

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. K. Höfler)

**Prognostische Bedeutung der Expression der Enzyme Thymidin
Phosphorylase, Dihydropyrimidin Dehydrogenase und Thymidylat
Synthase für nodal-negative colorectale Carcinome.**

Joachim Paul Schreglmann

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. H. K. Höfler
2. Priv.-Doz. Dr. M. A. Kremer

Die Dissertation wurde am 01.09.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 22.07.2009 angenommen.

A. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	4
B. EINLEITUNG	7
C. MATERIAL UND METHODEN	18
I. PATIENTENKOLLEKTIV	18
II. IMMUNHISTOCHEMIE	20
1. <i>Etablierung der Antikörper</i>	23
2. <i>Methodik</i>	25
2.1 Herstellung der Schnitte	26
2.2 Entparaffinierung	26
2.3 Antigendemaskierung - Epitop-Retrieval.....	27
2.3.1 PIER	27
2.3.2 HIER.....	28
2.3.2.1 HIER im Dampfdruckkochtopf	28
2.3.2.2 HIER im Wasserbad	28
2.3.2.3 HIER im Dampfger (Steamer).....	29
2.3.2.4 Mikrowelle.....	30
2.4 Blockierung der endogenen Peroxidase (POX)	30
2.5 Blockierung des endogenen Biotins	30
2.6 Antikörperinkubation	31
2.7 Detektionssysteme.....	32
2.8 Gegenfärbung, Entwässerung, Eindeckeln.....	32
3. <i>Auswertung der Immunhistochemie</i>	33
III. STATISTIK.....	36
D. ERGEBNISSE	37
I. ETABLIERUNG DER IMMUNHISTOCHEMIE UND AUSTESTUNG DER ANTIKÖRPER	37
II. LOKALISATION DER FÄRBUNG.....	38
III. AUSWERTUNG DES PATIENTENKOLLEKTIVS	42
E. DISKUSSION.....	51
F. ZUSAMMENFASSUNG	61
G. LITERATURVERZEICHNIS.....	62

H. DANKSAGUNG	71
I. LEBENSLAUF	72

A. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Complex
Ak	Antikörper
APC	Adenomatöse Polyposis Coli
BAX	BCL-2 associated X Protein
BRAF1	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
BUB1	ein „Checkpoint“-Protein (Kontrollpunkt-Protein)
c	chirurgische Beurteilung (in Verbindung mit der TNM-Klassifikation der UICC)
CIN	Chromosomal instabil
COX	Cyclooxygenase
CRC	Colorectales Carcinom
CTNNB1	catenin (catherin-associated protein) beta1
CU	Colitis ulcerosa
DCC	Deleted in Colorectal Carcinoma (Genlokalisierung 18q21.1)
DPD	Dihydropyrimidin Dehydrogenase
E2F2	E2F Transcription Factor 4
EGF	Endothelial Growth Factor
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
etc.	et cetera
Fa.	Firma
FAP	Familiäre Adenomatöse Polypose
FFPET	Formalin Fixed Paraffine Embedded Tissue
FJP	Familiäre juvenile Polypose
FU, (5-FU)	Fluorouracil, (5-Fluorouracil)
G	Grading
HER	Human Epidermal Growth Factor Receptor
HIER	Heat Induced Epitope Retrieval
HNPCC	Hereditary Non Polyposis Colon Carcinoma
I	Intensität
IHC	Immunhistochemie
IMSE	Institut für medizinische Statistik und Epidemiologie der TUM
is	in situ

KRAS	v-Ki-ras2, Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LOH	Loss Of Heterozygosity
LSAB	Labelled Strept-Avidin-Biotin
m	Meter oder milli- (10^{-3})
M	Metastase (Stadium der Fernmetastasierung in Verbindung mit der TNM-Klassifikation der UICC)
MC	Morbus Crohn
ml	Milliliter
MMR	Mismatch Repair System
MSH(Zahl)	MutS homolog 1, 2, 3,...
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSI-H	microsatellite instability of high grade
MSS	Mikrosatelliten-stabil
N	Nodalstatus (in Verbindung mit der TNM-Klassifikation der UICC)
NSAR	nicht-steroidale Antirheumatika
OT	Objektträger
P	Positivität
p	histopathologische Beurteilung (in Verbindung mit der TNM-Klassifikation der UICC)
p53	vgl. TP53
PAS	Befund und Dokumentationssystem der Fa. Paschmann/Oberhausen)
PIER	Protease Induced Epitope Retrieval
q	quantitativ
R	Rest (Tumorgewebe nach erfolgter Operation)
RT-PCR	Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction
S	Stromaanteil
S.	Seite
sog.	Sogenannt
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences bzw. Superior Performing Software System
T	Tumor (in Verbindung mit dem Tumorstadium der TNM-Klassifikation der UICC)
TGFBR2	Tumor Growth Factor Beta Receptor Type 2
TMA	Tissue Micro Array

TME	totale mesorectale Exzision
TMP	Thymidinmonophosphat
TP	Thymidin Phosphorylase
TP53	(ehemals p53) Tumor Protein 53
TS	Thymidylat Synthase
TUM	Technische Universität München
u.a.	unter Anderem
UICC	Union International Contre le Cancer (International Union Against Cancer)
V	Veneninvasion (in Verbindung mit der TNM-Klassifikation der UICC)
X	histopathologisch nicht beurteilbar
z.B.	zum Beispiel

B. Einleitung

Colorektale Karzinome (CRC) gehören in den Industrieländern zu den häufigsten malignen Tumoren, ihre Inzidenz nimmt in Westeuropa in den letzten Jahrzehnten zu und liegt derzeit bei 25-40 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohnern. Damit ist das CRC die dritthäufigste Carcinomart beim Mann (nach dem Bronchial- und Prostatacarcinom) und die zweithäufigste Carcinomart bei der Frau (nach dem Mammacarcinom). Betrachtet man ausschließlich Nichtraucher, dann ist das CRC unter Frauen und Männer gemeinsam das häufigste Malignom (Parkin, 1999). Es gibt deutliche nationale und geographische Unterschiede in der Inzidenz des CRC, wie auch bei anderen Malignomen. Derartige Unterschiede sind weltweit und auch innerhalb Europas regional zu beobachten, z.B. ist die Inzidenz in Tschechien doppelt so hoch, wie in Finnland (Levi, 1993). In afrikanischen Ländern ist z.B. unter der Bevölkerung Gambias die Wahrscheinlichkeit einer Neuerkrankung lediglich 1.3, während sie im Senegal bei 1.9 liegt (Schmoll, 1999).

In Westeuropa sinkt trotz steigender Inzidenz die Mortalität des CRC, sie beträgt aktuell etwa 15% aller onkologischen Todesfälle. Dies lässt sich nicht allein durch veränderte therapeutische Modalitäten erklären, denn es haben sich in der Chirurgie, Strahlentherapie und internistischen Onkologie, speziell in der adjuvanten Situation, keine grundlegenden Neuerungen ergeben, auch wenn man die totale mesorectale Exzision beim Rectumcarcinom (TME) und auch die Einführung der Immuntherapie (anti-EGF-Rezeptor-Ak Erbitux/
Cetuximab®) berücksichtigt (Costa, 2004) (Ragnhammar, 2001). Die Krebsfrüherkennung hat den entscheidenden Beitrag für die Senkung der Mortalität erbracht, d.h. das bessere Gesamtüberleben und tumorfreies Überleben. Dies ist unmittelbar Folge einer früheren Erstdiagnose und entsprechend niedrigeren Tumorstadien bei Erstdiagnose, sowie einer Therapie in einem früheren Stadium und damit verbunden auch verbesserten Heilungschancen (Aarnio, 1995).

Die Tumorgenetik der sporadischen CRC ist in den letzten drei Jahrzehnten detailliert untersucht worden. Auf Grundlage der Mechanismen der genomischen Instabilität lassen sich die CRC in zwei Gruppen unterteilen. Die Mehrzahl der CRC (80-85 %) ist chromosomal instabil (CIN), sie zeigt eine Umorganisation des Genoms, erkennbar an LOH's (loss of heterozygosity) (Jass, 2007). Diese Tumoren zeigen meist durch Mutationen hervorgerufene Funktionsverluste der Tumorsuppressorgene APC (adenomatöse polyposis coli) und p53. Die übrigen CRC (15-20 %) sind durch hochgradige Mikrosatelliteninstabilität (MSI-H –

microsatellite instability of high grade) gekennzeichnet (Jung, 2007). Ursache dieser Instabilität ist letztlich der Funktionsausfall des mismatch repair systems (MMR). Nicht nur molekulargenetisch, sondern auch klinisch unterscheiden sich CRC der beschriebenen genetischen Entstehungsmechanismen. MSI-H Karzinome liegen meist im rechten Hemicolon und zeigen histopathologisch meist einen muzinösen Typ. Sie sind häufig auch dicht von tumorinfiltrierenden T-Lymphozyten infiltriert. Auch prognostisch und therapeutisch scheinen sich diese Tumoren von den anderen genetischen Varianten zu unterscheiden. Ihre Prognose scheint günstiger, bezogen auf das Gesamtüberleben und das krankheitsfreie Überleben, wobei sie nach in-vitro Daten gegenüber der 5-FU (5-Fluoruracil) basierten Standardchemotherapie resistent erscheinen, im Gegensatz zu den Tumoren mit intaktem MMR system (Carethers, 2004). Allerdings sind die klinischen Daten dazu uneinheitlich (Choi, 2002; Ribic, 2003) und prospektive klinische Studien dazu sind noch nicht abgeschlossen. Grundlegend für diese Erkenntnisse waren vor allem die Arbeiten von Vogelstein (Vogelstein, 1988), der das Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz etabliert hat. In diesem Modell, das in den Folgejahren immer konkreter dargestellt werden konnte, wird postuliert, dass eine schrittweise Akkumulation genetischer Veränderungen, wie Mutationen, Deletionen, Amplifikationen, also komplexe genetische Veränderungen, notwendig sind, um ein normales Colonepithel genotypisch über ein Adenom in ein Karzinom zu transformieren (Richter, 2003). Phänotypisch entspricht diese Progression den verschiedenen Graden einer Intraepithelialen Neoplasie (Dysplasie) über ein in situ Carcinom zu einem invasiven Carcinom, wobei die genetischen Veränderungen den morphologischen Befunden vorausgehen. Unter den beteiligten Genen finden sich solche, die für Wachstumsfaktoren und deren Rezeptor kodieren (EGF-Rezeptorfamilie), (Rezeptor-) Thyrosinkinase, Schlüssel-moleküle der intrazellulären Signaltransduktion (K-ras), Transkriptionsfaktoren, Zellzyklusregulatoren, sowie Tumorsuppressorgene (p53) (Ma, 2000; Catalano, 2001). Dieser pathogenetische Weg betrifft etwa 90% aller colorectalen Carcinome (vgl. Abbildung 1) (Markowitz, 2000).

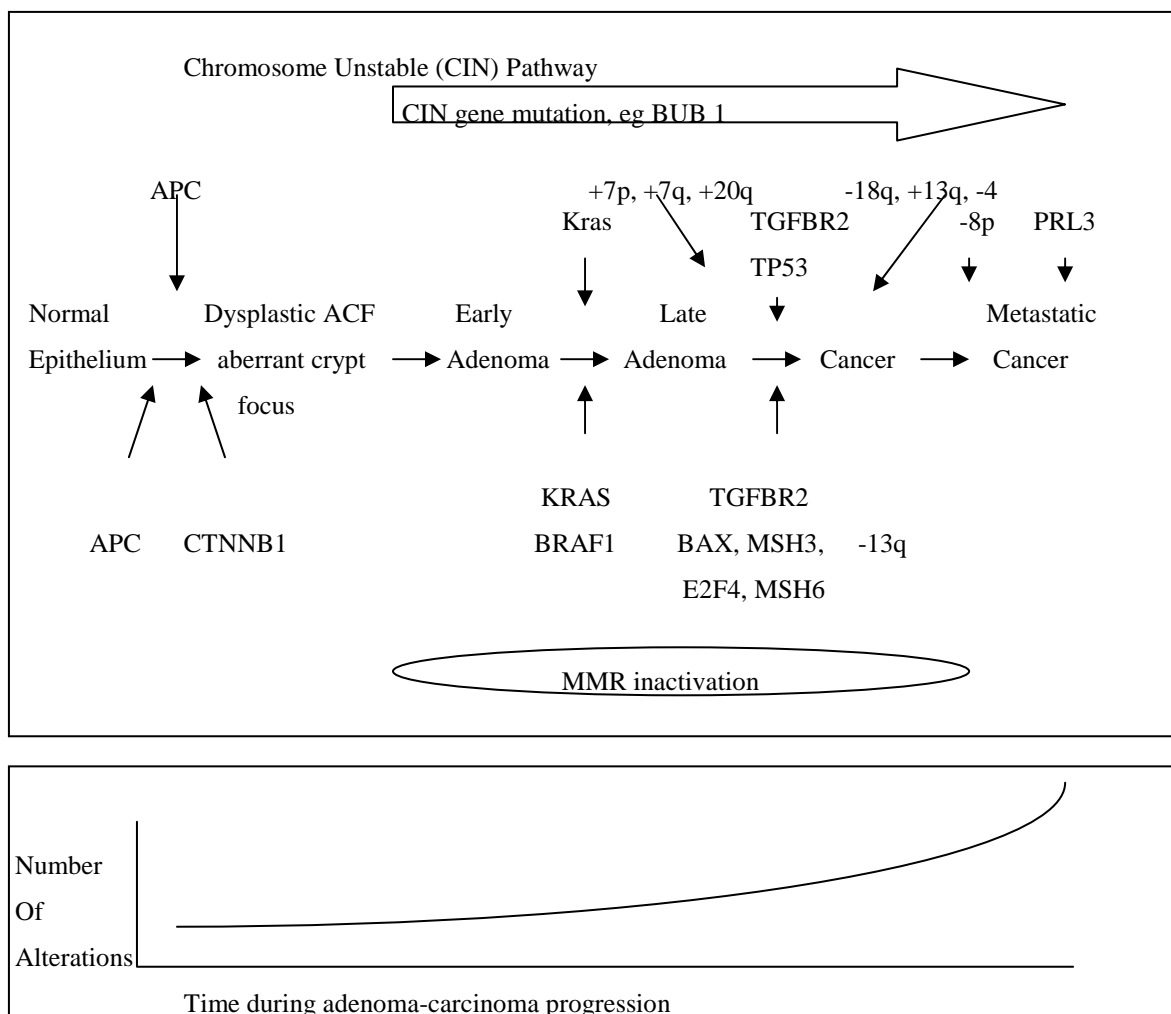


Abbildung 1
nach Markowitz, (HUGO, 2008)

Neben diesen sporadischen Karzinomen entstehen ca. 10 % der CRC auf dem Boden genetischer Syndrome die mit definierten Gendefekten einhergehen und Ursache verschiedener, in der Regel familiärer CRC sind: HNPCC (Lynch-Syndrom), FAP (Familiäre Adenomatöse Polypose), FJP (Familiäre juvenile Polypose), Peutz-Jeghers-Syndrom (Lentigopolypose), Gardner-, Turcot- und Li-Fraumeni Syndrom sowie weitere (Hamilton, 1995; Lynch, 2003).

In eine dritte Gruppe gehören jene colorectale Carcinome, die vor dem Hintergrund einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung entstehen, die die Entwicklung eines Carcinoms offenbar begünstigt, insbesondere die Colitis Ulcerosa (CU) und der Morbus Crohn (MC), wobei eine erhöhte Karzinominzidenz bei MC wesentlich seltener ist, als bei CU.

Als Auslöser für die Entstehung sporadischer Tumoren werden verschiedene Faktoren diskutiert, hierzu gehören unter anderem Ernährungsgewohnheiten, wie hochkalorische

Ernährung mit einem hohen Anteil an tierischem Fett, rotem Fleisch sowie geringem Anteil an Faser-, Gemüse- und calciumreichen Nahrungsmitteln, speziell in den westlichen Industrieländern. Daneben spielen zumindest epidemiologisch sogenannte „life style“ Faktoren, insbesondere Bewegungsmangel, ebenfalls eine Rolle. Der Beitrag, den diese Faktoren für die Karzinomentstehung im Einzelnen spielen, ist im Detail aber noch nicht sicher geklärt. Entsprechend schwierig sind Fragen der Präventivmedizin zu beantworten. Neben den genannten Ansatzpunkten gibt es in jüngster Zeit auch experimentelle pharmakologische Studien zur Prävention Colorectaler Carcinome. Diese betreffen die Therapie mit Salizylaten, also nicht-steroidalen Antirheumatika (NSARs). Es konnte gezeigt werden, dass die dauerhafte Einnahme niedrig dosierten Aspirins (100 mg/Tag) zu einer Abnahme des Lebenszeitrisikos für CRC um bis zu 50 % führt (Rosenberg, 1995; Giovannucci, 1999; Janne, 2000). Auch andere antiinflammatorische Substanzen, die Coxibe, also selektive Cyclooxygenase 2 (COX-2)- Inhibitoren, Vitaminpräparate (insbesondere Vitamin A, C und E), Calcium, aber auch N-Acetyl-L-Cystein-Protease-Inhibitoren und Glutathion-S-Transferase-Induktoren, Folsäure (mehr als 400 mg/Tag), sowie Buttersäure werden als protektive Substanzen diskutiert. Ihre Wirkmechanismen sind aber meist ungeklärt, für Folsäure wird beispielsweise ein Einfluß auf die Korrektur einer gestörten DNA-Methylierung diskutiert (Levin, 1995; Buecher, 2005).

Die Therapie des CRCs erfolgt stadienadaptiert, wie die Therapie aller soliden Malignome. Die Tumorstadien sind international einheitlich entsprechend der sog. „TNM-Klassifikation“ der Union International Contre le Cancer (UICC) definiert (Ch. Wittekind, 2003). Sie erlauben eine Zuordnung von Patienten in prognostische Gruppen („Risikogruppen“) und ermöglichen damit eine einheitliche risikoadaptierte adjuvante Therapie. Als mögliche Therapieverfahren gelten beim CRC neben den Standardverfahren der Operation, Strahlentherapie und „klassischen“ Chemotherapie nun auch die Immuntherapie sowie Kombinationen der verschiedenen Therapieverfahren (Culy, 2005). Die Standardtherapie besteht derzeit aus der Chirurgie, stadienabhängig gefolgt von einer adjuvanten Chemotherapie und beim Rektumkarzinom einer adjuvanten Radiochemotherapie. Die Standardchemotherapie ist seit 35 Jahren die intravenöse Therapie mit Pyrimidinbasenanaloga speziell dem 5-Fluorouracil, in Kombination mit Leucovorin (Grem, 1987; O'Connell, 1989). Sie war lange Zeit die Therapie der Wahl sowohl in der adjuvanten wie auch in der palliativen Situation, wobei heute zunehmend auch Kombinationstherapien mit weiteren Substanzen eingesetzt werden (Tumorregister-München, 2006).

Die klinischen Stadien sind in Tabelle 1, Tabelle 2 und Tabelle 3 dargestellt.

T	Primärtumor
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ: intraepithelial oder Infiltration der Lamina propria ¹
T1	Tumor infiltriert Submukosa
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert durch die Muscularis propria in die Subserosa oder in nicht peritonealisiertes perikolisches oder perirektales Gewebe
T4	Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen ^{2,3} und/oder perforiert das viszerale Peritoneum

Tabelle 1

T-Stadien der TNM-Klassifikation

Anmerkungen:

¹ Tis liegt vor, wenn Tumorzellen innerhalb der Basalmembran der Drüsen (intraepithelial), oder in der Lamina propria (intramukös) nachweisbar sind, ohne dass eine Ausbreitung durch die Muscularis mucosae in die Submukosa feststellbar ist

² Direkte Ausbreitung in T4 schließt auch die Infiltration anderer Segmente des Colorectums auf dem Weg über die Serosa ein, z.B. die Infiltration des Sigma durch ein Zökalkarzinom

³ Ein Tumor, der makroskopisch an anderen Organen oder Strukturen adhären ist, wird als cT4 klassifiziert. Ist bei der histologischen Untersuchung in den Adhäsionen kein Tumorgewebe nachweisbar, soll der Tumor als pT3 klassifiziert werden.

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 2

N-Stadien der TNM-Klassifikation

Anmerkung:

Ein Tumorknötchen im perikolischem oder perirektalen Fettgewebe ohne histologischen Anhalt für Reste eines Lymphknotens wird in der pN-Kategorie als regionäre Lymphknotenmetastase klassifiziert, wenn die Form und glatte Kontur eines Lymphknotens vorliegt. Wenn das Tumorknötchen eine irreguläre Kontur aufweist, soll es in der pT-Kategorie klassifiziert und auch als V1 (mikroskopische Veneninvasion) oder, fall es makroskopisch

erkennbar ist, als V2 verschlüsselt werden, weil es dann sehr wahrscheinlich ist, dass es eine Veneninvasion darstellt.

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

Tabelle 3

M-Stadien der TNM-Klassifikation

pTNM: pathologische Klassifikation:

die pT-, pN- und pM-Kategorien entsprechen den T-, N- und M-Kategorien.

pN0: Regionäre Lymphadenektomie und histologische Untersuchung üblicherweise von 12 oder mehr Lymphknoten.

Wenn die untersuchten Lymphknoten tumorfrei sind, aber die Zahl der üblicherweise untersuchten Lymphknoten nicht erreicht wird, soll pN0 klassifiziert werden.

Eine zusätzliche Möglichkeit der histopathologischen Einteilung maligner Tumoren ist die Graduierung (Tabelle 4).

G	Histopathologische Graduierung
GX	Differenzierung kann nicht bestimmt werden
G1	Gut differenziert
G2	Mäßig differenziert
G3	Niedrig differenziert
G4	Undifferenziert

Tabelle 4

Grading (Histopathologische Graduierung)

Neben der international gebräuchlichen TNM-Klassifikation wird bei CRC vor allem in angloamerikanischen Ländern auch noch die Klassifikation nach Dukes verwendet, die im frühen 20. Jahrhundert von dem englischen Pathologen Dukes für die Einteilung der Rectumcarcinome beschrieben und dann auf Colonicarcinome übertragen und folglich an Colon- und Rectumcarcinomen angewandt wurde (vgl. auch Anmerkung unten).

Zur Vereinfachung der Bezeichnung der Tumorstadien gibt es eine numerische Klassifikation

der TNM-Stadien, die fest an die TNM-Klassifikation gebunden und nicht als eigenständige Klassifikation zu verstehen ist (vgl. Tabelle 6).

Dukes	Stadium		Histopathologisches Bild
	TNM	Numerisch	
	TisN0M0	0	Karzinoma in situ
A	T1,T2N0M0	I	Infiltration beschränkt auf Mukosa und Submukosa bzw. Infiltration erreicht die Muskularis
B	T3N0M0	IIA	Infiltration oder Penetration der Serosa
B	T4N0M0	IIB	Infiltration eines Nachbarorganes
C	T1,T2N1M0	IIIA	Befall regionärer Lymphknoten
C	T3,T4N1M0	IIIB	Befall regionärer Lymphknoten
C	TxN2M0	IIIC	Befall von 4 oder mehr regionären Lymphknoten
D	TxNxMi	IV	Fernmetastasen (z. B. Leber, Lunge, etc.)

Tabelle 5

Gesamtübersicht TNM-Klassifikation/Dukes/Numerisch und histopathologisches Bild

Anmerkung: Das Dukes Stadium B enthält prognostisch unterschiedliche Gruppen, die Gruppe: pT3, pN0, cM0, mit einer besseren Prognose und die Gruppe: pT4, pN0, cM0, mit einer ungünstigeren Prognose, das gleiche gilt für die Gruppe Dukes C: jedes pT1-4, pN1, cM0 und pT1-4, pN2, cM0. Dies ist damit zu erklären, dass die ursprüngliche Dukes Klassifikation aus dem Jahre 1929 nur für die Klassifikation der lokoregionären Ausdehnung von Rektumkarzinomen eingeführt wurde, in den Folgejahren aber immer wieder verändert und angepasst wurde, um in der jetzigen Form schließlich auch für Colonicarcinome Verwendung zu finden. Die TNM-Klassifikation wurde erst im Jahre 1953 eingeführt, nachdem P. Denoix diese in den Jahren 1943-1952 entwickelt hatte. Bis 1967 wurden insgesamt 23 verschiedene Tumorentitäten in die TNM-Einteilung aufgenommen, seitdem erfolgen ständige Überarbeitungen (Ch. Wittekind, 2003).

Stadiengerechte Therapie des Kolonkarzinoms

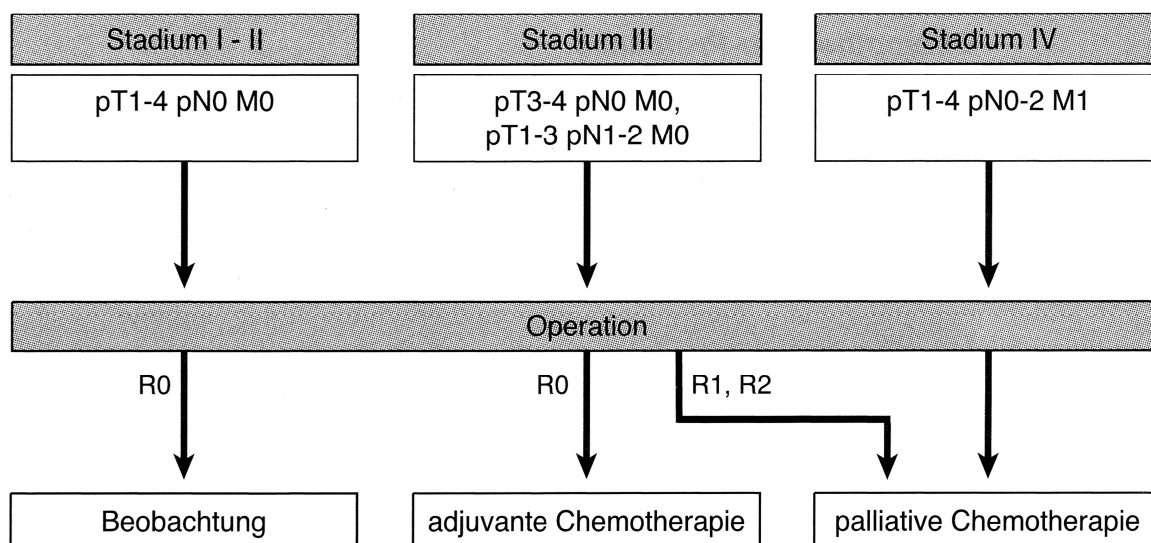
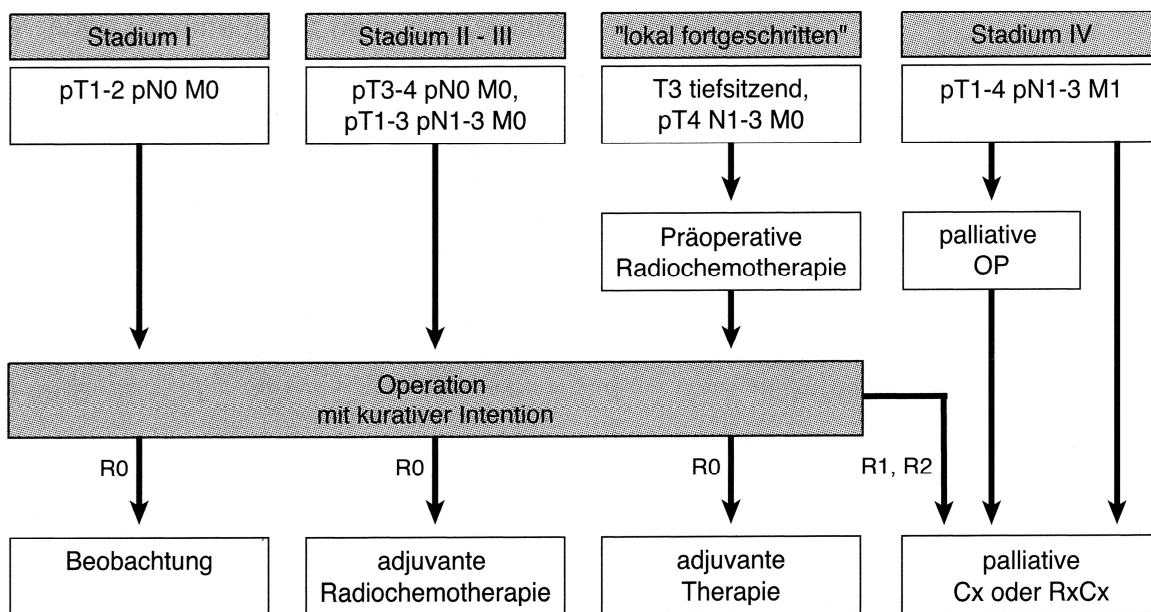


Abbildung 2 Stadiengerechte Therapie des Colocarcinoms (Berger D. P., 2002)

Stadiengerechte Therapie des Rektumkarzinoms



RxCx Radiochemotherapie, C_x Chemotherapie

Abbildung 3 Stadiengerechte Therapie des Rectumcarcinoms (Berger D. P., 2002)

Stadium TNM	Histopathologischer Befund	Fünf-Jahres-Überlebensrate (ca.)
T1 N0 M0	Infiltration beschränkt auf Mukosa und Submukosa	> 90 %
T2 N0 M0	Infiltration erreicht die Muskularis	85 %
T3 N0 M0	Infiltration oder Penetration der Serosa	70 – 80 %
TX N1,2 M0	Befall regionärer Lymphknoten	35 – 65 %
TX NX M1	Fernmetastasen (z. B. Leber, Lunge, stc.)	5 %

Tabelle 6

Fünf-Jahres-Überlebensraten in Abhängigkeit von dem Tumorstadium

Die 5-Jahres-Überlebensrate die sich aus den Tumorklassifikationen, sowohl der nach Dukes, wie auch der TNM-Klassifikation, ergibt, liegt für die unterschiedlichen Stadien des CRC zwischen über 90 % für frühe Stadien und 5 % für fortgeschrittene Stadien (vgl. Tabelle 6).

Für den einzelnen Patienten lässt sich aber eine Überlebenswahrscheinlichkeiten nicht angeben, denn für individuelle Patienten sind Statistiken nicht aussagekräftig, da 'Wahrscheinlichkeit' als statistische Größe immer nur für ein Kollektiv von Aussagekraft ist.

Man muß sich auch darüber bewusst sein, dass die histopathologischen und klinischen Tumorparameter, die der Tumorklassifikationen zu Grunde liegen, keine primären tumorbiologischen Merkmale sind, die unmittelbar die Aggressivität und etwa die Metastasierungsfähigkeit eines Malignoms kennzeichnen. Vielmehr sind diese Parameter lediglich sogenannte 'Surrogatmarker', d.h. Parameter, die bereits Folge und nicht Ursache der Tumorbiologie sind. Es gibt derzeit keinen Tumorparameter, der sicher vorhersagen lässt, ob ein Patient geheilt, oder ob er an seiner Krebserkrankung versterben wird.

Aus diesen Gründen ist man weiter auf der Suche nach neuen Prognoseparametern, die eine genauere Einteilung in unterschiedliche Prognosegruppen¹ erlauben (Bosman, 1999; Edler, 2000). Darunter finden sich sowohl weitere histopathologische Parameter, insbesondere aber molekularbiologische und genetische Marker, wie z.B. Mutationen des APC-Genes, der mismatch repair Gene, TP53, KRAS und DCC (Bosman, 1999).

¹ Anmerkung: Zusätzlich ist man auf der Suche nach prädiktiven Parametern, also solchen Parametern, die das Ansprechen auf eine bestimmte Therapie vorhersagen, sei es eine medikamentöse Therapie oder eine Strahlentherapie. Diese Fragestellung ist aber für die vorliegende Arbeit nicht relevant, da alle in dieser Studie untersuchten Patienten ausschließlich operativ (chirurgisch) therapiert wurden, eine weitere adjuvante Therapie (Strahlentherapie oder Chemotherapie) war nicht durchgeführt worden.

Unter den prognostisch relevanten molekularbiologischen Parametern wurden bereits in den 70-er und 80-er Jahren erstmals drei Enzyme beschrieben, die Thymidylat Synthase (TS), die Thymidin Phosphorylase (TP) und Dihydropyrimidin Phosphorylase (DPD) (Friedkin, 1973; Weber, 1978; Harris, 1988).

Diese Enzyme haben jeweils Schlüsselfunktionen im physiologischen Stoffwechsel der Pyrimidine: TS ist das einzige Enzym der de novo Synthese von Desoxy-Thymidinmonophosphat (dTMP) (Johnston, 1994; Edler, 2000; Takenoue, 2000). TS und TP sind an der intrazellulären Regulation eines konstanten Thymidinspiegels wesentlich beteiligt und regulieren damit indirekt auch die Proliferation bzw. Zellteilung (Kuniyasu, 1998; Sanguedolce, 1998). TP, das identisch ist mit dem Platelet Derived Endothelial Cell Growth Factor, ist auch ein wichtiger Mediator der Angiogenese (Takebayashi, 1996; Schwartz, 1998; Evrard, 1999; Evrard, 1999). Demgegenüber ist DPD ein wichtiges Enzym im Katabolismus des Pyrimidinstoffwechsel (Abbildung 4) (Miyamoto, 2000).

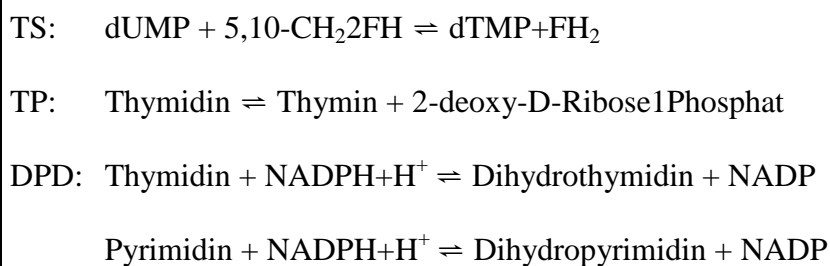


Abbildung 4

Funktionen der drei Enzyme TS, TP und DPD im physiologischen Stoffwechsel

Aufgrund der physiologischen Schlüsselfunktionen von TS, TP und DPD im Pyrimidinmetabolismus und damit im Metabolismus der DNA und RNA-Synthese, ist es vorstellbar, dass sie einen mittelbaren oder unmittelbaren Einfluß auf die Tumorbilogie der Colorectalen Carcinome haben und damit auch deren Prognose beeinflussen.

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Proteinexpression von TS, TP und DPD in CRC und die Korrelation dieser Parameter zum klinischen Krankheitsverlauf.

Daraus ergeben sich im Einzelnen folgende Ziele:

1. Etablierung einer standardisierten semiquantitativen immunhistochemischen Methode zur Bestimmung der Enzymexpression von TS, TP, DPD in formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Geweben (FFPET).
2. Charakterisierung der Enzymexpression in Normalgeweben des Colon und in Tumorgewebe Colorectaler Carcinome.

3. Zusammenstellung eines unselektionierten retrospektiven Kollektives von Patienten mit nodal-negativen colorectalen Carcinomen aus dem Archiv des Institutes für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München (TUM) und der Chirurgischen Klinik des Klinikum rechts der Isar der TUM. Einschlusskriterien waren: (1) nodal negatives Colon- oder Rectumcarcinom, (2) Primärtherapie ausschließlich operativ, (3) vollständige klinische Dokumentation mit erhobenen Verlaufsdaten.
4. Bestimmung der Enzymexpression in den CRC und Korrelation der Enzymexpression mit den klinischen Parametern (I) Tumorstadium, (II) Rezidiv, (III) krankheitsspezifische Überlebensrate, (IV) Gesamtüberlebensrate und (V) Tumorlokalisation.

C. Material und Methoden

I. PATIENTENKOLLEKTIV

Das Studienkollektiv setzt sich aus Patienten zusammen, die in der Chirurgischen Universitätsklinik des Klinikum rechts der Isar der TUM in den Jahren 1993 bis 1997 operiert wurden und deren Tumoren im Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der TUM histopathologisch untersucht und klassifiziert wurden. Der Fragestellung entsprechend wurde ein Kollektiv von Patienten mit CRC untersucht, die alle nodal negativ waren, d.h. Tumoren im TNM-Stadium pT1-pT4, pN0, pM0, R0 bzw. Dukes Stadien A und B.

Alle Patienten waren ausschließlich chirurgisch therapiert, d.h. durch primäre Tumorresektion behandelt, sie erhielten keine adjuvante oder neoadjuvante Chemotherapie oder Radiotherapie, da das Risiko eines Rezidivs oder einer Metastasierung zum Zeitpunkt der Therapie für zu gering angesehen wurde und demgegenüber eine signifikante Verbesserung der Prognose durch eine adjuvante Therapie nicht gesichert war.

Das Kollektiv umfasst 97 Patienten, die detaillierte Aufschlüsselung nach Alter, Geschlecht und Tumorstadien bzw. pathologisch-anatomischer Klassifikation findet sich in Tabelle 7 Studienkollektiv.

	Absolut	Prozent
Anzahl Patienten	97	100
Männlich	61	62,9
Weiblich	36	37,1
Stadium I / Dukes A	22	22,7
Hiervon T1	4	4,1
T2	18	18,6
Stadium II / Dukes B	75	77,3
Hiervon T3	62	63,9
T4	13	13,4
G1	0	0
G2	74	76,3
G3	22	22,7
G4	1	1,0
Lokalisation Colon	61	62,9
Rectum	36	37,1
Tumorbedingter Tod		
nein	87	89,7
ja	10	10,3
Colon	4	
Rectum	6	
Rezidiv		
nein	83	85,6
ja	14	14,4
Colon	6	
Rectum	8	
Alter in Jahren (bei Diagnose)		
Mittelwert	65,71	
Median	65	
Spannweite	26-87	
Beobachtungszeitraum in Monaten		
Median	63	

Tabelle 7

Studienkollektiv

II. IMMUNHISTOCHEMIE

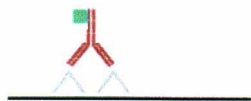
Die Immunhistochemie ist eine histochemische, morphologisch basierte in-situ Methode zum spezifischen Nachweis von Proteinen in Gewebeschnitten. Sie erlaubt eine qualitative Aussage zur Lokalisation eines Proteins in Geweben, wie auch eine semiquantitative Aussage zur relativen Höhe der Expression. Das Grundprinzip der Immunhistochemie besteht darin, einen Gewebeschnitt mit einem Antikörper zu inkubieren, der spezifisch an das gesuchte Protein bindet. Ein spezifischer Antikörper bindet an ein Epitop eines Proteins, eine Bindungsstelle von wenigen Peptiden. Man verwendet dazu monoklonale oder polyklonale Antikörper (Serum). Der spezifisch gebundene Antikörper, der sog. Primärantikörper, wird schließlich in dem Gewebeschnitt durch eine Enzymreaktion mit einem Farbstoff, dem Chromogen, für die Durchlichtmikroskopie sichtbar gemacht.

Diese Methode nennt man den direkten Nachweis, sie wird der Einfachheit wegen zunächst dargestellt, findet aber in der Praxis der Immunhistochemie selten Anwendung, da diese Methode eine relativ geringe Sensitivität besitzt.

Die sensitivere indirekte Methode beinhaltet noch einen Zwischenschritt, der zu einer Verstärkung der Chromogensignale führt. In diesem zusätzlichen Schritt wird dabei ein zweiter Antikörper, der sog. Sekundär-Antikörper oder Brückenantikörper, an den Primärantikörper gebunden. Der Sekundärantikörper ist spezifisch gegen Antikörper der Spezies gerichtet, aus der der Primärantikörper gewonnen wurde. An diesen Sekundärantikörper ist in den klassischen Verfahren ein Enzym gekoppelt, das mit einem Chromogen reagiert und es dadurch lichtmikroskopisch nachweisbar macht. In den modernen Nachweisverfahren sind zur Signalverstärkung und damit zur Erhöhung der Sensitivität, Antikörper und Enzym nicht direkt, sondern indirekt über hochaffine Moleküle als Bindungspartner gekoppelt. Da diese Moleküle mehr als eine Bindungsstelle haben, können auf diese Weise gleichzeitig mehrere Enzymmoleküle je Antikörper binden. Am häufigsten werden hierbei Streptavidin und Biotin bzw. Avidin und Biotin verwendet. Man bezeichnet diese Technik als doppelt indirekte Methode. Zunehmend wird aber auch eine einfach-indirekte Methode eingesetzt, bei der eine Signalverstärkung erreicht wird, indem multiple Enzymmoleküle über größere Kohlenhydratketten direkt an einen Sekundärantikörper gekoppelt sind, dieses Prinzip wird kommerziell u.a. als „Enhanced Polymer System“ bezeichnet.

Gewebeschnitte werden nach Abschluss der immunhistochemischen Färbung mit einer meist monochromatischen histologischen Färbung (z.B. Hämalaun) behandelt, was bei der Durchlichtmikroskopie eine detaillierte histomorphologische Beurteilung ermöglicht. In den folgenden schematischen Darstellungen Abbildung 5 - Abbildung 8 wird eine Auswahl immunhistochemischer Färbemethoden erläutert, die in dieser Arbeit eingesetzt wurden.

POX-konjugierter Primärantikörper

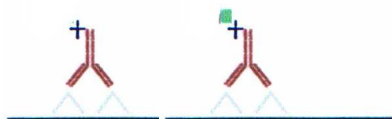


Auf die Inkubation des Primärantikörpers erfolgt direkt die Inkubation mit dem Chromogen. Es ist also nur ein Antikörperschritt nötig.

Abbildung 5

POX-konjugierter Primärantikörper

Biotinylierter Primär-Ak + Komplex

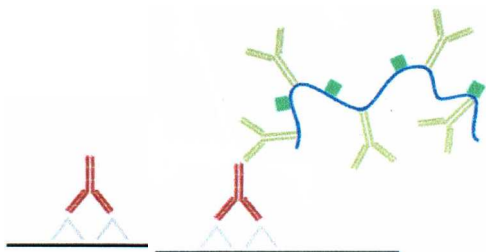


LSAB (Labelled Strept-Avidin-Biotin) basiert auf der Affinität von Avidin zu Biotin. Dieses Verfahren setzen wir sowohl für konjugierte, als auch für unkonjugierte Primärantikörper ein. Liegen biotinylierte Primärantikörper vor, so ist lediglich noch eine Chromogeninkubation nötig.

Abbildung 6

Biotinylierter Primär-Ak + Komplex (ggf. weiterer Schritt vorab bei unkonjugiertem Primär-Ak)

Primärantikörper + EnVision™



Bei der EnVision™-Methode erfolgt die Inkubation von Sekundärantikörper und Komplex in einem einzigen Schritt, da Sekundärantikörper und Peroxidase an einen Dextran-Polymerkörper gekoppelt vorliegen.

Abbildung 7

Primärantikörper + EnVision™

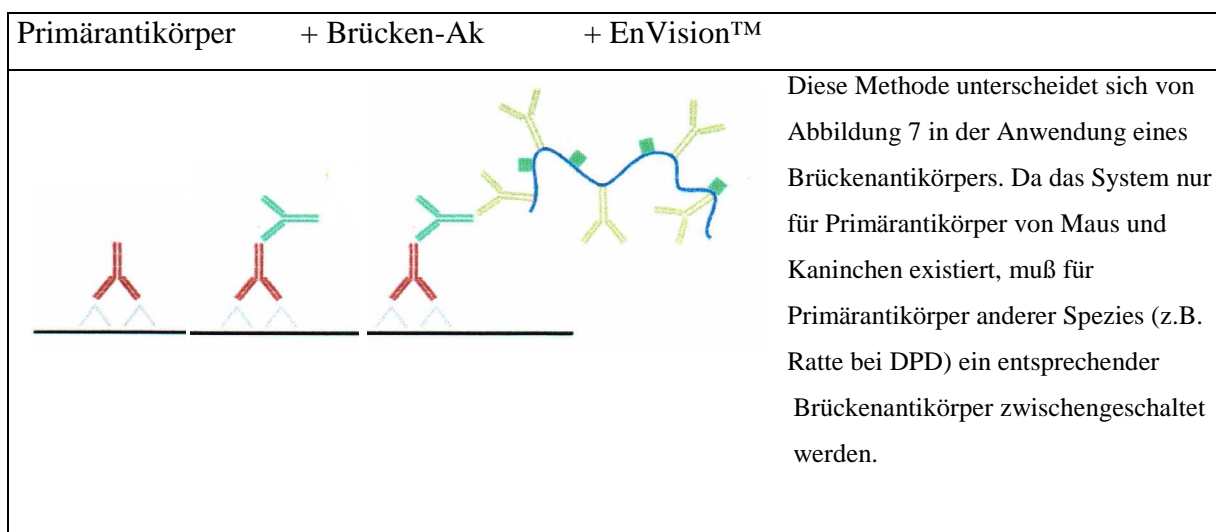


Abbildung 8

EnVision™-Methode für die verwandte DPD-IHC

1. Etablierung der Antikörper

Vor Beginn der Studie wurden durch Literaturrecherche in PubMed (PubMed, 2000) sowie in den Datenbanken kommerzieller Anbieter mit folgenden Suchbefehlen nach geeigneten Antikörpern gesucht: TS, thymidylate synthase, TP, thymidine phosphorylase, DPD, dihydropyrimidine dehydrogenase, antibody, immunohistochemistry.

Verfügbar waren schließlich Clone der Firmen Chemicon, Rockland und Hoffmann La Roche. Insgesamt standen vier AK zur Verfügung. Diese standen auch als biotinylierte und Peroxidase-konjugierte Clone zur Verfügung, die in unterschiedlichen Konjugationsstufen vorlagen, sodass vier verschiedene Antikörper und insgesamt 13 verschiedene Ak-„Konjugate“ ausgetestet wurden. Alle diese Ak wurden evaluiert nach Färberesultat, optimalem Färbeprotokoll und Kosten (vgl. Tabelle 8).

Antikörper gegen Enzym	TP	DPD	TS	
Antikörpername	TP 1C6-203 ²	DPD 2H9-1b ³	TS 106 ⁴	TS (pak) ⁵
Unkonjugiert:	+	+	+	+
Konjugiert				
Biotin 1:5	+	+	+	
Biotin 1:10	+	+	+	
Peroxidase	+	+	+	

Biotin 1:5 auf fünf Primärantikörper fällt ein biotinylierter

Tabelle 8

Ausgetestete Antikörper bzw. Antikörperkonjugate

Basierend auf den publizierten Literaturdaten wurden für die Etablierung der Immunhistochemie vier verschiedene Gewebe ausgewählt, die jeweils sowohl auf RNA-Ebene und auf Proteinebene (ELISA) hohe oder niedrige Expressionslevel zeigten. Es handelt sich hierbei um Colon, Ileum, Lymphknoten und Leber (Fox, 1995; Johnston, 1999; Guimbaud, 2000). Dabei ist die Expression und immunhistochemische Anfärbung von TP besonders hoch in mononukleären Zellen (z.B. Kupffer-Zellen der Leber)(Fox, 1995), für DPD in Hepatozyten und Plasmazellen (Johnston, 1999; Guimbaud, 2000) und für TS in Zentrozyten und Zentroblasten der Keimzentren.

² Hoffmann La Roche Basel, TP 1C6-203 10mg/ml

³ Hoffmann La Roche Basel, DPD 2H9-1b 5mg/ml

⁴ Chemicon Germany, Fischbacherweg 3A, 65719 Hofheim, Thymidylate Synthase, clone TS106 (Hu) Ms IgG1 100µg Catalog Nr. MAB4130

⁵ Pak hTS 7.4 (rabbit), Rockland, P.O. Box 316 Gilbertsville, PA 525, Vertrieb über Biomol Feinchemicalien GmbH, Waidmannstraße 35, 22769 Hamburg: Anti-Human Thymidylate Synthase (Sheep) Code 100-601-199 85mg/ml

Diese vier Gewebe wurden als Kontrollen in einem sogenannten Tissue Micro Array (TMA) zusammengestellt. Die Kontrollen wurden, bis auf das Lebergewebe, von Operationspräparaten zufällig ausgewählter Studienpatienten entnommen. Lebergewebe mit Normalbefunden wurde nach Datenbankrecherche im PAS-System des Pathologischen Institutes (Befund- und Dokumentationssystem der Firma Paschmann/Oberhausen) aus dem Paraffinarchiv des Pathologischen Institutes der Jahrgänge des Studienkollektivs ausgewählt. Es wurden je Gewebeart drei Proben verschiedener Patienten ausgetestet. Ein TMA enthielt kleine Blöcke von 2 mm Durchmesser mit Normalgewebe von Colon (vollständiger Querschnitt), Lymphknoten und Leberparenchym. Die Entnahme und Übertragung in Paraffinblöcke (aus den sog. Donorblöcken in die Akzeptorblöcke) erfolgte manuell mit einer Gewebestanze⁶.

Diese TMAs wurden damals erstmalig im pathologischen Institut eingesetzt und sollten als externe Kontrollen dienen, sie wurden in dieser Studie auf jedem immunhistochemisch gefärbten Objektträger neben den individuellen Tumورproben der CRC parallel mitgeführt (sogenannte on-slide-Kontrollen). Die TMA dienten dabei der Qualitätskontrolle der Färbungen, um zu gewährleisten, dass alle immunhistochemisch gefärbten Schnitte über diese externen Kontrollen vergleichbar waren bezüglich: (1) der Konstanz der Färbungen und damit der Vergleichbarkeit der verschiedenen Tumorgewebe, (2) als Referenzstandard für die Quantifizierung der Färbeintensität.

Die Etablierung der Immunhistochemie am Paraffinmaterial (TMA) erfolgte standardisiert nach folgendem Vorgehen: jeder einzelne Antikörper wurde in unterschiedlichen Titrationsreihen (monoklonale Antikörper) bzw. im sog. Schachbretttest (polyklonale Antikörper) an TMA eingesetzt. Folgende Parameter wurden bei der Austestung variiert: Antigen-Retrieval: (1) Protease, (2) hitzeinduzierte Antigen Retrieval Methoden - Mikrowelle, Dampfdrucktopf, Wasserbad, Steamer, (3) Retrieval-Puffer - EDTA pH 8.0, Citrat pH 7.0, (4) Detektionssysteme - LSAB (bei ungekoppelten Antikörpern) und EnVision. Die Austestungen wurden systematisch ausgewertet hinsichtlich der Intensität der spezifischen Färbung sowie möglicher unspezifischer Hintergrundfärbung. Es wurde das Färbeprotokoll ausgewählt, das bei maximaler Verdünnung, d.h. niedrigster Konzentration des Primärantikörpers, ein optimales Färbeergebnis ohne Hintergrundreaktion zeigte.

⁶ Gewebestanze Fa.Zytomed, Berlin

2. Methodik

Alle Schritte bei den immunhistochemischen Färbungen waren in gleicher bzw. ähnlicher Art im Immunhistologischen Labor des Pathologischen Institutes etabliert. Der Ablauf der Immunfärbungen ist in Abbildung 9 gezeigt.

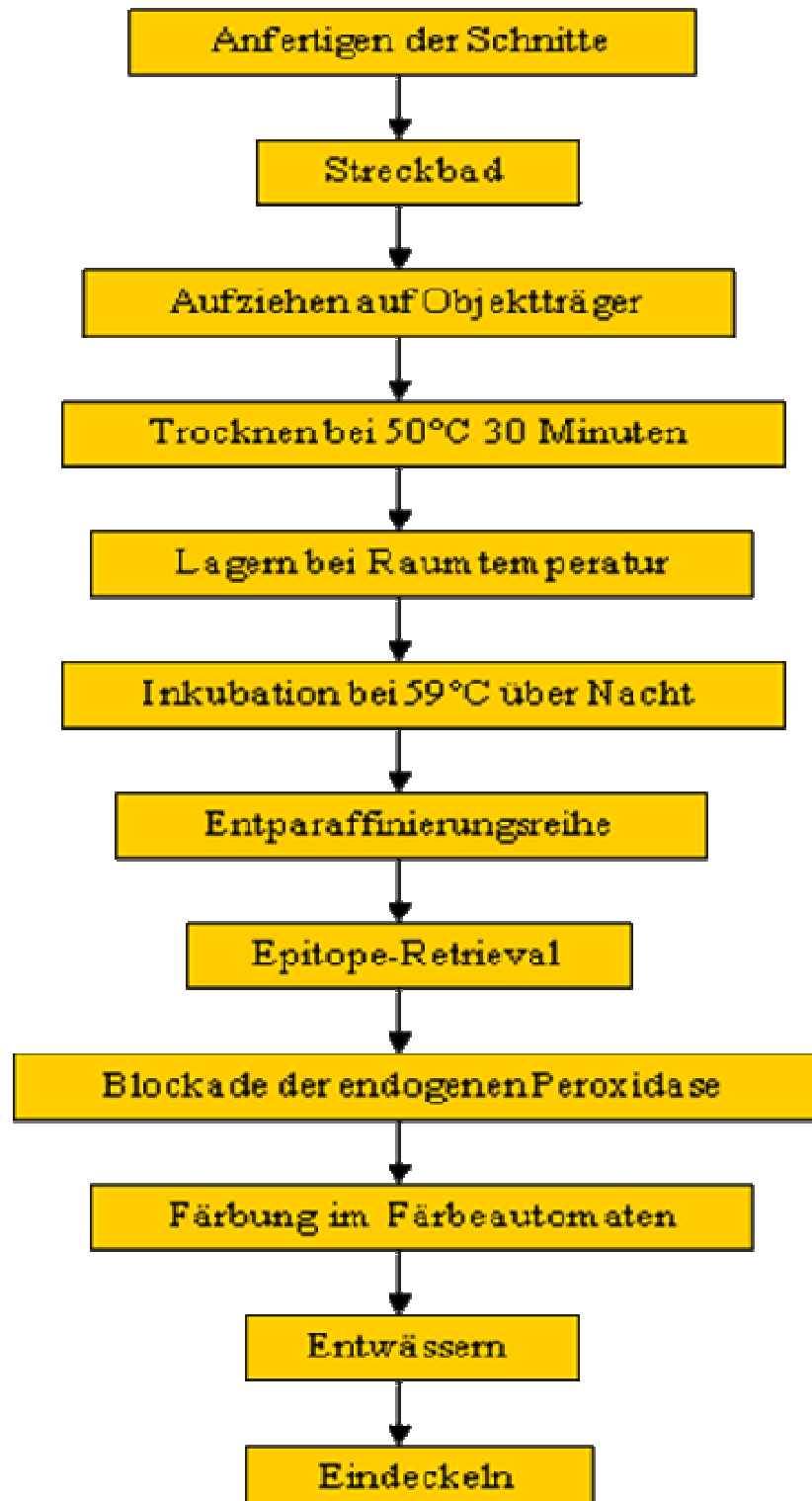


Abbildung 9

Schematischer Ablauf der Immunhistochemie

2.1 Herstellung der Schnitte

Die Paraffinblöcke wurden zum Härten für 30 Minuten auf einer Kühlplatte⁷ auf -18 °C gekühlt. Paraffinschnitte von $5\text{ }\mu\text{m}$ Dicke wurden auf einem Rotationsmicrotom⁸ hergestellt, unmittelbar auf ein 40 °C warmes Wasserbad⁹, das sog. Streckbad, übertragen und auf Glasobjektträger (OT)¹⁰ aufgezogen, die zur besseren Haftung zuvor beschichtet wurden (Pritt®-Flüssig-Klebstoff und Poly-L-Lysine¹¹ im Verhältnis 1:2). Auf alle Objektträger wurden zwei Präparate aufgezogen: ein Tumorschnitt eines Studienfalles und der TMA. Die feuchten OT werden auf einer Heizplatte bei 50 °C ¹² getrocknet. Vor der Weiterverarbeitung werden die ungefärbten Gewebeschnitte auf den OTs über Nacht bei 59 °C in einem Brutschrank¹³ inkubiert („gebacken“), um eine optimale Haftung während der folgenden Inkubationsschritte des immunhistochemischen Färbeprozesses zu gewährleisten.

2.2 Entparaffinierung

Die Paraffinschnitte wurden in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Dies erfolgte automatisiert in einem Färbeautomaten (Tabelle 9).

Xylol	11 x 1 Minute
Isopropylalkohol	4 x 1 Minute
Ethanol 96%	4 x 1 Minute
Ethanol 70%	4 x 1 Minute
Aqua dest	4 x 1 Minute

Tabelle 9

Entparaffinierungsreihe

Da entparaffinierte Schnitte immer feucht bleiben müssen, wurden sie anschließend entweder in den jeweiligen Inkubationspuffern oder als Zwischenschritt in Trispuffer¹⁴ gestellt.

⁷ Medite Tissue Cool Plate COP 20 (-18 °C), Medite Medizintechnik, 31303 Burgdorf, Germany

⁸ Microm HM 335 E

⁹ Medite Paraffin Streckbad TFB35 (40 °C), Medite Medizintechnik, 31303 Burgdorf, Germany

¹⁰ Dako ChemMate™ Capillary Gap Microscope Slides $100\mu\text{m}$ for use in TechMate™ Code No. S2025 Dako A/S Bio Tek Solutions, USA

¹¹ Sigma Poly-L-Lysine P-8920

¹² Medite Objektträger-Strecktisch OTS 40 (50 °C)

¹³ Heraeus Instrument Function line Typ B12 Best.Nr.50042307

¹⁴ $10\text{ mMol pH }7,6$ angefertigt aus $900\text{ ml Aqua dest} + 100\text{ ml }0,1\text{Mol pH }7,6$ (Stocklösung), welche angesetzt wird aus $60,5\text{ g Trizma®Base (Sigma T-1503 Trishydroxymethylaminomethan)} + 700\text{ ml Aqua dest}$, auf $\text{pH }7,6$

2.3 Antigenemaskierung - Epitop-Retrieval

Die Antigene (Epitope) der Gewebe werden durch Fixierung mit Formalin und den Alkoholen verändert, dies ist Folge einer Vernetzung von Nukleinsäuren, Proteinen und Kohlehydraten über Aldehydbrücken und Komplexierung divalenter Ionen und andererseits auch einer Fragmentierung. Die veränderten Epitope sind dadurch im Vergleich zu den nativen Epitopen unfixierter Frischgewebe meist nicht mehr für Antikörper bindungsfähig, man spricht deshalb von „Maskierung“. Die Antikörperbindung ist erst wieder möglich, wenn die Epitope physikalisch-chemisch "demaskiert" werden. Unter Demaskierung oder Retrieval versteht man verschiedene Verfahren, die die Antigene der Proteine wieder „freilegen“ können. Dies ist möglich durch enzymatische Proteolyse mittel Proteasen, oder durch Hitzeinduktion mittels feuchter Hitze. Besonders die hitzebasierten Retrievalmethoden haben die Immunhistochemie an Paraffinmaterial seit Anfang der 90-er Jahre revolutioniert und vielfach erst möglich gemacht. Die Variationen und Kombinationsmöglichkeiten der Retrieval-Verfahren sind nahezu unbegrenzt, die Methoden sind rein empirisch, doch gibt es grundsätzlich standardisierte Vorgehensweisen.

2.3.1 PIER

Für das Protease-induzierte Antigen Retrieval können eine Reihe verschiedener Proteinasen eingesetzt werden, z.B. Pronase, Proteinase K, Ficase. Einzelne Labore beschränken sich meist aus pragmatischen Gründen auf ein oder zwei Proteinasen, eine Protease, die selektiver schneidet und eine weitere Protease, die weniger selektiv (aggressiver) schneidet. In dieser Arbeit wurde das Enzym Protease verwendet. Die Objektträger werden für 20 Minuten in 0,1%iger Proteaselösung¹⁵ inkubiert und anschließend dreimal für 30 Sekunden in Trispuffer gespült. Die Schnitte müssen sehr sorgfältig gespült werden, um das Enzym vollständig zu entfernen, da Proteasen bei unbegrenzter Inkubation schließlich zur vollständigen Zerstörung der Antigene führen können. Die Inkubationsdauer entspricht Erfahrungswerten, eine Anpassung muss stets für jedes Epitop neu erfolgen, andernfalls kann es im Extremfall zu einer falsch negativen Reaktion führen.

eingestellt mit 2N Salzsäure und anschließend auf 1000 ml aufgefüllt. pH kontrollieren und 90 g NaCl (Merck No. 1.06404) darin auflösen.

¹⁵ angesetzt aus 50 mg Protease (Sigma P-8038) und 50 ml Trispuffer, gemischt über 10 Minuten auf einem Magnetrührer (IKAMAG® RCT)

2.3.2 HIER

Gemeinsames Grundprinzip dieser Demaskierungsvarianten ist der Einsatz von Hitze, auch als sog. Superheating, d.h. bis zu einer Temperatur von über 100°C. Die Inkubation kann im einfachsten Fall im Wasserbad erfolgen, häufig werden wegen der besseren Effizienz aber Dampfgarer (Steamer), Mikrowelle, Dampfdruckkochtopf oder Autoklav verwendet. Nur bei dem Autoklaven und dem Wasserbad handelt es sich um Laborgeräte, alle anderen Geräte sind Haushaltsgeräte. Die Inkubation der Gewebeschnitte erfolgt in allen Geräten mit Pufferlösungen, meist handelt es sich um sauren Citratpuffer¹⁶ oder basischen EDTA¹⁷-Puffer. Die Auswahl des Puffers richtet sich nach dem empirisch ermittelten optimalen Antigenretrieval, die Austestung eines Antikörpers und seine Optimierung beinhaltet demnach auch immer die vergleichende Austestung verschiedener Pufferlösungen und Geräte bei den HIER-Verfahren.

2.3.2.1 HIER im Dampfdruckkochtopf

Der Druckkochtopf¹⁸ wird mit zwei Litern Citratpuffer gefüllt und auf einer Heizplatte¹⁹ bis zum Kochen erhitzt. Sobald der Puffer kocht, werden die Schnitte eingestellt und der Topfdeckel fest verschlossen. Die Inkubationszeit wird erst gemessen, wenn im Druckanzeiger des Deckels die zweite Stufe der dreistufigen Druckanzeige angezeigt wird. Nach fünf Minuten wird der Kochtopf von der Heizplatte entfernt und unter fließend kaltem Leitungswasser abgekühlt. Der Deckel wird erst geöffnet, nachdem der Druckanzeiger den Nullwert anzeigt. Nach dem Öffnen, lässt man ca. 10 l kaltes Wasser in den Puffer zulaufen. Nach Abkühlung auf ca. 30°C werden die Schnitte entnommen und in Trispuffer eingestellt.

2.3.2.2 HIER im Wasserbad

Ein thermostat-gesteuertes Wasserbad²⁰ mit einer Zirkulationspumpe wird mit destilliertem Wasser gefüllt und auf 98°C erhitzt. In das Wasserbad wird eine Objektträgerküvette mit den entparaffinierten Schnitten gestellt. Die Küvette ist so weit mit Retrieval-Puffer (je nach Protokoll Citrat oder EDTA-Puffer) befüllt, dass alle OTs vollständig überschichtet sind. Die

¹⁶ 10 mmol, angesetzt auf o.g. Magnetrührer aus 4,2g Citronensäuremonohydrat (Merck No. 1.00242) und 2000 ml Aqua dest und mittels 2N NaOH auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt.

¹⁷ für 3 Liter werden 1,116 g EDTA (SIGMA Ethylenediaminetetraacetic acid E-5134) in 2,5 Liter Aqua dest gelöst, mit 1N NaOH auf einen pH von 8,0 eingestellt und mit Aqua dest auf 3 Liter aufgefüllt

¹⁸ WMF 5 Liter

¹⁹ Kochplatte IKA, Staufen

²⁰ GFL®, Typ 1012, No. 10457200 I

Schnitte werden für 60 Minuten inkubiert und anschließend für zehn Minuten bei Raumtemperatur in der Küvette abgekühlt.

Anmerkung: diese Wasserbad Methode hat unter den HIER Verfahren den Vorteil, dass sie in allen Labors gleichermaßen standardisiert eingesetzt werden kann. Die anderen HIER-Verfahren können aufgrund unterschiedlicher Gerätebauart Abänderungen des Protokolls, speziell der Inkubationszeiten erforderlich machen. Der Nachteil des Wasserbades liegt in der deutlich längeren Inkubationszeit von mindestens einer Stunde, d.h. der geringeren Effektivität.

2.3.2.3 HIER im Dampfgarer (Steamer)

Der Steamer²¹ wird entsprechend der Herstellerangabe bis zur zulässigen maximalen Höhe mit Leistungswasser befüllt und gestartet. Die Aufwärmzeit bis zum Kochen beträgt ca. 5 Minuten.

Die entparaffinierten Objektträger werden in eine offene Küvette²² gestellt, die ca. 0,5 cm hoch mit Retrieval-Puffer befüllt ist. Jeder Gewebeschnitt ist mit einem leeren Objektträger abgedeckt, so dass immer 2 OTs in den Küvettenfächern einen Kapillarspalt bilden, der zur vollständigen Benetzung der Gewebeschnitte führt. Die Küvette wird mit dem Deckel verschlossen. Sobald die Flüssigkeit im Steamer anfängt zu verdampfen, wird die Küvette in der Mitte des Dämpfereinsatzes gestellt und für 30 Minuten inkubiert. Danach wird die Küvette entnommen und für 30 Minuten an Raumtemperatur abgekühlt. Die Objektträgerpaare werden vorsichtig getrennt, um eine Verletzung des Gewebes zu vermeiden, und in Trispuffer eingestellt.

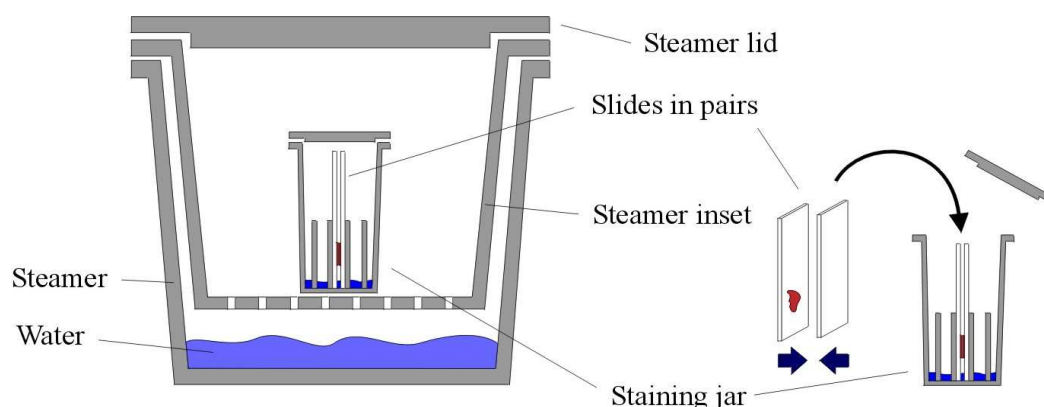


Abbildung 10
Steamer

²¹ WMF – Dampfgarer 4l

²² Typ Hallendahl über Merck Best.-Nr. 631F9130

2.3.2.4 Mikrowelle

Die OTs werden in eine geeignete Küvette eingestellt und mit Retrieval-Puffer vollständig überschichtet. Die Küvette wird verschlossen und in der Mitte der Mikrowellenkammer²³ gestellt. Die Inkubationszeit beträgt je nach Protokoll bei 750 Watt 20-40 Minuten.

Anschließend wird die geöffnete Küvette für 30 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt, dann die Objektträger aus dem Retrieval-Puffer wieder in Trispuffer überführt.

2.4 Blockierung der endogenen Peroxidase (POX)

Proteine mit Peroxydaseaktivität, die sog. „Endogene Peroxidasen“ werden in vielen Zellen synthetisiert, ihr bekanntester Vertreter ist das Hämoglobin der Erythrozyten.

Wie andere Proteine wird auch das Hämoglobin durch die Fixierung nicht dauerhaft inaktiviert, sondern kann durch das Retrieval wieder aktiviert werden. Wird für die Immunhistochemie ein peroxidase-spezifisches Chromogen eingesetzt, kann dieses u.U. auch von der endogenen Peroxidase umgesetzt werden und so eine unspezifische Reaktion verursachen. Deshalb ist bei Verwendung von POX in einem Detektionssystem die Blockade dieser endogenen Enzyme notwendig.

Zur Inaktivierung bzw. Blockierung der endogenen POX wurden die OTs im Anschluss an das Epitop-Retrieval für 20 Minuten in ein Blockierungsreagenz von Methanol mit 0,9 prozentiger H₂O₂-Lösung²⁴ inkubiert. Die OTs wurden anschließend dreimal für 30 Sekunden in Trispuffer gespült.

2.5 Blockierung des endogenen Biotins

Werden Biotin-haltige Detektionssysteme, wie das erwähnte LSAB®System verwendet, ist es erforderlich, endogenes Biotin oder „biotinartige Reaktivität“ des Gewebes zu blockieren.

Diese wird besonders durch alle HIER-Verfahren verstärkt, sodass hierdurch unspezifische Reaktionen hervorgerufen werden können. Die möglichen Reaktionsmuster sind je nach Gewebe sehr variabel, können zytoplasmatisch, nukleär und extrazellulär stromagebunden ausfallen. Verschiedene Gewebe, darunter auch die von uns untersuchten, enthalten in hohem Maße endogenes Biotin (J Rodriguez-Soto, 1997).

²³ Bauknecht, MWD 1820 *Duo*, 750W

²⁴ Wegen der maximal erreichbaren Konzentration von 30 % bei H₂O₂, werden, um eine 6 prozentige bzw. 0,9 prozentige Mischung zu erhalten, 20 ml bzw. 3 ml mit dem Mischungsmedium auf 100 ml aufgefüllt.

Die Biotin-Blockierung erfolgte mit einem kommerziell gebrauchsfertigem Kit, da dieses besser standardisiert ist, als laboreigene Ansätze aus Hühnereiweiss. Entsprechend den Herstellerangaben wurden die OTs 15 Minuten in Avidin-Reagenz inkubiert, nach einem Waschschrift für weitere 15 Minuten in Biotin-Reagenz²⁵.

2.6 Antikörperinkubation

Die immunhistochemischen Färbungen wurden mit einem Färbeautomaten²⁶ durchgeführt.

Die OT mit den Gewebeschnitten werden nach Entparaffinieren, Antigen-Retrieval und Blockierung der endogenen POX und des Biotins in 0,5 prozentiger Tween20-Lösung²⁷ gewaschen, um eine optimale Kapillarspaltwirkung zu erzielen. Anschließend werden sie entsprechend der Herstellerangaben in den Halterungen des Automaten positioniert.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit des Färbeprotokolls ist in Tabelle 10 lediglich der schematische Ablauf der Färbung aufgeführt, der vollständige Algorithmus der Färbung ist im Anhang dargestellt.

1	Buffer 1	2 x 10 sec
2	Avidin	15 min
3	Buffer 1	4 x 10 sec
4	Biotin	15 min
5	Buffer 1	4 x 10 sec
6	Antibody 1	2 x 25 min
7	Buffer 2	4 x 10 sec
8	Link Antibody	25 min
9	Buffer 2	4 x 10 sec
10	Complex	25 min
11	Buffer 3	4 x 10 sec
12	Chromogen	3 x 7 min
13	Buffer 3	10 sec
14	Haematoxylin	1 min
15	H ₂ O	4 x 15 sec

Tabelle 10

Färbeprotokoll (Beispiel)

Bei einer Detektion mittels EnVision™ entfallen die Schritte 1-4 sowie 8 und 9. Außerdem entfallen für die konjugierten Antikörper mehrere Schritte (für die biotinylierten Antikörper die Schritte 8 und 9, für die Peroxidase-konjugierten die Schritte 1-4 sowie 8-11).

²⁵ Vector Biotin-Blocking Kit bestehend aus zwei 18ml-Tropfflaschen Avidin bzw. Biotin, Vertrieb über Linaris Biologische Produkte: Linaris GmbH, Hotelstraße 11, 97877 Wertheim-Bettingen

²⁶ Dako TechMate™ Horizon, Dako Diagnostica GmbH, am Stadtrand 52, 22047 Hamburg

²⁷ SIGMA Polyoxyethylene-Sorbitan Monolaurate (Tween20) P-1379 in Trispuffer

Die Anordnung der vorkonfektionierten Reagenzien bzw. Absaugpads in den verschiedenen Positionen des Automaten ist in Tabelle 11 dargestellt, wobei die Nummerierung die Position im Gerät, nicht aber die zeitliche Abfolge der Inkubationen wiedergibt.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Pad 1	Pad 2	Pad 3	Pad 4	Buffer 1	Buffer 2	Buffer 3	H ₂ O	Antibody 1	Link	Complex	Chromogen	Hämalaun	Avidin	Biotin

Tabelle 11

Schematische Darstellung der einzelnen Positionen des Färbeautomaten

2.7 Detektionssysteme

Unter Kapitel II Immunhistochemie wurden die Prinzipien der Methoden bereits ausführlich dargelegt, so dass an dieser Stelle darauf verwiesen wird. In dieser Arbeit wurden zwei Detektionssysteme der Fa. DAKO eingesetzt, das EnVision™ System, eine indirekte Methode und das LSAB® System, eine doppelt indirekte Methode (vgl. Abbildung 6 - Abbildung 8).

2.8 Gegenfärbung, Entwässerung, Eindeckeln

Die Gegenfärbung erfolgt durch einminütige Inkubation in Hämalaun²⁸ und Wässerung („Bläuung“) mit kaltem Leitungswasser für 1 Minute. Damit ist die immunhistochemische Färbung abgeschlossen.

Anschließend werden die Präparate durch die Alkoholreihe bis zum Xylol (vgl. Tabelle 12) entwässert und mit Eindeckmedium²⁹ und einem Deckglas abgedeckt. Sie sind dann geschützt und konserviert und können unter dem Durchlichtmikroskop betrachtet werden.

Ethanol 70%	Ethanol 96%	Isopropylalkohol	Xylol
2 Behälter	2 Behälter	3 Behälter	5 Behälter

Tabelle 12

Entwässerungsreihe

²⁸ „Mayers saures Hämalaun“, zur Verfügung gestellt durch die Zentralapotheke des Klinikums Rechts der Isar

²⁹ Eukitt, Fa. Engelhardt, Emmendingen

3. *Auswertung der Immunhistochemie*

Die immunhistochemischen Färbungen wurden nach folgenden Kriterien beurteilt:

- I. Anteil der gefärbten Tumorzellen
- II. Intensität der gefärbten Tumorzellen
- III. Anteil der gefärbten Stromazellen
- IV. Intensität der gefärbten Stromazellen
- V. Tumor/Stroma-Verhältnis

Die Beurteilung und Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Tumorgewebe CRC erfolgte nach folgender Systematik:

1. Jeder immunhistochemische Schnitt wurde zunächst bezüglich des mitgeführten TMA (externe on-slide Kontrolle) beurteilt. Diese externe on-slide Kontrolle musste hinsichtlich Färbemuster und Färbeintensität identisch ausfallen wie der Referenzschnitt des TMA der nach dem optimierten Färbprotokoll zu Beginn der Studie gefärbt worden war.
2. War die on-slide Kontrolle korrekt, wurde das Tumorgewebe desselben OT bezüglich der Färbeintensität und des Färbemusters der internen Kontrollen beurteilt.
3. Waren beide Prüfungen ohne Beanstandung, wurde der immunhistochemische Schnitt in die Studie eingeschlossen, bei Beanstandungen wurde er ausgeschossen und die Färbung wurde wiederholt, bis zu einem optimalen Färbergebnis. Auf diese Weise konnten alle ausgewählten Tumorfälle in die Studie einbezogen werden.
4. Die Färbungen wurden mit einem semiquantitativen immunhistochemischen (immunreaktiven) Score quantifiziert, der analog dem Score gebildet wurde, wie er von Remmele und Stegner zur Quantifizierung des Rezeptorstatus beim Mammakarzinom etabliert ist (Remmele, 1987). Die Quantifizierung bestand aus zwei Teilen, zunächst wurde der prozentuale Anteil von Tumorzellen im Verhältnis zum Stroma mit Hilfe eines Rasterokulars in der Übersichtsvergrößerung (X 1.25, Zeiss Axioskop 2) bestimmt. Diese Bestimmung erfolgte nach einer 4-stufigen Skala von 1-4, die jeweils Abstufungen in 25%-Schritten entsprach. Anschließend wurde die dominierende Färbeintensität der beiden Tumorkomponenten nach einer 4-stufigen Skala von 0-3 beurteilt, sowie der Anteil an angefärbten Zellen im jeweiligen Kompartiment bestimmt (vgl. Tabelle 13). Als Referenz für die Abschätzung der Färbeintensität diente das on-slide Kontrollgewebe des TMA. Für beide Tumorkomponenten wurde aus diesen Bewertungen ein Gesamtwert als Produkt von Quantität und Intensität ermittelt (vgl. „Summenscore“ unten). Alle Werte wurden in

drei Durchgängen ermittelt. Zunächst wurden alle Tumoren parallel und unabhängig von zwei Befundern beurteilt, dem Doktoranden und einem erfahrenen Pathologen des Institutes (Dr. J. Nährig). Im dritten Schritt wurden dieselben Färbungen gemeinsam von beiden Gutachtern an einem Diskussionsmikroskop evaluiert. Die Werte aus den vorhergehenden Runden wurden verglichen, alle diskrepanten Fälle wurden abschließend diskutiert und schließlich gemeinsam quantifiziert. In 89 % ergab sich eine Übereinstimmung der Werte, ansonsten wurden lediglich geringe Abweichungen von einer Stufe der 4-stufigen Skala beobachtet.

5. Da sowohl die Tumorzellen, wie auch das Tumorstroma, d.h. desmoplastisches Bindegewebe einschließlich Tumor-infiltrierender Makrophagen und Lymphozyten eine Expression der Enzyme zeigen konnten, wurden Tumorzellen und Stromazellanteil getrennt voneinander beurteilt, da in der Literatur bis dato nicht zweifelsfrei gesichert war, welche biologische Bedeutung die Expression in beiden Komponenten hat. Zusätzlich wurde, ein sogenannter „Summenscore“ gebildet, um die Gesamtexpression im Tumor zu bestimmen

Dieser „Summenscore“ wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$T/S \times T^P \times T^I + (1-T/S) \times S^P \times S^I$$

T steht für Tumorzellen, S für Stromazellen, T/S für das Verhältnis von Tumor- zu Stromaanteil, ausgedrückt in prozentuaalem Anteil von Tumorzellen am Gesamttumor, P für positiven Anteil, d.h. den prozentualen Anteil an immunreaktiven Zellen sämtlicher Färbegrade und I steht für die dominierende Färbeintensität. Diese Formel wurde für diese Arbeit erstellt und durch den Mitarbeiter des Instituts für Medizinische Statistik und Epidemiologie der Technischen Universität München (IMSE), Herrn Diplommathematiker Dr. Hennig validiert.

Verhältnis von Tumoranteil zu Stromaanteil	
0-25%	1
26-50%	2
51-75%	3
76-100%	4
Anteil gefärbter Zellen je Kompartiment	
0-25%	1
26-50%	2
51-75%	3
76-100%	4
Intensität der Anfärbung je Kompartiment	
Keine Anfärbung	0
Weak staining	1
Moderate staining	2
Strong staining	3

Tabelle 13

Beurteilung der IHC

III. STATISTIK

Die statistischen Analysen wurden mit dem Statistik-Programm SPSS® Version 10.0 für Windows ausgewertet, eine Lizenz wurde über das Leibniz-Rechen-Zentrum München erworben. SPSS ist mittlerweile sowohl ein Firmenname, wie auch der Name dieses Statistikprogramms. Die Bezeichnung war ursprünglich die Abkürzung für „Statistical Package for the Social Sciences“, zwischenzeitlich wird diese Bezeichnung auch als Abkürzung für „Superior Performing Software System“ verwendet (Busch R., 2000).

Die Auswertung erfolgte in enger Zusammenarbeit mit dem IMSE unter der Projektbetreuung durch Herrn Diplommathematiker Dr. Michael Hennig.

Die Auswertung und Darstellung des Gesamtüberlebens wurde nach Kaplan-Meier berechnet und generiert (Kaplan E.L., 1958). Die Berechnung der Signifikanz der Übereinstimmung zweier Verteilungen erfolgte mit dem zweiseitigen Test nach Mann-Whitney (zweiseitiger Mann-Whitney-U-Test). Die Berechnung der Korrelation zweier Merkmale mit Ranginformationscharakter erfolgte mit dem Spearmanschen Rangkorrelationskoeffizienten (WEIß, 2003), als signifikant wurde jeweils ein p-Wert $\leq 0,05$ gewertet.

D. Ergebnisse

I. ETABLIERUNG DER IMMUNHISTOCHEMIE UND AUSTESTUNG DER ANTIKÖRPER

Die vergleichende Austestung und Optimierung der verschiedenen Färbemethoden und der verschiedenen Antikörperklone zeigte deutliche Unterschiede. Beim Vergleich der Antikörperklone, die teils konjugiert (gekoppelt an POX oder Biotin), teils unkonjugiert vorlagen, waren die unkonjugierten Antikörper (AK) der jeweiligen Klone den konjugierten Klonen überlegen. Die Färbungen mit den unkonjugierten AK waren wesentlich sensitiver. Im Vergleich der Retrieval Methoden waren bei allen Klonen die HIER Methoden den PIER Methoden überlegen, aber keine HIER Methode war für alle Epitope gleich effizient, es zeigten sich aber der Dampfdruckkochtopf und Steamer gegenüber Wasserbad und Mikrowelle überlegen. Auch der Vergleich der Detektionssysteme zeigte Unterschiede bezüglich der Sensitivität und der Spezifität (Hintergrund) der Färbung, auch in Abhängigkeit von dem eingesetzten Antikörper. Eine Blockade des endogenen Biotins erwies sich bei der LSAB-Methode als unbedingt erforderlich, da sich auch in dieser Arbeit die Literaturberichte bestätigten, dass HIER Methoden in hohem Maße endogenes Biotin bzw. biontinartige Epitope demaskieren und deshalb bei Verwendung eines ABC-Detektionssystems ohne Biotinblockierung eine starke Hintergrundreaktion des endogenen Biotins auftritt (J Rodriguez-Soto, 1997)

Folgende AK-Klone und optimierte Färbeprotokolle wurden schließlich etabliert und für diese Studie verwendet (Tabelle 14):

	DPD	TP	TS
Antikörperklon	rat poly-Ab 2H9-1b (5 mg/ml)	1C6-203 (10 mg/ml) moAb	pak hTS 7.4 (rabbit)
Verdünnung	1 : 4.000	1 : 60.000	1 : 500
Lieferant	Rockland USA	Hoffmann La Roche	Rockland/ Hoffmann La Roche
Antigenretrieval	KT 5 min in Citrat	Steamer 25 min EDTA	Steamer 25 min in EDTA
Blockade endog. POX	0,9 % H ₂ O ₂ in Methanol 20 min	0,9 % H ₂ O ₂ in Methanol 20 min	0,9 % H ₂ O ₂ in Methanol 20 min
	Zwischen-AK:		

	DAKO rabbit anti-rat 1:300		
Chromogen	EnVision (anti rabbit), DAB	LSAB-HRP (anti mouse), DAB	LSAB-HRP (anti rabbit), DAB

Tabelle 14

IHC-Materialien: Übersicht für die drei Enzyme DPD, TP und TS

II. LOKALISATION DER FÄRBUNG

Alle drei untersuchten Enzyme TS, TP und DPD zeigten in der Immunhistochemie eine diffuse zytoplasmatische Färbung bzw. Lokalisation. Zusätzlich zeigte TP auch eine Zellkernanfärbung.

Tabelle 15 gibt einen Überblick über die Färbeintensität der ausgewählten Positivkontrollen. Die geringste Färbeintensität (Grad 1) zeigte für alle drei Enzyme die glatte Muskulatur der Colonwand, die höchste Färbeintensität (Grad 3) zeigten für TP Makrophagen (auch Kupfferzellen der Leber), für DPD die Hepatozyten, für TS die Zentrozyten und Zentroblasten der Follikelkeimzentren.

Die Abbildung 11 - Abbildung 13 zeigen beispielhaft Anfärbungen verschiedener Gewebe. In Abbildung 14 ist schematisch und in Schnittvergrößerung ein OT mit Studiengewebe und TMA dargestellt. Die Abbildung 15 - Abbildung 19 zeigt beispielhaft Tumorfärbungen im Ausschnitt.

	Colon	Ileum	Lymphknoten	Leber
TS	+ (glatte Muskulatur)	+ (glatte Muskulatur)	+++ (Zentrozyten/ blasten)	
TP	+ (glatte Muskulatur)	+ (glatte Muskulatur)		+++ (Mononukleäre Zellen/Kupfferzellen)
DPD	+ (glatte Muskulatur)	+ (glatte Muskulatur)		+++ (Hepatozyten und Plasmazellen)

Tabelle 15

Immunhistochemische Anfärbung verschiedener Gewebe/Zellen

+ **weak staining**

++ **moderate staining**

+++ **strong staining**

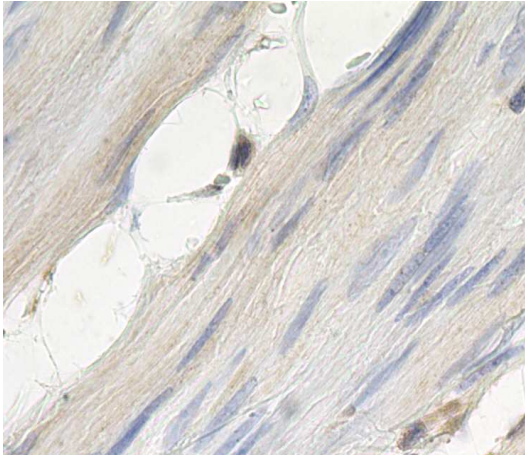


Abbildung 11
Glatte Muskulatur, TP, Intensitätsgrad 1

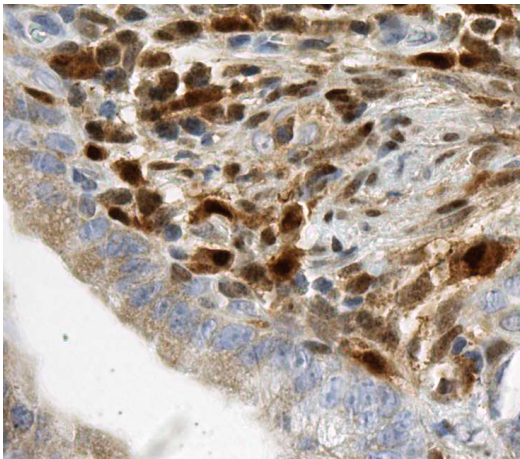


Abbildung 12
Colongewebe mit Macrophagen, TP, Färbung Intensitätsgrad 3

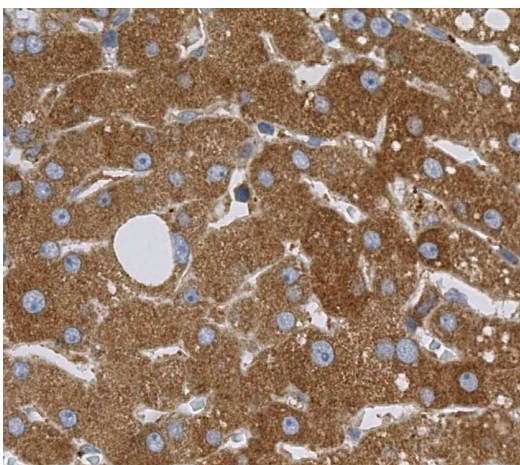


Abbildung 13
Lebergewebe, DPD, Färbung Intensitätsgrad 3

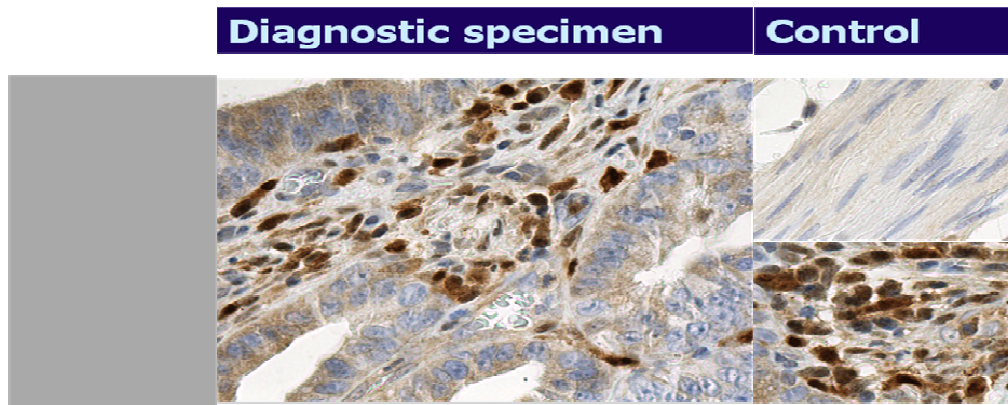


Abbildung 14

schematische Darstellung Tumorgewebe und der TMA auf dem Objektträger, jeweils in Vergrößerung

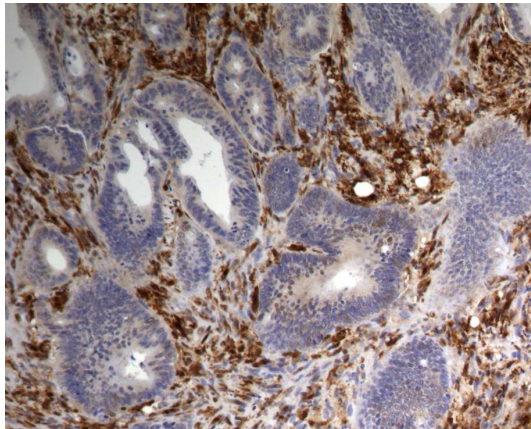


Abbildung 15

TP-Tumor-Färbung

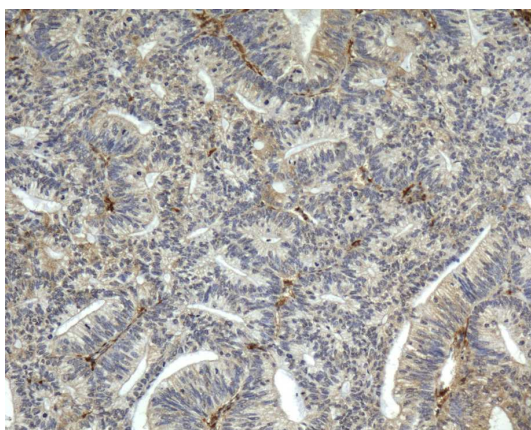


Abbildung 16

TP-Tumor-Färbung

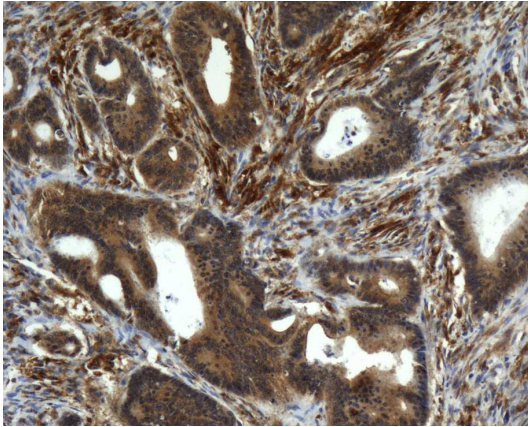


Abbildung 17
DPD-Tumor-Färbung

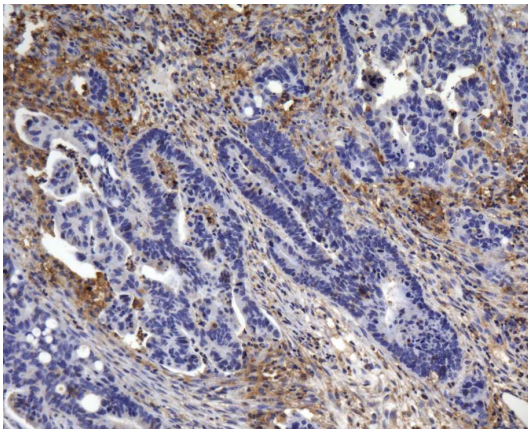


Abbildung 18
DPD-Tumor-Färbung

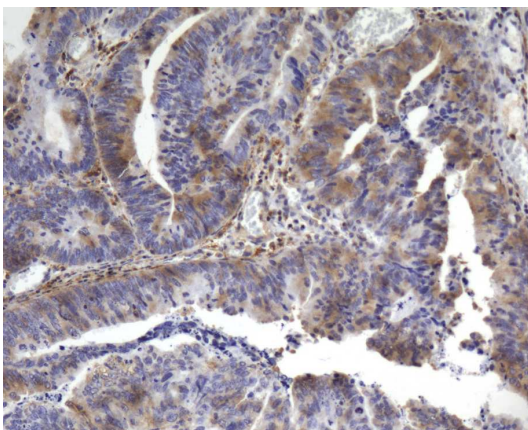


Abbildung 19
TS-Tumor-Färbung

Alle drei Enzyme waren in allen untersuchten Geweben nachweisbar, jedoch in unterschiedlich hohem Ausmaß und unterschiedlicher Intensität. Im Einzelnen stellten sich die Färbungen wie folgt dar:

(1) Bis auf 2 Tumore bei TS zeigten alle für alle drei Enzyme immer eine Anfärbung. (2) Die Intensität der Färbungen von TS und DPD in Carcinomzellen und Stromazellen innerhalb eines Tumors und im Vergleich verschiedener Tumoren war grundsätzlich heterogen, d.h. sie konnten über die gesamte Skala (Grad 0-3) variieren. (3). Dem gegenüber waren die Färbungen von TP in der Mehrzahl der Fälle konstant über den Tumor verteilt. (4) Das Tumorstroma war immer positiv für TP und DPD (vgl. Tabelle 16). (5) Makrophagen zeigten stets eine maximale Färbeintensität für TP, demzufolge zeigten Tumoren mit einer hohen Makrophagendichte des Stromas einen hohen Stromascore und auch einen hohen Summenscore des Gesamtpräparates (vgl. unten). Dies galt aber nicht für TS und DPD.

III. AUSWERTUNG DES PATIENTENKOLLEKTIVS

Eine tabellarische Zusammenstellung der Rohdaten aller Färbeergebnissen des Studienkollektivs ist im Anhang separat angefügt. Es wurden nur Färbungen ausgewertet, die konstante Ergebnisse der TMA-Kontrollen zeigten, abweichende (schwächere oder stärkere) Färbungen wurden nicht ausgewertet, sondern wiederholt (ca. 5% der Färbungen).

Aus diesen Daten wurden die Scorewerte ermittelt. Die Minima, die Maxima und die Mittelwerte aus diesen Scores sind in Tabelle 16 dargestellt. Sie wurden berechnet zur Unterscheidung statistischer Gruppen nach niedriger und hoher Expression.

	Mittelwert			Minimum			Maximum		
	Tumorzellen	Stromazellen	Gesamtwert	Tumorzellen	Stromazellen	Gesamtwert	Tumorzellen	Stromazellen	Gesamtwert
TS	4,36	2,21	18,51	0	0	0	9	3	39
DPD	5,42	4,12	25,19	0	1	3	12	9	51
TP	4,97	7,03	27,79	0	3	3	12	12	52

Tabelle 16

Immuno-score (Mittelwert, Minimum, Maximum) von TS, TP und DPD in Tumo- Stromazellen, bzw. Gesamtwert sämtlicher Tumoren

Mit den angewandten statistischen Tests, dem Spearman-Korrelationskoeffizienten sowie dem Test auf signifikante Unterschiede nach Mann-Whitney ergaben sich folgende signifikante Korrelationen mit einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$:

1. Der Gesamt-TS-Wert korreliert negativ mit dem tumorbedingtem Tod ($p = 0,05$), d.h. für Patienten mit hohen Gesamt-TS-Werten gilt eine geringere Wahrscheinlichkeit am Tumor zu versterben, außerdem ist das Gesamtüberleben für Patienten mit hohen Gesamt-TS-Werten besser.

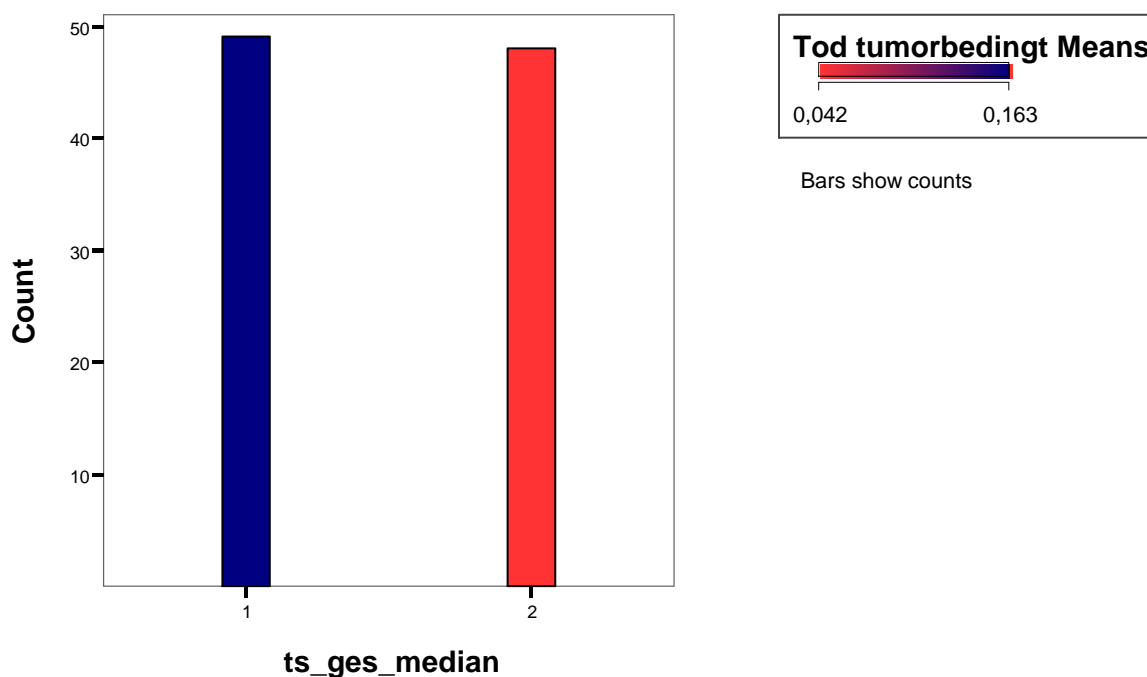


Abbildung 20

Balkendiagramm zur Korrelation zwischen tumorbedingtem Tod und TS-Gesamtwert:

16,3 % der Patienten mit einem niedrigem TS-Gesamtwert ($ts_ges_median = 1$) verstarben in dem Beobachtungszeitraum, während lediglich 4,2 % der Patienten mit einem hohen TS-Gesamtwert ($ts_ges_median = 2$) verstarben.

Survival Functions

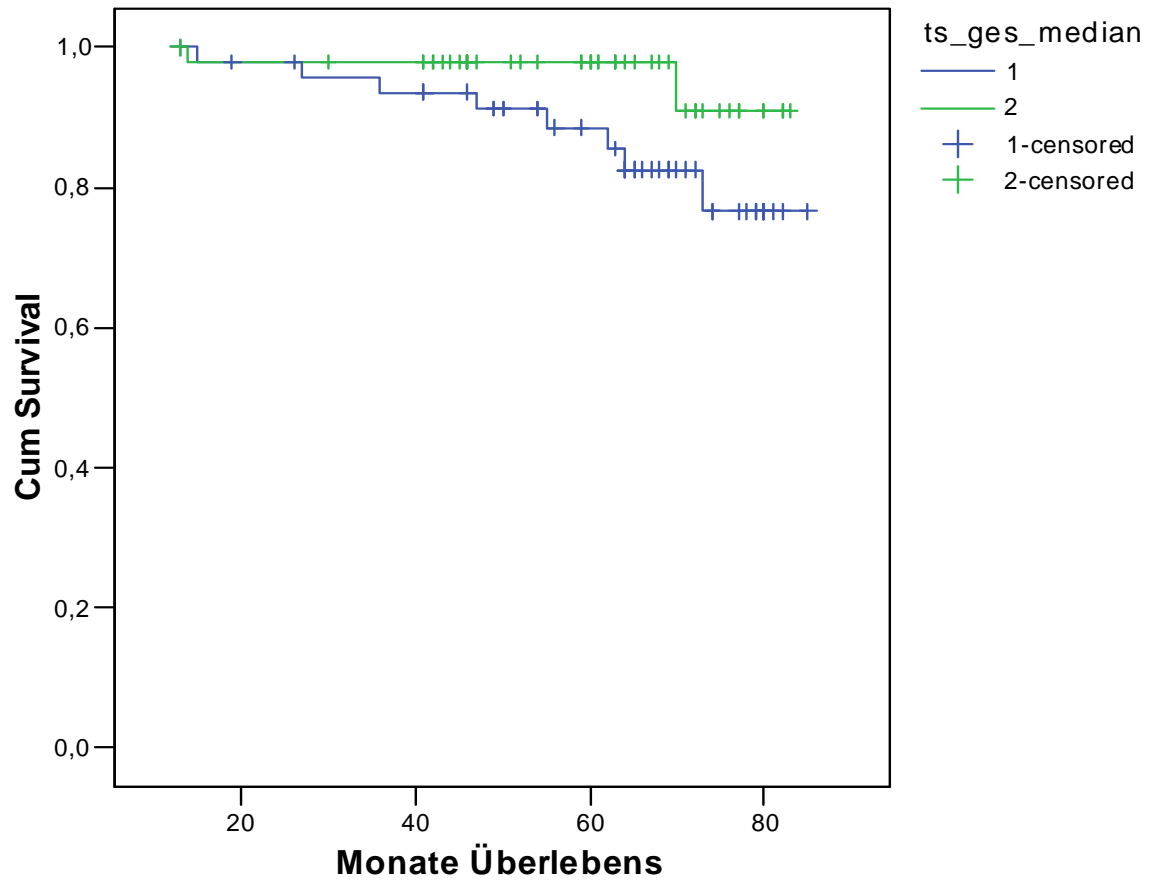


Abbildung 21

Die Kaplan-Meier-Überlebenskurve für TS-Gesamt-Wert zeigt einen Überlebensvorteil für Patienten mit einem hohen TS-Gesamtwert (grün) gegenüber Patienten mit einem niedrigen TS-Gesamt-Wert (blau).

2. Der Stroma-TP-Wert korreliert negativ mit der Rezidivrate ($p = 0,017$), d.h. Tumoren mit hohen Stroma-TP-Werten zeigen niedrigere Rezidivraten.

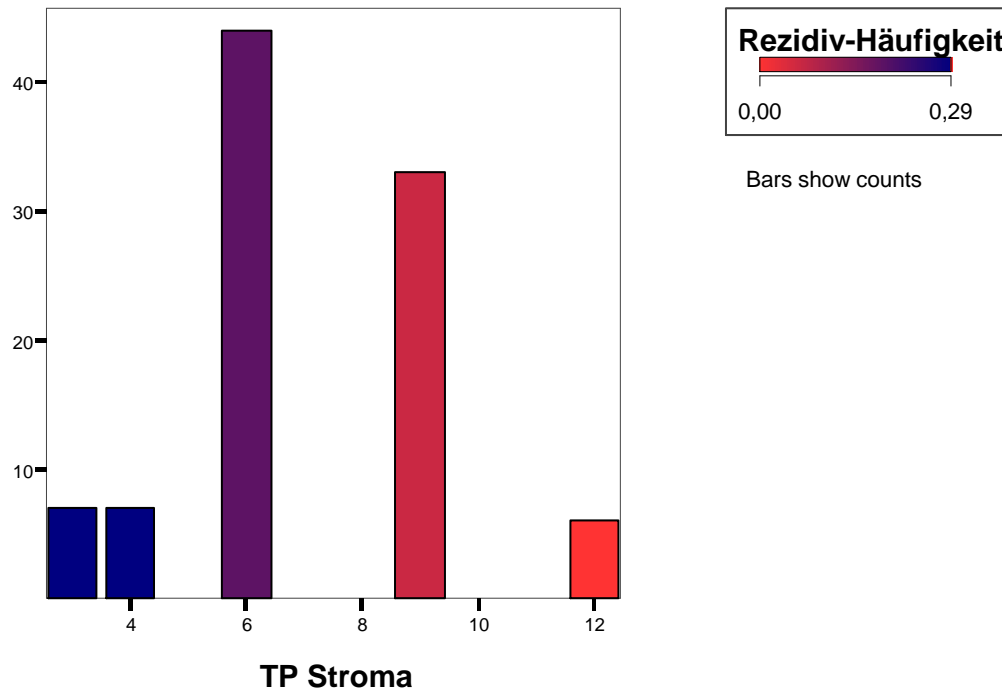


Abbildung 22

Balkendiagramm zur Korrelation zwischen Auftreten eines Rezidivs und dem TP-Stromawert:

0 % der Patienten mit einem hohem TP-Stroma-Wert (Score 12) erlitten ein Tumorrezidiv, während maximal 29% der Patienten mit niedrigeren TP-Stroma-Werten ein Rezidiv entwickelten.

3. Der Gesamt-DPD-Wert korreliert positiv mit dem rezidivfreien Überleben ($p = 0,044$), d.h. hohe Gesamt-DPD-Werte sind mit einer höheren rezidivfreien Überlebensrate assoziiert.

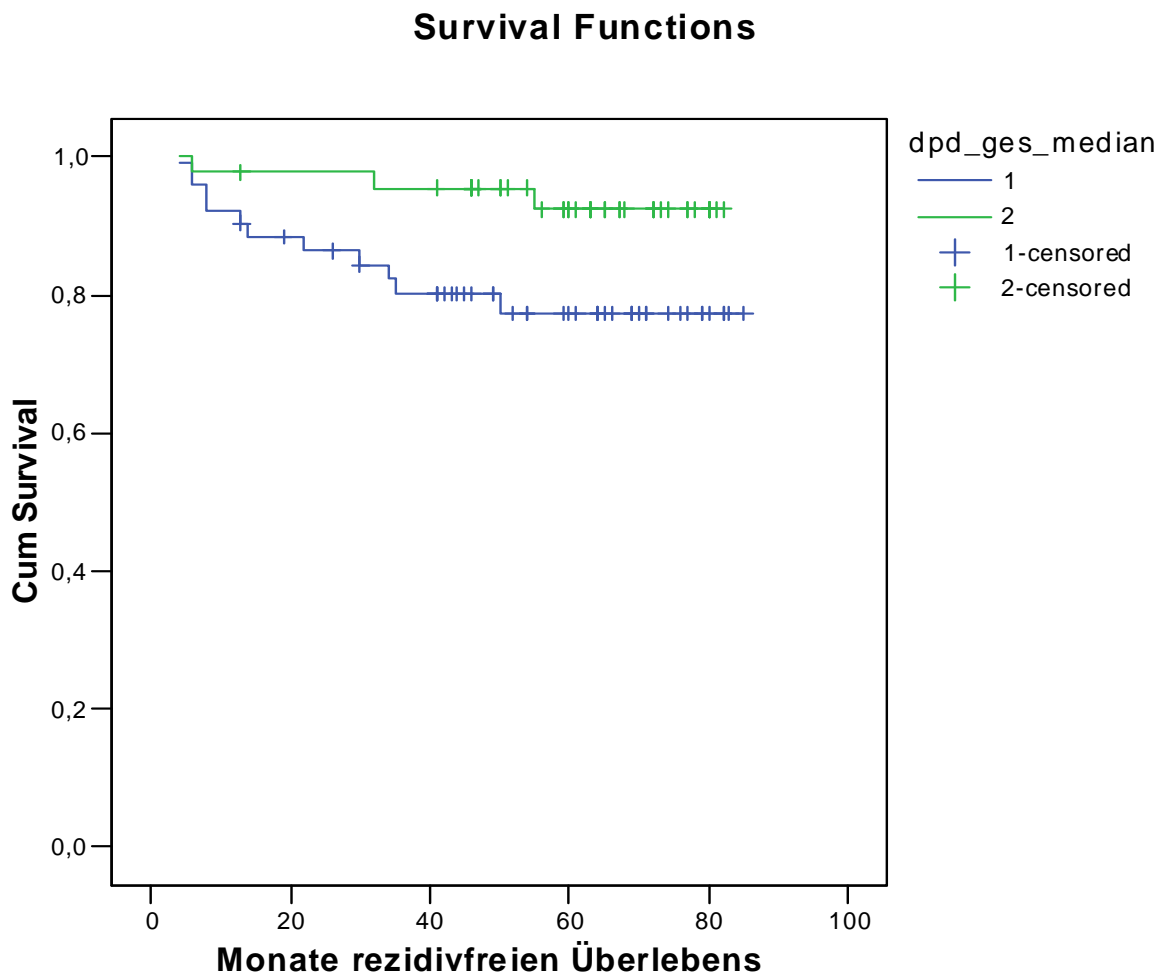


Abbildung 23

Die Kaplan-Meier-Überlebenskurve für DPD-Gesamt-Wert zeigt einen Überlebensvorteil für Patienten mit einem hohen DPD-Gesamt-Wert (grün) gegenüber Patienten mit einem niedrigen DPD-Gesamt-Wert (blau).

4. Der Stroma-DPD-Wert korreliert negativ mit dem Dukes-Stadium ($p = 0,027$), d.h. hohe Stroma-DPD-Werte wurden gehäuft bei niedrigen Dukes-Stadien beobachtet.

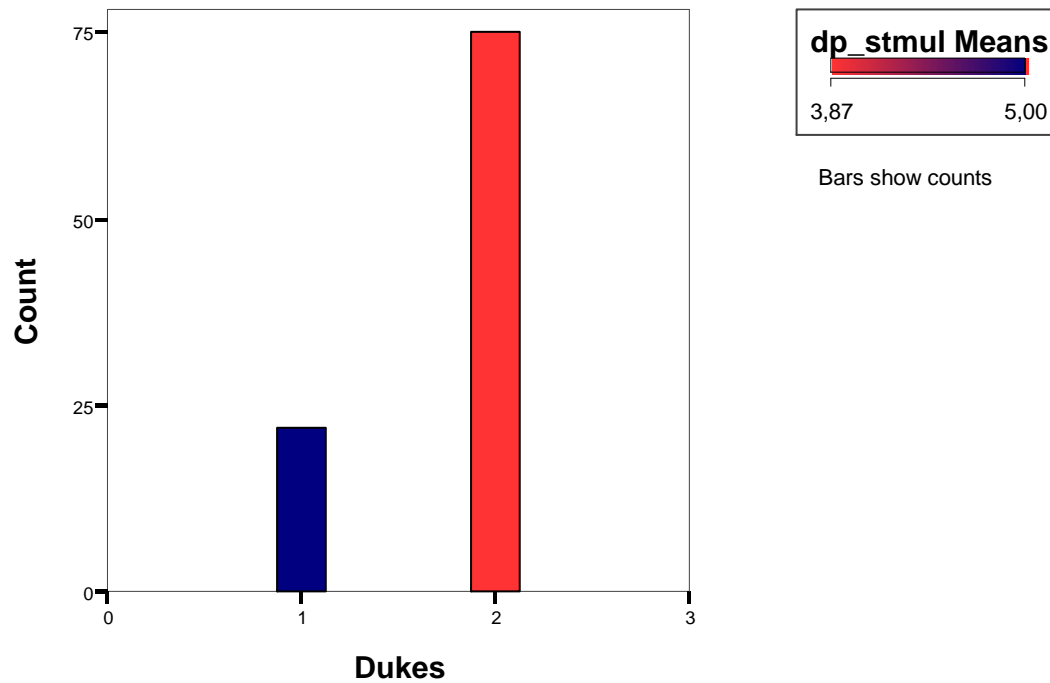


Abbildung 24

Balkendiagramm zur Korrelation zwischen Stroma-DPD-Wert und Dukes Stadium:

Tumoren des Dukes-Stadium 1 zeigen durchschnittliche einen DPD-Stroma-Wert von 5,0, während CRC des Dukes-Stadium 2 einen niedrigeren DPD-Stroma-Wert von 3,87 zeigen.

Neben diesen Korrelationen konnten folgende weitere statistisch signifikante Korrelationen beobachtet werden:

5. Das pT-Tumorstadium ist in den proximalen Darmabschnitten (rechtes Hemicolon) höher als in den distalen ($p = 0,000$).

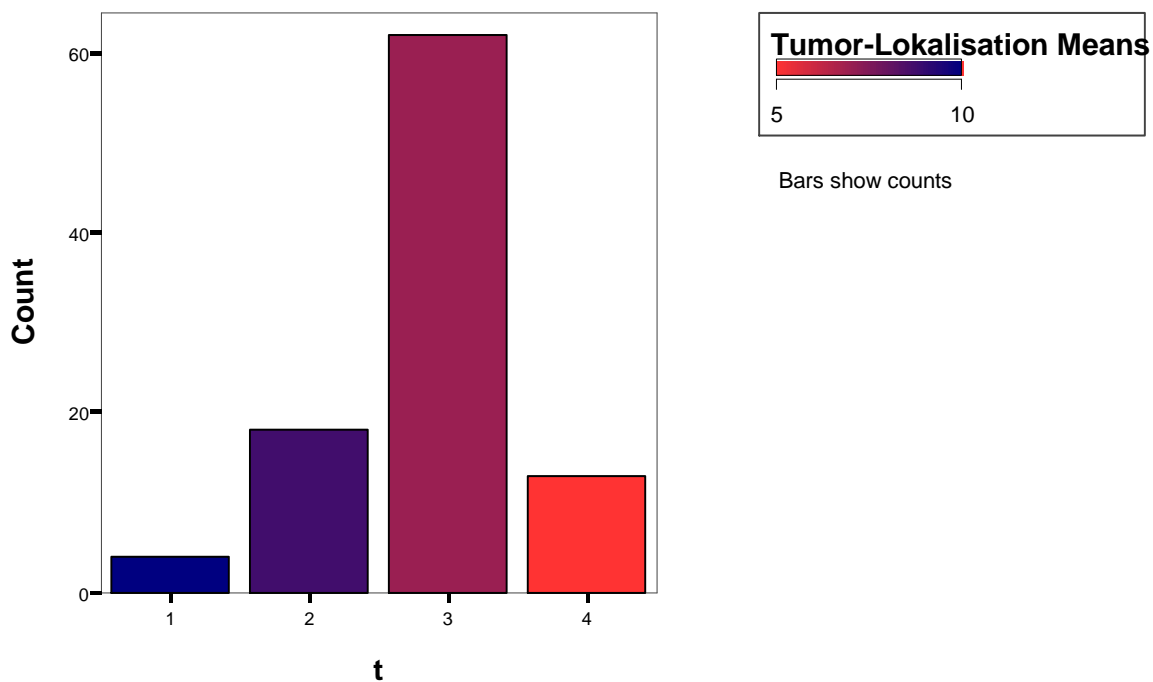


Abbildung 25

Balkendiagramm zur Korrelation der Tumorlokalisierung zum T-Stadium:

T1-Tumoren zeigen sich gehäuft distal (Coecum entspricht Lokalisation 1, distales Rectum 15) mit einer durchschnittlichen Lokalisation von 10, während sich T4-Tumoren deutlich gehäuft proximal mit einer durchschnittlichen Lokalisation von 5 zeigen.

6. Ein hoher Stromaanteil des Tumorgewebes ist ein prognostisch ungünstiger Faktor bezüglich des Tumorrezidivs ($p = 0,011$) und des tumorbedingten Todes ($p = 0,001$).

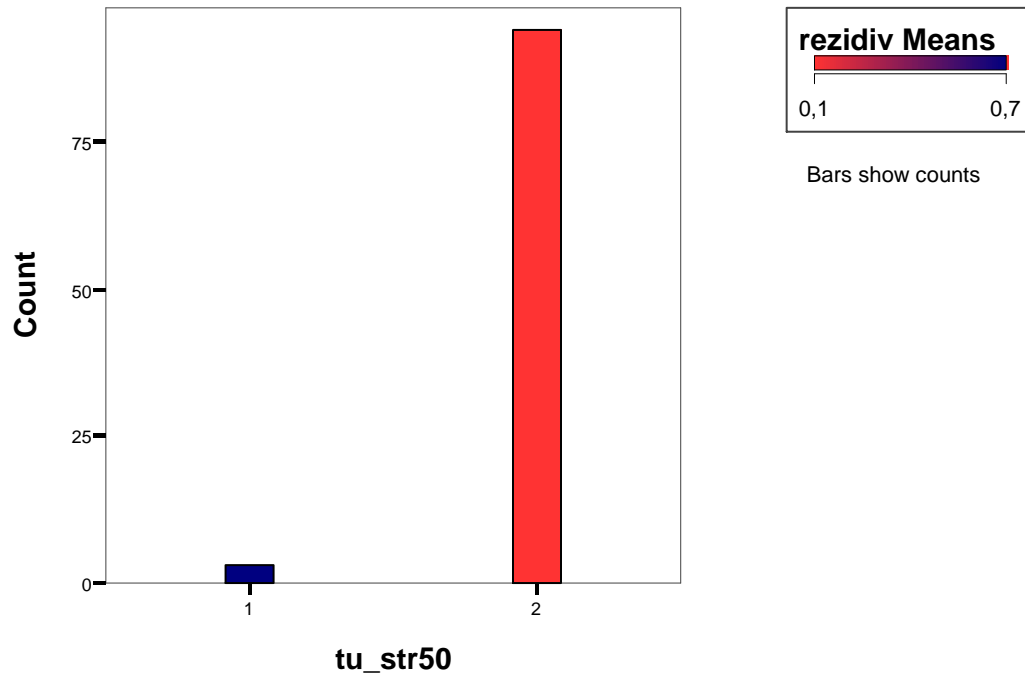


Abbildung 26

Balkendiagramm zur Korrelation von Rezidiv zum Verhältnis Tumor/Stroma:

10 % der Patienten mit einem Tumor/Stromaverhältnis von > 50 % ($tu_str\ 50 = 2$) entwickelten ein

Tumorrezidiv, während 70 % der Patienten mit einem Tumor/Stromaverhältnis von ≤ 50 % ($tu_str50 = 1$) ein Tumorrezidiv entwickelten.

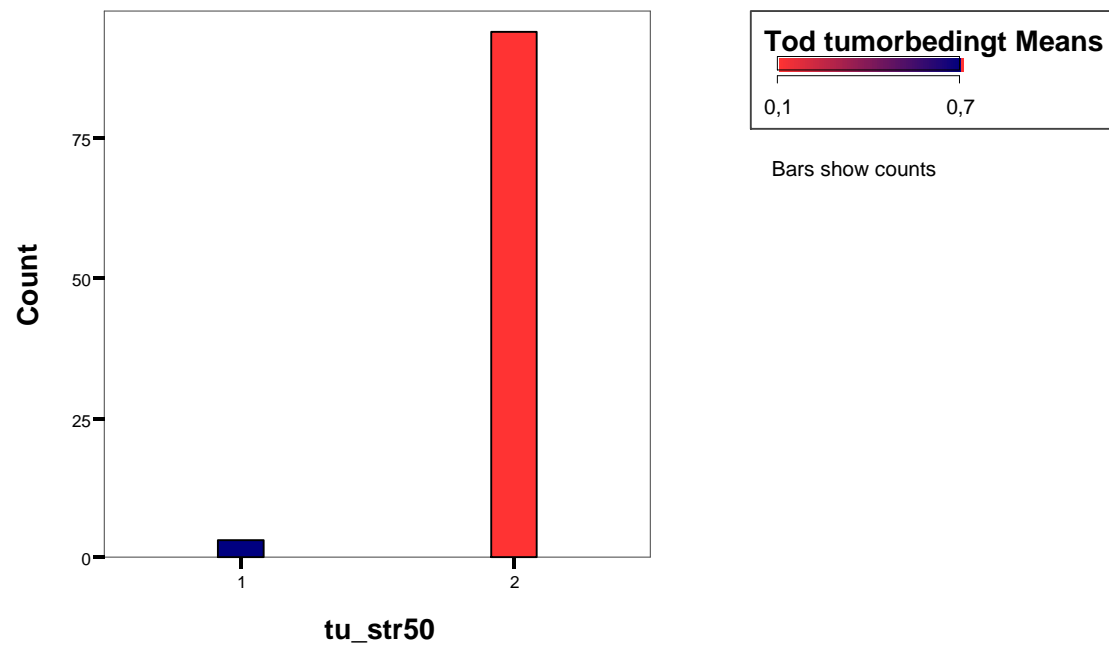


Abbildung 27

Balkendiagramm zur Korrelation von tumorbedingtem Tod und dem Verhältnis Tumor/Stroma:

10 % der Patienten mit von > 50 % (tu_str 50 = 2) verstarben im Beobachtungszeitraum, während 70 % der Patienten mit einem Tumor/Stromaverhältnis von \leq 50 % (tu_str50 = 1) verstarben.

E. Diskussion

Prognosefaktoren sind eine wichtige Grundlage für onkologische Therapien. Der bedeutendste klinische Prognoseparameter Colorectaler Carcinome ist das Tumorstadium nach UICC. Er ist die Grundlage für die primäre Therapieauswahl und beruht auf der histopathologischen Beurteilung der Operationspräparate. Das Tumorstadium ist aber ein Surrogatmarker und hat alleine eine begrenzte prognostische Aussagefähigkeit, da die Patienten innerhalb definierter Prognosegruppen variable Krankheitsverläufe zeigen. Für individualisierte Therapieentscheidungen sind in Zukunft bessere, speziell molekulare Parameter, erforderlich.

Die Enzyme Thymidylat Synthase (TS), Thymidin Phosphorylase (TP) und Dihydropyrimidin Phosphorylase (DPD) wurden erstmals vor über 30 Jahren bezüglich ihres Einflusses auf die Wirksamkeit einer Chemotherapie hin untersucht, TP 1978 (Weber, 1978), TS 1973 (Friedkin, 1973) und DPD 1988 (Harris, 1988). In der Folge wurden sie als mögliche direkte Zielmoleküle einer Tumorthherapie identifiziert, da sie Schlüsselfunktionen im Pyrimidinmetabolismus und damit einem zentralen Zellstoffwechsel besitzen, der Angriffspunkt verschiedener Chemotherapeutika und speziell des 5-FU ist (Bollag, 1957). Die Erkenntnisse aus diesen langjährigen Untersuchungen haben aber bis heute keinen Eingang in die klinischen Routine gefunden, nicht zuletzt, weil es keine prospektiven Studien zur klinischen Relevanz gibt.

Darüber hinaus fanden sich bereits Mitte der 90-er Jahre konkrete Hinweise auf ihre mögliche Bedeutung als Prognoseparameter Colorectaler Carcinome (Sanguedolce, 1995; Takebayashi, 1996; Nita, 1998). Diese Daten beruhen auf ELISA Untersuchungen und immunohistochemischen Untersuchungen sowie auch der quantitativen RT-PCR (Sanguedolce, 1998; Edler, 2000; Paradiso, 2000; Takenoue, 2000; Allegra, 2002).

Das Ziel unserer retrospektiven Studie war die Evaluierung der drei Proteine TS, TP und DPD als Prognosefaktoren Colorectaler Carcinome. Ihre Expression wurde auf Proteinebene mit

Hilfe einer semiquantitativen Immunhistochemie untersucht. Um die Auswirkung möglicher weiterer Einflussfaktoren auf die Prognose so weit wie möglich auszuschalten wurde ein möglichst homogenes Kollektiv ausgewählt. Dieses Studienkollektiv umfaßte 97 Patienten mit nodal-negativen Colorectalen Carcinomen, die ausschließlich operativ behandelt worden waren und die aufgrund ihres Tumorstadiums keine weitere adjuvante Therapie erhalten hatten. Wir entschieden uns für die Immunhistochemie als Nachweismethode, da sie wesentliche Vorteile vor der ELISA und der quantitativen RT-PCR bietet. Die Immunhistochemie ermöglicht die genaue Analyse der Enzymlokalisierung und die getrennte Analyse der Tumorzellen und des Tumorstromas, sie ist gut standardisierbar, sie ist an paraffinfixiertem Gewebe (FFPET) einsetzbar, sie ist allen Pathologien verfügbar und relativ kostengünstig.

Die Immunhistochemie bietet die Möglichkeit der semiquantitativen Analyse, die ausreichend präzise sein kann, um therapeutisch relevante Schwellenwerte zu definieren, wie bisher für die Steroidrezeptoren und HER-2 beim Mammakarzinom gezeigt (Wolff, 2007).

Die Immunhistochemie wurde zwar in bislang publizierte Studien schon verwendet, eine vergleichbar differenzierte qualitative und quantitative Analyse, wie sie hier vorgestellt wird, wurde aber in diesen Arbeiten nicht eingesetzt (s.u.). Voraussetzung dafür war zunächst die Etablierung der verwendeten Antikörper und Färbeprotokolle. Eine besondere Herausforderung war die Quantifizierung der Färbungen, da bislang in der Routinediagnostik quantifizierte Antigene entweder nukleär (Steroidrezeptoren) oder membranär (HER-2) vorliegen, während TS, TP und DPD zytoplasmatisch lokalisiert sind.

Analog der von Remmele und Stegner etablierten Methode zur semiquantitativen Beurteilung der Immunhistochemie (Remmele, 1987) wurde dabei im ersten Schritt der prozentuale Anteil gefärbter Zellen bestimmt und im zweiten Schritt der vorherrschende Intensitätsgrad gefärbter Zellen festgelegt (vgl. B.II.3 Tabelle 13). Die Auswertung wurde getrennt für die Tumorzellen und die Stromazellen vorgenommen. Um zusätzlich einen Gesamtwert für den

Tumor zu bestimmen, wurde eine Summenformel entwickelt, die eine Berechnung aus den zuvor ermittelten Werten erlaubte.

Unsere Analyse zeigte eine Spannweite der immunhistochemisch nachgewiesenen Expression der drei Enzyme über den gesamten theoretisch möglichen Bereich. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Literaturdaten (Metzger, 1998; Mori, 2000; Iqbal, 2001). Eine lineare Beschreibung der Färbewerte ist damit allerdings nicht gegeben, da nicht alle Werte zwischen 0 und 12 (Einzelwerte Tumor und Stroma) bzw. zwischen 0 und 60 (Gesamtwert nach der Summenformel

$T/S \times T^P \times T^I + (1-T/S) \times S^P \times S^I$) vertreten sind.

Eine lineare Verteilung von Meßwerten ist für statistische Analysen ideal. Dies ist also theoretisch ein möglicher Nachteil der Immunhistochemie gegenüber echt quantitativen Methoden wie ELISA und q-RT-PCR (Lassmann, 2002).

Im Vergleich zu unserer Methode wurden in den publizierten Studien zu TS, TP und DPD bei der Beurteilung der immunhistochemischen Färbung die Gewebeschnitte „summarisch“ als Ganzes beurteilt (Yoshimura, 1990; Evrard, 1999; Evrard, 1999; Haqqani, 1999). In all diesen Studien wird nicht nach den angefärbten Gewebekomponenten differenziert. Es wird jeweils die Anfärbung des Tumors abgeschätzt, ohne zu berücksichtigen, welche Zellen eines Tumors sich anfärben, ob es sich also um Stromazellen oder Tumorzellen im eigentlichen Sinne handelt. Dazu werden unterschiedliche Scores verwendet, manche Autoren geben lediglich eine zweistufige Graduierung an und unterscheiden dabei rein deskriptiv zwischen „fokaler“ und „diffuser“ Anfärbung (Johnston, 1995), während andere die Graduierung nach prozentualen Werten vornehmen, wobei die Anfärbung z.B. von bis zu 25 % oder auch 30 % eines Tumors als fokale Anfärbung und eine darüber liegende als diffuse Anfärbung bezeichnet wird (Johnston, 1994; Pestalozzi, 1997; Miyamoto, 2000). Differenziertere Bewertungen unterscheiden bis zu fünf (Fox, 1996; Leek, 1998; Takenoue, 2000; Katsumata, 2001) oder sogar sechs Stufen (Takenoue, 2000). Eine Begründung für das jeweilige

Vorgehen wird meist nicht angegeben, nur vereinzelt wird der Verzicht auf eine getrennte Bewertung von Tumorzellen und Stromazellen damit begründet, dass die immunhistochemische Färbung für ein Protein (etwa DPD) in Tumorzellen und Stromazellen in den einzelnen Tumoren immer gleich stark ausfällt (Uetake, 1999; Miyamoto, 2000). Dies können wir aber nach unserer Analysen so nicht bestätigen (siehe Rohdaten in der Anlage). Auch die Bewertung der Färbeintensität ist in der Literatur sehr uneinheitlich. Manche Autoren verwenden eine vierstufige Skala einschließlich eines Null-Wertes (Johnston, 1994; Fox, 1996; Pestalozzi, 1997; Miyamoto, 2000) andere Studien verwenden mehr als vier Stufen (Cascinu, 1999; Cascinu, 2000; Takenoue, 2000), oder weniger (Suda, 1999; Suda, 1999; Takenoue, 2000). Uneinheitlich zwischen den Studien ist auch das Vorgehen in der Beurteilung von Fällen, in denen verschiedene Zellen (Tumorzellen und Stromazelle) unterschiedlich stark angefärbt sind. Manche Autoren bewerten in solchen Fällen die am stärksten angefärbten Zellen (Aschele, 1999), andere wiederum legen einen „Durchschnittswert“ fest (Fox, 1996). Aus der Literatur gab es Hinweise, dass es biologisch von Bedeutung sein könnte, welche Zellen in einem Tumor die drei Enzyme exprimieren. So wurde in vitro ein sogenannter by-stander-effekt von Stromazellen beschrieben, die die Tumorzellen umgeben (Evrard, 1999). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Quantifizierung derart differenziert vorgenommen. Nur so bietet sich z.B. auch die Möglichkeit, immunhistochemische Daten mit den genannten quantitativen Methoden zu vergleichen (qRT-PCR), dieser Ansatz wurde auch in einer parallel durchgeführten Studie untersucht (Lassmann, 2006).

Voraussetzung für eine semiquantitative Auswertung der Immunhistochemie ist eine standardisierte Ausführung und eine optimale Färbung. Darunter ist eine Färbung zu verstehen, die so intensiv ist, dass das gesamte Spektrum der Färbintensitäten dargestellt wird, bei Fehlen einer unspezifischen (Hintergrund-) Färbung. Darüber hinaus sollte eine optimale

Färbung und ein optimales Färbprotokoll so sensitiv wie möglich sein, das heißt in der Praxis, dass eine möglichst geringe Konzentration eines Antikörpers ausreicht, um eine maximale positive Färbung zu erreichen. Die bestehende Literatur macht bezüglich derartiger Optimierungen allerdings meist keine Angaben.

Wir haben die Färbungen in vielfacher Weise standardisiert. Alle Färbungen wurden mit einheitlichen Chargen der Antikörper gefärbt. Als Detektionssysteme wurden nur fertig konfektionierte Fertigreagenzien („kits“) verwendet. Alle Färbungen wurden auf einem Färbeautomaten in Serien durchgeführt. Es wurden externe Kontrollen auf jedem Objektträger als sog. „on-slide-Kontrolle“ als TMA mitgeführt. So konnte gewährleistet werden, dass auch minimale Schwankungen in der Färbequalität, die die quantitative Aussage beeinflussen, erkennbar waren. Nur konstante Färbungen wurden für die Auswertung zugelassen. Dies war bei Durchführung der Studie ein Novum. Damit war auch eine Vergleichbarkeit zwischen den verschiedenen Tumoren möglich. Zusätzlich lagen in allen Tumorpräparaten endogene Kontrollen für die schwächste Färbintensität vor in Form der glatten Muskulatur der Darmwand. Damit war es auch möglich, die Schnittdicke als Einflussfaktor für die Färbintensität auszuschließen. TS, TP und DPD zeigen, anders als andere quantifizierte Färbungen (Steroidrezeptoren und HER-2), eine zytoplasmatisch lokalisierte Färbung, bei der die Schnittdicke nach unseren Ergebnissen einen wesentlichen Einfluss auf die Färbintensität hat („Schnittickenphänomen“). Negative Färbungen können in Einzelfällen aber das Resultat biologischer Phänomene sein und nicht ein Färbartefakt. Speziell für DPD sind Genpolymorphismen beschrieben, die zu einem kompletten Expressionsverlust führen, der sog. DPD Defizienz, dies liegt etwa bei einem von 72 Patienten vor (Ridge, 1998). Klinisch werden die Patienten u.U. mit letalen Nebenwirkungen unter einer 5-FU-Chemotherapie auffällig (Milano, 1994).

Durch die aufwendige Austestung verschiedener Antikörper und die Austestung verschiedener Vorbehandlungsmethoden und Detektionssysteme konnte das Ziel einer

standardisierten Immunhistochemie erreicht werden. Derart vergleichende Daten waren aus der Literatur nicht verfügbar.

Bei der hitzeinduzierten Vorbehandlung wurde bei TS und TP auf den „Steamer“ (Dampfgarer) zurückgegriffen, da diese Methode sehr gut standardisierbar ist. Nur das Wasserbad ist bezüglich der Standardisierbarkeit dem Steamer überlegen, ist aber meist die ineffizienteste Methode, da nur Temperaturen $< 100^{\circ}\text{C}$ erreichbar sind. Der Dampfdrucktopf verwendet zusätzlich noch das Druckprinzip und erreicht damit höhere Temperaturen („superheating“).

Da die Protease-Vorbehandlung („PIER“) die im Vergleich schlechtesten Ergebnisse erzielte und sie gleichzeitig die Methode ist, die am schwierigsten standardisierbar ist, war sie für diese Antikörper gegenüber den HIER-Methoden keine gute Alternative.

Eine Blockierung des endogenen Biotin war bei dem biotinbasierten Detektionssystem (LSAB) zwingend erforderlich, da ohne diese Blockierung eine starke Hintergrundreaktion bestand. Die direkte Immunhistochemie mit primär konjugierten Antikörpern war, wie zu erwarten war, nicht realisierbar, da sie nicht ausreichend sensitiv war, der direkte Nachweis gelingt meist nur mit der Immunfluoreszenz, diese wäre aber methodisch keine Alternative gewesen, da sie keine optimale morphologische Beurteilung erlaubt, was aber Voraussetzung zur Beurteilung der Studienfragen war.

Thymidin Phosphorylase ist ein Enzym, das immunhistochemisch sowohl im Zytoplasma, wie auch im Kern lokalisiert ist (Yoshimura, 1990; Fox, 1995; Leek, 1998; Shomori, 1999). Wir konnten beide Expressionsmuster von TP in Stromazellen und Tumorzellen nachweisen. Unter den Stromazellen sind besonders die Makrophagen hervorzuheben, die immer eine maximale Färbung (Score 3) zeigten (Yoshimura, 1990; Shomori, 1999). Demgegenüber war die Färbeintensität der Tumorzellen variabel (Score 0-3). Auch Normalgewebe, wie unsere Positivkontrolle Lebergewebe, zeigte eine intensive Färbung von Kupffer Zellen als ortsspezifischen Makrophagen und eine schwächere Färbung von Hepatozyten (Yoshimura, 1990). Auch nicht-neoplastisches Gewebe, wie entzündliches Granulationsgewebe mit einem

hohen Gehalt von Makrophagen zeigt immunhistochemisch eine starke Positivität von TP (Brown, 1998).

In unserer Studie korreliert ein niedriger Stromawert von Thymidin Phosphorylase („TP Gesamt“) mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für ein Tumorrezidiv (Lokalrezidiv). TP korreliert aber nicht mit der Überlebensrate. Diese Korrelation erwies sich als unabhängig vom UICC Stadium und der Graduierung des Tumors. In der Literatur wird von anderen Gruppen, passend zu unseren Ergebnissen, die hohe Expression von TP mit einer günstigen Prognose korreliert (Saito, 2000; Tsuji, 2004) bzw. auch mit einer niedrigeren Rate von hämatogenen und lymphogenen Metastasierungen korreliert (Saito, 2000). Eine mögliche, wenn auch hypothetische Erklärung bietet Saito et al., die diskutieren, dass intratumorale Makrophagen vor allem eine wichtige immunologische Bedeutung haben, die gegenüber der angiogenetischen Funktion von TP im Vordergrund steht (Saito, 2000). Dies widerspricht der Meinung anderer Autoren, die die Angiogenesefunktion von TP als Prognosefaktor in den Vordergrund stellen (Tokunaga, 2002). TP kann aufgrund seiner angiogenetischen Wirkung das Tumorwachstum fördern (Takebayashi, 1996; Evrard, 1999), wobei es sich dabei um eine spezielle Tumorneoangiogenese handelt (Toi, 1995; Takebayashi, 1996; Engels, 1997; Schwartz, 1998; Shomori, 1999). Methodisch haben Saito et al., ähnlich wie wir, die TP Expression differenziert im Stroma und Tumor beurteilt, dies erklärt möglicherweise die abweichenden Resultate anderer Studien. Methodisch und inhaltlich davon völlig zu trennen sind neuere Studien, die TP im Serum von Patienten mit CRC untersuchten und diese mit der Prognose und dem Auftreten von Lebermetastasen korrelierten. Hohe TP Werte korrelieren dabei mit einer ungünstigen Prognose (Haraguchi, 2008). Über den Gehalt von TP im Tumor selbst gibt es aber in dieser Studie keine Daten, so dass diese Ergebnisse derzeit nicht weiter interpretiert werden können.

Thymidylat Synthase wird im Zytoplasma vieler Zellen der Normalgewebe exprimiert und immunhistochemisch nachgewiesen. Dazu gehört auch die glatte Muskulatur des Intestinaltraktes und der Blutgefäßen, Makrophagen (auch ortsspezifische), Granulozyten (Suda, 1999) und die Zentrozyten und Zentroblasten der Keimzentren (Kuniyasu, 1998), Leberepithelien (Johnston, 1992) sowie Fibroblasten (Johnston, 1992; Pestalozzi, 1997). TS zeigt nach unseren Ergebnissen eine starke Heterogenität der Färbung, nicht nur im Vergleich verschiedener Tumoren, sondern auch innerhalb eines Tumors. Dies wurden auch schon von anderen Autoren berichtet (Sanguedolce, 1998). Deshalb ist es umso wichtiger, die Auswertung so differenziert durchzuführen, wie sie in dieser Arbeit erfolgte.

Es ist nicht auszuschließen dass darin das besondere Problem der Untersuchung von TS in Tumoren liegt. In dieser Arbeit wurde eine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem TS-Gesamtwert und dem Gesamtüberleben gefunden. Dieses Ergebnis ist vergleichbar einer Studie von Sanguedolce, der eine positive Korrelation zwischen TS und dem Gesamtüberleben, sowie eine negative Korrelation zu Dukes-Stadium und Graduierung zeigen konnte (Sanguedolce, 1998).

Bei der statistischen Auswertung wurden von uns ebenfalls Werte ermittelt, die „knapp“ unterhalb der statistischen Signifikanz lagen. Diese Werte wurden von uns als nicht aussagefähig bewertet und nicht berichtet, obwohl es mittlerweile fast schon üblich ist, nicht signifikante Ergebnisse als „Tendenzen“ zu bezeichnen. Darauf wurde in dieser Arbeit bewusst verzichtet, weil es inhaltlich nicht korrekt ist. Statistische Korrelation sind Hypothesen, die auf mathematischen Berechnungen beruhen. Diesen Berechnungen werden Schwellenwerte zugrunde gelegt, die eine hohe, wenn gleich nicht absolute Wahrscheinlichkeit aufzeigen, dass Korrelationen nicht auf Zufällen, sondern auf tatsächlichen Zusammenhängen beruhen. Schließt man „Trendwerte“ mit ein, nimmt man in Kauf, Hypothesen mit einer unwahrscheinliche Korrelationen bzw. Korrelationen mit einer nur geringen Wahrscheinlichkeit zu formulieren. In Zahlen ausgedrückt, bedeutet eine Korrelation mit einer Signifikanz von $p \leq 0,05$, dass die Wahrscheinlichkeit einer zufälligen Übereinstimmung der korrelierten Parameter $\leq 5 \%$ beträgt. Alle Korrelationen außerhalb dieser Signifikanz, haben aber eine wesentlich geringere Wahrscheinlichkeit, nicht zufällig zu sein (Busch R., 2000).

Dihydropyrimidin Dehydrogenase ist das entscheidende Enzym des Pyrimidin-Katabolismus (Diasio, 1994), es reguliert damit zusammen mit TS und TP den Pyrimidinmetabolismus der Zellen. Die höchste „organgebundene“ DPD Expression besteht in der Leber, d.h. den Hepatozyten (Lu, 1992; Mori, 2000). Auch Makrophagen einschließlich der Kupffer-Zellen und auch Lymphozyten zeigen eine hohe Expression (Lu, 1993; McLeod, 1998; Johnston, 1999; Uetake, 1999; Miyamoto, 2000; Takenoue, 2000). Wir konnten zeigen, dass hohe gesamt DPD-Werte mit einem niedrigeren Tumorstadium und einer längeren rezidivfreien Überlebenszeit, jedoch nicht dem Gesamtüberleben korrelieren. Beim Magenkarzinom wurden identische Daten bereits berichtet bezüglich der Korrelation mit dem Tumorstadium (Takabayashi, 2000) und dem rezidivfreien Überleben (Ishikawa, 1999).

In dieser Arbeit wurden im Vergleich zu anderen Publikationen eine relativ aufwendige Methode der semiquantitativen immunhistochemischen Untersuchung vorgestellt.

Rechtfertigen die Ergebnisse diese Methodik, oder ist eine einfachere Analyse, wie sie in anderen Studien vorgenommen wurden, ausreichend?

Bei der Analyse von TS ist statistisch nur der Gesamt-Wert relevant, während für TP alleine der Stroma-Wert entscheidend ist. Bei DPD ist sowohl der Gesamt-Wert, wie auch der Stroma-Wert bedeutsam. Nach den vorgelegten Ergebnissen, scheint es also notwendig, die Immunhistochemie sehr differenziert zu analysieren. Dies betrifft nicht nur die Beurteilung der Färbeintensität, da für die Ermittlung des Gesamt-Wertes nach unserer Methode das Verhältnis der Tumorzellanteile zum Stromaanteil ermittelt werden muß, so dass auch diese differenzierte quantitative Auswertung unabhängig von der Beurteilung der Färbeintensität von Bedeutung ist.

Neben der Berücksichtigung der Einzelwerte von TS, TP und DPD wurde in der Literatur auch die Relation der Enzymexpression von Enzympaarungen (TS/DPD sowie TP/DPD) bei der Beurteilung berücksichtigt (Ishikawa, 1998; Kornmann, 2002). In unserer Studie ergaben sich aber diesbezüglich keine Korrelationen.

Es muß an dieser Stelle auch darauf hingewiesen werden, dass es nur einzelne Studien gibt, die die Prognose von TS, TP und DPD an Kollektiven untersuchen, die keine Chemotherapie erhalten hatten. Die drei Enzyme werden auch als prädiktive Parameter diskutiert, dass heißt, sie werden mit der Vorhersage eines Ansprechens auf Chemotherapie in Verbindung gebracht („Response“-Prädiktion). So sollen Tumoren mit hohe DPD-Werte schlecht auf eine Chemotherapie ansprechen (Beck, 1994; Nita, 1998; Miyamoto, 2000). Hohe TS Werte im Tumor sind bei chemotherapierten Colonicarcinomen mit einer guten Prognose vergesellschaftet (Johnston, 1994; Paradiso, 2000), einzelne Autoren zeigten allerdings auch bessere Remissionsraten bei niedrigen TS-Werten in untersuchten Lymphknotenmetastasen bei CRC (Aschele, 2000; Iqbal, 2001). Für TP wurde gezeigt, dass erhöhte TP-Werte zu einer erhöhten Ansprechrate einer 5-FU-basierten Chemotherapie führt (Fox, 1997; Evrard, 1999), aber auch das Gegenteil, also eine niedrigere Ansprechrate wurde beschrieben (Metzger, 1998; Salonga, 2000).

Daher vermischen sich bei der Analyse von TS, TP und DPD in chemotherapierten Kollektiven möglicherweise die prognostischen und die prädiktiven Aussagen. Die vorgelegte Studie zeichnet sich dadurch aus, dass sie ein sehr homogenes Patientenkollektiv umfaßt, das ausschließlich operiert worden war. Obwohl in diesem Kollektiv Patienten mit CRC der Tumorstadien pT1, pT2, pT3 und pT4 eingeschlossen waren, hatte das UICC Stadium keine

prognostische Aussagekraft in der retrospektiven Analyse über einen Nachbeobachtungszeitraum von median 63 Monaten (13-85).

Es handelt sich bei den dargestellten Korrelationen von TS, TP und DPD um statistisch unabhängige Prognoseparameter. Diese Ergebnisse erhärten die Hypothese, dass TS, TP und DPD in bestimmten Tumorstadien neben der etablierten UICC Klassifikation unabhängige prognostische Parameter für CRC sein könnten.

F. Zusammenfassung

In dieser Dissertation wurde in einer retrospektiven Studie die prognostische Bedeutung der Proteinexpression von Thymidylat Synthase, Thymidin Phosphorylase und Dihydropyrimidin Dehydrogenase in Colorectalen Carcinomen der UICC Stadien I und II untersucht, die ausschließlich operativ behandelt worden waren. Das Kollektiv umfasste 97 Patienten mit einem Altersmedian von 65 Jahren (26-87 Jahre), darunter 61 Männer (62,9 %) und 36 Frauen (37,1 %) mit einem medianen Beobachtungszeitraum von 63 Monaten (13-85 Monate). 22 Patienten (27,2 %) befanden sich im UICC Stadium I [pT1 4 (4,1 %), pT2 18 (18,6 %)], 75 (77,3 %) im Stadium II [pT3 62 (63,9 %), pT4 13 (13,4 %)]. 61 (62,9 %) der Tumore waren im Kolon lokalisiert, 36 (37,1 %) im Rektum. In dem Beobachtungszeitraum erkrankten 14 Patienten (14,4 %) an einem Rezidiv, davon verstarben 10 Patienten (10,3 %).

Die Proteinexpression von TS, TP und DPD wurden mittels semiquantitativer Immunhistochemie an Formalin-fixiertem Paraffingewebe ermittelt. Es erfolgte dabei eine getrennte Beurteilung von Tumorzellen und Stromazellen, zusätzlich wurde ein Gesamtwert für die Proteinexpressionen berechnet.

Die statistischen Tests nach Mann-Whitney und Spearman zeigten folgende Korrelationen:

1. Patienten mit hohen Werten TS-Gesamt-Werten haben ein längeres Gesamtüberleben ($p = 0,05$).
2. Patienten mit niedrigen TP-Werten im Stroma haben signifikant häufiger ein Rezidiv ($p = 0,017$).
3. Patienten mit hohen DPD-Werten für das Gesamtpräparat erwartet ein längeres rezidivfreies Überleben ($p = 0,044$). Diese Patienten haben auch ein niedrigeres UICC/Dukes-Stadium ($p = 0,027$).
4. Patienten mit einem niedrigen Tumor-/Stromaverhältnis ($\leq 50\%$) entwickeln häufiger ein Rezidiv ($p = 0,011$) und sterben häufiger im Beobachtungszeitraum ($p = 0,001$) als Patienten mit einem hohen Tumor/Stromaverhältnis ($> 50\%$).

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass TS, TP und DPD unabhängige Prognosefaktoren nodal-negativer CRC sein können.

G. Literaturverzeichnis

- Aarnio, M., J. P. Mecklin, L. A. Aaltonen, M. Nystrom-Lahti and H. J. Jarvinen. Life-time risk of different cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) syndrome. *Int J Cancer* 64(6) 1995: 430-3.
- Allegra, C. J., A. L. Parr, L. E. Wold, M. R. Mahoney, D. J. Sargent, P. Johnston, P. Klein, K. Behan, M. J. O'Connell, R. Levitt, J. W. Kugler, M. Tria Tirona and R. M. Goldberg. Investigation of the prognostic and predictive value of thymidylate synthase, p53, and Ki-67 in patients with locally advanced colon cancer. *J Clin Oncol* 20(7) 2002: 1735-43.
- Aschele, C., D. Debernardis, S. Casazza, G. Antonelli, G. Tunesi, C. Baldo, R. Lionetto, F. Maley and A. Sobrero. Immunohistochemical quantitation of thymidylate synthase expression in colorectal cancer metastases predicts for clinical outcome to fluorouracil-based chemotherapy. *J Clin Oncol* 17(6) 1999: 1760-70.
- Aschele, C., D. Debernardis, G. Tunesi, F. Maley and A. Sobrero. Thymidylate synthase protein expression in primary colorectal cancer compared with the corresponding distant metastases and relationship with the clinical response to 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res* 6(12) 2000: 4797-802.
- Beck, A., M. C. Etienne, S. Cheradame, J. L. Fischel, P. Formento, N. Renee and G. Milano. A role for dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidylate synthase in tumour sensitivity to fluorouracil. *Eur J Cancer* 10(22) 1994: 1517-22.
- Berger D. P., E. R., Mertelsmann R. *Das Rote Buch, Hämatologie und internistische Onkologie*. 2002: 593-603.
- Bollag, W. [Experimental studies on 5-fluorouracil, a cytostatic agent.]. *Schweiz Med Wochenschr* 87(26) 1957: 817-20.
- Bosman, F. T. Molecular pathology of colorectal cancer. *Cytogenet Cell Genet* 86(2) 1999: 112-7.
- Bosman, F. T. and F. Joris. [Molecular pathology of colorectal cancer]. *Rev Med Suisse Romande* 119(10) 1999: 775-82.
- Brown, N. S. and R. Bicknell. Thymidine phosphorylase, 2-deoxy-D-ribose and angiogenesis. *Biochem J* 334(Pt 1) 1998: 1-8.
- Buecher, B., D. Bouancheau, A. Broquet, S. Bezieau, M. G. Denis, C. Bonnet, M. F. Heymann, A. Jarry, J. P. Galmiche and H. M. Blottiere. Growth inhibitory effect of celecoxib and rofecoxib on human colorectal carcinoma cell lines. *Anticancer Res* 25(1A) 2005: 225-33.
- Busch R., F. B., Hennig M. (2000). *SPSS Statistic-Software-Kurs für Mediziner*, Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie der Technischen Universität München.
- Carethers, J. M., E. J. Smith, C. A. Behling, L. Nguyen, A. Tajima, R. T. Doctolero, B. L. Cabrera, A. Goel, C. A. Arnold, K. Miyai and C. R. Boland. Use of 5-fluorouracil and survival in patients with microsatellite-unstable colorectal cancer. *Gastroenterology* 126(2) 2004: 394-401.
- Cascinu, S., C. Aschele, S. Barni, D. Debernardis, C. Baldo, G. Tunesi, V. Catalano, M. P. Staccioli, A. Brenna, P. Muretto and G. Catalano. Thymidylate synthase protein expression in advanced colon cancer: correlation with the site of metastasis and the clinical response to leucovorin-modulated bolus 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res* 5(8) 1999: 1996-9.
- Cascinu, S., V. Catalano, C. Aschele, S. Barni, D. Debernardis, L. Gallo, R. Bandelloni, M. P. Staccioli, A. M. Baldelli, A. Brenna, A. Valenti, P. Muretto and G. Catalano. Immunohistochemical determination of p53 protein does not predict clinical response in advanced colorectal cancer with low thymidylate synthase expression receiving a bolus 5-fluorouracil-leucovorin combination. *Ann Oncol* 11(8) 2000: 1053-6.

- Catalano, V., A. M. Baldelli, P. Giordani and S. Cascinu. Molecular markers predictive of response to chemotherapy in gastrointestinal tumors. *Crit Rev Oncol Hematol* 38(2) 2001: 93-104.
- Ch. Wittekind, H. J. M., F. Bootz (2003). TNM Klassifikation maligner Tumoren, International Union against cancer UICC.
- Choi, S. W., K. J. Lee, Y. A. Bae, K. O. Min, M. S. Kwon, K. M. Kim and M. G. Rhyu. Genetic classification of colorectal cancer based on chromosomal loss and microsatellite instability predicts survival. *Clin Cancer Res* 8(7) 2002: 2311-22.
- Costa, A. F., G. B. Sander and P. D. Picon. Cetuximab in colon cancer. *N Engl J Med* 351(15) 2004: 1575-6; author reply 1575-6.
- Culy, C. Bevacizumab: antiangiogenic cancer therapy. *Drugs Today (Barc)* 41(1) 2005: 23-36.
- Diasio, R. B., A. B. Van Kuilenburg, Z. Lu, R. Zhang, H. Van Lenthe, H. D. Bakker and A. H. Van Gennip. Determination of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) in fibroblasts of a DPD deficient pediatric patient and family members using a polyclonal antibody to human DPD. *Adv Exp Med Biol* 370 1994: 7-10.
- Edler, D., M. Hallstrom, P. G. Johnston, I. Magnusson, P. Ragnhammar and H. Blomgren. Thymidylate synthase expression: an independent prognostic factor for local recurrence, distant metastasis, disease-free and overall survival in rectal cancer. *Clin Cancer Res* 6(4) 2000: 1378-84.
- Edler, D., U. Kressner, P. Ragnhammar, P. G. Johnston, I. Magnusson, B. Glimelius, L. Pahlman, G. Lindmark and H. Blomgren. Immunohistochemically detected thymidylate synthase in colorectal cancer: an independent prognostic factor of survival. *Clin Cancer Res* 6(2) 2000: 488-92.
- Engels, K., S. B. Fox, R. M. Whitehouse, K. C. Gatter and A. L. Harris. Up-regulation of thymidine phosphorylase expression is associated with a discrete pattern of angiogenesis in ductal carcinomas in situ of the breast. *J Pathol* 182(4) 1997: 414-20.
- Evrard, A., P. Cuq, J. Ciccolini, L. Vian and J. P. Cano. Increased cytotoxicity and bystander effect of 5-fluorouracil and 5-deoxy-5-fluorouridine in human colorectal cancer cells transfected with thymidine phosphorylase. *Br J Cancer* 80(11) 1999: 1726-33.
- Evrard, A., P. Cuq, J. Ciccolini, L. Vian and J. P. Cano. Increased cytotoxicity and bystander effect of 5-fluorouracil and 5-deoxy-5-fluorouridine in human colorectal cancer cells transfected with thymidine phosphorylase. *Br J Cancer* 80(11) 1999: 1726-33.
- Evrard, A., P. Cuq, B. Robert, L. Vian, A. Pelegri and J. P. Cano. Enhancement of 5-fluorouracil cytotoxicity by human thymidine-phosphorylase expression in cancer cells: in vitro and in vivo study. *Int J Cancer* 80(3) 1999: 465-70.
- Fox, S. B., K. Engels, M. Comley, R. M. Whitehouse, H. Turley, K. C. Gatter and A. L. Harris. Relationship of elevated tumour thymidine phosphorylase in node-positive breast carcinomas to the effects of adjuvant CMF. *Ann Oncol* 8(3) 1997: 271-5.
- Fox, S. B., A. Moghaddam, M. Westwood, H. Turley, R. Bicknell, K. C. Gatter and A. L. Harris. Platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase expression in normal tissues: an immunohistochemical study. *J Pathol* 176(2) 1995: 183-90.
- Fox, S. B., M. Westwood, A. Moghaddam, M. Comley, H. Turley, R. M. Whitehouse, R. Bicknell, K. C. Gatter and A. L. Harris. The angiogenic factor platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase is up-regulated in breast cancer epithelium and endothelium. *Br J Cancer* 73(3) 1996: 275-80.
- Friedkin, M. Thymidylate synthetase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 38 1973: 235-92.
- Giovannucci, E. The prevention of colorectal cancer by aspirin use. *Biomed Pharmacother* 53(7) 1999: 303-8.

- Grem, J. L., D. F. Hoth, J. M. Hamilton, S. A. King and B. Leyland-Jones. Overview of current status and future direction of clinical trials with 5-fluorouracil in combination with folinic acid. *Cancer Treat Rep* 71(12) 1987: 1249-64.
- Guimbaud, R., S. Guichard, C. Dusseau, V. Bertrand, T. Aparicio, I. Lochon, E. Chatelut, D. Couturier, R. Bugat, S. Chaussade and P. Canal. Dihydropyrimidine dehydrogenase activity in normal, inflammatory and tumour tissues of colon and liver in humans. *Cancer Chemother Pharmacol* 45(6) 2000: 477-82.
- Hamilton, S. R., B. Liu, R. E. Parsons, N. Papadopoulos, J. Jen, S. M. Powell, A. J. Krush, T. Berk, Z. Cohen, B. Tetu and et al. The molecular basis of Turcot's syndrome. *N Engl J Med* 332(13) 1995: 839-47.
- Haqqani, A. S., R. T. Cowling, J. A. Maroun and H. C. Birnboim. Characterization of a polyclonal antibody to human thymidylate synthase suitable for the study of colorectal cancer specimens. *J Histochem Cytochem* 47(12) 1999: 1563-74.
- Haraguchi, M., K. Komuta, T. Ueda, A. Akashi, S. Minami, J. Furui and T. Kanematsu. Prognostic significance of the serum thymidine phosphorylase levels in venous blood drainage specimens in patients with colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 55(82-83) 2008: 418-21.
- Harris, B. E., R. L. Song, Y. J. He, S. J. Soong and R. B. Diasio. Circadian rhythm of rat liver dihydropyrimidine dehydrogenase. Possible relevance to fluoropyrimidine chemotherapy. *Biochem Pharmacol* 37(24) 1988: 4759-62.
- HUGO (2008). www.genenames.org. HUGO Gene Nomenclature Committee, EMBL Outstation - Hinxton, European Bioinformatics Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge, CB101SD, UK. 07.08.2008
- Iqbal, S. and H. J. Lenz. Determinants of prognosis and response to therapy in colorectal cancer. *Curr Oncol Rep* 3(2) 2001: 102-8.
- Ishikawa, T., F. Sekiguchi, Y. Fukase, N. Sawada and H. Ishitsuka. Positive correlation between the efficacy of capecitabine and doxifluridine and the ratio of thymidine phosphorylase to dihydropyrimidine dehydrogenase activities in tumors in human cancer xenografts. *Cancer Res* 58(4) 1998: 685-90.
- Ishikawa, Y., T. Kubota, Y. Otani, M. Watanabe, T. Teramoto, K. Kumai, T. Takechi, H. Okabe, M. Fukushima and M. Kitajima. Thymidylate synthetase and dihydropyrimidine dehydrogenase levels in gastric cancer. *Anticancer Res* 19(6C) 1999: 5635-40.
- J Rodriguez-Soto, R. W., R V Rouse. Endogenous Avidin-binding Activity in Paraffin-embedded Tissue revealed after Microwave Treatment. *Applied immunohistochemistry* 5(1) 1997: 59-62.
- Janne, P. A. and R. J. Mayer. Chemoprevention of colorectal cancer. *N Engl J Med* 342(26) 2000: 1960-8.
- Jass, J. R. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 50(1) 2007: 113-30.
- Johnston, P. G., J. C. Drake, J. Trepel and C. J. Allegra. Immunological quantitation of thymidylate synthase using the monoclonal antibody TS 106 in 5-fluorouracil-sensitive and -resistant human cancer cell lines. *Cancer Res* 52(16) 1992: 4306-12.
- Johnston, P. G., E. R. Fisher, H. E. Rockette, B. Fisher, N. Wolmark, J. C. Drake, B. A. Chabner and C. J. Allegra. The role of thymidylate synthase expression in prognosis and outcome of adjuvant chemotherapy in patients with rectal cancer. *J Clin Oncol* 12(12) 1994: 2640-7.
- Johnston, P. G., H. J. Lenz, C. G. Leichman, K. D. Danenberg, C. J. Allegra, P. V. Danenberg and L. Leichman. Thymidylate synthase gene and protein expression correlate and are associated with response to 5-fluorouracil in human colorectal and gastric tumors. *Cancer Res* 55(7) 1995: 1407-12.

- Johnston, S. J., S. A. Ridge, J. Cassidy and H. L. McLeod. Regulation of dihydropyrimidine dehydrogenase in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 5(9) 1999: 2566-70.
- Jung, A. [Microsatellite instability and therapeutic sensitivity]. *Verh Dtsch Ges Pathol* 91 2007: 112-8.
- Kaplan E.L., M. P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 53 1958: 457-481.
- Katsumata, K., T. Sumi, S. Yamashita, S. Takahashi, M. Mori, T. Baba, T. Murohashi, K. Nagashima, T. Ashizawa, K. Yamamoto, Y. Koyanagi and K. Katoh. The significance of thymidine phosphorylase expression in colorectal cancer. *Oncol Rep* 8(1) 2001: 127-30.
- Kornmann, M., K. H. Link, I. Galuba, K. Ott, W. Schwabe, P. Hausler, P. Scholz, J. Strater, S. Polat, B. Leibl, E. Kettner, C. Schlichting, W. Baumann, H. Schramm, U. Hecker, K. Ridwelski, J. H. Vogt, K. U. Zerbian, F. Schutze, E. D. Kreuser, D. Behnke and H. G. Beger. Association of time to recurrence with thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase mRNA expression in stage II and III colorectal cancer. *J Gastrointest Surg* 6(3) 2002: 331-7.
- Kuniyasu, T., T. Nakamura, Y. Tabuchi and Y. Kuroda. Immunohistochemical evaluation of thymidylate synthase in gastric carcinoma using a new polyclonal antibody: the clinical role of thymidylate synthase as a prognostic indicator and its therapeutic usefulness. *Cancer* 83(7) 1998: 1300-6.
- Lassmann, S., M. Bauer, R. Soong, J. Schreglmann, K. Tabiti, J. Nahrig, R. Ruger, H. Hofler and M. Werner. Quantification of CK20 gene and protein expression in colorectal cancer by RT-PCR and immunohistochemistry reveals inter- and intratumour heterogeneity. *J Pathol* 198(2) 2002: 198-206.
- Lassmann, S., M. Hennig, R. Rosenberg, J. Nahrig, J. Schreglmann, F. Krause, M. Poignee-Heger, H. Nekarda, H. Hofler and M. Werner. Thymidine phosphorylase, dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidylate synthase mRNA expression in primary colorectal tumors-correlation to tumor histopathology and clinical follow-up. *Int J Colorectal Dis* 21(3) 2006: 238-47.
- Leek, R. D., R. Landers, S. B. Fox, F. Ng, A. L. Harris and C. E. Lewis. Association of tumour necrosis factor alpha and its receptors with thymidine phosphorylase expression in invasive breast carcinoma. *Br J Cancer* 77(12) 1998: 2246-51.
- Levi, F., C. La Vecchia, F. Lucchini and P. Boyle. Cancer incidence and mortality in Europe, 1983-87. *Soz Praventivmed* 38 Suppl 3 1993: S155-229.
- Levin, B. The role of dietary factors and chemoprevention in gastrointestinal malignancy. *Curr Opin Oncol* 7(4) 1995: 377-80.
- Lu, Z., R. Zhang and R. B. Diasio. Dihydropyrimidine dehydrogenase activity in human peripheral blood mononuclear cells and liver: population characteristics, newly identified deficient patients, and clinical implication in 5-fluorouracil chemotherapy. *Cancer Res* 53(22) 1993: 5433-8.
- Lu, Z. H., R. Zhang and R. B. Diasio. Purification and characterization of dihydropyrimidine dehydrogenase from human liver. *J Biol Chem* 267(24) 1992: 17102-9.
- Lynch, H. T. and A. de la Chapelle. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 348(10) 2003: 919-32.
- Ma, A. H., L. Xia, S. J. Littman, S. Swinler, G. Lader, A. Polinkovsky, J. Olechnowicz, L. Kasturi, J. Lutterbaugh, P. Modrich, M. L. Veigl, S. D. Markowitz and W. D. Sedwick. Somatic mutation of hPMS2 as a possible cause of sporadic human colon cancer with microsatellite instability. *Oncogene* 19(18) 2000: 2249-56.
- Markowitz, S. DNA repair defects inactivate tumor suppressor genes and induce hereditary and sporadic colon cancers. *J Clin Oncol* 18(21 Suppl) 2000: 75S-80S.

- McLeod, H. L., J. Sludden, G. I. Murray, R. A. Keenan, A. I. Davidson, K. Park, M. Koruth and J. Cassidy. Characterization of dihydropyrimidine dehydrogenase in human colorectal tumours. *Br J Cancer* 77(3) 1998: 461-5.
- Metzger, R., K. Danenberg, C. G. Leichman, D. Salonga, E. L. Schwartz, S. Wadler, H. J. Lenz, S. Groshen, L. Leichman and P. V. Danenberg. High basal level gene expression of thymidine phosphorylase (platelet-derived endothelial cell growth factor) in colorectal tumors is associated with nonresponse to 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res* 4(10) 1998: 2371-6.
- Milano, G. and M. C. Etienne. Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) and clinical pharmacology of 5-fluorouracil (review). *Anticancer Res* 14(6A) 1994: 2295-7.
- Miyamoto, S., N. Boku, A. Ohtsu, S. Yoshida, A. Ochiai, H. Okabe and M. Fukushima. Clinical implications of immunoreactivity of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase in gastric cancer treated with oral fluoropyrimidine (S-1). Study Group of S-1 for Gastric Cancer. *Int J Oncol* 17(4) 2000: 653-8.
- Mori, K., M. Hasegawa, M. Nishida, H. Toma, M. Fukuda, T. Kubota, N. Nagasue, H. Yamana, Y. S. C. K. Hirakawa, T. Ikeda, K. Takasaki, M. Oka, M. Kameyama, M. Toi, H. Fujii, M. Kitamura, M. Murai, H. Sasaki, S. Ozono, H. Makuuchi, Y. Shimada, Y. Onishi, S. Aoyagi, K. Mizutani, M. Ogawa, A. Nakao, H. Kinoshita, T. Tono, H. Imamoto, Y. Nakashima and T. Manabe. Expression levels of thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase in various human tumor tissues. *Int J Oncol* 17(1) 2000: 33-8.
- Nita, M. E., O. Tominaga, H. Nagawa, T. Tsuruo and T. Muto. Dihydropyrimidine dehydrogenase but not thymidylate synthase expression is associated with resistance to 5-fluorouracil in colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 45(24) 1998: 2117-22.
- O'Connell, M. J. A phase III trial of 5-fluorouracil and leucovorin in the treatment of advanced colorectal cancer. A Mayo Clinic/North Central Cancer Treatment Group study. *Cancer* 63(6 Suppl) 1989: 1026-30.
- Paradiso, A., G. Simone, S. Petroni, B. Leone, C. Vallejo, J. Lacava, A. Romero, M. Machiavelli, M. De Lena, C. J. Allegra and P. G. Johnston. Thymidilate synthase and p53 primary tumour expression as predictive factors for advanced colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 82(3) 2000: 560-7.
- Parkin, D. M., P. Pisani and J. Ferlay. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer* 80(6) 1999: 827-41.
- Pestalozzi, B. C., H. F. Peterson, R. D. Gelber, A. Goldhirsch, B. A. Gusterson, H. Trihia, J. Lindtner, H. Cortes-Funes, E. Simmoncini, M. J. Byrne, R. Golouh, C. M. Rudenstam, M. Castiglione-Gertsch, C. J. Allegra and P. G. Johnston. Prognostic importance of thymidylate synthase expression in early breast cancer. *J Clin Oncol* 15(5) 1997: 1923-31.
- PubMed (2000). www.ncbi.nlm.nih.gov/. national center for biotechnology information, U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894. 03.05.2002
- Ragnhammar, P., L. Hafstrom, P. Nygren and B. Glimelius. A systematic overview of chemotherapy effects in colorectal cancer. *Acta Oncol* 40(2-3) 2001: 282-308.
- Remmele, W. and H. E. Stegner. [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologie* 8(3) 1987: 138-40.
- Ribic, C. M., D. J. Sargent, M. J. Moore, S. N. Thibodeau, A. J. French, R. M. Goldberg, S. R. Hamilton, P. Laurent-Puig, R. Gryfe, L. E. Shepherd, D. Tu, M. Redston and S. Gallinger. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 349(3) 2003: 247-57.

- Richter, H., P. Slezak, A. Walch, M. Werner, H. Braselmann, E. Jaramillo, A. Ost, I. Hirata, K. Takahama and H. Zitzelsberger. Distinct chromosomal imbalances in nonpolyploid and polyploid colorectal adenomas indicate different genetic pathways in the development of colorectal neoplasms. *Am J Pathol* 163(1) 2003: 287-94.
- Ridge, S. A., J. Sludden, X. Wei, A. Sapone, O. Brown, S. Hardy, P. Canney, P. Fernandez-Salguero, F. J. Gonzalez, J. Cassidy and H. L. McLeod. Dihydropyrimidine dehydrogenase pharmacogenetics in patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 77(3) 1998: 497-500.
- Rosenberg, L. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cancer. *Prev Med* 24(2) 1995: 107-9.
- Saito, S., N. Tsuno, H. Nagawa, E. Sunami, J. Zhengxi, T. Osada, J. Kitayama, Y. Shibata, T. Tsuruo and T. Muto. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor correlates with good prognosis in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 88(1) 2000: 42-9.
- Salonga, D., K. D. Danenberg, M. Johnson, R. Metzger, S. Groshen, D. D. Tsao-Wei, H. J. Lenz, C. G. Leichman, L. Leichman, R. B. Diasio and P. V. Danenberg. Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphorylase. *Clin Cancer Res* 6(4) 2000: 1322-7.
- Sanguedolce, R., I. Brumarescu, G. Dardanoni, A. Grassadonia, G. Vultaggio and L. Rausa. Thymidylate synthase level and DNA-ploidy pattern as possible prognostic factors in human colorectal cancer: a preliminary study. *Anticancer Res* 15(3) 1995: 901-6.
- Sanguedolce, R., G. Vultaggio, F. Sanguedolce, G. Modica, F. Li Volsi, G. Diana, G. Guereio, L. Bellanca and L. Rausa. The role of thymidylate synthase levels in the prognosis and the treatment of patients with colorectal cancer. *Anticancer Res* 18(3A) 1998: 1515-20.
- Schmoll, H. J. *Kompandium Internistische Onkologie*, 3. Auflage, Band 2. 1999: 941-1039.
- Schwartz, E. L., E. Wan, F. S. Wang and N. Baptiste. Regulation of expression of thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor in human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 58(7) 1998: 1551-7.
- Shomori, K., T. Sakatani, A. Goto, T. Matsuura, H. Kiyonari and H. Ito. Thymidine phosphorylase expression in human colorectal mucosa, adenoma and carcinoma: role of p53 expression. *Pathol Int* 49(6) 1999: 491-9.
- Suda, Y., Y. Kuwashima, Y. Tanaka, K. Uchida and S. Akazawa. Immunohistochemical detection of thymidylate synthase in advanced gastric cancer: a prognostic indicator in patients undergoing gastrectomy followed by adjuvant chemotherapy with 5-fluoropyrimidines. *Anticancer Res* 19(1B) 1999: 805-10.
- Suda, Y., Y. Kuwashima, Y. Tanaka, K. Uchida, H. Sakamoto, Y. Hashiguchi and T. Sekine. Expression of thymidylate synthase and thymidine phosphorylase in recurrence and survival rates of advanced gastric cancer. *Gastric Cancer* 2(3) 1999: 165-172.
- Takabayashi, A., S. Iwata, Y. Kawai, M. Kanai, Y. Taki, T. Takechi and M. Fukushima. Dihydropyrimidine dehydrogenase activity and mRNA expression in advanced gastric cancer analyzed in relation to effectiveness of preoperative 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Int J Oncol* 17(5) 2000: 889-95.
- Takebayashi, Y., S. Akiyama, S. Akiba, K. Yamada, K. Miyadera, T. Sumizawa, Y. Yamada, F. Murata and T. Aikou. Clinicopathologic and prognostic significance of an angiogenic factor, thymidine phosphorylase, in human colorectal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 88(16) 1996: 1110-7.
- Takenoue, T., J. Kitayama, Y. Takei, N. Umetani, K. Matsuda, M. E. Nita, K. Hatano, T. Tsuruo and H. Nagawa. Characterization of dihydropyrimidine dehydrogenase on immunohistochemistry in colon carcinoma, and correlation between

- immunohistochemical score and protein level or messenger RNA expression. *Ann Oncol* 11(3) 2000: 273-9.
- Takenoue, T., H. Nagawa, K. Matsuda, S. Fujii, M. E. Nita, K. Hatano, J. Kitayama, T. Tsuruo and T. Muto. Relation between thymidylate synthase expression and survival in colon carcinoma, and determination of appropriate application of 5-fluorouracil by immunohistochemical method. *Ann Surg Oncol* 7(3) 2000: 193-8.
- Toi, M., S. Hoshina, T. Taniguchi, Y. Yamamoto, H. Ishitsuka and T. Tominaga. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase in human breast cancer. *Int J Cancer* 64(2) 1995: 79-82.
- Tokunaga, Y., H. Hosogi, T. Hoppou, M. Nakagami, A. Tokuka and K. Ohsumi. Prognostic value of thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor in advanced colorectal cancer after surgery: evaluation with a new monoclonal antibody. *Surgery* 131(5) 2002: 541-7.
- Tsuji, T., T. Sawai, H. Yamashita, H. Takeshita, T. Nakagoe, H. Shindou, H. Fukuoka, M. Yoshinaga, S. Hidaka, T. Yasutake, T. Nagayasu and Y. Tagawa. Platelet-derived endothelial cell growth factor expression is an independent prognostic factor in colorectal cancer patients after curative surgery. *Eur J Surg Oncol* 30(3) 2004: 296-302.
- Tumorregister-München (2006). *Gastrointestinale Tumoren*.
- Uetake, H., W. Ichikawa, T. Takechi, M. Fukushima, Z. Nihei and K. Sugihara. Relationship between intratumoral dihydropyrimidine dehydrogenase activity and gene expression in human colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 5(10) 1999: 2836-9.
- Vogelstein, B., E. R. Fearon, S. R. Hamilton, S. E. Kern, A. C. Preisinger, M. Leppert, Y. Nakamura, R. White, A. M. Smits and J. L. Bos. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319(9) 1988: 525-32.
- Weber, G., E. Olah, M. S. Lui and D. Tzeng. Biochemical programs and enzyme-pattern-targeted chemotherapy in cancer cells. *Adv Enzyme Regul* 17 1978: 1-21.
- WEIß (2003). *Basiswissen Medizinische Statistik*.
- Wolff, A. C., M. E. Hammond, J. N. Schwartz, K. L. Hagerty, D. C. Allred, R. J. Cote, M. Dowsett, P. L. Fitzgibbons, W. M. Hanna, A. Langer, L. M. McShane, S. Paik, M. D. Pegram, E. A. Perez, M. F. Press, A. Rhodes, C. Sturgeon, S. E. Taube, R. Tubbs, G. H. Vance, M. van de Vijver, T. M. Wheeler and D. F. Hayes. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 25(1) 2007: 118-45.
- Yoshimura, A., Y. Kuwazuru, T. Furukawa, H. Yoshida, K. Yamada and S. Akiyama. Purification and tissue distribution of human thymidine phosphorylase; high expression in lymphocytes, reticulocytes and tumors. *Biochim Biophys Acta* 1034(1) 1990: 107-13.

Anhang

Schritt-Nr.	Position	Inhalt	Verweilzeit
1	1	PAD 1	00:00:29
2	5	BUF 1	00:00:10
3	1	PAD 1	00:00:29
4	5	BUF 1	00:00:10
5	1	PAD 1	00:00:45
6	14	Avidin	00:15:00
7	1	PAD 1	00:00:45
8	5	BUF 1	00:00:10
9	1	PAD 1	00:00:29
10	5	BUF 1	00:00:10
11	1	PAD 1	00:00:29
12	5	BUF 1	00:00:10
13	1	PAD 1	00:00:29
14	5	BUF 1	00:00:10
15	1	PAD 1	00:00:45
16	15	Biotin	00:15:00
17	1	PAD 1	00:00:45
18	5	BUF 1	00:00:10
19	1	PAD 1	00:00:29
20	5	BUF 1	00:00:10
21	1	PAD 1	00:00:29
22	5	BUF 1	00:00:10
23	1	PAD 1	00:00:29
24	5	BUF 1	00:00:10
25	1	PAD 1	00:00:45
26	9	Antibody 1	00:25:00
27	1	PAD 1	00:00:45
28	5	BUF 1	00:00:10
29	1	PAD 1	00:00:29
30	5	BUF 1	00:00:10
31	1	PAD 1	00:00:29
32	5	BUF 1	00:00:10
33	1	PAD 1	00:00:29
34	5	BUF 1	00:00:10
35	1	PAD 1	00:00:45
36	9	Antibody 1	00:25:00
37	2	PAD 2	00:00:45
38	6	BUF 2	00:00:10
39	2	PAD 2	00:00:29
40	6	BUF 2	00:00:10
41	2	PAD 2	00:00:29
42	6	BUF 2	00:00:10
43	2	PAD 2	00:00:29
44	6	BUF 2	00:00:10

Schritt-Nr.	Position	Inhalt	Verweilzeit
45	2	PAD 2	00:00:45
46	10	Link	00:25:00
47	2	PAD 2	00:00:45
48	6	BUF 2	00:00:10
49	2	PAD 2	00:00:29
50	6	BUF 2	00:00:10
51	2	PAD 2	00:00:29
52	6	BUF 2	00:00:10
53	2	PAD 2	00:00:29
54	6	BUF 2	00:00:10
55	2	PAD 2	00:00:45
56	11	Complex	00:25:00
57	3	PAD 3	00:00:45
58	7	BUF 3	00:00:10
59	3	PAD 3	00:00:29
60	7	BUF 3	00:00:10
61	3	PAD 3	00:00:29
62	7	BUF 3	00:00:10
63	3	PAD 3	00:00:29
64	7	BUF 3	00:00:10
65	3	PAD 3	00:00:45
66	12	Chromogen	00:07:00
67	3	PAD 3	00:00:35
68	7	BUF 3	00:00:10
69	3	PAD 3	00:00:35
70	12	Chromogen	00:07:00
71	3	PAD 3	00:00:35
72	7	BUF 3	00:00:10
73	3	PAD 3	00:00:35
74	12	Chromogen	00:07:00
75	3	PAD 3	00:00:35
76	7	BUF 3	00:00:10
77	3	PAD 3	00:00:35
78	13	Haemalaun	00:01:00
79	4	PAD 4	00:00:35
80	7	BUF 3	00:00:10
81	4	PAD 4	00:00:45
82	8	H ₂ O	00:00:15
83	4	PAD 4	00:00:29
84	8	H ₂ O	00:00:15
85	4	PAD 4	00:00:29
86	8	H ₂ O	00:00:15
87	4	PAD 4	00:00:29
88	8	H ₂ O	00:00:15

Anhang 1:

Färbelarithmeticus am Immunhistochemieroboter Dako TechMate™ Horizon

Platz	TS-Tumor P	TS-Tumor I	TS-Stroma P	TS-Stroma I	TP-Tumor P	TP-Tumor I	TP-Stroma P	TP-Stroma I	DPD-Tumor-	DPD-Tumor I	DPD-Stroma	DPD-Stroma	Tumor/Strom		Platz	TS-Tumor P	TS-Tumor I	TS-Stroma P	TS-Stroma I	TP-Tumor P	TP-Tumor I	TP-Stroma P	TP-Stroma I	DPD-Tumor-	DPD-Tumor	DPD-Stroma	DPD-Stroma	Tumor/Strom
1	3	1	1	3	4	2	3	3	4	1	1	2	4		53	2	2	1	3	4	2	3	3	4	2	3	1	4
2	4	2	0	0	4	2	3	3	4	1	3	1	1		54	1	1	1	3	3	1	3	3	4	2	2	3	4
4	3	2	1	1	4	1	3	2	3	1	3	1	3		55	4	2	2	1	4	1	2	2	4	2	3	1	3
5	4	1	1	3	4	2	3	3	1	1	3	2	4		56	3	1	1	2	2	1	3	2	4	2	3	1	4
7	3	1	1	3	4	1	3	1	3	1	3	1	2		57	1	1	1	1	4	2	3	3	4	2	2	3	2
8	4	1	1	3	4	1	3	3	4	1	3	2	4		58	3	2	1	3	4	2	2	3	4	2	3	1	3
9	3	2	1	1	4	1	3	3	2	1	3	1	3		59	4	2	2	1	4	1	3	2	4	1	3	1	4
10	3	2	1	2	4	1	4	3	1	3	2	1	4		60	3	2	1	3	4	1	2	3	4	1	2	1	4
11	4	1	1	3	4	2	3	2	3	1	3	3	3		61	4	2	1	3	4	1	3	2	4	1	2	1	4
12	1	1	0	0	4	1	3	2	4	1	2	3	3		62	3	2	1	3	3	1	1	3	4	1	2	1	4
13	1	2	0	0	4	1	3	1	4	2	3	1	3		63	3	1	1	3	4	2	3	3	4	1	3	2	3
14	3	2	1	3	4	2	3	3	4	2	3	1	3		64	3	1	1	1	1	1	2	3	4	1	3	1	4
15	3	1	2	1	4	1	2	3	4	3	3	1	3		65	4	1	1	3	4	1	3	3	4	2	2	3	3
16	3	1	1	3	4	1	2	3	4	3	2	1	3		66	1	2	0	0	4	1	2	3	4	1	1	3	3
17	4	2	1	2	4	1	1	3	4	2	2	2	4		67	4	2	1	3	4	2	3	3	4	2	2	3	3
18	2	1	1	3	3	1	3	2	3	2	3	2	3		68	4	2	1	3	4	2	3	3	4	1	1	3	4
19	3	1	1	2	2	1	3	3	4	1	3	1	3		69	3	3	1	1	3	1	3	3	1	1	3	1	4
20	0	0	3	1	2	1	3	2	4	1	1	3	4		70	4	1	1	3	4	2	4	3	4	3	3	2	4
21	2	2	1	3	4	1	3	3	4	1	1	3	3		71	4	1	1	3	3	2	3	3	4	2	3	1	4
22	4	2	1	3	4	3	2	2	4	2	3	1	4		72	3	2	1	3	3	1	3	3	4	2	2	3	3
23	3	2	1	3	3	1	2	2	4	2	3	1	3		73	3	1	1	3	3	1	3	2	4	1	2	3	3
24	3	2	1	3	4	2	3	3	4	3	1	3	3		74	4	2	1	3	4	2	3	3	4	2	3	1	3
25	3	1	1	3	3	1	2	3	4	3	3	1	3		75	4	2	2	1	4	2	1	3	4	2	3	1	4
26	4	2	1	3	4	2	2	3	4	2	2	3	4		76	2	1	0	0	4	2	3	3	4	2	3	2	3
27	3	2	2	1	3	1	1	3	3	1	3	1	4		77	4	1	1	3	4	1	2	3	4	1	2	3	3
28	0	0	1	3	0	0	1	3	0	0	1	3	4		78	0	0	0	0	4	2	2	2	4	2	3	1	3
29	3	1	1	3	3	1	2	3	2	1	1	3	4		79	2	1	1	3	2	1	4	3	3	2	3	3	4
30	0	0	0	0	4	1	2	2	4	2	2	1	4		80	2	1	0	0	4	2	2	3	4	2	3	1	4
31	1	1	1	3	3	1	3	3	4	1	3	1	4		81	2	2	1	3	4	1	3	3	4	1	3	2	3
32	2	2	1	3	4	2	2	3	4	1	2	3	4		82	2	1	0	0	4	1	2	3	4	1	3	1	4
33	3	2	1	3	4	1	2	3	4	2	3	1	4		83	3	2	1	3	4	2	4	3	4	1	3	3	4
34	3	1	1	3	2	1	2	3	4	1	3	1	4		84	2	2	1	1	3	1	3	3	4	2	3	3	3
35	0	0	1	1	4	2	3	2	4	2	3	2	3		85	3	2	1	2	4	1	3	3	4	2	2	3	4
36	3	2	1	3	4	1	2	3	4	1	3	1	3		86	4	2	1	3	3	1	2	3	4	2	2	3	3
37	2	2	1	3	3	1	3	3	3	2	3	3	4		87	4	2	1	3	4	1	2	3	4	1	2	1	4
39	3	2	1	1	4	1	3	2	4	1	2	1	4		88	4	1	1	3	3	1	3	2	4	1	3	3	4
40	3	1	1	1	3	2	2	3	4	1	3	1	3		89	2	2	1	3	3	1	3	3	4	1	3	3	4
41	2	1	1	1	4	1	3	2	3	1	1	1	4		90	3	2	1	1	4	1	2	3	4	1	2	3	4
42	1	1	2	1	4	1	3	3	4	2	2	3	3		91	3	2	2	1	4	1	2	3	4	1	2	1	3
43	3	1	1	3	2	1	2	2	3	1	3	1	3		92	3	3	1	3	4	2	3	3	4	1	1	3	4
44	0	0	1	1	4	1	2	3	1	1	1	1	4		93	4	2	1	2	3	2	2	3	4	1	1	3	4
45	3	1	1	1	3	1	2	3	1	1	2	1	3		94	4	1	1	3	4	2	2	3	4	1	3	1	4
46	1	1	1	2	4	1	3	3	1	1	2	2	4		95	2	1	0	0	1	2	3	3	3	1	2	3	4
47	1	1	1	1	3	1	2	3	4	1	3	1	4		96	4	2	1	3	4	2	4	3	4	1	3	3	3
48	3	2	3	1	4	2	2	3	4	1	3	1	3		97	3	1	1	3	3	1	2	3	3	1	2	1	4
49	2	1	2	1	4	1	2	2	4	1	3	1	3		98	3	1	1	3	2	2	2	3	3	1	2	2	3
50	3	1	1	1	4	1	4	3	4	1	3	3	3		##	2	1	1	3	4	2	3	3	4	1	2	1	4
51	4	2	2	1	4	2	2	3	4	3	3	1	4		##	4	2	1	2	4	2	2	3	4	3	4	1	3
52	4	2	1	3	4	2	3	3	4	1	3	3	4															

Anhang 2:

Übersicht über die Beurteilung der Färbungen der 97 Studienpatienten

H. Danksagung

In erster Linie gilt mein Dank dem Direktor des Institutes für Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München, Herrn Professor Dr. med. Heinz Höfler und Herrn Professor Dr. med. Martin Werner (bis 2002 leitender Oberarzt des Institutes) für die freundliche und vertrauensvolle Überlassung des Themas und ihre wissenschaftliche Betreuung.

Ein herzlicher Dank gilt auch den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Labors für Immunhistochemie und der Molekularpathologie, die mich an langen Abenden in die Materie einführten und stets mit Rat und Tat zur Seite standen, insbesondere danke ich Frau Dr. rer. nat. Silke Lassmann, die auch die Mitarbeit in einem weiteren Projekt (quantitative PCR) betreute.

Herr Diplommathematiker Dr. Hennig vom Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie der Technischen Universität München danke ich sehr für die Betreuung des statistischen Methodenteils.

Ein ausdrücklicher und freundschaftlicher Dank gilt Herrn Dr. med. Jörg Nährig, der sich zuerst während der praktischen Durchführung der Arbeit jederzeit hilfreich zeigte und auch während der Zeit der Auswertung und Niederschrift, immer wieder selbstlos bis weit in die Nacht mit mir die Arbeit konstruktiv diskutierte.

Gesondert möchte ich meinen Freunden und meiner Familie danken.

Namentlich Herrn Diplommathematiker Michael Behnke sei gedankt u.a. für die Hilfe bei Computerproblemen und Formatierungsfragen, er war hier von unüberschätzbarem Wert. In Liebe danke ich Frau Dr. med. Alexandra Schum, die mir in den Jahren stets zur Seite stand.

Zum Schluß, doch nicht zuletzt danke ich ganz besonders meinen lieben Eltern Inge und Georg Schreglmann und meinen Geschwistern Christoph, Daniel und David für Ihre Unterstützung während meines Studiums und meines gesamten Lebensweges.

I. Lebenslauf

Name: Schreglmann, Joachim Paul

Geburtsdatum und –ort: 20.02.1976 in München

Eltern: Schreglmann, Georg, Programmierer in Rente
Schreglmann, geb. Fröhlich, Inge, Hausfrau

Geschwister: drei Brüder

Schulbildung: 1982 – 1986 Max-Kolmsperger-Grundschule, München
1986 – 1995 Heinrich-Heine-Gymnasium, München
Abitur 6/1995

Studium: 10/1995 – 3/1996 Studium der Pädagogik an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
4/1996 – 3/1998 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Physikum 3/1998
4/1998 – 4/2003 Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität, München
1. Staatsexamen 3/1999
2. Staatsexamen 3/2002
3. Staatsexamen 4/2003

Famulaturen – Praktika 8/1998 Chirurgie am Kreiskrankenhaus Perlach, München
9/1999 Orthopädie am Mittelbayerischen Rehabilitationszentrum Klinikum Luitpoldpark, Kötzing
10/1999 Innere Medizin am Gefängnis Krankenhaus Stadelheim, München
11/99 - 3/00 Präparationsassistent am Anatomischen Institut der LMU München

4/2000 Pathologie am Pathologischen Institut der Technischen Universität, München

3/2001 Innere Medizin am Gulf Coast Medical Center, Mississippi, USA

Berufspraxis:

5-8/2002 Praktisches Jahr am Städtischen Krankenhaus München-Harlaching, Abteilung für Psychosomatik

9-12/2002 Praktisches Jahr am Städtischen Krankenhaus München-Bogenhausen, Abteilung für Innere Medizin

1-3/2003 Praktisches Jahr am Kantonalen Spital Uznach, Abteilung für Chirurgie

7/03-2/04 Arzt im Praktikum am Interdisziplinären Tumorzentrum des städtischen Krankenhauses München-Harlaching

4/04-12/06 Assistenzarzt am Klinikum Traunstein (Innere Medizin mit Kardiologie/Pneumologie, Nephrologie/Endokrinologie und Gastroenterologie, Chirurgie, Pädiatrie, Urologie)

3/07-08/08 Assistenzarzt in der hausärztlichen Gemeinschaftspraxis Dr. Schlosser in Unterhaching bei München

Seit 09/08 Arzt an der Malteser Klinik von Weckbecker - Fachklinik für Naturheilverfahren, Leitung des Bereichs Sport- und Ernährungsmedizin

Zusatzausbildungen:

2005 Sportmedizin

2007 Ernährungsmedizin
Reisemedizin

2008 Naturheilverfahren
Fachkundenachweis Rettungsdienst