbiologischen Bereich mittlerweile sehr breite Verwendung findet. Im Vergleich zu bisherigen PCR-Methoden, bei denen Desoxyribonukleinsäure(DNA)-Produkte nur qualitativ nachgewiesen werden konnten, wurde es durch Entwicklung der quantitativen real-time PCR möglich, Aussagen über die Ausgangs-DNA- bzw. RNA-Mengen zu machen. Die Idee, die vorhandene Menge an Markergenen zu bestimmen und von diesem Ergebnis eine prognostische Relevanz ableiten zu können, wurde bereits in einzelnen Studien aufgegriffen [27].

2.3 Fragestellung und Zielsetzung

In dieser Studie sollen die Lymphknotenpräparate sowie Gewebeproben des Primärtumors, der an einem kolorektalen Karzinom erkrankten Patienten, unmittelbar nach der operativen Therapie gesichert und anschließend sowohl histopathologisch als auch molekularbiologisch mit der QRT-PCR untersucht werden. Die molekularbiologische Untersuchung erfolgt über den Nachweis von CK20-mRNA mit Hilfe der LightCycler-Technologie (Roche Diagnostics). Dabei werden die bisher in der Literatur beschriebenen Methoden zusammengefasst, optimiert und in den klinischen Routineablauf integriert. Das Auftreten von disseminierten Tumorzellen soll auf Abhängigkeit von verschiedenen klinischen Parametern untersucht werden. Alle extrahierten Lymphknoten werden histologisch untersucht und in direktem Vergleich der molekularbiologischen Untersuchung zugeführt. Die daraus resultierenden Ergebnisse und davon abhängigen UICC-Stadien werden einander gegenübergestellt und analysiert. Ziel ist es, einerseits den Nachweis zu erbringen, dass mit dieser quantitativen real-time PCR-Methode isolierte Tumorzellen zuverlässig nachgewiesen werden können. Andererseits soll eine standardisierte und in einer großen Fallzahl reproduzierbare molekularbiologische Methode für den klinischen Routineablauf etabliert werden, die eine weitere prognostische Differenzierung bei Patienten mit kolorektalem Karzinom im Stadium I und II ermöglicht und somit eine Entscheidungshilfe für die Indikationsstellung zu einer adjuvanten Therapie darstellt.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Patientendaten

In dieser Studie wurden von 31 Patienten, die an einem Adenokarzinom des Kolons bzw. Rektums erkrankten und die Indikation zur operativen Therapie erfüllten, Gewebeproben von Primärtumor und Lymphknoten untersucht. Die 9 Frauen und 22 Männern wurden in der Chirurgischen Klinik des Bundeswehrkrankenhauses Ulm operiert. Entsprechend der klinischen und histopathologischen Beurteilung der Tumorausbreitung erfolgte die Einteilung der Tumorstadien nach den Kriterien der Union International Contre le Cancer (UICC). Es wurden insgesamt 391 Lymphknotenpräparate gesammelt. Die vorliegende Arbeit wurde, als ein Teil einer prospektiven klinischen Studie, der Ethikkommission der Universität Ulm zur Prüfung vorgelegt.

3.1.2 Operatives Vorgehen

Die operative Therapie zielte auf Entfernung des tumortragenden Darmabschnittes mit seinem Lymphabflussgebiet hin. Bevor auch nur geringe Manipulationen am tumortragenden Darm stattfanden, erfolgte die präliminäre Ligatur der zu- und abführenden Gefäße, um eine Tumorzellaussaat zu verhindern. Der Darm wurde auf Höhe der späteren Resektion oral und aboral ligiert. Als Standardresektionen wurden die im Folgenden dargestellten Tumorresektionen angesehen:

Zökum- und Aszendenskarzinom:

Bei Tumorlokalisation im rechten Kolon erfolgt eine Hemikolektomie rechts mit Ileotransversostomie. Die A. colica dextra, die terminale A. ileocolica und der rechtsseitige Ast der A. colica media werden jeweils zentral abgesetzt.

Karzinom der rechten Kolonflexur:

Da beim rechtsseitigen Flexurenkarzinom in 30 % Lymphknoten entlang der A. colica media befallen sind, erfolgt eine erweiterte Hemikolektomie rechts. Bei dieser Operation wird die A. colica media zentral ligiert, das rechtsseitige große Netz wird am Kolon belassen und mit entfernt.

Karzinom der linken Kolonflexur:

Beim linksseitigen Flexurenkarzinom ist entsprechend dem rechtsseitigen Flexurenkarzinom die Mitentfernung der A. colica media entscheidend. Auch hier wird das linksseitige große Netz mit entfernt, nach Ligatur der A. colica media wird wie beim Deszendenskarzinom fortgefahren.

Transversumkarzinom:

Beim Karzinom des Colon transversum ist je nach Lokalisation links bzw. rechts der A. colica media die erweiterte Hemikolektomie links bzw. rechts oder sogar die subtotale Kolektomie mit Ileosigmoideostomie indiziert.

Deszendenskarzinom:

Beim Karzinom des Colon descendens stellt die Hemikolektomie links mit zentralem Absetzen der Sigmoidalabgänge und der A. colica sinistra am Stamm der A. mesenterica inferior den Standardeingriff dar.

Rektumkarzinome:

Rektumkarzinome im oralen und mittleren Rektumdrittel werden durch kontinenserhaltende anteriore bzw. tiefe anteriore Resektion behandelt. Die operative Entfernung des Rektumkarzinoms aus dem unteren Drittel wird stadiengerecht durchgeführt. „Low risk“- Karzinome (T1 N0, G1–2) nicht größer als 3 cm, mit dem Finger gut erreichbar, können durch lokale Vollwandexzision reseziert werden. „High risk“- T1-Tumoren und T2/3-Tumoren mit einem Mindestabstand von 2 cm oral der Puborektalisschleife können je nach anatomischen Gegebenheiten durch tiefe anteriore Resektion oder durch das Anwenden von Analanastomosen entfernt werden. Alle übrigen Tumorkategorien,

die weniger als 2 cm oral der Puborektalisschleife liegen, oder den Muskel infiltrieren, werden mit der abdomino-perinealen Rektumexstirpation behandelt.

3.1.3 Gewebeaufbereitung

Unmittelbar im Anschluss an die operative Resektion der tumortragenden Darmanteile wurden in der Abteilung Pathologie des Bundeswehrkrankenhauses Ulm die Lymphknoten herauspräpariert. Die Lymphknoten wurden halbiert, wobei eine Hälfte der routinemäßigen histopathologischen Beurteilung zugeführt und die andere Hälfte, ebenso wie Gewebeproben der Primärtumoren, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und schließlich bei -80° Celsius gelagert wurde. Die herauspräparierten Lymphknoten wurden in Gruppen von I bis IV, entsprechend der anatomischen Lokalisation (siehe Tabelle 5), eingeordnet.

Tabelle 5: Gruppeneinteilung der entnommenen Lymphknoten

Gruppe	Lokalisation bei Kolonkarzinom	Lokalisation bei Rektumkarzinom
I	perikolisch - Abstand zum Tumor < 10cm	perirektal - Abstand zum Tumor < 5cm
II	perikolisch - Abstand zum Tumor > 10cm	perirektal - Abstand zum Tumor > 5cm
III	Abflussgebiet Mesenterialarterien	Abflussgebiet Mesenterialarterien
IV	paraaortale Lymphknoten	paraaortale Lymphknoten

3.1.4 Einschlusskriterien für die molekularbiologische Untersuchung

Es wurden Patienten des Bundeswehrkrankenhauses Ulm in diese Studie aufgenommen, die an einem Adenokarzinom des Kolon/Rektum erkrankt waren und einer chirurgischen Therapie unterzogen wurden. Einschlusskriterien waren die R0-Resektion des Primärtumors, sowie die Durchführbarkeit der systematischen regionären Lymphadenektomie. Die postoperative histopathologische Beurteilung stellte für die Patienten kein Ausschlusskriterium dar. Die Auswahl der Lymphknoten die molekularbiologisch untersucht wurden, erfolgte nach der histopathologischen Beurteilung. Nur Gewebeproben, die histopathologisch Lymphknotengewebe aufwiesen, wurden der

molekularbiologischen Untersuchung zugeführt. Die aus den Proben extrahierten Nukleinsäurelösungen mussten außerdem eine photometrisch bestimmbare Qualität (Ratio OD₂₆₀/OD₂₈₀) und Reinheit (Ratio OD₂₆₀/OD₂₃₀) aufweisen, um mögliche Störfaktoren zu minimieren.

3.2 Methoden

3.2.1 Gewebeaufschluss und -homogenisierung

Ein effektiver Gewebeaufschluss, sowie eine ausreichende Homogenisierung des Gewebematerials sind entscheidend für die intrazelluläre Ribonukleinsäure(RNA)-Isolation. Der komplette Aufschluss von Zellwänden und Plasmamembranen der einzelnen Zellen und Organellen ist Voraussetzung für die Auslösung der im Gewebe vorhandenen RNA. Die Homogenisierung ist notwendig um die Viskosität der Zelllysate zu reduzieren und hochmolekulare zelluläre Komponenten abzutrennen. Diese Schritte erfolgten im MagnaLyser der Firma Roche Diagnostics, wobei zu den tiefgefrorenen Gewebeproben 500 µl Lysis/Binding Buffer gegeben wurde.

3.2.2 RNA-Extraktion

Die Extraktion der Gesamt-RNA wurde mit dem High Pure RNA Tissue Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) durchgeführt. Aufschluss und Homogenisierung erfolgten in guanidinhydrochlorid-haltigem Lysis/Binding Buffer, was eine sofortige Inaktivierung der enthaltenen RNAsen zur Folge hatte und somit die Isolation intakter RNA sicherstellte. Nach Zugabe von Ethanol band die RNA selektiv an einem aus Glasfaserfleece bestehenden Filter in speziellen High Pure filter tubes. Bei den folgenden Auswasch- und Zentrifugierschritten blieb die RNA am Glasfaserfleece gebunden, während sonstige zelluläre Bestandteile abgelöst wurden. Im letzten Schritt wurde die Nukleinsäure durch Elution Buffer ausgewaschen.

3.2.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Gemäß dem Lambert-Beer'schen Gesetz ist die Konzentration einer Lösung direkt proportional zu ihrer Extinktion bzw. Absorption. Diese Relation macht man sich bei der spektralphotometrischen Quantifizierung von Nukleinsäuren zu nutze. Das Prinzip besteht in der Messung der Absorption eines monochromatischen Lichtstrahls, welcher die Probelösung durchstrahlt. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte direkt im Eluat des letzten Extraktionsschrittes. Gemessen wurde die Absorption im Spektralphotometer bei 260 nm (Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren), bei 280 nm (Absorptionsspektrum von Proteinen) sowie bei 230 nm (Verunreinigungen). Die RNA-Konzentration konnte nun mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten errechnet werden. Um ein Maß für die Qualität der Nukleinsäurelösung zu erhalten, kann der Quotient aus OD_{260}/OD_{280} , die sogenannte Ratio, gebildet werden. Bei einer proteinfreien Nukleinsäurelösung liegt diese im Bereich von 1,7-1,9. Der Quotient OD_{260}/OD_{230} gibt Aufschluss über die Reinheit der eluierten Lösung. Ein OD_{260} ist definiert als die Menge eines Oligonukleotids, die in einem Volumen von 1 ml bei einer Schichtdicke von 1 cm und einer Wellenlänge von 260 nm eine Extinktion von 1 aufweist.

3.2.4 Reverse Transkriptase - Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die reverse Transkriptase - PCR ist ein von der Standard-PCR abgeleitetes Verfahren, welches zur Amplifizierung von RNA-Material dient. Voraussetzung für diesen Vorgang ist zunächst der Aufbau von, zu der vorhandenen Messenger-RNA (mRNA), komplementärer DNA (cDNA) durch reverse Transkription. Diese cDNA dient dann als Ausgangsmaterial für weiterführende PCR-Verfahren. Die Gewebeproben eines Patienten wurden in einem gemeinsamen Schritt bearbeitet, wobei die maximale Kapazität 16 Proben pro Analyserun betrug.

3.2.4.1 cDNA-Synthese

Für die Synthese der cDNA wird bei eukaryotischer mRNA der am 3´-Ende vorhandene sogenannte Poly-A Schwanz ausgenutzt, an den ein Oligonukleotid binden kann, um die Reaktion zu initiieren. In dieser Arbeit wurde der LightCycler-CK20 Quantification Kit (Roche Diagnostics) nach Angaben des Herstellers verwendet (siehe Tabelle 6). Es wurde zunächst ein Mastermix hergestellt, der die angegebenen Mengen der einzelnen Reagenzien multipliziert mit der Probenanzahl enthielt. Dann wurden je 10 µl RNA-Eluat zu 10 µl Mastermix gegeben. Neben der extrahierten RNA wurde zusätzlich eine Calibrator-RNA transkribiert. Die CK20-Calibrator-RNA ist Bestandteil des LightCycler-CK20 Quantification Kit und enthält eine konstante, bekannte CK20-mRNA-Fraktion. Die reverse Transkription erfolgte nach einem typischen Temperaturprofil (siehe Tabelle 7) im MasterCycler.

Tabelle 6: Protokoll cDNA-Synthese

verwendete Abkürzungen: dNTP = 2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat; H₂O = Wasser; RNA = Ribonukleinsäure; CK20 = Zytokeratin 20

Volumen	Komponente	
2µl	H ₂ O, steril	Mastermix
4µl	LightCycler – CK20 Reverse Transcriptase Reaction Mix	
1µl	LightCycler – CK20 Random Hexamers	
2µl	LightCycler – CK20 Dextoxynucleotide Triphosphate (dNTP)Mix	
1µl	LightCycler – CK20 Reverse Transcriptase	
10µl	RNA-Eluat	

Tabelle 7: Transkriptionsablauf im MasterCycler

	Zeit in Minuten	Temperatur
Annealing	10	25 °C
Reverse Transkription	30	42 °C
Inaktivierung der Reaktion	5	94 °C

3.2.4.2 Standard-Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der PCR werden definierte DNA-Sequenzen spezifisch durch thermostabile DNA-Polymerasen vermehrt. Die Spezifität der Amplifikation wird durch den Einsatz von zwei Oligonukleotiden, sogenannten Primern, gewährleistet, welche zwei bestimmte, zu beiden Seiten der zu amplifizierenden Zielsequenz gelegenen Regionen erkennen. Dabei liegt jeweils eine dieser Primerbindungsstellen auf einem der komplementären DNA-Stränge, sodass jeder der beiden DNA-Stränge als Vorlage (template) dient. Die DNA-Polymerase synthetisiert den neuen DNA-Strang vom Primer ausgehend (primer extension). Während eines Reaktionszyklus entstehen aus einem Doppelstrang zwei neue doppelsträngige DNA-Moleküle. Da jedes dieser DNA-Moleküle im nächsten Reaktionszyklus erneut als template dient, kommt es nach wenigen Reaktionszyklen zu einer exponentiellen Vermehrung der DNA-Moleküle. Die sequentielle Trennung des DNA-Doppelstrangs (Schritt 1: Denaturierung), die Bindung der Primer (Schritt 2: Annealing), die Synthese des neuen komplementären Stranges (Schritt 3: Extension) und die erneute Auftrennung der Doppelstränge wird durch ein definiertes Temperaturprogramm gesteuert. Die hohe Sensitivität der PCR resultiert aus der exponentiellen Zunahme der spezifischen DNA-Moleküle. Die Methode ist abhängig von der spezifischen DNA-Polymerase. Aus dem Bakterium *Thermus Aquaticus* (Taq), welches in heißen Quellen vorkommt, kann diese hitzebeständige Polymerase gewonnen werden. Da diese sogenannte Taq-Polymerase durch wiederholtes Erhitzen nicht zerstört wird, konnte diese Methode vollautomatisiert werden [36].

3.2.4.3 real-time PCR

Die quantitative real-time PCR wurde mit dem LightCycler der Firma Roche Diagnostics (siehe Abbildung 1) durchgeführt. Der LightCycler besteht im wesentlichen aus einer thermostabilen Reaktionskammer mit Heiz- bzw. Kühlvorrichtung und einem Fluorimeter. Es ermöglicht die Durchführung einer kompletten PCR in kurzer Zeit, wobei der Verlauf am angeschlossenen PC direkt verfolgt werden kann. Qualitative und halbquantitative Aussagen konnten so

bereits während des Ablaufs getroffen werden. Die quantitative Auswertung erfolgte mittels geeigneter Software. Es wurde ein 124 Basenpaare(bp) großes Fragment der für CK20 codierenden mRNA von der cDNA amplifiziert. Dafür wurden spezifische Primer des Herstellers verwendet.

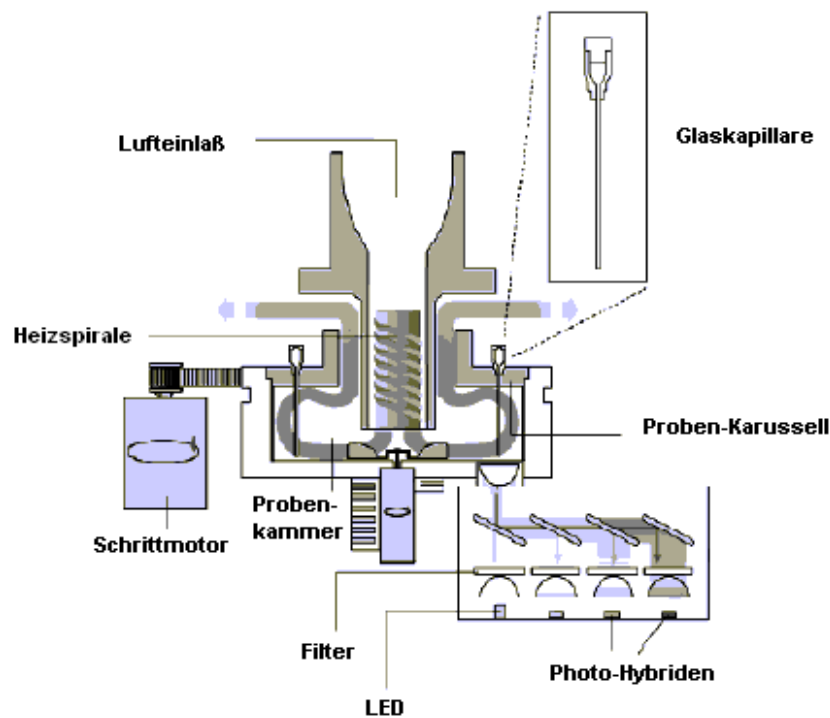


Abbildung 1: Schema des LightCyclers. An einer Stelle im Boden der Probenkammer befindet sich das Linsensystem der Optik zur Anregung und Detektion der Fluoreszenz in den Reaktionsansätzen. Das Anregungslicht mit einer Wellenlänge von 470 nm wird von einer Licht emittierende Diode (LED) erzeugt und über das Linsensystem auf die Kapillarenspitze fokussiert. Das im Inneren der Kapillare daraufhin, von den im Reaktionsgemisch enthaltenen Fluorophoren, emittierte Fluoreszenzlicht wird zum größten Teil durch Totalreflexion an den Glaswänden zur Kapillarenspitze zurückgeleitet und von ihr wiederum auf das darunter befindliche Linsensystem fokussiert. Über dichroitische Filter wird es dann an Photohybrid-Detektoren weitergeleitet. Die optische Einheit enthält drei Interferenzfilter für Licht der Wellenlängen von 530, 640 und 710 nm. Abbildung verändert gegenüber dem Original aus dem LightCycler-Benutzerhandbuch [61].

3.2.4.5 Messprinzip des LightCycler

Die spezifische Detektion der PCR-Produkte erfolgt unter Verwendung von Hybridisation Probes. Zu einem Standard-PCR-Ansatz werden zusätzlich zwei sequenzspezifische Oligonukleotide (Hybridisation Probes) zugefügt, welche zwischen den beiden Primern in räumlicher Nähe zueinander an die Ziel-DNA binden. Diese Hybridisation Probes sind mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Ein Oligonukleotid ist am 3'-Ende mit LightCycler-Fluorescein markiert. Die zweite Hybridisation Probe ist am 5'-Ende mit LightCycler-Red 640 markiert und um eine Verlängerung durch die Polymerase zu verhindern, am 3'-Ende durch einen Phosphatrest blockiert. Die Detektion basiert auf dem FRET-Prinzip (fluorescence resonance energy transfer). Binden die beiden Hybridisation Probes an der gesuchten Ziel-DNA in räumlicher Nähe und regt man gleichzeitig das Fluorescein der ersten Hybridisation Probe an, überträgt diese die Energie auf den benachbarten zweiten Fluoreszenzfarbstoff (LC-Red 640). Dieser emittiert nun rote Fluoreszenz, deren Intensität in Summe direkt proportional der Menge an Ziel-DNA ist. Die Messung des Signals erfolgt einmal pro Zyklus nach dem Primer Annealing. Zu diesem Zeitpunkt sind beide Hybridisation Probes an die Ziel-DNA gebunden und es erfolgt ein Energietransfer. Ungebundene Hybridisation Probes geben auf Grund der fehlenden räumlichen Nähe (diffundieren frei in der Lösung) kein Signal.

Die relativen Quantifizierung der transkribierten cDNA-Menge lief nach einem exakten PCR-Protokoll ab, das Temperatur und Zyklusanzahl standardisiert vorgab (siehe Tabelle 8). Es wurden für jede einzelne der vorhandenen Probelösungen zwei PCR-Ansätze hergestellt. Dabei wurde wiederum der LightCycler-CK20 Quantification Kit (Roche Diagnostics) nach Angaben des Herstellers verwendet (siehe Tabelle 9). In einen Ansatz wurden sequenzspezifische Hybridisation Probes für die gesuchte CK20-cDNA (LightCycler-CK20 Detection Mix) gegeben, in den anderen Ansatz Hybridisation Probes (LightCycler-CK20 Reference Detection Mix) für die so genannte Housekeeping-Gen-cDNA, die als Referenzgen-DNA diente. Housekeeping-Gene

sind eine große Gruppe von Genen, die für den Erhalt der Zellfunktion essentielle Proteine codieren. Um als Referenzgen geeignet zu sein, müssen konstante, stabile und in den verschiedenen Gewebeproben gleiche Expressionsaktivitäten nachweisbar sein. Im Kitsystem des Herstellers wurde hierfür das für Porphobilinogen-Desaminase (PBGD) codierende Housekeeping-Gen verwendet. Somit erfolgte die Bestimmung der Konzentration der CK20-cDNA (target) in Abhängigkeit von der Konzentration einer Referenz-cDNA (reference). Das Ergebnis ist der Quotient target/reference, die so genannte relative Ratio. Durch diese Methode erhält man einen relativen Wert, der eine Aussage erlaubt über die CK20-mRNA-Expression im Verhältnis zur gesamten RNA-Expression im untersuchten Gewebe, unabhängig von der absoluten Quantität und Qualität der Ausgangseluate. Neben der relativen Ratio target/reference der einzelnen Proben, wurde auch die relative Ratio der Calibrator-Probe bestimmt. Der Calibrator ist eine Positivprobe mit einer konstanten, bekannten CK20-mRNA-Fraktion. Um Fehler zu vermeiden wurde zunächst der Mastermix hergestellt, wobei ein Mastermix für die CK20-cDNA und ein zweiter für die PBGD-cDNA gefertigt wurde (siehe Tabelle 9). Jede cDNA-Probe wurde nun jeweils zweimal als Matrize (template), einmal für die Amplifikation von CK20 und einmal für die Amplifikation von PBGD eingesetzt, ebenso wie die bei jedem LightCycler-Run benötigte Calibrator-cDNA, sowie eine Negativkontrolle mit sterilem Wasser (H₂O).

Tabelle 8: PCR-Protokoll LightCycler

verwendete Abkürzungen: Temp. = Temperatur; °C/sec = Grad Celsius pro Sekunde

1. Schritt: Denaturierung

Programm	Denaturierung		Zyklen	1
Segment	Temperatur in °C	Inkubationszeit in sec	Temp.-Anstieg in °C/sec	
1	95	600	20	

2. Schritt: Amplifikation

Programm	Amplifikation		Zyklen	50
Segment	Temperatur in °C	Inkubationszeit in sec	Temp.-Anstieg in °C/sec	
1	95	10	20	
2	60	10	20	
3	72	10	20	

3. Schritt: Kühlen

Programm	Cooling		Zyklen	1
Segment	Temperatur in °C	Inkubationszeit in sec	Temp.-Anstieg in °C/sec	
1	40	30	20	

Tabelle 9: Real-time PCR-Ansatz für den Nachweis von CK20

verwendete Abkürzungen: cDNA = komplementäre Desoxyribonukleinsäure; H₂O = Wasser; CK20 = Zytokeratin 20; PBGD = Porphobilinogen-Desaminase

	CK20	PBGD	
Volumen	Komponenten		
14µl	H ₂ O, steril	H ₂ O, steril	Master Mix
2µl	LightCycler-CK20 Detection Mix	LightCycler-CK20 Reference Detection Mix	
2µl	LightCycler-CK20 Enzym Master Mix	LightCycler-CK20 Enzym Master Mix	
2µl	Proben-cDNA	Proben-cDNA	

Die Reaktionsansätze wurden in speziellen Glaskapillaren analysiert. Nach dem Einsetzen suchte das Gerät automatisch nach der Zahl der Glaskapillaren, optimierte die Position der Kapillaren über dem Fluorimeter und speicherte diese Werte für jede Probe ab. Die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe erfolgte durch eine Licht emittierende Diode (LED) über die Spitze der Kapillare, welche als optische Einheit wirkt und die emittierte Fluoreszenzstrahlung gebündelt nach unten wieder abgibt. Eine Kombination von halbdurchlässigen Spiegeln und wellenlängenspezifischen Filtern leitet die emittierte Fluoreszenzstrahlung zu den Photohybriden weiter (siehe Abbildung 1). Diese wandeln das optische Signal in ein elektrisches Signal um, welches sofort über die serielle Schnittstelle zum PC übermittelt wird. Als Funktion aus Fluoreszenzsignal und Zyklus erhält man für jede Probe eine exponentielle Kurve, die der Gleichung $C = C_0 \times E^{CP}$ folgt (siehe Abbildung 2). Dabei ist C die Konzentration der Amplifikationsprodukte im gemessenen Zyklus, C_0 die initiale Konzentration, E der Exponentialkoeffizient für die Amplifikationseffizienz und CP der so genannte crossing point. Als crossing point wird der Zyklus (cycle) bezeichnet in dem die DNA-Amplifikation in die exponentielle Phase übergeht und gilt als der Punkt, der am genauesten das proportionale Verhältnis von Fluoreszenzemission zur Ausgangskonzentration wiedergibt. Somit konnten der Verlauf der PCR mit Hilfe der LightCycler Software (hier: Version 3.5) ohne Zeitverzögerung online am Rechner verfolgt und bereits während des PCR-Laufs Aussagen über den Erfolg getroffen werden. Das PCR-Protokoll wurde ebenso über den angeschlossenen PC gesteuert und überwacht.

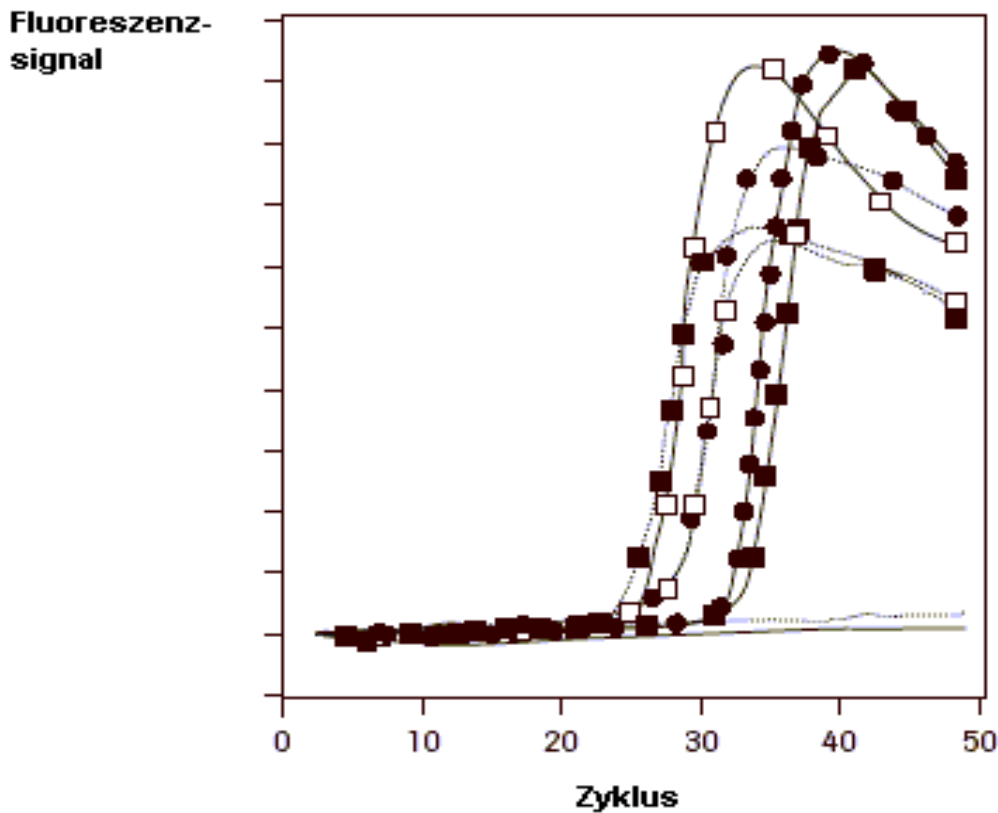


Abbildung 2: Signalverlauf der PCR. Die dargestellten Kurven sind Funktionen aus Fluoreszenzsignal und Zyklus und stellen den typischen Signalverlauf einer CK20-PCR dar. Die Kurven geben die Fluoreszenzsignale der CK20-Detektion (durchgezogene Linie) sowie PBGD-Detektion (gestrichelte Linie) für eine Gewebeprobe 1 (■), Gewebeprobe 2 (●) sowie der Kalibratorprobe (□) und einer Negativprobe (ohne Symbol) wieder. Abbildung verändert gegenüber dem Original aus dem Instruction Manual des LightCycler-CK20 Quantification Kit.

3.2.5 Analyse und Auswertung der Daten

Die LightCycler Software (Version 3.5) ermittelte zunächst die crossing points der einzelnen Proben. Dazu wurde die Programmoption Second Derivate Maximum Method gewählt, die automatisch die crossing points (CP) festlegte. Dies wird

durch einen Programm-Algorithmus erzielt, der den ersten Wendepunkt der exponentiellen Fluoreszenzkurve bestimmt.

Im folgenden Schritt wurden wie beschrieben, die relative Ratios der einzelnen Proben, sowie die relative Ratio der Calibrator-Probe berechnet. Die verschiedenen Proben konnten dadurch unabhängig von der absoluten, sich im Extraktionseluat befindenen RNA-Konzentration und beeinflussenden Inhibitoren verglichen werden. Zur Bestimmung des Endergebnisses, der so genannten normalisierten Ratio, wurde die relative Ratio der einzelnen Proben dividiert durch die konstante relative Ratio der Calibrator-Probe. Dieses Vorgehen diente dazu vorhandene Differenzen in der PCR-Effizienz zwischen der CK20- und Referenzgen-Detektionssensitivität auszugleichen, sowie einen Kalibrierwert festzulegen, der den direkten Vergleich zwischen verschiedenen LightCycler Runs ermöglichte. Die Auswertung der Messungen erfolgte mit Hilfe der Relative Quantification Software, wobei dazu neben den crossing points (CP) der Amplifikationskoeffizient (E) benötigt wurde. Der Amplifikationskoeffizient spiegelt die Effizienz der PCR wieder. Er wurde durch die Bestimmung von Standardkurven festgelegt und vom Kit-Hersteller vorgegeben. Um die Ergebnisse übersichtlich darzustellen, wurde der Wert der normalisierten Ratio mit 10^6 multipliziert, die Ratio des Calibrators somit auf 1 000 000 gesetzt. Das bedeutet, dass eine Gewebeprobe mit einer normalisierten Ratio von 100 000 eine um den Faktor zehn geringere CK20-mRNA-Expression aufwies als die Calibrator-Probe. Auf der Grundlage verschiedener Studien [26,51] wurde in dieser Arbeit eine Gewebeprobe dann als positiv befundet, wenn die normalisierte Ratio einen Wert größer 10^4 aufweist.

3.3 Statistik

Bei dieser Studie handelt es sich um eine klinische Fallstudie. Das bedeutet, dass Patienten mit einer diagnostizierten Erkrankung in eine Klinik aufgenommen wurden und somit als Fall betrachtet werden konnten. Somit konnten sie in die Studie einbezogen werden. In den Untersuchungen wurde eine Vielzahl von Daten erhoben, die im Verlauf der Studie aufbereitet und weiter ausgewertet

wurden. Da in dieser Studie keine Kontrollgruppe aufgenommen werden konnte und zum jetzigen Zeitpunkt noch keine prospektiven Daten über den Krankheitsverlauf vorliegen, konnten statistische Tests, die Aussagen über Spezifität, Sensitivität und Treffsicherheit der verwendeten Methode erlauben, nicht durchgeführt werden. Bei den aufgezeigten Ergebnissen handelt es sich somit um eine deskriptive Darstellung der gewonnenen Daten.

4 Ergebnisse

4.1 Patientenkollektiv

4.1.1 Geschlecht und Alter

In diese Studie wurden 31 Patienten mit kolorektalem Karzinom, bei denen die Indikation zur operativen Therapie gegeben war, aufgenommen. Davon waren 22 (71 %) männlichen und 9 (29 %) weiblichen Geschlechts. Das Durchschnittsalter zum Operationszeitpunkt betrug 63,9 Jahre, die Altersverteilung reichte von 41 bis 88 Jahren, der Häufigkeitsgipfel lag zwischen 61 und 70 Jahren (siehe Abbildung 3).

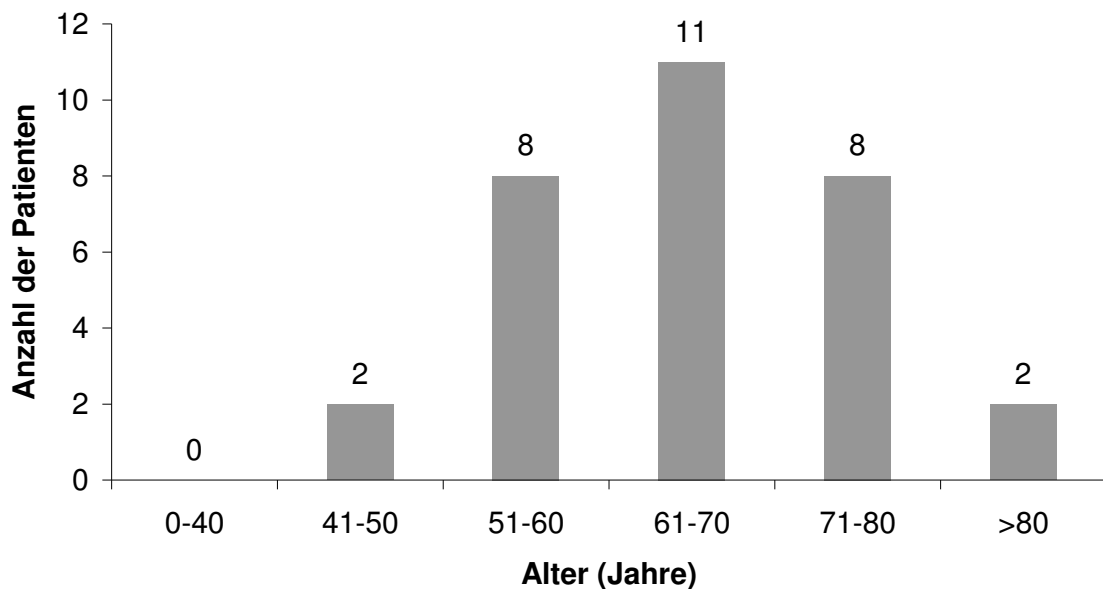


Abbildung 3: Altersverteilung der 31 in die Studie aufgenommenen Patienten

4.2 Tumordaten

4.2.1 CK20 Nachweis im Primärtumor

Der Beurteilung der CK20-Expression in den Lymphknoten in Abhängigkeit von der Expression im Primärtumor kommt eine wichtige Bedeutung zu. Der Nachweis disseminierter Tumorzellen in Lymphknoten über die CK20-mRNA als Markergen kann nur dann erfolgen, wenn der Primärtumor CK20-mRNA exprimiert. Vor der Auswertung und Analyse der übrigen Daten musste daher zunächst festgestellt werden, für welche Patienten sich die beschriebene molekularbiologische Methode eignet. Wir fanden in 29 Fällen (93,5 %) ein positives Ergebnis für CK20-mRNA im Primärtumor. Bei zwei Patienten (6,5 %) konnte keine CK20-mRNA-Expression nachgewiesen werden. Bei diesen zwei Patienten wurde molekularbiologisch kein positiver Lymphknotenbefund erhoben. Die weitere Auswertung der Ergebnisse bezieht sich nun auf die 29 Patienten mit CK20-Expression im Primärtumor.

4.2.2 Tumorlokalisation

Die Tumoren waren im Colon ascendens, Colon descendens, Colon sigmoideum und im Rektum lokalisiert. Die Häufigkeitsverteilung zeigt die folgende Abbildung (Abbildung 4).

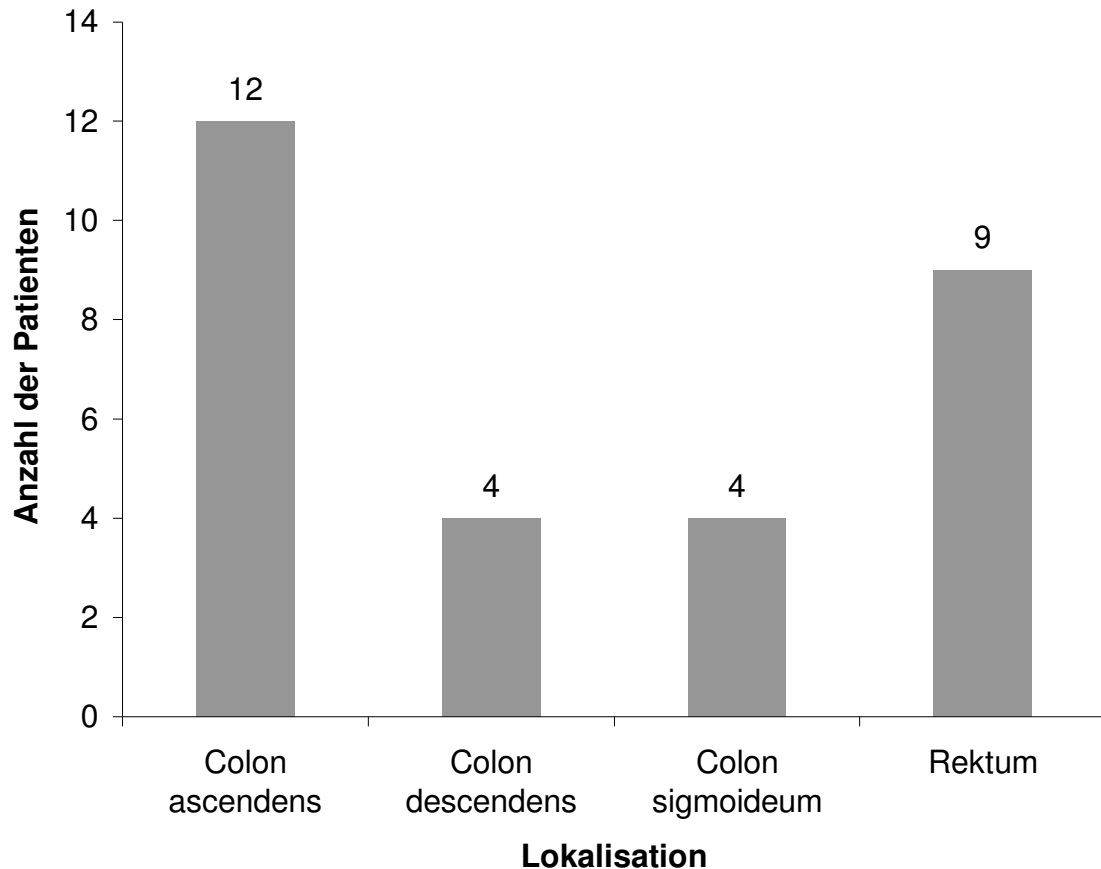


Abbildung 4: Verteilung der 29 Patienten nach Tumorlokalisierung

4.2.3 Staging und Grading

Das pathologische Staging zeigte folgende Aufteilung: 4 Patienten bzw. 6 Patienten wiesen einen T1- bzw. T2-Tumor auf (13,8 % bzw. 20,7 %). 17 Patienten (58,6 %) litten an einem T3-Tumor, nur 2 Patienten (6,9 %) an einem T4-Tumor. 19 Patienten (65,5 %) zeigten histopathologisch tumorfreie Lymphknoten, je 5 Patienten (17,25 %) wurden in die Kategorien N1 bzw. N2 eingeteilt. Bei 4 Patienten (13,8 %) wurden Fernmetastasen diagnostiziert. Die Differenzierungsgrade (Grading) der Primärtumoren in der histopathologischen Beurteilung zeigten einen G1-Tumor (3,4%) und je 14 Tumoren (48,3%) in den Kategorien G2 bzw. G3.

4.2.3 UICC-Stadien

Nach der Einteilung der UICC lassen sich 4 Tumorstadien unterteilen. Basierend auf der histopathologischen Beurteilung wurden die untersuchten Patienten diesen Stadien zugewiesen (siehe Abbildung 5). Patienten im Stadium I weisen einen Primärtumor auf, der die Tunica muscularis propria nicht überschreitet (T1,T2) und histopathologisch weder Lymphknoten- noch Fernmetastasen (N0,M0) zeigen. Stadium II beinhaltet weiter fortgeschrittene Tumoren (T3,T4), wobei ebenfalls keine Metastasen nachzuweisen sind (N0, M0). Eine Einteilung in Stadium III bedeutet, dass Lymphknotenmetastasen vorhanden sind (jedes T, N1-2, M0), in Stadium IV sind bereits Fernmetastasen vorhanden (jedes T, jedes N, M1).

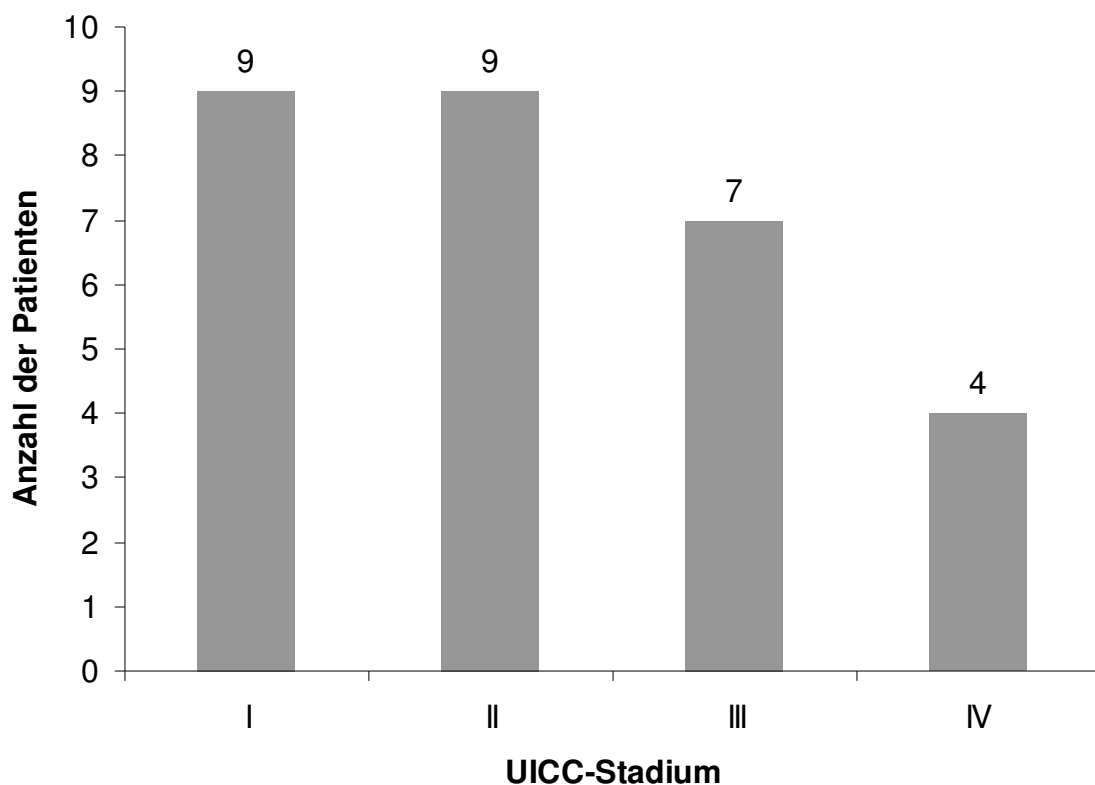


Abbildung 5: Verteilung der 29 Patienten in den einzelnen UICC-Stadien nach histopathologischem Befund

verwendete Abkürzungen: UICC = Union Contre le Cancer

4.3 molekularbiologische Ergebnisse

4.3.1 Nachweis von CK20-mRNA in Lymphknoten

Insgesamt wurden in dieser Studie Primärtumoren und 391 Lymphknoten von 31 Patienten auf das Vorliegen von CK20-mRNA unter Verwendung der LightCycler-Technik analysiert. 362 Lymphknoten stammen dabei von den 29 Patienten, die eine Expression von CK20-mRNA im Primärtumor aufwiesen. Von diesen Lymphknoten konnten in 38 (10,5 %) Fällen histologisch Tumorzellen nachgewiesen werden. Der Nachweis der CK20-Expression war bei 89 (24,6 %) Lymphknoten positiv. 14 weitere histologisch positive Lymphknoten wurden nicht molekularbiologisch untersucht. Diese Lymphknoten wurden aufgrund der ungenügenden Abgrenzbarkeit vom Primärtumor nicht präpariert um so die histopathologische Beurteilung nicht zu gefährden. Die Ergebnisse des molekularbiologischen Nachweisverfahrens sind in Tabelle 10 dargestellt. Ein Lymphknoten wurde dann als CK20-positiv befundet, wenn bei der Auswertung der molekularbiologischen Untersuchung die ermittelte normalisierte Ratio größer 10^4 war. Ersichtlich in der Tabelle sind außerdem die Lokalisation der molekularbiologisch positiv befundenen Lymphknoten, sowie die zugehörigen histopathologische Einteilungen der Patienten in die UICC-Stadien.

Tabelle 10: Einzeldaten der 29 untersuchten Patienten: UICC-Stadium, molekularbiologisches Ergebnis sowie Lokalisation der molekularbiologisch positiven Lymphknoten (nach Gruppen).

Verwendete Abkürzungen: Pat.Nr. = laufende Patientenummer; UICC = Union Contre le Cancer; CK20 positiv = positives molekularbiologisches Untersuchungsergebnis

Pat.Nr.	UICC –Stadium	CK 20 positiv	Positive Lymphknotenstationen			
			I	II	III	IV
1	I	0	0	0	0	0
2	III	6	3	3	0	0
3	I	10	1	2	7	0

Pat.Nr.	UICC –Stadium	CK 20 positiv	Positive Lymphknotenstationen			
			I	II	III	IV
4	I	1	0	1	0	0
5	II	0	0	0	0	0
6	I	0	0	0	0	0
7	I	9	3	4	2	0
8	II	0	0	0	0	0
9	II	0	0	0	0	0
10	IV	9	7	2	0	0
11	IV	1	0	1	0	0
12	III	9	2	6	1	0
13	II	1	0	1	0	0
14	II	0	0	0	0	0
15	III	4	0	2	2	0
16	II	0	0	0	0	0
17	III	5	2	2	1	0
18	I	2	0	1	1	0
19	II	0	0	0	0	0
20	III	4	3	1	0	0
21	I	2	1	0	1	0
22	IV	6	2	3	1	0
23	I	0	0	0	0	0
24	I	0	0	0	0	0
25	III	7	2	4	1	0
26	IV	4	1	3	0	0
27	II	1	0	0	1	0
28	II	3	1	1	1	0
29	III	5	4	1	0	0

4.3.2 Vergleich zwischen histologischem und molekularbiologischem Nachweis von disseminierten Tumorzellen in Lymphknoten

Die 362 Lymphknoten, die sowohl histopathologisch als auch molekularbiologisch auf das Vorliegen disseminierter Tumorzellen untersucht wurden, weisen die in Tabelle 11 dargestellten Ergebnisse auf. Von den 38 Lymphknoten mit histologisch positivem Ergebnis konnten 35 (92,1 %) in der molekularbiologischen Untersuchung durch den Nachweis der CK20-Expression bestätigt werden. Bei den 324 histologisch tumorfreen Lymphknoten konnten in 54 Fällen (16,7 %) eine CK20-Expression gezeigt werden.

Tabelle 11 : Molekularbiologisch positive Lymphknoten aufgeteilt nach histologischem Ergebnis

Zeichenerklärung: LK = Lymphknoten; %_{CK20/histo} = prozentualer Anteil der molekularbiologisch positiven (CK20-Expression) Lymphknoten von der Gesamtzahl histologisch negativer bzw. positiver Lymphknoten

Histologisches Ergebnis	CK20-Expression	% _{CK20/histo}
Negative LK: 324	54	16,7
Positive LK: 38	35	92,1

4.3.2.1 Lokalisation der molekularbiologisch und histologisch untersuchten Lymphknoten

Bei der postoperativen Präparation der Lymphknoten wurden diese aufgrund ihrer Lokalisation in Gruppen von I bis IV eingeteilt. Insgesamt wurden aus der Gruppe I 126 Lymphknoten, die sich im perikolischen (Tumorabstand < 10 cm) bzw. perirektalen (Tumorabstand < 5 cm) Fettgeweben befanden, präpariert. In die Gruppe II wurden 115 Lymphknoten des perikolischen bzw. perirektalen Fettgewebes eingeteilt, deren Abstand mehr als 10 bzw. 5 cm vom Primärtumor betrug. 120 Lymphknoten wurden entlang der versorgenden Gefäße (Gruppe III)

und nur ein Lymphknoten wurde perioperativ aus dem paraaortalen Bereich entnommen (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Verteilung der untersuchten Lymphknoten nach anatomischer Lokalisation

Gruppe	Kolonkarzinome	Rektumkarzinome	Anzahl Lymphknoten
I	perikologisch - Abstand zum Tumor < 10 cm	perirektal - Abstand zum Tumor < 5 cm	126
II	perikologisch - Abstand zum Tumor > 10 cm	perirektal - Abstand zum Tumor > 5 cm	115
III	Abflussgebiet Mesenterialarterien	Abflussgebiet Mesenterialarterien	120
IV	paraaortale Lymphknoten	paraaortale Lymphknoten	1

Werden die histologisch bzw. molekularbiologisch positiv befundenen Lymphknoten anhand dieser Gruppeneinteilung gegenübergestellt, zeigt sich die in Abbildung 6 dargestellte Verteilung. In Gruppe I befinden sich 19 (15,1 %) histopathologisch und 32 (25,4 %) molekularbiologisch positive Lymphknoten. In Gruppe II stehen 12 (10,4 %) histopathologisch positiven 38 (33,0 %) molekularbiologisch positive Lymphknoten gegenüber, sowie 7 (5,8 %) histopathologisch und 19 (15,8 %) molekularbiologisch positive in Gruppe III. Aus Gruppe IV wurde nur ein Lymphknoten analysiert, der sowohl molekularbiologisch als auch histopathologisch tumorfrei erschien.

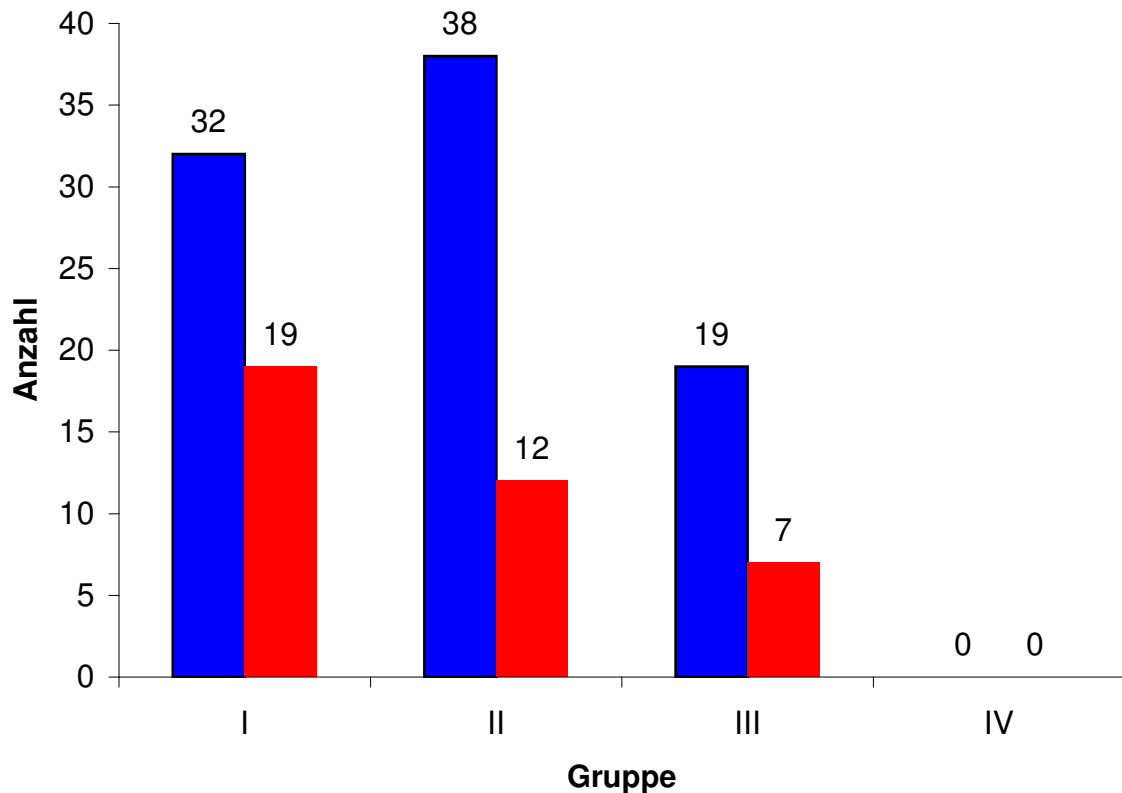


Abbildung 6: Verteilung der 89 molekularbiologisch positiven (blaue Balken) und 38 histopathologisch positiven (rote Balken) Lymphknoten nach anatomischer Lokalisation (Gruppe I-IV)

Der direkte Vergleich zwischen molekularbiologischem und histopathologischem Ergebnis der einzelnen Lymphknoten, eingeteilt nach der Lokalisation, ergibt die in den Tabellen 13 und 14 aufgezeigten Werte. Bei den histologisch positiv befundenen Lymphknoten, finden sich lediglich in Gruppe I 3 Fälle, in denen molekularbiologisch keine CK20-Expression nachgewiesen werden konnte. In den übrigen Gruppen konnte der histologische Befund durch die molekularbiologische Untersuchung immer bestätigt werden. Bei den histologisch negativ befundenen Lymphknoten, zeigten 15 % in Gruppe I, 25,2 % in Gruppe II sowie 10,6 % in Gruppe III in der real-time PCR eine Expression von CK20-mRNA.

Tabelle 13 : nachgewiesene CK20-Expression in histologisch positiven Lymphknoten aufgeteilt nach Lokalisation (Gruppe I-IV)

Zeichenerklärung: % CK20/histo+ = prozentualer Anteil der molekularbiologisch positiven (CK20-Expression) Lymphknoten von der Anzahl histologisch positiver Lymphknoten in der jeweiligen Lokalisationsgruppe und von der Gesamtzahl

Lokalisations-Gruppe	Histologisch positive Lymphknoten	CK20-Expression	% CK20/ histo+
I	19	16	84,21
II	12	12	100
III	7	7	100
IV	0	0	--
Gesamt	38	35	92,1

Tabelle 14 : nachgewiesene CK20-Expression in histologisch negativen Lymphknoten aufgeteilt nach Lokalisation (Gruppe I-IV)

Zeichenerklärung: % CK20/histo- = prozentualer Anteil der molekularbiologisch positiven (CK20-Expression) Lymphknoten von der Anzahl histologisch negativer Lymphknoten in der jeweiligen Lokalisationsgruppe und von der Gesamtzahl.

Lokalisations-Gruppe	Histologisch negative Lymphknoten	CK20-Expression	% CK20/histo-
I	107	16	15,0
II	103	26	25,2
III	113	12	10,6
IV	1	0	--
Gesamt	324	54	16,7

4.4 Patientenbezogene Ergebnisse

4.4.1 Patientenbezogener Vergleich der molekularbiologischen und histopathologischen Ergebnisse

Bisher wurden die Ergebnisse der einzelnen Lymphknoten analysiert und die histopathologischen Befunde direkt den molekularbiologischen gegenübergestellt. Im Weiteren kann der einzelne Patient, mit der kompletten Anzahl der entnommenen Lymphknoten in Befundkategorien eingeteilt werden. Für das histopathologische als auch das molekularbiologische Ergebnis wird ein Patient in die Kategorie positiv eingeteilt, wenn wenigstens ein Lymphknoten durch die jeweilige Methode positiv bewertet wird. 10 der 29 (34,5 %) in dieser Studie untersuchten Patienten wiesen in der histopathologischen Lymphknotenbeurteilung ein positives Ergebnis auf, während bei der molekularbiologischen Analyse bei 19 Patienten (65,5 %) eine Expression von CK20-mRNA in wenigstens einem Lymphknoten nachgewiesen werden konnte. Nach der TNM-Klassifikation unterteilt man die positiven Befunde in N1, für 1-3 positive Lymphknoten und N2, für mehr als 3 positive Lymphknoten. Bei 10 von 10 (100%) Patienten, die histopathologisch einen positiven Lymphknotenstatus zeigten, konnten molekularbiologisch disseminierte Tumorzellen bestätigt werden. Ebenso zeigte sich ein CK20-Nachweis bei 9 der 19 (47,4%) histopathologisch negativ bewerteten Patienten.

Tabelle 15 zeigt die erhobenen Daten der 29 untersuchten Patienten unter Angabe der histopathologisch festgelegten TNM-Klassifikation, der UICC-Stadien sowie der Anzahl der histopathologisch bzw. molekularbiologisch positiv befundeten Lymphknoten.

Tabelle 15: patientenbezogene Ergebnisse: UICC-Stadium, histologische TNM-Klassifizierung, sowie Anzahl der histopathologisch bzw. molekularbiologisch positiv befundenen Lymphknoten.

verwendete Abkürzungen: Pat.Nr. = laufende Patientenummer; UICC = Union Contre le Cancer; histologisch positive: Anzahl der histologisch positiven Lymphknoten; CK20 pos = Anzahl molekularbiologisch positiver Lymphknoten; T = Ausdehnungsstadium des Primärtumors; N = histologisches Stadium des Lymphknotenbefalls; M = Stadium der Fernmetastasierung; N_{CK20} = molekularbiologisches Stadium des Lymphknotenbefalls

Pat.Nr.	UICC-Stadium				histologisch Positive	CK20 pos (N _{CK20})
		T	N	M		
1	I	2	0	0	0	0(0)
2	III	3	2	0	4	6(2)
3	I	1	0	0	0	10(2)
4	I	2	0	0	0	1(1)
5	II	3	0	0	0	0(0)
6	I	2	0	0	0	0(0)
7	I	1	0	0	0	9(2)
8	II	3	0	0	0	0(0)
9	II	4	0	0	0	0(0)
10	IV	4	2	1	9	9(2)
11	IV	2	1	1	2	1(1)
12	III	3	1	0	1	9(2)
13	II	3	0	0	0	1(1)
14	II	3	0	0	0	0(0)
15	III	3	2	0	5	4(2)
16	II	3	0	0	0	0(0)
17	III	3	2	0	4	5(2)
18	I	1	0	0	0	2(1)
19	II	3	0	0	0	0(0)
20	III	3	1	0	3	4(2)

Pat.Nr.	UICC-Stadium				histologisch positiv	CK20 pos (N _{CK20})
		T	N	M		
21	I	1	0	0	0	2(1)
22	IV	3	2	1	5	6(2)
23	I	2	0	0	0	0(0)
24	I	2	0	0	0	0(0)
25	III	3	1	0	3	7(2)
26	IV	3	0	1	0	4(2)
27	II	3	0	0	0	1(1)
28	II	3	0	0	0	3(1)
29	III	3	1	0	2	5(2)

4.4.2 Abhängigkeit der Ergebnisse von Tumorausbreitung und UICC-Stadien

Die Tabelle 16 zeigt die absolute bzw. relative Verteilung der positiv bewerteten Patienten in Abhängigkeit von der Tumorausbreitung.

Tabelle 16: histologischer, molekularbiologischer Befund aufgeteilt nach T-Kategorie des Primärtumors

Verwendete Abkürzungen: T = Ausdehnungsstadium des Primärtumors

T-Kategorie	histologischer Befund		molekularbiologischer Befund	
	positiv	negativ	positiv	negativ
1	0 (0%)	4 (100%)	4 (100%)	0 (0%)
2	1 (16,7%)	5 (83,3%)	1 (16,7%)	5 (83,3%)
3	7 (41,2%)	10 (58,8%)	12 (70,6%)	5 (29,4%)
4	1 (50%)	1 (50%)	1 (50%)	1 (50%)

In der Darstellung der erhobenen Befunde aufgeteilt nach der Stadieneinteilung der UICC fanden sich in den Stadien I und II deutliche Unterschiede zwischen

dem molekularbiologischen und histopathologischen Ergebnis (Tabelle 17). Definitionsgemäß sind die histologischen Lymphknotenbefunde in diesen Stadien negativ. Durch die molekularbiologische Untersuchung konnten in Stadium I 5 Patienten (55,6 %) und in Stadium II 3 Patienten (33,3 %) positiv bewertet werden. Im Stadium IV konnten alle 4 Fälle (100 %), in denen Fernmetastasen diagnostiziert wurden, molekularbiologisch positiv bewertet werden. Die histopathologische Bewertung war in 3 von 4 Fällen (75 %) positiv.

Tabelle 17: histologischer, molekularbiologischer Befund aufgeteilt nach UICC-Stadium.

verwendete Abkürzungen : UICC = Union Contre le Cancer.

UICC-Stadium	histologischer Befund		molekularbiologischer Befund	
	positiv	negativ	positiv	Negativ
I	0 (0%)	9 (100%)	5 (55,6%)	4 (44,4%)
II	0 (0%)	9 (100,0%)	3 (33,3%)	6 (66,7%)
III	7 (100,0%)	0 (0%)	7 (100,0%)	0 (0%)
IV	3 (75,0%)	1 (25,0%)	4 (100,0%)	0 (0%)

Wird das molekularbiologische Ergebnis für die neue Stadieneinteilung zugrunde gelegt (UICC-Stadium_{mol.}), verändern sich die Einteilungen, wie in Abbildung 7 dargestellt. In 8 (27,6 %) Fällen führte das molekularbiologische Ergebnis zu einem upstaging von Stadium I (5 Fälle) bzw. II (3 Fälle) in Stadium III. In 21 Fällen (72,4 %) wurde die histopathologische Stadieneinteilung bestätigt. In keinem Fall (0 %) führte die molekularbiologische Untersuchungsmethode zu einem downstaging des histopathologischen Ergebnisses.

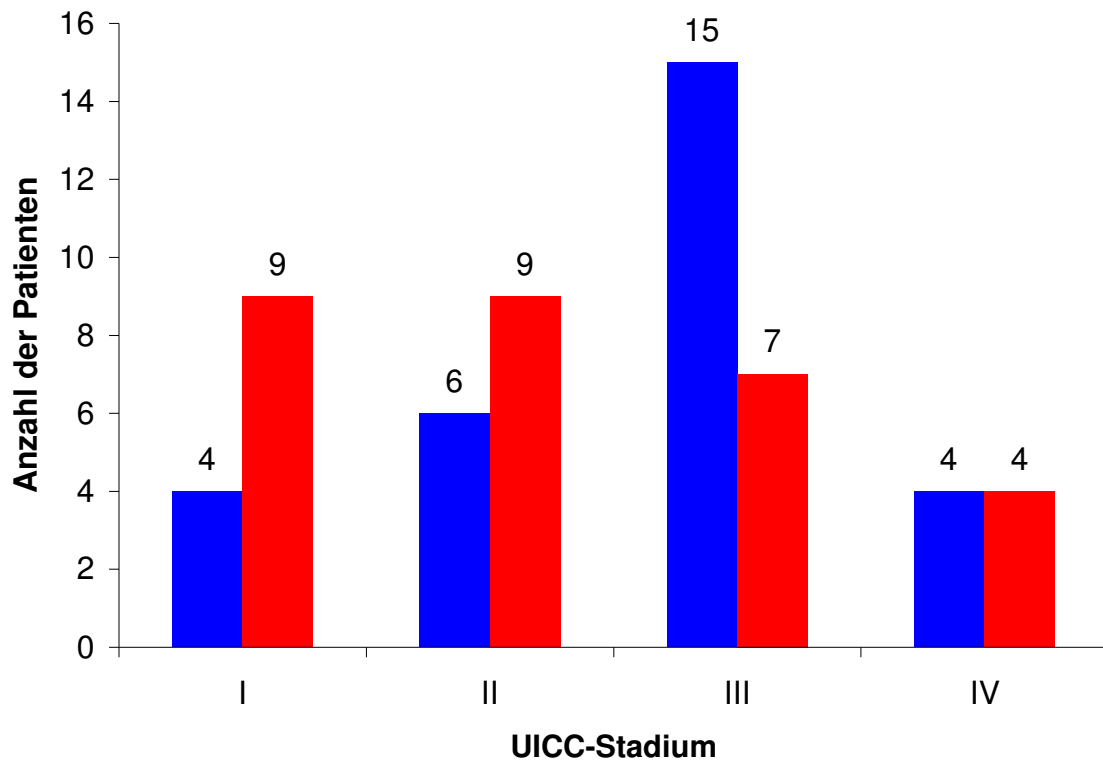


Abbildung 7: Verteilung der 29 Patienten in die UICC-Stadien; molekularbiologisches Ergebnis (blaue Balken) und histopathologisches Ergebnis (rote Balken) im Vergleich.

verwendete Abkürzungen : UICC = Union Contre le Cancer

4.4.3 Abhängigkeit der Ergebnisse von der Primärtumorlokalisation

Es fällt auf, dass 6 der 12 Patienten (50 %) die einen Tumor im Colon ascendens aufwiesen in ein höheres Stadium eingeteilt wurden, während lediglich jeweils ein Patient mit Tumor im Colon descendens bzw. Colon sigmoideum sowie kein Patient mit Rektumkarzinom ein verändertes Ergebnis durch die molekularbiologische Methode aufwies (siehe Abbildung 8).

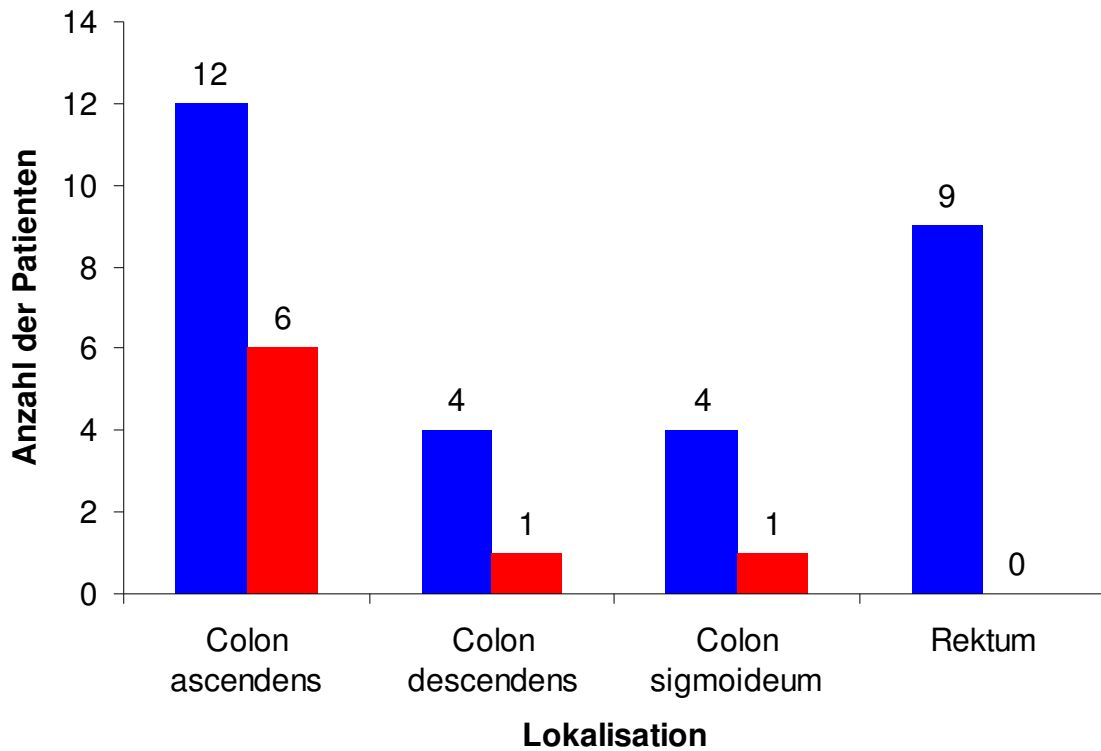


Abbildung 8: Anzahl der upstaging, aufgeteilt nach Lokalisation des Primärtumors. Aufgezeigt werden die Gesamtzahl der 29 Patienten, (blaue Balken = Gesamtzahl) sowie die Anzahl der 8 Patienten die durch das molekularbiologische Staging in ein höheres UICC-Stadium eingeteilt wurden (rote Balken = Anzahl upstaging), beide aufgeteilt nach jeweiliger Primärtumorlokalisierung.

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methodik

5.1.1 Grundlage und Bedeutung der Untersuchung

Bei Patienten mit kolorektalem Karzinom ist die systematische regionäre Lymphadenektomie zentraler Bestandteil der Therapie. Darüber hinaus ist der histologische Lymphknotenstatus ein bedeutendes Kriterium zur Prognoseeinschätzung, die durch die postoperative Stadieneinteilung nach der UICC standardisiert wird. Problematisch erscheinen dabei Patienten in den UICC-Stadien I und II. Obwohl man in diesen Stadien von einem niedrigen Rezidivrisiko ausgeht, beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate 70-80 %, somit erleiden dennoch 20-30 % der Patienten im Verlauf von fünf Jahren ein Tumorrezidiv [28,44]. Ziel der derzeitigen wissenschaftlichen Forschung ist es, in dieser Gruppe zusätzliche prognostische Marker zu finden, um Patienten mit einem hohen Rezidivrisiko, die möglicherweise von einer adjuvanten Therapie profitieren, zu erkennen.

Die prognostische Bedeutung von isolierten disseminierten Tumorzellen in Lymphknoten bei kolorektalem Karzinom ist in der Literatur mehrfach untersucht worden [6,33,45,59]. In anfänglichen Studien wurde durch immunohistochemische Nachweisverfahren (IHC) die Sensitivität der histologischen Diagnostik verbessert, eine prognostische Relevanz konnte jedoch bisher nicht belegt werden. Die IHC ist eine kosten- und zeitintensive Technik, die sich im Übrigen auch aufgrund widersprüchlicher Studienergebnisse nicht im klinischen Alltag etablieren konnte [1,5,48]. Durch die Einführung molekularbiologischer Methoden in die Tumordiagnostik ergab sich ein weites Feld neuer Möglichkeiten. Die molekularbiologische Diagnostik, unter Nutzung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), ist die bisher sensitivste Methode für den Nachweis okkulten Tumorzellen. Da für das kolorektale Karzinom kein tumorspezifischer Marker vorhanden ist, wird stattdessen ein gewebespezifischer Marker verwendet. Hierzu eignet sich

Zytokeratin 20 (CK20), ein Intermediärfilament, das von den Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes exprimiert wird [37]. CK20 wurde in mehreren Studien, aufgrund der für gastrointestinale Epithelzellen charakteristischen Expression und dem unveränderten Expressionsmuster der Zytokeratine beim Übergang von normalem zu malignem Wachstum, als potentiell sinnvoller prognostischer Marker beschrieben [7,34].

5.1.2 Entwicklung der molekularbiologischen Diagnostik

Zu den bedeutensten molekularbiologischen Ansätzen gehören die Studien von Liefers et al. [29], Futumura et al. [13] und Weitz et al. [57]. Liefers et al. untersuchten 192 Lymphknoten von 26 Patienten im Stadium I und II. Bei 14 Patienten konnten mittels einer sogenannten reversen Transkriptase-PCR (einfache, qualitative Polymerase-Kettenreaktion) Tumorzellen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse dieser Studie werden jedoch kontrovers diskutiert, da nur 7,4 Lymphknoten pro Patient analysiert wurden, zu wenig Negativkontrollen eingeschlossen wurden und die Sensitivität der reversen Transkriptase-PCR nicht ausreichend untersucht wurde [58].

Mit einer kombinierten „nested“-CK20-PCR (nested PCR: nach der ersten PCR wird zur Erhöhung der Sensitivität eine zweite PCR mit den Produkten der Ersten durchgeführt) und zusätzlich einer Carcinoembryonic Antigen(CEA)-PCR konnten Futumura et al. bei 13 von 13 Patienten im UICC Stadium I bzw. II Tumorzellen in Lymphknoten detektieren . Ebenso mit einer „nested“-CK20-PCR fanden Weitz et al. isolierte disseminierte Tumorzellen bei 14 von 16 Patienten UICC Stadium I bzw. II. Die Nachweisquoten der beiden letztgenannten Studien liegen damit allerdings wesentlich höher als die Rezidivraten in den entsprechenden Stadien. Die Ergebnisse dieser Studien, die Markergene nur qualitativ nachweisen konnten, zeigen, dass die beschriebenen Methoden nur eingeschränkte klinische Bedeutung besitzen. Die hohe Sensitivität, die keine quantitative Aussage über die extrahierte RNA erlaubt und so eine hohe Anfälligkeit für Kontamination darstellt, und die große Variabilität der Ergebnisse, verursacht durch uneinheitliche PCR-Protokolle, führen zu einem hohen Anteil falsch positiver

Nachweise und machen eine adäquate Vergleichsführung zwischen den einzelnen Studien nahezu unmöglich [58].

In der weiteren Entwicklung wurden immunohistochemische und molekularbiologische Methoden beschrieben. Dabei wurden die Techniken einzeln oder auch kombiniert eingesetzt, mit dem Ziel, sowohl Sensitivität als auch Spezifität zu verbessern. Während immunohistochemische Methoden zur Charakterisierung der CK20-Protein-Expression im Primärtumor und in Metastasen eingesetzt wurden, war die PCR die Methode der Wahl zum Nachweis disseminierter Tumorzellen im Blut [6,12,59], in Lymphknoten [13,27,33,45] und im Knochenmark [57] von Patienten die an einem kolorektalen Karzinom erkrankt waren. Einzelne Autoren konnten Zusammenhänge zwischen Stadium [12,50] bzw. Differenzierungsgrad [46] und dem Nachweis von CK20 aufzeigen. Andere Studien widerlegten diese Theorien, außerdem haben einige Autoren über die CK20-Detektion bei Probanden mit nichtmalignen Erkrankungen bzw. mit anderen Karzinomerkkrankungen berichtet [6,59,64]. Diese Tatsachen lassen die Möglichkeit, eine prognostische Aussage durch eine rein qualitative PCR-Methode zu treffen, sehr problematisch erscheinen.

Merrie et al. (2003) fassten die bedeutensten Studien zu dieser Thematik zusammen und beschrieben, dass bei einer Spanne von 15-100 %, mit einem mittleren Wert von 29 %, der untersuchten histologisch N0 befundeten Patienten mit kolorektalem Karzinom, molekularbiologisch disseminierte Tumorzellen detektiert wurden [31]. Nur wenige dieser Studien haben die prognostische Bedeutung der gewonnenen Ergebnisse überprüft. Hayashi et al. [18] zeigten, dass 52 % der histologisch N0 gestagten Patienten, mit Mutationen in den K-Ras- oder p53-Genen in den Primärtumoren, molekularbiologisch detektierbare okkulte Tumorzellen aufwiesen. Von diesen Patienten entwickelten 73 % eine Rezidivkrankung in einem Beobachtungszeitraum von fünf Jahren, wobei bei keinem der 34 molekularbiologisch negativ befundeten Patienten eine Rezidivkrankung auftrat. Die verwendete, aufwendige und kostenintensive Methode lässt sich allerdings schwer in den klinischen Alltag einbinden. Außerdem kann sie nur angewendet werden bei Patienten mit K-Ras- oder p53-

Gen Mutationen, die eine nachweislich schlechtere Prognose aufweisen, als Patienten ohne diese Mutationen [43,65]. Somit hat dieses Verfahren keine generelle Gültigkeit. Liefers et al.[29] verwendeten einen reverse Transkriptase-PCR Ansatz für das Carcinoembryonic Antigen (CEA). Pro Patient wurden sieben Lymphknoten untersucht. Dabei konnte eine deutliche Differenz in der 5-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit nachweisbaren disseminierten Tumorzellen im Vergleich zu Patienten mit molekularbiologisch negativem Befund dargestellt werden. Die 5-Jahres-Überlebensrate betrug 75 % bei Patienten ohne und nur 36 % bei Patienten mit disseminierten Tumorzellen. Da, wie bereits erwähnt, nur wenige Kontrolllymphknoten untersucht wurden und CEA außerdem nicht als zuverlässiger Marker für disseminierte Tumorzellen angesehen wird [58], bestehen Zweifel an der Sensitivität und Spezifität der Methode.

Rosenberg et al. versuchten durch Kombination von IHC und reverse Transkriptase-PCR die Sensitivität und Spezifität zu verbessern und fanden bei einer Analyse von 30 Fällen, bei denen jeweils zwei peritumorale Lymphknoten entfernt wurden, deutliche Hinweise dass ein CK20-positives PCR-Signal ein unabhängiger prognostischer Marker für Patienten mit kolorektalem Karzinom im Stadium I und II nach UICC darstellen könnte [45]. Aufgrund der geringen Anzahl an untersuchten Lymphknoten und der kurzen postoperativen Beobachtungszeit sind die Ergebnisse allerdings nicht signifikant. Merrie et al. (2003) demonstrierten in einer Studie mit 141 Patienten erstmals eine signifikante prognostische Bedeutung einer positiven CK20-reverse Transkriptase-PCR in Lymphknotengewebe [31].

Zusammenfassend gilt die qualitative Bestimmung von Markergenen zum Nachweis disseminierter Tumorzellen als eine sehr umstrittene Methode zur prognostischen Beurteilung des weiteren Krankheitsverlaufes. Ein wichtiger Grund ist die fehlende Standardisierung einer PCR-Methode und damit die Möglichkeit verschiedene Studien miteinander zu vergleichen. Ein weiterer Grund ist die nicht ausreichend untersuchte Sensitivität und Spezifität. Da ein qualitativer Nachweis keine Aussage über die Expressionseigenschaften des untersuchten Gewebes erlaubt, fällt es schwer die prognostische Relevanz einzuordnen. Vielmehr beweist

der alleinige Nachweis einer positiven Probe nicht unbedingt das Vorhandensein einer aktiven Tumorzelle, sondern kann auch durch Kontamination oder das Vorhandensein weit weniger aktiver, CK20 exprimierender Zellen nicht-kolorektalen Ursprungs zurückzuführen sein [25,51].

5.1.3 Die quantitativen real-time PCR

Die Entwicklung eines quantitativen real-time PCR-Systems (QRT-PCR) ist in dieser Hinsicht ein entscheidender Fortschritt und ermöglicht eine Vielzahl von neuen Möglichkeiten in der molekularbiologischen Diagnostik [63]. Durch Entwicklung der quantitativen real-time PCR wurde es möglich, Aussagen über die Ausgangs-DNA- bzw. RNA-Mengen zu machen. Dies macht die quantitative real-time PCR zu einem unentbehrlichen Werkzeug im wissenschaftlichen und diagnostischen Bereich. Es gelang bereits in einzelnen Studien disseminierte Tumorzellen bei Patienten mit kolorektalem Karzinom, über die quantitative Bestimmung von Markergenen in Lymphknoten nachzuweisen [27,51]. Durch die neu entwickelte LightCycler-Technologie [23,63] (Roche Diagnostics, Mannheim) wurde die Grundlage für eine standardisierte und damit in einer Vielzahl von Studien vergleichbare QRT-PCR-Methode geschaffen.

Entscheidenden Beitrag an der in dieser Arbeit durchgeführten Methode hat die Studie von Soong et al. [51]. Soong et al. beschrieben dabei erstmals die quantitative Bestimmung der CK20-mRNA in Lymphknoten mit Hilfe der LightCycler-Technologie. Um die Expressionseigenschaften verschiedener Ursprungszellen und somit die Spezifität der CK20-Detektion zu untersuchen, wurden die CK20-mRNA-Level in mehreren Lymphknoten und Primärtumoren von Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen wie Mammakarzinom, Malignem Melanom oder Plattenepithelzellkarzinom bestimmt. Mit dieser Studie wurde nicht nur ein standardisiertes QRT-PCR-Protokoll entwickelt, sondern es konnten auch Unterschiede im CK20-Expressionslevel in Lymphknoten von verschiedenen zugehörigen Tumortypen aufgezeigt werden. So wiesen die untersuchten Lymphknoten von Patienten mit kolorektalem Karzinom eine deutliche höhere CK20-mRNA-Expression auf als die der übrigen Tumorarten.

Schließt man diese neuen Erkenntnisse in die durch eine Vielzahl an Hinweisen aus qualitativen Untersuchung hervorgegangene Vermutung der prognostischen Relevanz von CK20-mRNA-Detektion in Lymphknoten ein, so liegt es nahe den weiteren Krankheitsverlauf in Abhängigkeit der quantitativ feststellbaren Expressionshöhe zu untersuchen.

Lassmann et al. (2004) versuchten die prognostische Relevanz von CK20-spezifischer QRT-PCR mit LightCycler-Technologie und IHC für das Auftreten von Rezidiverkrankungen zu evaluieren. Dabei wurden Primärtumoren und Lymphknoten von 72 Patienten untersucht, die zuvor nach operativer Therapie mit Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet wurden. Alle Patienten wiesen in der histopathologischen Beurteilung tumorfreie Lymphknoten auf, befanden sich somit nach UICC also in den Stadien I und II. Zwar konnte in dieser Studie die prognostische Bedeutung durch CK20-IHC oder QRT-PCR nicht signifikant nachgewiesen werden. Eine deutlich höhere Inzidenz für Rezidiverkrankungen bei Patienten mit CK20-mRNA positiven Lymphknoten (57.1 %), als bei Patienten mit CK20-mRNA negativen Lymphknoten (38,5 %) lässt aber dennoch auf einen Zusammenhang der Untersuchungsergebnisse mit dem weiteren Krankheitsverlauf schließen [27]. Durch die Kombination von IHC und QRT-PCR konnten Lassmann et al. im weiteren zeigen, dass die untersuchten Primärtumoren sehr heterogen sind und häufig unterschiedliche CK20-Expressionsmuster aufweisen. Daher scheint der Beurteilung der CK20-Expression in den Lymphknoten, in Abhängigkeit von der CK20-Expression im Primärtumor, eine wichtige Bedeutung zuzukommen. Weiterhin leitet sich daraus ab, dass nicht jede Tumorzelle, die von einem heterogenen Primärtumor dissoziiert, CK20-mRNA exprimiert [26,27].

5.1.4 Zusammenfassung der bisherigen Untersuchungen und Schlussfolgerung für die durchgeführte Methode

In der vorliegenden Studie wurde erstmals die molekularbiologische Untersuchung in den klinischen Routineablauf integriert. Um einen möglichst geringen Verlust der sehr empfindlichen RNA sicherzustellen, wurden hierbei die Gewebeproben der Primärtumoren und Lymphknoten unmittelbar nach der operativen Resektion schockgefroren. Durch die Halbierung der Lymphknoten, konnte die QRT-PCR parallel zur histopathologischen Beurteilung durchgeführt werden, ohne dass sich die beiden Methoden dabei beeinflussten. Eine zusätzliche immunhistochemische Untersuchung wurde nicht durchgeführt, da sich dadurch in bisherigen Studien [27] keine bedeutsame Verbesserung der Aussagefähigkeit ergeben hat und der weitere Untersuchungsschritt einen erheblichen zeitlichen und finanziellen Mehraufwand bedeutete. Zur Interpretation der gemessenen Daten benutzten wir eine Methode, die die relative Ratio der CK20-mRNA-Konzentration, unter Verwendung des Amplifikationskoeffizienten (E) bestimmt. Das Endergebnis, die sogenannte normalisierte Ratio, ist dabei das Verhältnis der relativen Ratio (CK20-mRNA-Konzentration/Referenzgen-mRNA-Konzentration) einer Gewebeprobe zur relativen Ratio des Calibrators. Durch die Bestimmung der CK20-mRNA-Konzentration im Verhältnis zur Referenzgen-mRNA-Konzentration werden Konzentrationsdifferenzen der Ausgangslösungen sowie Unterschiede im Reaktionsablauf einzelner Proben ausgeglichen. Die Kalkulation der normalisierten Ratio dient dazu vorhandene Differenzen in der PCR-Effizienz zwischen den CK20- und Referenzgen-Detektionssensitivitäten auszugleichen, sowie einen Kalibrierwert festzulegen, der den direkten Vergleich zwischen verschiedenen LightCycler-Runs ermöglicht und somit einen Standard-Referenzpunkt festsetzt.

Zusammenfassend lässt sich durch die in der Literatur beschriebenen Entwicklungen und Methoden ableiten, dass die LightCycler-Technik eine quantitative Beurteilung der CK20-Expression durch disseminierte Tumorzellen in Lymphknoten bei Patienten mit kolorektalem Karzinom ermöglicht. Es liegen

deutliche Hinweise vor, dass diese Ergebnis eine prognostische Relevanz für den weiteren Krankheitsverlauf aufzeigt. Berücksichtigt man dabei die Erkenntnis, dass die Expression in einem Tumor stets sehr heterogen stattfindet und disseminierte kolorektale Tumorzellen daher nicht zwangsläufig CK20 exprimieren, scheint die LightCycler-Technologie zwar einen zusätzlichen diagnostisch Marker aufweisen zu können, ist im Umkehrschluss aber nicht geeignet die histopathologische Diagnostik vollkommen zu ersetzen. Der in dieser Studie gewählte Untersuchungsablauf, das molekularbiologische Screening parallel, unmittelbar nach der chirurgischen Resektion durchzuführen, stellt somit eine Möglichkeit dar, zusätzliche quantitative prognostische Informationen zu gewinnen, ohne dabei die nach bisherigen Standards empfohlene Diagnostik zu beeinflussen. Die in bisherigen Studien beschriebenen Methoden wurden optimiert und in einem standardisierten Protokoll, das nun die Möglichkeit bietet über hohe Fallzahlen die prognostische Relevanz zu untersuchen, zusammengefasst. Durch das LightCycler-Instrument wird eine kurze Untersuchungszeit gesichert, außerdem ermöglicht das geschlossene Kapillarsystem zusammen mit der Kombinationsmöglichkeit der einzelnen Reagenzien durch das Kit-System eine maximale Reduktion von Manipulationen und weiterhin der Gefahr von Kontaminationen der untersuchten Proben.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

31 Patienten mit kolorektalem Karzinom der Chirurgischen Klinik des Bundeswehrkrankenhaus Ulm wurden in diese Studie aufgenommen. Nach der operativen Resektion der tumortragenden Darmanteile, erfolgte parallel die histopathologische Beurteilung sowie das molekularbiologische Screening der aus dem Resektat präparierten Lymphknoten und Proben des Primärtumors. Insgesamt wurden 391 Lymphknoten entnommen. Das molekularbiologische Screening erfolgt nach einer standardisierten Methode. Es wurden ausschließlich kommerzielle Kits der Firma Roche Diagnostics nach Angaben des Herstellers verwendet. Wo es möglich war wurden die Reagenzien unter Herstellung eines Mastermix kombiniert, um Manipulationen und Konzentrationsdifferenzen zu

minimieren. Die Ergebnisse aus histopathologischer und molekularbiologischer Untersuchung wurden für jeden einzelnen Lymphknoten dokumentiert und verglichen.

5.2.1 Alters- und Geschlechterverteilung

Die Altersverteilung und der Häufigkeitsgipfel in der Studienpopulation stimmte in etwa mit den Angaben der Literatur überein. So liegt der Häufigkeitsgipfel um das 65. Lebensjahr [22], nur 5 % der Patienten sind jünger als 43 Jahre. Die Inzidenz kolorektaler Karzinome steigt in allen Industrienationen kontinuierlich an. Von den geschätzten Neuerkrankungen in Deutschland entfielen 1998 ca. 27.000 (47,4 %) auf Männer, bei den Frauen waren es ca. 30.000 (52,6 %) Neuerkrankungen [3]. Die Geschlechtsverteilung in unserer Studie stimmte somit nicht mit den Angaben der Literatur überein und ist auf die kleine, statistisch nicht repräsentative Population zurückzuführen. Allerdings scheint dies nach bisherigen Erkenntnissen keine Auswirkung auf die Prognose und Metastasierungseigenschaften zu haben, so dass diese Tatsache im Hinblick auf die Fragestellung zu vernachlässigen ist.

5.2.2 Lokalisation

Nach den Angaben der Literatur befinden sich 50-60 % der kolorektalen Karzinome im Kolon, 40-50 % im Rektum. Von den Kolonkarzinomen finden sich 25 % im Colon ascendens und Zökum, 15 % im Colon transversum, 10 % im Colon descendens und 50 % im Sigma [22]. Auch diese Angaben zeigen Differenzen, zu den in unserer Studie untersuchten Fälle. Bei den untersuchten Fällen befanden sich 12 (41,4 %) Primärtumoren im Colon ascendens, je 4 (13,8%) im Colon descendens bzw. Colon sigmoideum und 9 (31,0 %) Primärtumoren im Rektum. Hierbei ist anzumerken, dass in der Literatur keine gesicherten Anhaltspunkte für Einflüsse auf Krankheitsverlauf, Metastasierungseigenschaften oder Rezidivhäufigkeiten zu finden sind, die auf der Lokalisation beruhen.

5.2.3 Staging und Grading

Alle Patienten, die mit der Diagnose Kolon- bzw. Rektumkarzinom im Untersuchungszeitraum im Bundeswehrkrankenhaus Ulm operativ therapiert wurden, sind in diese Studie aufgenommen worden. Die Ergebnisse des durchgeführten molekularbiologischen Screenings der entnommenen Lymphknoten sind langfristig vor allem für Patienten in den Tumorstadien I und II nach UICC von Bedeutung. Hier können die Resultate als zusätzlicher Hinweis die Entscheidung über eine adjuvante Chemotherapie beeinflussen und somit die individuelle Therapieplanung entscheidend verbessern. 2 von 31 aufgenommenen Patienten wiesen keine CK20-Expression im Primärtumor auf. Bei diesen Patienten ist die beschriebene Methode daher ungeeignet, um disseminierte Tumorzellen nachzuweisen. Von den restlichen 29 untersuchten Patienten wiesen 18 diese Stadien I und II auf. Dennoch wurden 11 anderen Patienten der Stadien III (7 Patienten) und IV (4 Patienten) mit aufgenommen. Somit konnte die Gesamtzahl an Lymphknoten erhöht werden, was die Aussagefähigkeit des direkten Vergleichs von molekularbiologischer zu histopathologischer Untersuchung eines einzelnen Lymphknotens einerseits, sowie der Stadieneinteilung eines Patienten basierend auf histopathologischem Befund gegenüber Stadieneinteilung nach molekularbiologischem Befund andererseits deutlich verbessert.

5.2.4 molekularbiologische Ergebnisse

5.2.4.1 Nachweis von CK20-mRNA in Primärtumoren

Wir fanden in 29 Fällen (93,5 %) ein positives Ergebnis für CK20-mRNA im Primärtumor. Bei zwei weiteren Patienten (6,5 %) konnte keine CK20-mRNA-Expression im Primärtumor nachgewiesen werden. Bei keinem dieser zwei Patienten wurde molekularbiologisch ein positiver Lymphknotenbefund erhoben. In der Literatur wird der Anteil CK20-positiver kolorektaler Primärtumoren mit 90-95 % beschrieben [26,27,51]. Da der Nachweis disseminierter Tumorzellen in

Lymphknoten über die CK20-mRNA als Markergen nur dann erfolgen kann, wenn die Zellen des Primärtumors CK20-mRNA exprimieren, wurden die beiden CK20-negativen Patienten nicht in die restliche Auswertung aufgenommen. Anzumerken ist, dass in keinem der 29 untersuchten Lymphknoten der beiden Fälle ein positives CK20-mRNA-Signal auftrat.

5.2.4.2 Nachweis von CK20-mRNA in Lymphknoten

362 Lymphknoten der 29 Patienten mit CK20-mRNA exprimierendem Primärtumor wurden wie beschrieben präpariert und sowohl der histopathologischen als auch der molekularbiologischen Untersuchung zugeführt. Die histopathologische Beurteilung der Lymphknoten fiel positiv aus, wenn die in Formalin fixierten Präparate mikroskopisch Mikrometastasen aufwiesen. Dies trat in 38 Fällen und somit 10,5 % der untersuchten Lymphknoten auf. Molekularbiologisch positiv wurden diejenigen untersuchten Gewebeproben gewertet, die eine normalisierte Ratio oberhalb des festgesetzten Grenzwertes aufwiesen. 89 Lymphknoten oder 24,6 % wurden molekularbiologisch positiv befundet. Dies zeigt eine deutlich höhere Nachweisrate durch die molekularbiologische Untersuchung.

Da Lymphknoten, deren Entnahme aufgrund ihrer ungenügenden Abgrenzbarkeit vom Primärtumor die histopathologische Beurteilung beeinträchtigt hätte, zugunsten der pathologischen Diagnose nicht entfernt wurden, wurden insgesamt 14 histopathologisch positive Lymphknoten der molekularbiologischen Untersuchung nicht zugeführt. Somit kann bei diesen Lymphknoten keine vergleichende Aussage gemacht werden. Allerdings ist festzuhalten, dass bei allen Patienten, bei denen diese spezielle Situation auftrat, mindestens ein weiterer, in die Studie aufgenommener Lymphknoten molekularbiologisch positiv befundet wurde, so dass diese Tatsache keine Auswirkung auf die resultierende Stadieneinteilung der Patienten nach den Kriterien der UICC hatte.

5.2.4.3 Vergleich zwischen molekularbiologischem und histopathologischem Ergebnis

Von den 38 Lymphknoten mit histologisch positivem Ergebnis konnten 35 (92,1 %) in der molekularbiologischen Untersuchung durch den Nachweis der CK20-Expression bestätigt werden. Bei den 324 histologisch tumorfreien Lymphknoten konnten in 54 Fällen (16,7 %) eine CK20-Expression gezeigt werden. Dies zeigt einen deutlichen Zusammenhang zwischen den histologisch nachweisbaren Mikrometastasen und dem Ergebnis des molekularbiologischen Screenings und deutet, verglichen mit bisherigen Ergebnissen [13,29,45,57], auf eine höhere Spezifität der verwendeten Methode hin. Nur in 3 der 38 histopathologisch positiven Lymphknoten (7,9 %) konnten molekularbiologisch keine disseminierten Tumorzellen nachgewiesen werden. Ursachen dafür können eine ungleichmäßige Verteilung der Tumorzellen in den halbierten Lymphknoten, eine Degradierung der mRNA aufgrund zu langer Präparationszeiten, sowie Fehler im Verlauf der RNA-Extraktion, der Transkription der mRNA bzw. der PCR mit der cDNA sein. Eine Verminderung dieser Abweichung könnte durch eine Verbesserung der klinischen Abläufe, sowie die Durchführung einer molekularbiologischen Kontrolluntersuchung erreicht werden.

5.2.4.4 molekularbiologisches Ergebnis nach Lokalisation

Unter Betrachtung der Lokalisation der entnommenen Lymphknoten zeigt diese Studie auffällige Ergebnisse. Während bei der histopathologischen Untersuchung 15,0 % der positiven Lymphknoten in Gruppe I, 10,4 % in Gruppe II und 5,8 % in Gruppe III zu finden waren und die relative Anzahl somit mit Entfernung vom Primärtumor abnahm, fand sich beim CK20-Nachweis der größten Anteil positiver Lymphknoten in Gruppe II (33,0 %) und nur 25,2 % in Gruppe I, sowie 15,8 % in Gruppe III. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass in der molekularbiologischen Untersuchung bei drei Patienten ausschließlich Lymphknoten der Gruppe II positiv waren, bei einem Patient ausschließlich Lymphknoten der Gruppe III. Bei insgesamt sechs Patienten, die molekularbiologisch disseminierte Tumorzellen

aufwiesen, wurden die unmittelbar in der Umgebung des Tumors lokalisierten Lymphknoten (Gruppe I) negativ befundet. Die in verschiedenen Studien propagierte Methode, das molekularbiologische Screening auf die sogenannten Sentinel-Lymphknoten zu beschränken [45,47], kann durch die gewonnenen Daten in dieser Studie daher nicht unterstützt werden. Die Frage, wie viele Lymphknoten der molekularbiologischen Diagnostik zugeführt werden sollten, ist bisher nicht beantwortet. Für das histopathologische Staging wurde dieses Problem eingehend untersucht [49]. Demnach scheint eine Anzahl von wenigstens zwölf Lymphknoten für ein akkurates histopathologisches Staging notwendig zu sein. Merrie et al. (2001) haben in einer früheren Studie versucht, bei kolorektalen Karzinom-Patienten eine selektive Lymphknotengruppe zu finden, die für eine aussagekräftige molekularbiologische Analyse genutzt werden kann. Dies war allerdings nicht erfolgreich und führte zu der Empfehlung bei einem Patienten wenigstens zehn Lymphknoten zu analysieren [30]. Dieses Erkenntnis, die molekularbiologische Untersuchung nicht auf bestimmte Lymphknoten zu beschränken, wird durch unsere Ergebnisse gestützt.

5.2.4.5 molekularbiologisches Ergebnis nach Tumoreigenschaften

Wie aufgezeigt, kann anhand der gewonnenen Daten nicht auf einen Zusammenhang von Tumorausbreitung und CK20-Detektion geschlossen werden. Während in Kategorie T2 und T4 keine Veränderungen zwischen histopathologischem und molekularbiologischem Ergebnis auftraten, wiesen die Kategorie T3 deutliche und die Kategorie T1 sogar komplett unterschiedliche Lymphknotenbefunde auf. Dennoch lassen sich für beide Methoden, die histopathologische und die molekularbiologische, keine Aussagen über eine Auswirkung der Tumorausbreitung auf die Metastasierungseigenschaften ableiten. Auch dieses Ergebnis entspricht den Beobachtungen anderer Studien [27,31,45]. Werden die Ergebnisse in Abhängigkeit von den UICC-Stadien betrachtet, die als internationaler Standard für die Einteilung kolorektaler Karzinome gelten und außerdem die Beurteilungsgrundlage für die individuelle Therapieplanung darstellen, lässt sich ein deutlicher Hinweis für die Bedeutung der molekularbiologischen Ergebnissen aufzeigen. In den Stadien I und II wird bisher

eine adjuvante Chemotherapie außerhalb von Studien nicht empfohlen [53,67]. Unsere Ergebnisse zeigten bei 8 der 18 (44,4 %) Patienten in diesen Stadien einen positiven molekularbiologischen Befund. Bei den Patienten in Stadium III, das definitionsgemäß positive histopathologische Lymphknoten beinhaltet, konnten die Ergebnisse molekularbiologisch bestätigt werden. In Stadium IV wurden bereits Metastasen des Primärtumors diagnostiziert. Hier trat bei allen vier Patienten ein molekularbiologisch positiver Lymphknotenstatus auf, während bei der histopathologischen Untersuchung ein Patient N0 befundet wurde.

Nach den Beobachtungen und Erkenntnissen bisheriger Studien [27,31] haben wir nun das molekularbiologische Lymphkotenenergebnis als Grundlage für eine neue Stadieneinteilung nach den geltenden UICC-Kriterien verwendet. Insgesamt wurden nach der molekularbiologischen Untersuchung 8 der 29 Patienten in ein fortgeschritteneres Stadium eingeteilt. Somit würden 27,6 % der Patienten für eine adjuvante Therapie in Betracht kommen. Diese Ergebnisse bewegen sich im Bereich der Rezidivraten und weisen daraufhin, dass mit Hilfe der beschriebenen Methode, ein nützlicher Marker bestimmt werden kann, der auf die Entscheidung über eine adjuvante Therapie einen bedeutenden Einfluss haben könnte.

Eine weitere Auffälligkeit bei diesen Daten ist die Abhängigkeit der Ergebnisse von der Lokalisation. Bei 6 der 8 (75 %) neu eingestuften Patienten befand sich der Primärtumor im Colon ascendens, was auf ein besonders häufiges Vorkommen disseminierter Tumorzellen bei dieser Lokalisation hinweist, während kein Patient mit Rektumkarzinom und nur jeweils einer mit Karzinom im Colon descendens bzw. Colon sigmoideum in ein höheres Stadium eingeteilt wurde. Ob diese Beobachtung gestützt und möglicherweise eine Ursache gefunden werden kann, muss bis zum Vorliegen weiterer Studien mit größeren Fallzahlen abgewartet werden.

5.3 Schlussfolgerung

Abschließend ist anzumerken, dass nun der Krankheitsverlauf sowie die Überlebensrate dieses Patientenkollektivs über einen längeren Zeitraum verfolgt werden muss. Nur so wird es möglich, Aussagen über eine prognostische Bedeutung der dargestellten Werte treffen zu können. Wir haben eine standardisierte, reproduzierbare Methode beschrieben, die es ermöglicht an einer Vielzahl von Patienten mit kolorektalem Karzinom ein molekularbiologisches Lymphknotenscreening durchzuführen, dessen Ergebnisse direkt miteinander verglichen werden können. So wird es möglich sehr bald eine genügend große Fallzahl zu erreichen um die prognostische Bedeutung der QRT-PCR zu bestimmen. Als nächster Schritt kommt in Betracht, die Patienten, die mit der beschriebenen molekularbiologischen Untersuchung einen positiven Lymphknotenbefund aufweisen, einer adjuvanten Therapie zuzuführen und deren Effekt ebenfalls in einer Studie mit großer Fallzahl zu untersuchen.

6 Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom ist die häufigste Krebserkrankung in Deutschland. Die Therapie mit kurativer Zielsetzung gestaltet sich unterschiedlich. Während Patienten im Stadium III und IV nach UICC (Union Contre le Cancer) eine adjuvante Chemotherapie erhalten, gilt diese für Patienten im UICC-Stadium I und II als nicht indiziert. Da die Rezidivrate in dieser Gruppe dennoch bei 20-30 % liegt, werden prognostische Marker benötigt, um Patienten mit einem hohen Rezidivrisiko, die von einer adjuvanten Therapie profitieren, zu erkennen. In dieser Studie wurde unmittelbar nach der operativen Therapie ein molekularbiologisches Lymphknotenscreening auf disseminierte Tumorzellen in Lymphknoten durchgeführt und mit den histopathologischen Lymphknotenbefunden verglichen. Von 31 Patienten wurden Gewebeproben der Primärtumoren und insgesamt 391 Lymphknoten mit der quantitativen real-time Polymerase-Kettenreaktion(QRT-PCR)-Methode auf Expression von CK20-mRNA (Zytokeratin 20 - Messenger-Ribonukleinsäure) nach einem standardisierten Protokoll untersucht. Bei 29 Patienten (93,5 %) konnte eine Expression von CK20-mRNA im Primärtumor nachgewiesen werden. Bei diesen 29 Patienten zeigten 35 von 38 (92,1 %) histologisch positiven Lymphknoten, sowie 54 von 324 (16,7 %) histologisch negativen Lymphknoten ein positives molekularbiologisches Ergebnis. 8 Patienten (27,6 %), die histopathologisch negative Lymphknotenbefunde aufwiesen, wurden durch das molekularbiologische Ergebnis in ein höheres UICC-Stadium eingestuft, bei allen anderen Patienten wurde das histopathologisch festgelegte Stadium bestätigt. Diese Werte bewegen sich im Bereich der Rezidivrate, die quantitative CK20-mRNA-Detektion in Lymphknoten kann somit ein zusätzliches Kriterium bei der Entscheidung über eine adjuvante Therapie darstellen. Die anatomische Verteilung der positiven Befunde, lässt eine Beschränkung des molekularbiologischen Screenings auf bestimmte Lymphknotengruppen nicht sinnvoll erscheinen. Um die prognostische Bedeutung der Methode abzuschätzen, sind Untersuchungen an einer größeren Fallzahl erforderlich. Durch Optimierung und Integration der QRT-PCR in den klinischen Diagnostikablauf, konnte ein standardisiertes und reproduzierbares Verfahren beschrieben werden. Dadurch

können künftige Studien direkt miteinander verglichen werden, ohne dabei die histopathologische Beurteilung zu beeinflussen. Als nächster Schritt kommt in Betracht, Patienten aufgrund des molekularbiologischen Ergebnisses, einer adjuvanten Therapie zuzuführen und deren Effekt im Rahmen einer klinischen Studie zu beurteilen.

7 Literaturverzeichnis

1. Adell G, Boeryd B, Franlund B, Sjudahl R, Hakansson L: Occurrence and prognostic importance of micrometastases in regional lymph nodes in Dukes' B colorectal carcinoma: an immunohistochemical study. *Eur J Surg* 162: 637-642 (1996)
2. Ahsan H, Neugut AI, Garbowski GC, Jacobson JS, Forde KA, Treat MR, Waye JD: Family history of colorectal adenomatous polyps and increased risk for colorectal cancer. *Ann Intern Med* 128: 900-905 (1998)
3. Becker N: Epidemiology of colorectal cancer. *Radiologe* 43: 98-104 (2003)
4. Bernstein CN, Blanchard JF, Kliwer E, Wajda A: Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Cancer* 91: 854-862 (2001)
5. Broll R, Schauer V, Schimmelpenning H, Strik M, Woltmann A, Best R, Bruch HP, Duchrow M: Prognostic relevance of occult tumor cells in lymph nodes of colorectal cancer carcinomas: an immunohistochemical study. *Dis Colon Rectum* 40: 1465-1471 (1997)
6. Bustin SA, Gyselmann VG, Williams NS, Dorudi S: Detection of cytokeratins 19/20 and guanyl cyclase C in peripheral blood of colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 79: 1813-1820 (1999)
7. Calnek D, Quaroni A : Differential localization by in situ hybridization of distinct keratin mRNA species during intestinal epithelial cell development and differentiation. *Differentiation* 53: 95-104 (1993)
8. Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF: The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 48: 526-535 (2001)
9. Eichner R, Bonitz P, Sun TT: Classification of epidermal keratins according to their immunoreactivity, isoelectric point, and mode of expression. *J Cell Biol* 98: 1388-1396 (1984)

10. Fielding LP, Arsenault PA, Chapuis PH, Dent O, Gathright B, Hardcastle JD, Hermanek P, Jass JR, Newland RC: Clinicopathological staging for colorectal cancer: an International Documentation System (IDS) and an International Comprehensive Anatomical Terminology (ICAT). *J Gastroenterol Hepatol* 6: 325-344 (1991)
11. Foulkes WD: A tale of four syndromes: familial adenomatous polyposis, Gardner syndrome, attenuated APC and Turcot syndrome. *QJM* 88: 853-863 (1995)
12. Funaki NO, Tamaka J, Ohshio G, Onodera H, Maetani S, Imamura M: Cytokeratin 20 mRNA in peripheral venous blood of colorectal carcinoma patients. *Br J Cancer* 77: 1327-1332 (1998)
13. Futumura M, Takagi Y, Koumura H, Kida H, Tanemura H, Shimokawa K, Saji S: Spread of colorectal cancer micrometastases in regional lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reactions for carcinoembryonic antigen and cytokeratin 20. *J Surg Oncol* 68: 34-40 (1998)
14. Gastinger I, Marusch F: Evidence-based Chirurgie des Kolonkarzinoms. *Zentralbl Chir* 126: 283-288 (2001)
15. Ghossein RA, Bhattacharya S, Rosai J: Molecular detection of micrometastases and circulating tumor cells in solid tumors. *Clin Cancer Res* 5: 1950-1960 (1999)
16. Giovannucci E: Modifiable risk factors for colon cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 31: 925-943 (2002)
17. Hatzfeld M, Weber K: The coiled coil of in vitro assembled keratin filaments is a heterodimer of type I and II keratins: use of site-specific mutagenesis and recombinant protein expression. *J Cell Biol* 110: 1199-1210 (1990)
18. Hayashi N, Ito I, Yanagisawa A, Kato Y, Nakamori S, Imaoka S, Watanabe H, Ogawa M, Nakamura Y: Genetic diagnosis of lymph-node metastasis in colorectal cancer. *Lancet* 345: 1257-1259 (1995)
19. Hermanek P: Disseminated tumor cells versus micrometastasis: definitions and problems. *Anticancer Res* 19: 2771-2774 (1999)

20. Hermanek P: Lymphknoten und maligne Tumorkrankheit. Zentralbl Chir 125: 790-795 (2000)
21. Hermanek P Jr, Wiebelt H, Riedl S, Staimmer D, Hermanek P: Langzeitergebnisse der chirurgischen Therapie de Colocarzinoms. Ergebnisse der Studiengruppe colorectales Carcinom (SGKRK). Chirurg 65: 287-297 (1994)
22. Herold G: Innere Medizin 2004. Eigenverlag, Köln, S. 413-418 (2004)
23. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R: Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology 11:1026-1030 (1993)
24. Johnson PW, Burchill SA, Selby PJ: The molecular detection of circulating tumour cells. Br J Cancer 72: 268-276 (1995)
25. Jung R, Petersen K, Kruger W, Wolf M, Wagener C, Zander A, Neumaier M: Detection of micrometastasis by cytokeratin 20 RT-PCR is limited due to stable background transcription in granulocytes. Br J Cancer 81: 870-873 (1999)
26. Lassmann S, Bauer M, Soong R, Schreglmann J, Tabiti K, Nahrig J, Ruger R, Hofler H, Werner M: Quantification of CK20 gene and protein expression in colorectal cancer by RT-PCR and immunohistochemistry reveals inter- and intratumour heterogeneity. J Pathol 198: 198-206 (2002)
27. Lassmann S, Bauer M, Rosenberg R, Nekarda H, Soong R, Ruger R, Hofler H, Werner M: Identification of occult tumor cells in node negative lymph nodes of colorectal cancer patients by cytokeratin 20 gene and protein expression. Int J Colorectal Dis 19: 87-94 (2004)
28. Lehnert Th, Herfarth Ch: Grundlagen und Wert der Lymphadenektomie beim colorectalen Karzinom. Chirurg 67: 889-899 (1996)
29. Liefers GJ, Cleton-Jansen AM, van de Velde CJ, Hermans J, van Krieken JH, Cornelisse CJ, Tollenaar RA: Micrometastases and survival in stage II colorectal cancer. N Engl J Med 339: 223-228 (1998)

30. Merrie AE, Phillips LV, Yun K, McCall JL: Skip metastases in colon cancer: assessment by lymph node mapping using molecular detection. *Surgery* 129: 684-691 (2001)
31. Merrie AE, van Rij AM, Dennett ER, Phillips LV, Yun K, McCall JL: Prognostic significance of occult metastases in colon cancer. *Dis Colon Rectum* 46: 221-231 (2003)
32. Midgley R, Kerr D: Colorectal cancer. *Lancet* 353: 391-399 (1999)
33. Miyake Y, Yamamoto H, Fujiwara Y, Ohue M, Sugita Y, Tomita N, Sekimoto M, Matsuura N, Shiozaki H, Monden M: Extensive micrometastases to lymph nodes as a marker for rapid recurrence of colorectal cancer: a study of lymphatic mapping. *Clin Cancer Res* 7: 1350-1357 (2001)
34. Moll R, Zimbelmann R, Goldschmidt MD, Keith M, Laufer J, Kasper M, Koch PJ, Franke WW: The human gene encoding cytokeratin 20 and its expression during fetal development and in gastrointestinal carcinomas. *Differentiation* 53: 75-93 (1993)
35. Muller AD, Sonnenberg A: Prevention of colorectal cancer by flexible endoscopy and polypectomy – a case-control study of 32 702 veterans. *Ann Intern Med* 123: 904-911 (1995)
36. Mullis KB, Faloona FA: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350 (1987)
37. Nagle RB: Intermediate filaments: a review of the basic biology. *Am J Surg Pathol* 12: 4-16 (1988)
38. Nagle RB: Intermediate filaments. Efficacy in surgical pathologic diagnosis. *Am J Clin Pathol* 91: 14-18 (1989)
39. Osborn M, Weber K: Tumor diagnosis by intermediate filament typing: a novel tool for surgical pathology. *Lab Invest* 48: 372-394 (1983)
40. Pantel K, von Knebel Doebritz M von, Izbicki JR, Riethmüller G: Disseminierte Tumorzellen : Diagnostik, prognostische Relevanz, Phänotypisierung und therapeutische Strategien. *Chirurg* 68: 1241-1250 (1997)

41. Pantel K, von Knebel Doeberitz M: Detection and clinical relevance of micrometastatic cancer cells. *Curr Opin Oncol* 12: 95-101 (2000)
42. Parkin DM, Bray FI, Devesa SS: Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer* 37: 4-66 (2001)
43. Pricolo VE, Finkelstein SD, Wu TT, Keller G, Bakker A, Swalsky PA, Bland KI: Prognostic value of TP53 and K-ras-2 mutational analysis in stage III carcinoma of the colon. *Am J Surg* 171: 41-46 (1996)
44. Ratto C, Sofo L, Ippoliti M, Merico M, Doglietto GB, Crucitti F: Prognostic factors in colorectal cancer. Literature review for clinical application. *Dis Colon Rectum* 41: 1033-1049 (1998)
45. Rosenberg R, Hoos A, Mueller J, Baier P, Stricker D, Werner M, Nekarda H, Siewert JRI: Prognostic significance of cytokeratin-20 reverse transcriptase polymerase chain reaction in lymph nodes of node-negative colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* 20: 1049-1055 (2002)
46. Rotem D, Cassel A, Lindenfeld N, Mecz Y, Sova Y, Resnick M, Stein A: Urinary cytokeratin 20 as a marker for transitional cell carcinoma. *Eur Urol* 37: 601-604 (2000)
47. Saha S, Bilchik A, Wiese D, Espinosa M, Badin J, Ganatra BK, Desai D, Kaushal S, Singh T, Arora M: Ultrastaging of colorectal cancer by sentinel lymph node mapping technique-a multicenter trial. *Ann Surg Oncol* 8: 94-98 (2001)
48. Sasaki M, Watanabe H, Jass JR, Ajioka Y, Kobayashi M, Matsuda K, Hatakeyama K: Occult lymph node metastases detected by cytokeratin immunohistochemistry predict recurrence in "node-negative" colorectal cancer. *J Gastroenterol* 32: 758-764 (1997)
49. Scott KW, Grace RH: Detection of lymph node metastases in colorectal carcinoma before and after fat clearance. *Br J Surg* 76: 1165-1167 (1989)
50. Soeth E, Vogel I, Roder C, Juhl H, Marxsen J, Kruger U, Henne-Bruns D, Kremer B, Kalthoff H: Comparative analysis of bone marrow and venous blood isolates from gastrointestinal cancer patients for the detection of disseminated tumor cells using reverse transcription PCR. *Cancer Res* 57: 3106-3110 (1997)

51. Soong R, Beyser K, Basten O, Kalbe A, Rueschoff J, Tabiti K: Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction detection of cytokeratin 20 in noncolorectal lymph nodes. *Clin Cancer Res* 7: 3423-3429 (2001)
52. Steinert PM: The two-chain coiled-coil molecule of native epidermal keratin intermediate filaments is a type I-type II heterodimer. *J Biol Chem* 265: 8766-8774 (1990)
53. Takahashi T, Kato T, Kodaira S, Koyama Y, Sakabe T, Tominaga T, Hamano K, Yasutomi M, Ogawa N: Prognostic factors of colorectal cancer. Results of multivariate analysis of curative resection cases with or without adjuvant chemotherapy. *Am J Clin Oncol* 19: 408-415 (1996)
54. Tsavallas G, Patel H, Allen-Mersh TG: Detection and clinical significance of occult tumor cells in colorectal cancer . *Br J Surg* 88: 1307-1320 (2001)
55. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HAT: New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 116: 1453-1456 (1999)
56. Vlems FA, Diepstra JH, Cornelissen IM, Ruers TJ, Ligtenberg MJ, Punt CJ, van Krieken JH, Wobbes T, van Muijen GN: Limitations of cytokeratin 20 RT-PCR to detect disseminated tumour cells in blood and bone marrow of patients with colorectal cancer: expression in controls and downregulation in tumour tissue. *Mol Pathol* 55: 156-163 (2002)
57. Weitz J, Kienle P, Magener A, Koch M, Schrodell A, Willeke F, Autschbach F, Lacroix J, Lehnert T, Herfarth C, von Knebel Doeberitz M: Detection of disseminated colorectal cancer cells in lymph nodes, blood and bone marrow. *Clin Cancer Res* 5: 1830-1836 (1999)
58. Weitz J, Koch M, Lehnert Th, Herfarth Ch, von Knebel Doeberitz M: Nachweis isolierter disseminierter Tumorzellen colorectaler Carcinome in Lymphknoten. *Chirurg* 71: 410-416 (2000)

59. Wharton RQ, Jonas SK, Glover C, Khan ZA, Klokouzas A, Quinn H, Henry M, Allen-Mersh TG: Increased detection of circulating tumor cells in the blood of colorectal carcinoma patients using two reverse transcription-PCR assays and multiple blood samples. *Clin Cancer Res* 5: 4158-4163 (1999)
60. Wiggers T, Jeekel J, Arends JW, Brinkhorst AP, Kluck HM, Luyk CI, Munting JD, Povel JA, Rutten AP, Volovics A: No-touch isolation technique in colon cancer: a controlled prospective trial. *Br J Surg* 75: 409-415 (1988)
61. Wilhelm, J: Entwicklung real-time-PCR-basierter Methoden. Naturwissenschaftl. Inauguraldissertation, Universität Gießen 2003
62. Wittekind C, Wagner G (Hrsg): TNM-Klassifikation maligner Tumoren. 5. Auflage, Springer, Berlin Heidelberg New York, S. 64-67 (1997)
63. Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ: The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques* 22: 176-181 (1997)
64. Wyld DK, Selby P, Perren TJ, Jonas SK, Allen-Mersh TG, Wheeldon J, Burchill SA: Detection of colorectal cancer cells in peripheral blood by reverse-transcriptase polymerase chain reaction for cytojeratin 20. *Int J Cancer* 79: 288-293 (1998)
65. Yamaguchi A, Kurosaka Y, Fushida S, Kanno M, Yonemura Y, Miwa K, Miyazaki I: Expression of p53 protein in colorectal cancer and its relationship to short-term prognosis. *Cancer* 70: 2778-2784 (1992)
66. Yamamoto N, Kato Y, Yanagisawa A, Ohta H, Takahashi T, Kitagawa T: Predictive value of genetic diagnosis for cancer micrometastasis: histologic and experimental appraisal. *Cancer* 80: 1393-1398 (1997)
67. Yarbro JW, Page DL, Fielding LP, Partridge EE, Murphy GP: American Joint Committee on Cancer prognostic factors consensus conference. *Cancer* 86: 2436-2446 (1999)
68. Zhang B, Li X, Nakama H, Zhang X, Wei N, Zhang X, Zhang L: A case-control study on risk of changing food consumption for colorectal cancer. *Cancer Invest* 20: 458-463 (2002)

8 Danksagung

Diese Arbeit wurde in der Chirurgischen Klinik des Bundeswehrkrankenhaus Ulm unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Heinz Gerngroß verwirklicht. Herr Professor Gerngroß verstarb vor der Fertigstellung dieser Arbeit. Seine persönliche Art, die ich stets als vertrauensvoll, unterstützend und inspirierend empfand, wird für mich in besonderer Erinnerung bleiben.

Ich danke seinem Nachfolger Herrn Dr. med. Reinhard Steinmann, sowie Herrn PD Dr. Christian Willy für das entgegengebrachte Vertrauen und die Bereitschaft diese Arbeit weiter zu führen.

Mein herzlicher Dank geht an Herrn Dr. Erkki Lotspeich für die ausgezeichnete Betreuung und hilfreiche Unterstützung während dieses Projekts.

Ganz besonders möchte ich Frau PD Dr. Susanne Gansauge und Herrn PD Dr. Frank Gansauge für die wissenschaftliche Unterstützung und konstruktive Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit danken.

Herrn Dr. Marco Ramadani und Herrn Jörn Steiger danke ich für die Einarbeitung in die molekularbiologische Diagnostik und die Unterstützung während der Laborarbeit. Sie standen mir bei Problemen immer mit gutem Rat und Geduld zur Seite.

Herrn Dr. Klaus Kraft, Leiter der Abteilung Pathologie des Bundeswehrkrankenhaus Ulm, und seinen Mitarbeitern danke ich für die wertvolle Mithilfe und Unterstützung im Rahmen der Probenpräparation.

Zuletzt danke ich Herrn Manfred Siemontowitz und Frau Sabrina Bucher für die konstruktive Kritik bei der Ausformulierung dieser Arbeit.