

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin I

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Gregor

Stellenwert von Determinanten des 5-Fluorouracil-  
Stoffwechsels beim Kolonkarzinom im UICC-Stadium III

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Susanne Margarete Knauß  
aus  
Böblingen

2006

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. B. Klump
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. P. Brossart

*meinen Eltern*



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1 EPIDEMIOLOGIE	1
1.2 ÄTIOLOGIE	1
1.3 PATHOGENESE	2
1.4 KLASSIFIKATION	3
1.5 THERAPIEMODALITÄTEN BEIM KOLONKARZINOM	5
1.5.1 CHIRURGISCHE RESEKTION	5
1.5.2 ADJUVANTE CHEMOTHERAPIE	6
1.5.3 PALLIATIVE CHEMOTHERAPIE	8
1.6 PROGNOSE	8
1.7 PROGNOSTISCHE UND PRÄDIKTIVE FAKTOREN	9
1.8 BEDEUTUNG VON DETERMINANTEN DES 5-FU-STOFFWECHSELS	10
1.8.1 5-FU-METABOLISMUS	10
1.8.2 THYMIDYLAT-SYNTASE	13
1.8.3 THYMIDIN-PHOSPHORYLASE (TP)	14
1.8.4 DIHYDROPYRIMIDIN-DEHYDROGENASE	15
1.8.5 KOMBINIERTER BETRACHTUNG VON TS, TP UND DPD	15
1.9 ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG	17
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>18</b>
2.1 ERHEBUNG DES PATIENTENKOLLEKTIVS	18
2.2 CHARAKTERISIERUNG DES PATIENTENKOLLEKTIVS	20
2.3 MATERIALIEN	21
2.4 IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN	22
2.4.1 INDIREKTE AVIDIN-BIOTIN METHODE	22
2.4.2 DURCHFÜHRUNG DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNGEN	23
2.4.3 MIKROSKOPISCHE ANALYSE	27
2.5 MOLEKULARGENETISCHE UNTERSUCHUNGEN	29
2.5.1 RNA ISOLATION AUS IN PARAFFIN-EINGEBETTETEM GEWEBE	29
2.5.2 REAL-TIME-PCR (ECHT-ZEIT-POLYMERASEKETTENREAKTION) IM LIGHTCYCLER	31
2.5.3 REVERSE TRANSKRIPTION	35
2.5.4 LIGHTCYCLER PCR PROTOKOLL ZUR AMPLIFIKATION VON TS, TP UND DPD	36

<b>2.6</b>	<b>STATISTISCHE BERECHNUNGEN</b>	<b>37</b>
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>40</b>
<b>3.1</b>	<b>AUSWERTBARES MATERIAL</b>	<b>40</b>
<b>3.2</b>	<b>IMMUNHISTOCHEMISCHE ERGEBNISSE</b>	<b>40</b>
3.2.1	PROTEINEXPRESSION DER THYMIDYLAT-SYNTASE (TS)	40
3.2.2	PROTEINEXPRESSION DER THYMIDIN-PHOSPHORYLASE (TP)	42
3.2.3	PROTEINEXPRESSION DER DIHYDROPYRIMIDIN-DEHYDROGENASE	43
3.2.4	KORRELATION DER ENZYMEXPRESSION MIT KLINISCHEN UND HISTOPATHOLOGISCHEN VARIABLEN	44
<b>3.3</b>	<b>MOLEKULARGENETISCHE ERGEBNISSE</b>	<b>48</b>
3.3.1	MRNA-GEHALT DER THYMIDYLAT-SYNTASE	48
3.3.2	MRNA-GEHALT DER THYMIDIN-PHOSPHORYLASE	50
3.3.3	MRNA-GEHALT DER DIHYDROPYRIMIDIN-DEHYDROGENASE	51
3.3.4	KORRELATION DES MRNA-GEHALTS MIT KLINISCHEN UND HISTOPATHOLOGISCHEN VARIABLEN	52
<b>3.4</b>	<b>METHODENVERGLEICH</b>	<b>54</b>
3.4.1	VERGLEICH DER RELATIVEN TS-MRNA-EXPRESSION MIT DER TS- PROTEINEXPRESSION	54
3.4.2	VERGLEICH DER RELATIVEN TP-MRNA-EXPRESSION MIT DER TP- PROTEINEXPRESSION	55
3.4.3	VERGLEICH DER RELATIVEN DPD-MRNA-EXPRESSION MIT DER DPD- PROTEINEXPRESSION	56
<b>3.5</b>	<b>UNIVARIATE ÜBERLEBENSZEITANALYSE</b>	<b>57</b>
3.5.1	ALLGEMEINE ANALYSE DER ÜBERLEBENSZEIT UND DER REZIDIVFREIEN ZEIT	57
3.5.2	ÜBERLEBENSZEITANALYSE UND ANALYSE DER REZIDIVFREIEN ZEIT VERSCHIEDENER KLINISCHER UND HISTOPATHOLOGISCHER PARAMETER	58
3.5.3	ÜBERLEBENSZEITANALYSE UND ANALYSE DER REZIDIVFREIEN ZEIT IN KORRELATION ZUR TS-PROTEINEXPRESSION	60
3.5.4	ÜBERLEBENSZEITANALYSE UND ANALYSE DER REZIDIVFREIEN ZEIT IN KORRELATION ZUR TS-MRNA-EXPRESSION	62
3.5.5	ÜBERLEBENSZEITANALYSE UND ANALYSE DER REZIDIVFREIEN ZEIT IN KORRELATION ZUR TP-PROTEINEXPRESSION	64
3.5.6	ÜBERLEBENSZEITANALYSE UND ANALYSE DER REZIDIVFREIEN ZEIT IN KORRELATION ZUR TP-MRNA-EXPRESSION	67

3.5.7	ÜBERLEBENSZEITANALYSE UND ANALYSE DER REZIDIVFREIEN ZEIT IN KORRELATION ZUR DPD-PROTEINEXPRESSION	68
3.5.8	ÜBERLEBENSZEITANALYSE UND ANALYSE DER REZIDIVFREIEN ZEIT IN KORRELATION ZUR DPD-MRNA-EXPRESSION	70
<b>3.6</b>	<b>ÜBERLEBENSZEITANALYSE UND ANALYSE DER REZIDIVFREIEN ZEIT IN KORRELATION ZUR KOMBINIERTEN BETRACHTUNG VON TS, TP UND DPD</b>	<b>71</b>
3.6.1	KOMBINIERTE ANALYSE DER PROTEINEXPRESSION VON TS, TP UND DPD	71
3.6.2	KOMBINIERTE ANALYSE DER MRNA-EXPRESSION VON TS, TP UND DPD	72
<b>3.7</b>	<b>MULTIVARIATE ANALYSE NACH DEM COX'SCHEN REGRESSIONSMODEL</b>	<b>74</b>
<b>4.</b>	<b><u>DISKUSSION</u></b>	<b>76</b>
<b>4.1</b>	<b>ÜBERSICHT</b>	<b>76</b>
<b>4.2</b>	<b>BEWERTUNG DES PATIENTENKOLLEKTIVS</b>	<b>78</b>
<b>4.3</b>	<b>BEWERTUNG DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN ERGEBNISSE</b>	<b>81</b>
4.3.1	TS-PROTEINEXPRESSION	81
4.3.2	TP-PROTEINEXPRESSION	81
4.3.3	DPD-PROTEINEXPRESSION	82
<b>4.4</b>	<b>BEWERTUNG DER MOLEKULARGENETISCHEN ERGEBNISSE</b>	<b>82</b>
4.4.1	RELATIVE TS-MRNA-EXPRESSION	82
4.4.2	RELATIVE TP-MRNA-EXPRESSION	83
4.4.3	RELATIVE DPD-MRNA-EXPRESSION	83
4.4.4	ERKLÄRUNG FÜR UNTERSCHIEDLICHE EXPRESSIONSLEVEL DER UNTERSUCHTEN MARKER	84
4.4.5	BEWERTUNG DER KORRELATION DER EXPERIMENTELL BESTIMMTEN PARAMETER MIT KLINISCHEN VARIABLEN	84
<b>4.5</b>	<b>BEWERTUNG DER ÜBERLEBENSZEITANALYSE UND DES REZIDIVFREIEN ÜBERLEBENS</b>	<b>84</b>
4.5.1	BEWERTUNG DER ALLGEMEINEN ANALYSE	84
4.5.2	BEWERTUNG DER MRNA UND PROTEINEXPRESSION DER THYMIDYLAT-SYNTASE	85
4.5.3	BEWERTUNG DER MRNA UND PROTEINEXPRESSION DER THYMIN- PHOSPHORYLASE	91
4.5.4	BEWERTUNG DER MRNA UND PROTEINEXPRESSION DER DIHYDROPYRIMIDIN- DEHYDROGENASE	94
<b>4.6</b>	<b>BEWERTUNG DER MULTIVARIATEN ANALYSE</b>	<b>95</b>

---

<b>4.7</b>	<b>BEWERTUNG DER ÜBERLEBENSZEITANALYSE UND ANALYSE DER REZIDIVFREIEN ZEIT BEI KOMBINATION DER MARKER</b>	<b>95</b>
<b>4.8</b>	<b>METHODENVERGLEICH</b>	<b>96</b>
<b>4.9</b>	<b>AUSBLICK</b>	<b>98</b>
<b>5.</b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG</u></b>	<b>101</b>
<b>6.</b>	<b><u>VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN</u></b>	<b>101</b>
<b>7.</b>	<b><u>VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN</u></b>	<b>107</b>
<b>7.1</b>	<b>ABBILDUNGEN</b>	<b>107</b>
<b>7.2</b>	<b>TABELLEN</b>	<b>108</b>
<b>8.</b>	<b><u>ANHANG</u></b>	<b>110</b>
<b>8.1</b>	<b>MATERIALIEN IMMUNHISTOCHEMIE</b>	<b>110</b>
8.1.1	HERSTELLUNG DER MEDIEN UND PUFFERLÖSUNGEN	110
8.1.2	VERBRAUCHSGEGENSTÄNDE	110
8.1.3	CHEMIKALIEN	110
8.1.4	ANTIKÖRPER	111
8.1.5	GERÄTE	111
<b>8.2</b>	<b>MATERIALIEN REAL-TIME-PCR</b>	<b>112</b>
8.2.1	GERÄTE	112
8.2.2	VERBRAUCHSGEGENSTÄNDE	113
8.2.3	KITS	113
<b>9.</b>	<b><u>LITERATURVERZEICHNIS</u></b>	<b>114</b>
<b>10.</b>	<b><u>DANKSAGUNG</u></b>	<b>114</b>
<b>11.</b>	<b><u>LEBENS LAUF</u></b>	<b>130</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Epidemiologie

Das kolorektale Karzinom gehört zu den häufigsten Krebserkrankungen der westlichen Hemisphäre. Allein in Deutschland wird die Zahl der jährlich Neuerkrankten auf über 66.000 geschätzt mit einer zunehmenden Tendenz seit den 70er Jahren (Robert-Koch Institut, Berlin 2000). Deutschland steht damit an erster Stelle im Vergleich zu anderen europäischen Ländern.

Mit fast 29.000 Sterbefällen pro Jahr stellt das kolorektale Karzinom in Deutschland, nach dem Prostatakrebs bei Männern und dem Brustdrüsenkrebs bei Frauen, die zweithäufigste Ursache der krebsbedingten Todesfälle dar (Amtliche Todesursachenstatistik, Statistisches Bundesamt Wiesbaden, 2000; Robert-Koch Institut, 2000).

## 1.2 Ätiologie

Die Ätiologie des sporadischen kolorektalen Karzinoms ist nicht sicher geklärt. Als prädisponierende Faktoren werden der häufige Konsum von rotem Fleisch, tierischen Fetten, Alkohol, eine ballaststoffarme Kost, sowie Bewegungsarmut und Nikotinkonsum angeschuldigt (Midgley et Kerr, 1999).

Besonders der Einfluss einer ballaststoffarmen Kost wird hierbei kontrovers diskutiert (Giovannuci et al., 1994).

Als gesicherte Risikofaktoren gelten kolorektale Adenome (in Abhängigkeit von Zahl, Größe und Dysplasiegrad) und chronisch-entzündliche Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa und Morbus Crohn. Generell haben Verwandte ersten Grades von Patienten mit Darmkrebs ein erhöhtes Risiko selbst zu erkranken.

Zu den selteneren Risikofaktoren, die schon in jüngeren Jahren zur Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms führen, gehören einige autosomal-dominant erbliche Erkrankungen wie die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), das Gardner-, Hamilton- und Turcot-Syndrom und das hereditäre nicht-polypöse Kolonkarzinom-Syndrom (HNPCC-bzw. Lynch-Syndrom).

### 1.3 Pathogenese

Es wird grundsätzlich zwischen der Entstehung sporadischer Tumoren, die etwa 85% der kolorektalen Karzinome umfassen, sowie den hereditären Formen, die ungefähr 15% betreffen, differenziert.

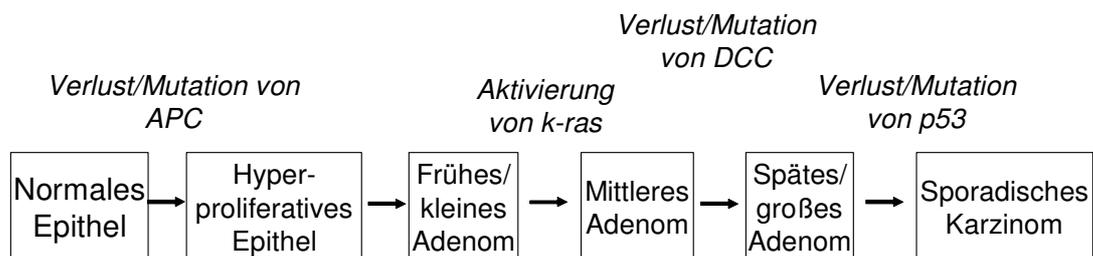
Zentrale Mechanismen der Tumorentwicklung stellen Mutationen von Onkogenen, Tumorsuppressorgenen und Mutator-/Reparaturgenen dar. Onkogene fördern das Zellwachstum und damit die maligne Entartung, während Tumorsuppressorgene über eine Hemmung des Zellzyklus die Zellproliferation kontrollieren. Die sogenannten Mutator-/Reparaturgene schützen die Integrität der genetischen Information, indem sie zur Reparatur zufällig auftretender DNA- oder Replikationsdefekte beitragen. Eine Inaktivierung dieser Gene resultiert in einer deutlich erhöhten Mutationsrate und führt damit zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit einer malignen Entartung (Strachan, Read, 1996).

In der Pathogenese des sporadischen kolorektalen Karzinoms geht man davon aus, dass sich bösartige Neubildungen des Darms aus vorbestehenden gutartigen Adenomen entwickeln. Hauptsächlich große und villöse Polypen haben ein höheres Entartungspotential (Seidensticker, Schmiegel, 1998). Diese Progression vom normalen Epithel zum Karzinom wurde im Jahre 1975 von Muto und Kollegen als „Adenom-Karzinom-Sequenz“ beschrieben (Muto et al., 1975). Später wurde diese histo-pathologische Vorstellung der Tumorentstehung um ein molekulares Modell von in mehreren Schritten erworbenen genetischen Veränderungen erweitert (Fearon, Vogelstein, 1990). Dabei kommt es nach und nach durch genomische Mutationen zur Aktivierung von Onkogenen (z.B. k-ras) und dem Verlust von Tumorsuppressorgenen (z.B. p53, DCC und APC), die normalerweise die Tumorgenese unterdrücken würden. Dieser gut charakterisierte Entwurf basiert auf dem sogenannten „Chromosomeninstabilitäts (CIN)“- Signalweg und lässt sich bei etwa 80% der kolorektalen Karzinome nachweisen (Abbildung 1).

Ein anderer, ebenfalls gut beschriebener molekularer Entstehungsweg ist der „Mikrosatelliteninstabilitäts (MIN)“- Signalweg, der durch inaktivierende Veränderungen von Mutator-/Reparatur-Genen gekennzeichnet ist. Mutationen in diesen Genen (z.B. MSH2, MLH1, MSH6, PMS1/2) können in etwa 16% der

sporadischen und in bis zu 86% der HNPCC-Tumore detektiert werden (Aaltonen et al., 1994; Kim et al., 1994).

Für die Tumorgenese der erblichen Formen des kolorektalen Karzinoms wird das Vorhandensein von Keimbahnmutationen postuliert. Das Auftreten von somatischen Mutationen auf dem korrespondierenden Allel („Two-Hit-Hypothese“) führt schließlich zu einem kompletten Verlust der genetischen Information und damit zur Tumorentstehung (Knudson, 1971).



**Abbildung 1: Mehrschritt-Karzinogenese („Adenom-Karzinom-Sequenz“) des kolorektalen Karzinoms (modifiziert nach Kullmann, 2003)**

## 1.4 Klassifikation

Kolorektale Neoplasien werden gemäß der Klassifikation der WHO (World Health Organization) in Karzinome des Kolons und des Rektums eingeteilt. Entsprechend zum anatomischen Aufbau können die Tumore des Kolons dem Zökum, der rechten Flexur, dem Kolon ascendens, dem Kolon transversum, der linken Flexur, dem Kolon descendens und dem Sigma zugeordnet werden. Als Rektumkarzinome sind die Tumore definiert, die weniger als 16 cm von der Anokutanlinie bzw. weniger als 12 cm von der Linea dentata entfernt lokalisiert liegen.

Kolon- und Rektumkarzinome werden wegen embryologischer und biologischer Gemeinsamkeiten in der Literatur oft zusammen behandelt. Andererseits existieren, nicht zuletzt aufgrund anatomischer Besonderheiten, fundamentale Unterschiede, aus denen sich wiederum differente Therapiestrategien ableiten. So weichen sowohl chirurgische Resektionstechniken als auch adjuvante Therapiemodalitäten beim Kolon- und Rektumkarzinom deutlich voneinander

ab. Lediglich in der palliativen Situation kommen teilweise übereinstimmende Therapiekonzepte zum Einsatz. In der hier vorliegenden Arbeit werden ausschließlich Kolonkarzinome untersucht.

Eine Stadieneinteilung des Kolonkarzinoms erfolgt nach DUKES oder der TNM-Klassifikation wobei „T“ für Tumordinfiltrationstiefe, „N“ für Lymphknotenbefall und „M“ für Metastasierung steht. Die Klassifikation nach DUKES wurde in den letzten Jahren durch die differenziertere Einteilung der UICC (union international contre le cancer) abgelöst, die auf dem TNM – System beruht (Tabelle 1).

**Tabelle 1: TNM Klassifikation, Klassifikation nach DUKES und UICC Stadien (2002)**

TNM-Klassifikation		Klassifikation nach DUKES	UICC Stadium
Tis	Carcinoma in situ	-	-
T1	Muscularis propria nicht befallen	A	I
T2	Muscularis propria befallen		
T3	Subserosa befallen	B	II
T4	Befall angrenzender Organe oder Penetration des viszerale Peritoneums		
N1	1-3 regionäre Lymphknoten befallen	C	III
N2	> 3 regionäre Lymphknoten befallen		
M1	Fernmetastasen	D	IV

Grundlage der exakten Stadieneinteilung ist vor allem die Festlegung des Lymphknotenstatus. Dafür ist die Untersuchung von mindestens 12 regionären Lymphknoten erforderlich (Hermanek, 1995; Le Voyer et al., 2003). Eine korrekte Erfassung des Lymphknotenstatus erlangt besondere Bedeutung, da sich darin Stadium II (N0) von Stadium III (N positiv) unterscheidet und hiervon wiederum die Entscheidung für oder gegen eine adjuvante Therapie abhängt. Das in der vorliegenden Arbeit analysierte Kollektiv von Kolonkarzinomen wurde anhand der zum Zeitpunkt der Erhebung geltenden UICC Klassifikation von 1992 eingestuft, die ergänzend in Tabelle 2 dargestellt ist. Die aktuelle

Klassifikation unterscheidet sich gegenüber dieser Einteilung in der Neubewertung des Lymphknotenstatus.

**Tabelle 2: TNM Klassifikation, Klassifikation nach DUKES und UICC Stadien (1992)**

TNM-Klassifikation		Klassifikation nach DUKES	UICC Stadium
Tis	Carcinoma in situ	-	-
T1	Muscularis propria nicht befallen	A	I
T2	Muscularis propria befallen		
T3	Subserosa befallen	B	II
T4	Befall angrenzender Organe oder Penetration des viszeralen Peritoneums		
N1-2	Angrenzende Lymphknoten befallen	C	III
N3	Entfernte (paraaortale) Lymphknoten befallen		
M1	Fernmetastasen	D	IV

## 1.5 Therapiemodalitäten beim Kolonkarzinom

### 1.5.1 Chirurgische Resektion

In der Therapie des Kolonkarzinoms kommt der chirurgischen Tumorresektion nach wie vor eine vorrangige Bedeutung zu. Sofern keine Fernmetastasen vorliegen, wird eine R0-Resektion, also eine vollständige Entfernung des Tumors durchgeführt. Dies umfasst die Resektion des tumortragenden Kolonabschnitts mit dem regionalen Lymphabflussgebiet und schließt eventuell auch eine Mitentfernung von adhärennten Organen mit ein. Maßgeblich für das Ausmaß der Darmresektion ist weniger die Tumorausbreitung als vielmehr das nach zentraler Gefäßligatur zu entfernende Lymphabflussgebiet. Nach strenger Indikationsstellung können gleichzeitig aufgetretene Fernmetastasen ebenfalls reseziert werden (Hermanek, 2000).

Trotz optimaler Operationstechniken entwickeln nach alleiniger chirurgischer Therapie etwa 50% der Patienten ein Tumorrezidiv (Midgley et Kerr, 1999).

Rektumkarzinome neigen eher zur Ausbildung eines Lokalrezidivs, beim Kolonkarzinom hingegen kommt es häufiger zur lymphogenen oder hämatogenen Metastasierung mit der Ausbildung von Fernmetastasen (Ragnhammar et al., 2001).

### **1.5.2 Adjuvante Chemotherapie**

Die unbefriedigenden Ergebnisse bei alleiniger operativer Behandlung, besonders im Stadium III (pT1-4, pN positiv, M0) sind wahrscheinlich auf bereits vorhandene Mikrometastasierungen zurückzuführen. Daraus leitet sich ein Interesse an adjuvanten (lat. adiuvarre - unterstützen, helfen) Therapieoptionen ab. Insbesondere im Falle des nodal-positiven Kolonkarzinoms geht man von bereits im Kreislauf zirkulierenden neoplastischen Zellen aus, die nach der Operation möglicherweise mittels einer systemischen Chemotherapie abgetötet werden können.

Deshalb besteht derzeit, unter der Voraussetzung einer vollständigen Entfernung des Primärtumors (R0-Resektion), für das UICC Stadium III die Indikation zur Durchführung einer adjuvanten Chemotherapie.

Seit den 50er Jahren wird der Antimetabolit 5-Fluorouracil (5-FU), der zur Gruppe der Fluoropyrimidine gehört, beim Kolonkarzinom als Chemotherapeutikum der Wahl eingesetzt. Über Jahrzehnte hinweg zeigte sich 5-FU als wirksamste Einzelsubstanz. Erst in den 90er Jahren erwies sich eine Kombination mit dem Immunmodulator Levamisol über 12 Monate als überlegen (Moertel et al., 1990). Heutzutage gilt eine sechs-monatige Gabe von 5-FU und Folinsäure als Standardtherapie (Tabelle 3).

Im Stadium III ließ sich mit dieser Behandlung, im Vergleich zu alleiniger chirurgischer Intervention, das geschätzte Risiko ein Rezidiv zu entwickeln um ein Drittel reduzieren (Macdonald, 1999). Neuere Daten deuten stark darauf hin, dass eine Ergänzung dieser Therapie mit Oxaliplatin das rezidivfreie Überleben beim Kolonkarzinom in diesem Stadium weiter signifikant verbessern kann (André et al., 2004). Außerdem scheinen oral verfügbare Formen von 5-FU wie Capecitabine und UFT in Kombination mit Folinsäure in ihrer Wirkung äquivalent zur intravenösen Therapie zu sein (Twelves et al., 2005). Obwohl

sich hier ein Wechsel des Standardregimes andeutet, stellt 5-FU weiterhin die Basis jeglicher adjuvanten Therapiemaßnahmen im Stadium III dar.

**Tabelle 3: Entwicklung der Studienlage zur adjuvanten Therapie in den 90er Jahren.**  
LEV=Levamisol; 5-FU=5-Fluorouracil; LV=Leucovorin; Mo=Monate

Studie (Jahr)	n	Therapie	5-Jahres-überlebensrate (%)	Bemerkung
Moertel (1990, 1995)	971	Kontrolle	55	Todesrate um 33%↓ (p=0.007)
		LEV	64	
		5-FU/LEV	71	
IMPACT (1995)	1526	Kontrolle	78 (3-Jahre)	Stadium III: 5-Jahresüberlebensrate 64% vs. 76%
		5-FU/LV	83	
NCCG-NCI (1998)	915	5-FU/LEV (12 Mo)	68	12 Monate Therapie ist nicht effektiver als 6 Monate
		5-FU/LEV (6 Mo)	60	
		5-FU/LEV/LV (12 Mo)	63	
		5-FU/LEV/LV (6 Mo)	70	
NSABP C0-4 (1999)	2151	5-FU/LEV	70	Zugabe von LEV zu 5-FU/LV: kein Überlebensvorteil
		5-FU/LV	74	
		5-FU/LV/LEV	72	
IMPACT B2 (1999)	1016	Kontrolle	80	Kein signifikanter Überlebensvorteil durch Chemotherapie im Stadium II
	5-FU/LV	82		

Für das Stadium II besteht aufgrund der uneinheitlichen Datenlage derzeit außerhalb von Studien weiterhin keine Indikation für die Durchführung einer adjuvanten Therapie.

### 1.5.3 Palliative Chemotherapie

Das Ziel einer palliativen Chemotherapie ist neben einer Verlängerung der Gesamtüberlebenszeit vor allem auch eine Verbesserung der Lebensqualität. Im Vergleich zu rein supportiven Maßnahmen, sind die medianen Überlebenszeiten mit einer 5-FU-basierten Therapie ungefähr doppelt so hoch (5 versus 11 Monate) (Scheithauer et al., 1993). Durch die Zugabe neuer Substanzen, wie Irinotecan und Oxaliplatin, zu einer Therapie mit 5-FU und Folinsäure, konnte seit Ende der 90er Jahre eine Verlängerung der medianen Überlebenszeit auf bis zu 19 Monate erreicht werden (Giacchetti et al., 1999; Saltz et al., 2000; De Gramont et al., 2000; Douillard, 2000; Goldberg et al., 2004). In einer aktuellen Studie gelang eine weitere Verlängerung der Gesamtüberlebenszeit auf mehr als 20 Monate durch den sequentiellen Einsatz von 5-FU/Folinsäure plus Irinotecan gefolgt von 5-FU/Folinsäure plus Oxaliplatin oder vice versa (Tournigand et al., 2004).

Somit sind Fluoropyrimidine nach wie vor wesentlicher Bestandteil auch in der palliativen Therapie des Kolonkarzinoms.

## 1.6 Prognose

Das Langzeitüberleben ist hauptsächlich vom Tumorstadium abhängig: je fortgeschrittener der Tumor ist, desto schlechter ist die Prognose. Während Patienten im Stadium I eine sehr gute Prognose haben (nach 5 Jahren sind fast 90% noch am Leben), sinkt die Überlebensrate nach 5 Jahren im Stadium IV auf weniger als 5% (Merkel et al., 2001). Die 5-Jahresüberlebensraten variieren aber nicht nur streng stadienabhängig, sondern insbesondere auch innerhalb des Stadiums III gemäß der unten aufgeführten Tabelle 4. Insgesamt versterben immer noch etwa die Hälfte der Patienten an der Erkrankung (Jemal et al., 2005).

**Tabelle 4: 5-Jahresüberlebensraten in Abhängigkeit des TNM Stadiums. (Tabelle modifiziert nach Merkel et al., 2001)**

TNM-Stadium	5-Jahresüberlebensrate
I (pT1/2 N0 M0)	85-90%
II (pT3/4 N0 M0)	70-75%
IIIA (pT1/2 N1 M0)	77-91%
IIIB (pT3/4 N1 M0)	54-63%
IIIC (pT1-4 N2 M0)	28-37%
IV (pT1-4 N1/2 M1)	<5%

## 1.7 Prognostische und prädiktive Faktoren

Obwohl beim Kolonkarzinom im UICC Stadium III eine klare Indikation zur Durchführung einer adjuvanten Therapie besteht, profitieren derzeit nur etwa 5-15% der Patienten davon (IMPACT, 1995; Moertel et al., 1990). Auch in der palliativen Situation, selbst unter Einsatz von Kombinationsregimen, zeigt nur ungefähr die Hälfte der Patienten ein Therapieansprechen (Giacchetti et al., 1999; De Gramont et al., 2000).

In den letzten Jahrzehnten wurden aus diesem Grund große Anstrengungen unternommen, um mögliche prädiktive Faktoren zu identifizieren, die schon vor Einleitung einer zytostatischen Behandlung, eine individuelle Vorhersage über ein Therapieansprechen treffen könnten. Dies ist vor allem auch im Hinblick auf das mögliche Nebenwirkungsspektrum einer Chemotherapie bedeutsam. So werden bei der Behandlung mit 5-FU Übelkeit, Erbrechen, Durchfälle, Mukositis, Myelosuppression, kardiale und neurotoxische Effekte als potentielle Begleiterscheinungen beschrieben (Midgley et Kerr, 1999).

Unabhängig von der Verabreichung einer zytostatischen Therapie gelten die R0-Resektion, das TNM-Stadium und der Differenzierungsgrad als gesicherte prognostische Indikatoren (Hermanek, 1995; Gill et al., 2004).

Als weitere prognostische Faktoren wurden eine Reihe unterschiedlicher molekularbiologischer Marker wie p53, ki-67, bcl-2, k-ras, MSH2 und DCC

untersucht. Dabei handelt es sich entweder um Tumorsuppressor-, Onko- oder Mutator-/Reparaturgene. Diese Untersuchungen stützen sich dabei auf die Hypothese, dass bei einer Aktivierung von Onkogenen oder einem Verlust von Tumorsuppressor- und Mutator-/Reparaturgenen ein schlechterer klinischer Verlauf zu erwarten ist. Obwohl sich dies in einigen Studien bestätigen ließ ist bis jetzt noch kein molekularbiologischer Faktor so aussagekräftig, dass er Eingang in den klinischen Alltag gefunden hätte (Klump et al., 2004; Graziano, Cascinu, 2003), wie dies beispielsweise für den Hormonrezeptorstatus beim Mammakarzinom der Fall ist: nur Patientinnen mit Hormonrezeptor-positiven Karzinomen werden mit Östrogeninhibitoren behandelt.

Es wäre wünschenswert auch beim Kolonkarzinom Faktoren zu finden, die eine Entscheidung für oder gegen eine adjuvante Therapie mit 5-FU erleichtern würden.

Ein neuer Ansatz besteht darin, unter den unmittelbar am Metabolismus der eingesetzten Zytostatika beteiligten Enzyme nach Markern zu suchen, die zur prätherapeutischen Differenzierung zwischen therapiesensitiven und -resistenten Kolonkarzinomen geeignet sein könnten. Da beim Kolonkarzinom Fluoropyrimidine sowohl in der adjuvanten als auch in der palliativen Situation nach wie vor wesentlicher Bestandteil der Therapie sind, steht der Stellenwert von Determinanten des 5-FU-Stoffwechsels zunehmend im Focus des Interesses.

## **1.8 Bedeutung von Determinanten des 5-FU-Stoffwechsels**

### **1.8.1 5-FU-Metabolismus**

5-FU ist selbst inaktiv und entfaltet seine zytotoxische Wirkung erst, wenn es in die Nukleotide Fluorouridin 5'-triphosphat (FUTP), 5'-Fluoro-2'-desoxyuridin-5'-triphosphat (FdUTP) und 5-Fluoro-2'-desoxyuridin-5'-monophosphat (FdUMP) metabolisiert wird (Pinedo et Peters, 1988).

Mehrere Enzyme sind an dieser Aktivierung beteiligt. FdUMP kann entweder (1) direkt über die Thymidin-Phosphorylase (TP) oder (2) indirekt über FUMP mittels der Enzyme Orotat-Phosphorybosyl-Transferase bzw. (3) Uridin-Phosphorylase metabolisiert werden (Abbildung 2). Auf diesem Weg entsteht auch FUTP.

Welcher der drei Wege bevorzugt benützt wird, ist nicht abschließend geklärt (Peters et al., 1986; Schwartz et al., 1995).

FUTP wird in RNA, FdUTP in DNA inkorporiert und entfaltet dadurch seine zellschädigende Wirkung. Als wichtigster Mechanismus wird allerdings die Hemmung des Enzyms Thymidylat-Synthase (TS) durch FdUMP angesehen (Peters et al., 1987).

TS stellt die einzige intrazelluläre Quelle der Thymidin „de novo“-Synthese dar, welches essentiell für die DNA-Synthese und das damit verbundene Zellwachstum ist (Conrad et Ruddle, 1972). FdUMP bildet in Gegenwart von 5,10-Methylen-tetrahydrofolat (THF) mit TS einen kovalent gebundenen reversiblen ternären Komplex (Danenberg et al., 1982). THF ist ein wichtiges Co-Enzym für TS und wird aus Folsäure gebildet.

Vorklinische Studien haben gezeigt, dass der Wirkungsmechanismus von 5-FU von dem Verabreichungsmodus abhängig ist. Während eine Bolus-Injektion ihren zellschädigenden Effekt hauptsächlich über den Einbau von FUDP in RNA entfalten soll, führt eine Gabe als kontinuierliche Infusion zu einer Hemmung der Thymidylat-Synthase und greift so hauptsächlich in der S-Phase (Synthesephase) des Zellzyklus an (Aschele et al., 1992).

Der Abbau von 5-FU erfolgt durch das Enzym Dihydropyrimidin-Dehydrogenase in den inaktiven Metaboliten Dihydrofluracil (Heggie et al., 1987). Am Ende der Stoffwechselkette steht F- $\beta$ -Alanin. Die Pharmakokinetik von 5-FU ist hauptsächlich von der DPD-Aktivität abhängig, die in der normalen Bevölkerung um das bis zu 18-fache variiert (Lu et al., 1995). Kommt es aufgrund von molekularen Defekten zu einer verminderten oder ganz aufgehobenen Enzymaktivität vor, treten lebensbedrohliche toxische Reaktionen auf 5-FU auf (Milano et al., 1999; Morison et al., 1997).

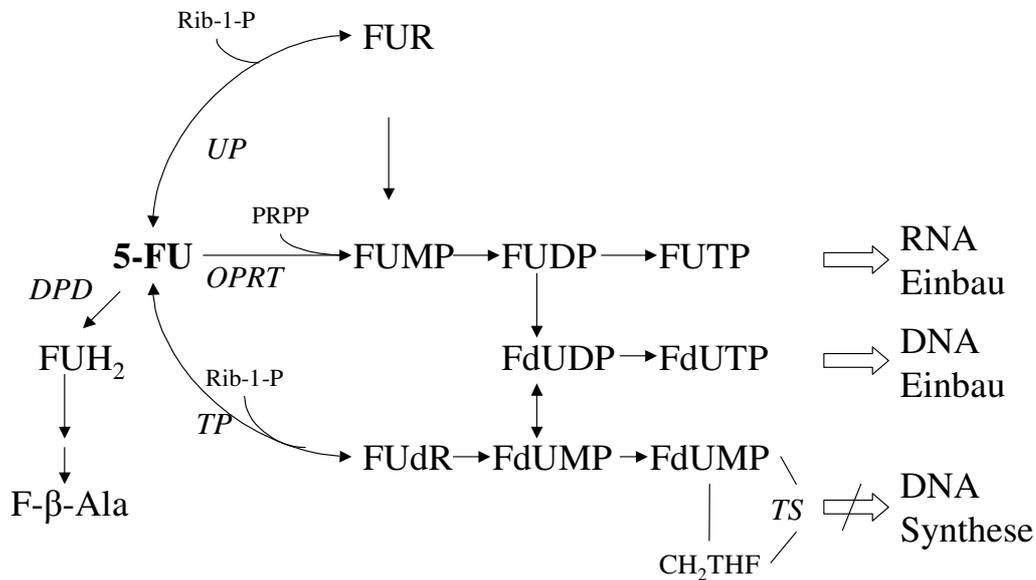


Abbildung 2: Metabolismus von 5-FU.

Die zytotoxische Wirkung wird durch den Einbau von FUTP in RNA oder durch die Inhibition der Thymidylat-Synthase (TS) erreicht. Die relevanten beteiligten Enzyme sind Uridin-Phosphorylase (UP), Orotat-Phosphorybosyl-Transferase (OPRT), Thymidin-Phosphorylase (TP), Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPD). Die beteiligten Metaboliten sind 5-Fluorouracil (5-FU); 5-Fluorouridin (FUR); 5-Fluoro-2'-desoxyuridin (FUdR); 5-Phosphoribosyl-1-pyroposphat (PRPP); 5'-Fluorouridin-5'-monophosphat (FUMP); 5'-Fluorouridin-5'-diphosphat (FUDP); 5'-Fluoro-2'-desoxyuridin-5'-triphosphat (FdUTP); 5'-Fluoro-2'-desoxyuridin-5'-monophosphat (FdUMP); Ribose-1-phosphat (Rib-1-P); 5,10-Methylen-tetrahydrofolat (CH<sub>2</sub>THF); Dihydrofluorouracil (FUH<sub>2</sub>); 5-Fluoro-β-Alanin (F-β-Ala). (Modifiziert nach Pinedo, Peters, 1988)

In Bezug auf die prognostische Bedeutung der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Enzyme, ergeben sich aus diesen Stoffwechselwegen folgende hypothetische Überlegungen:

Eine bessere Prognose ergäbe sich für Patienten, die im Tumor

1. eine niedrige DPD-Expression aufweisen, da durch den verlangsamten Abbau eine erhöhte Zytotoxizität zu erwarten wäre
2. eine hohe TP-Expression zeigen, da eine gesteigerte Bildung „falscher“ Metaboliten zu einer DNA-bzw. RNA-Schädigung der Tumorzelle führt

3. eine niedrige TS-Expression aufweisen, da eine ausreichende Hemmung durch FdUMP erfolgen kann und somit die DNA Synthese gestört wird (gilt für kontinuierliche Infusion von 5-FU)

TS sollte bei einer Bolusinjektion von 5-FU keinen prognostischen Einfluss besitzen, da die zellschädigende Wirkung direkt als RNA Schädigung erfolgt.

### 1.8.2 Thymidylat-Synthase

Unter den am Metabolismus von 5-FU beteiligten Enzymen, ist die Thymidylat-Synthase (Enzym Commission (EC): 2.1.1.45) am besten untersucht. Das kodierende Gen liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 18, umfasst 7 Exons und kodiert für ein Protein mit zwei identischen Untereinheiten mit einem molekularen Gewicht von je 36 kDa.

In vitro Studien an humanen Karzinomzelllinien haben gezeigt, dass die TS-Expression ein bestimmender Faktor für die Sensitivität der Tumorzellen auf 5-FU ist (Berger et al., 1985; Johnston et al., 1992). Dies legte die Vermutung nahe, dass die TS-Expression im Tumor auch in vivo eine wichtige Rolle spielen könnte. Eine Vielzahl retrospektiver Studien konnte beim kolorektalen Karzinom einen Zusammenhang zwischen dem TS-Gehalt und dem Ansprechen auf eine 5-FU basierte Therapie aufzeigen, wobei eine hohe TS-Expression mit einem schlechteren Ansprechen einherging (Edler et al., 2000; Cascinu et al., 1999; Aschele et al., 2000; Paradiso et al., 2000; Aschele et al., 1999; Lenz et al., 1998; Leichman et al., 1997; Allegra et al., 2003). Es ergab sich jedoch nur bei ungefähr der Hälfte dieser Studien in der univariaten Analyse auch eine Korrelation mit dem Gesamtüberleben.

Diesen Zusammenhang konnten Allegra und Kollegen bei einem Kollektiv von 465 kolorektalen Tumoren der Dukes Stadien C und D jedoch nicht aufzeigen. (Allegra et al., 2002). Auch eine Studie, die ein Kollektiv mit 112 adjuvant behandelten Kolonkarzinompatienten im Stadium II und III untersuchte, fand keinen Einfluss der TS-Intensität auf das Gesamtüberleben (Tomiak et al., 2001).

Außerdem scheint im Hinblick auf das Therapieansprechen keine Korrelation zwischen der TS-Expression im Primärtumor und der in korrespondierenden Metastasen zu bestehen (Aschele et al., 2000, Findlay et al., 1997).

In einer Untersuchung mit 420 kurativ operierten Patienten mit Kolonkarzinomen im Stadium III, die ein Bolus-5-FU-Regime erhalten hatten, ergab sich überraschenderweise, dass eine hohe TS-Expression mit einer verminderten Rezidivhäufigkeit und einer längeren Gesamtüberlebenszeit einherging (Edler et al., 2002).

Insgesamt ist die Studienlage sowohl in Bezug auf die angewandten Methoden (z.B. Immunhistochemie versus RT-PCR; aus Primärtumor gewonnenes Material versus Material aus Metastasen), als auch in Bezug auf die eingesetzten Therapieregime (z.B. 5-FU als Dauerinfusion versus 5-FU als Bolus-Applikation) sehr heterogen, so dass die Frage nach dem sinnvollsten methodischen Ansatz zur TS-Bestimmung ebenso unklar ist wie der Stellenwert der Thymidylat-Synthase als prognostischem und prädiktivem Marker.

### **1.8.3 Thymidin-Phosphorylase (TP)**

Ein weiteres Enzym, das Gegenstand laufender Untersuchungen ist, ist die Thymidin-Phosphorylase (TP)(EC 2.4.2.4). Es besteht aus zwei identischen Untereinheiten, von denen jede ein Molekulargewicht von 55 kD besitzt. Es wurde gezeigt, dass die Thymidin-Phosphorylase identisch zu „platelet-derived endothelial cell growth factor“ (PD-ECGF) ist (Moghaddam, Bicknell, 1992; Usuki et al., 1992; Furukawa et al., 1992; Sumizawa et al., 1993). Dadurch erhält es neben seinen Funktionen im Nukleotidmetabolismus noch zusätzliche Potenz als Wachstumsfaktor. In vitro stimuliert es die Chemotaxis und die Aufnahme von [<sup>3</sup>H]Thymidin in Endothelzellen, in vivo zeigt es angiogenetische Aktivität (Ishikawa, et al., 1989; Miyazono et al., 1987; Haraguchi et al., 1994). Die Fähigkeit eines Tumors, die Bildung neuer Blutgefäße zu stimulieren, ist Voraussetzung für Größenwachstum und Metastasierung (Folkman et Klagsbrun, 1987; Liotta et al., 1974).

Basierend auf diesen Erkenntnissen zeigen einige Studien beim kolorektalen Karzinom, dass eine hohe TP-Expression ungünstig für das Gesamtüberleben ist (Van Triest et al., 2000; Takebayashi 1996, Aoki et al., 2002; Ichikawa et al., 2003; Salonga et al., 2000; Tokunaga et al, 2002). Andere Autoren konnten dies aber nicht bestätigen (Ikeguchi et al., 2000; Nishimura et al., 2002).

Interessanterweise ergab sich in einer Studie an unbehandelten Patienten, dass sogar die TP-Expression des Stromagewebes ein prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben sein könnte (Saito et al., 2000).

Gerade für das UICC Stadium III sind die Ergebnisse aber recht widersprüchlich. So findet eine Untersuchung an 32 kolorektalen Tumoren der Dukes Stadien B und C, dass eine niedrige TP-Expression mit einem besseren Überleben einhergeht, während Nishimura und Kollegen bei 88 Patienten im gleichem Stadium mit einer oralen 5-FU Therapie ein entgegengesetztes Resultat erhalten (Van Triest et al., 2000; Nishimura et al., 2002).

So erfordert es gerade beim adjuvant behandelten Karzinom noch weitere Studien, um die Vorhersagekraft von TP, nicht nur als angiogenetischem Faktor, sondern auch als Enzym im 5-FU Metabolismus besser beurteilen zu können.

#### **1.8.4 Dihydropyrimidin-Dehydrogenase**

In neuen Arbeiten wurde die Aufmerksamkeit auf das 5-FU abbauende Enzym Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPD) gelenkt. Das Enzym DPD (EC: 1.3.1.2) besteht aus zwei identischen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von je 105 kD (Lu et al., 1992).

Die Mehrzahl der Studien fand, dass ein niedriger Gehalt an DPD mit einem besseren Tumoransprechen oder einer verlängerten Gesamtüberlebenszeit einhergeht (Salonga et al., 2000; Kornmann et al., 2003; Ichkawa et al., 2003; Oi et al., 2004).

Allerdings konnte dieser Zusammenhang nicht in allen Studien bestätigt werden (Etienne et al., 2002; Ikeguchi, 2002).

Insgesamt ist die Datenlage noch sehr schwach und weitere Studien werden folgen müssen, um die Bedeutung von DPD als prognostischem Faktor besser einschätzen zu können.

#### **1.8.5 Kombinierte Betrachtung von TS, TP und DPD**

Unter der Vorstellung, die komplexen Vorgänge des Zusammenspiels unterschiedlicher Enzyme des 5-FU-Metabolismus besser abzubilden, wurden Studien einzelner Marker im Verlauf der letzten Jahre zunehmend durch die

kombinierte Analyse mehrerer molekularbiologischer Faktoren ergänzt. In einer retrospektiven Arbeit konnten Salonga und Mitarbeiter im Jahre 2000 beim fortgeschrittenen kolorektalen Karzinom zeigen, dass die kombinierte Analyse mehrerer Marker in der Voraussagekraft einem einzelnen überlegen ist. In dieser Untersuchung konnte mit Hilfe der Marker TS, TP und DPD für alle in die Studie eingeschlossenen Patienten (n=33) eine Vorhersage bezüglich des Ansprechens auf eine 5-FU-basierte Therapie getroffen werden (Salonga et al., 2000).

Zur Analyse dieser molekularbiologischen Marker wurden bisher viele verschiedene Methoden angewandt. So wurden biochemische Assays zur Bestimmung der Enzymaktivität, molekulargenetische Untersuchungen (RT-PCR) zur Ermittlung des mRNA-Gehalts oder immunhistochemische Verfahren zum Nachweis der Proteinexpression durchgeführt. Dabei sind vor allem die biochemischen und molekulargenetischen Ansätze auf die Verwendung von frischem Gewebe angewiesen. Als besonders sensitiv gilt dabei die RT-PCR, da hier im Gegensatz zu Enzym-Assays schon kleine Gewebeproben ausreichen. In der Sensitivität als fast gleichwertig angesehen, bietet die Immunhistochemie den Vorteil, dass hier archiviertes Material aus Paraffinblöcken verwendet werden kann und so die Möglichkeit besteht auch größere Kollektive zu untersuchen. Immunhistochemische Färbungen sind aber wiederum in der Auswertung fehleranfällig, da eine subjektive Einschätzung der Färbeintensität erforderlich ist.

Bislang wurde angenommen, dass eine Formalinfixierung die Struktur der RNA verändert und deshalb eine RNA-Isolation aus auf diese Weise archiviertem Material nicht möglich ist (Masuda et al., 1999).

In jüngster Zeit stellte sich jedoch immer mehr heraus, dass eine RNA-Isolation auch aus formalinfixiertem, in paraffin-eingebettetem Gewebe gute Ergebnisse erzielt (Koopmans et al., 1993; Mies, 1994; Godfrey et al., 2000). Noch gibt es aber nicht ausreichend Daten, ob diese Methode auch zur Bestimmung von prognostischen Faktoren beim kolorektalen Karzinom angewandt werden kann. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit konnten bisher Shirota und Mitarbeiter einen

prognostischen Stellenwert von TS aus paraffin-konserviertem Gewebe bei 50 fortgeschrittenen kolorektalen Karzinomen nachweisen (Shirota et al., 2001). Nur eine Studie an 10 kolorektalen Primärtumoren des Dukes Stadiums D führte einen Vergleich der TS-mRNA- und Proteinexpression durch (Wong et al., 2001).

Wie hoch dabei der mögliche Einfluss von verunreinigendem Bindegewebe ist, wurde durch eine Gegenüberstellung mit immunhistochemischen Ergebnissen an einem adjuvant behandelten Kollektiv noch nicht untersucht. Auch eine Bestimmung des mRNA-Gehalts von TP und DPD aus Paraffinmaterial wurde bis dato noch nicht durchgeführt.

## **1.9 Zielsetzung und Fragestellung**

Ziel der hier vorgestellten Untersuchung war es, anhand von paraffin-eingebettetem Tumorgewebe von Kolonkarzinompatienten im UICC Stadium III, die adjuvant mit einer 5-FU basierten Chemotherapie behandelt worden waren

1. die relative mRNA-Expression von TS, TP und DPD mittels Real-time PCR zu bestimmen
2. den Proteingehalt der o. g. Enzyme semiquantitativ mittels Immunhistochemie zu analysieren
3. eine Äquivalenzprüfung zwischen Immunhistochemie und Real-time-PCR bezüglich der o.g. Marker durchzuführen

Außerdem sollte in einer orientierenden Analyse

1. die Korrelation des TS-, TP- und DPD-Gehalts mit histo-pathologischen und klinischen Parametern bestimmt werden und
2. die prognostische Bedeutung von TS, TP und DPD sowohl einzeln als auch in Kombination überprüft werden

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Erhebung des Patientenkollektivs

Als Grundlage der vorliegenden Arbeit dienten Gewebeblöcke und klinische Daten einer prospektiven multizentrischen Studie der Arbeitsgemeinschaft für Gastroenterologische Onkologie in Nordrhein-Westfalen (Porschen et al., 1997; Arkenau et al., 2003). Im Rekrutierungszeitraum von Dezember 1991 bis Dezember 1994 wurden 702 Patienten mit einem kurativ operierten Kolonkarzinom im UICC Stadium III (pT1-4, pN positiv, M0) in die Studie eingebracht. Unter diesen waren 680 Patienten auswertbar. Studienziel war die Beurteilung der Effektivität und Toxizität einer adjuvanten Chemotherapie mit 5-FU (400mg/m<sup>2</sup>, ab 2. Zyklus 450 mg/m<sup>2</sup> als Bolusinfusion, Tag 1-5, 12 Zyklen, Arm A) und Leucovorin (100 mg/m<sup>2</sup>, Arm A) im Vergleich zu 5-FU/Levamisol (Moertel Schema, Arm B).

In Arm A der Studie wurden 349 und in Arm B 331 Patienten aufgenommen. 22 Patienten mussten ausgeschlossen werden, da sie folgende Einschlusskriterien nicht erfüllten: Fernmetastasen (12 Patienten), gleichzeitig aufgetretener Zweittumor (1 Patient), N0-Kategorie (1 Patient), Rektumkarzinom (4 Patienten), fehlende schriftliche Zustimmung (4 Patienten). Keiner der Patienten hatte in den fünf vorausgegangenen Jahren eine Chemo- oder Strahlentherapie erhalten. Es erfolgte eine stratifizierte Randomisation prognostisch wichtiger Untergruppen wie T- und N-Kategorie, Differenzierungsgrad und Lokalisation des Tumors, so dass die Verteilung dieser Gruppen in beiden Armen ausgeglichen war. Auch die Anzahl der untersuchten Lymphknoten stimmte im Mittel überein (14,2 ± 10,7 versus 13,7 ± 9,5; befallene Lymphknoten 3,8 ± 4,3 versus 3,7 ± 3,8) (Porschen et al., 2001).

Die Erfassung der klinischen Daten durch die teilnehmenden Zentren erfolgte anhand einheitlicher Patientendokumentationsbögen, die an die Studienzentrale zurückgesandt wurden. Die pathohistologischen Befunde des Operationspräparates wurden den Berichten der jeweiligen Pathologischen Institute

entnommen. Die Tumorpräparate wurden sowohl nach dem TNM-Stadium, als auch nach Tumorgröße, Anzahl befallener Lymphknoten im Verhältnis zur Gesamtzahl der untersuchten Lymphknoten und dem histologischen Differenzierungsgrad (G1-G4) beurteilt. Anhand dieser Daten ließ sich die Stadieneinteilung nach UICC (1992) ermitteln. Die Lokalisation der Tumore ging aus den Operationsberichten hervor.

Einheitlich wurde der Operationstermin als Beginn des Beobachtungszeitraums gewählt. Die Tumornachsorge sollte fünf Jahre betragen.

Die Nachsorge wurde in den ersten zwei Jahren vierteljährlich, in den darauf folgenden drei Jahren halbjährlich und danach nur noch jährlich durchgeführt. Das Spektrum der Untersuchungen umfasste Anamnese, körperliche Untersuchung, Test auf okkultes Blut im Stuhl, CEA-Spiegelbestimmung (optional), Abdomen-Sonographie, Röntgen-Thorax, Koloskopie und Computertomographie des Abdomens. Patienten, die sich nicht mehr zur Nachsorge in der an der Studie beteiligten Klinik vorstellten, wurden direkt kontaktiert oder es wurden Informationen über die zuständigen Hausärzte und Einwohnermeldeämter erfragt. Stichtag des Follow-up, der in diese Studie eingebrachten Patienten, war der 31. Juli 2001. Die mediane Nachbeobachtungszeit lag bei 82 Monaten (Arkenau et al., 2003).

Aus dem oben beschriebenen Patientenkollektiv waren in der Abteilung für Gastroenterologie der Universität Tübingen 204 in paraffin-eingebettete Tumorsektate verfügbar. Für die vorliegende retrospektive Studie wurde daraus eine Stichprobe von 50 Patienten ausgewählt. Die Selektion erfolgte nach rein chronologischen Kriterien: Tumorpräparate der 50 letzten Patienten, die in die Studie eingeschlossen wurden und von denen archiviertes Material erhältlich war, wurden zur Durchführung der Immunhistochemie und RT-PCR herangezogen.

## 2.2 Charakterisierung des Patientenkollektivs

Von den 50 ausgewählten Patienten stellte sich heraus, dass 4 Paraffinblöcke kein ausreichendes Tumorgewebe enthielten. Diese wurden von vornherein von der Auswertung ausgeschlossen. Im Folgenden wird deshalb von einer Stichprobengröße von 46 Patienten ausgegangen.

Davon waren 30 (65,2%) weiblich und 16 (34,8%) männlich. Das mediane Alter zum Zeitpunkt der Operation betrug 62 Jahre mit einer Spannweite von 32 bis 79 Jahren.

Der Median der Nachbeobachtungszeit betrug 58,2 Monate mit einer Spannbreite von 4,9-103,4 Monaten. In diesem Zeitraum traten 20 Todesfälle auf.

Die Tumordinfiltrationstiefe umfasste die Kategorien T2 bis T4, wobei 3 (6,5%) die Infiltrationstiefe T2, 38 (82,6%) T3 und 5 (10,9 %) Tumore die Infiltrationstiefe T4 erreichten. Ein Tumor (2,2%) war gut differenziert (G1), 29 (63%) mäßig (G2) und 16 (34,8%) schwach (G3). Undifferenzierte (G4) Tumore gab es nicht.

26 (56,5%) Patienten wiesen einen Lymphknotenbefall von weniger als drei benachbarten Lymphknoten (N1) auf, 12 (26,1%) von mehr als drei (N2) und bei 8 (17,4%) Patienten waren auch entferntere Lymphknoten (paraaortal, N3) befallen.

Fernmetastasierungen kamen nicht vor, so dass alle Patienten in das UICC Stadium III eingestuft werden konnten. 21 (45,7%) der Tumore waren rechtseitig (rechts der Flexura coli sinistra gelegen), 25 (54,3%) waren linksseitig lokalisiert.

20 (43,5%) Patienten erhielten eine Therapie mit 5-FU/Leucovorin (Arm A) und 26 (56,5%) mit 5-FU/Levamisol.

Die Charakteristika der hier untersuchten Stichprobe stimmen im Wesentlichen mit den Charakteristika des archiviert erhältlichen Materials überein (Tabelle 5).

Tabelle 5: Charakteristika des Patientenkollektivs und der Stichprobe

	archiviertes Material	Stichprobe
<b>Gesamt</b>	204	46
<b>Geschlecht</b>		
<b>Männlich</b>	83 (40,7%)	16 (34,8%)
<b>Weiblich</b>	121 (59,1%)	30 (65,2%)
<b>Medianes Alter (Jahre)</b>	62	62
<b>Tumorinfiltrationstiefe</b>		
<b>pT1</b>	0	0
<b>pT2</b>	19 (9,3%)	3 (6,5%)
<b>pT3</b>	155 (76,0%)	38 (82,6%)
<b>pT4</b>	30 (14,7%)	5 (10,5%)
<b>Lymphknotenkategorie</b>		
<b>pN1</b>	116 (56,9%)	26 (56,5%)
<b>pN2</b>	63 (30,9%)	12 (26,1%)
<b>pN3</b>	25 (12,3%)	8 (17,4%)
<b>Differenzierungsgrad</b>		
<b>G1 (gut)</b>	16 (7,8%)	1 (2,2%)
<b>G2 (mäßig)</b>	131 (64,2%)	29 (63,0%)
<b>G3 (schwach)</b>	56 (27,5%)	16 (34,8%)
<b>G4 (undifferenziert)</b>	1 (0,5%)	0 (0%)
<b>Lokalisation</b>		
<b>Rechts</b>	102 (50%)	21 (45,7%)
<b>Links</b>	102 (50%)	25 (54,3%)
<b>Behandlungsregime</b>		
<b>Arm A (5-FU/LV)</b>	105 (51,5%)	20 (43,5%)
<b>Arm B (5-FU/LEV)</b>	99 (48,5%)	26 (56,5%)

## 2.3 Materialien

Die verwendeten Materialien für die immunhistochemischen und molekulargenetischen Untersuchungen sind im Anhang aufgelistet.

## 2.4 Immunhistochemische Untersuchungen

### 2.4.1 Indirekte Avidin-Biotin Methode

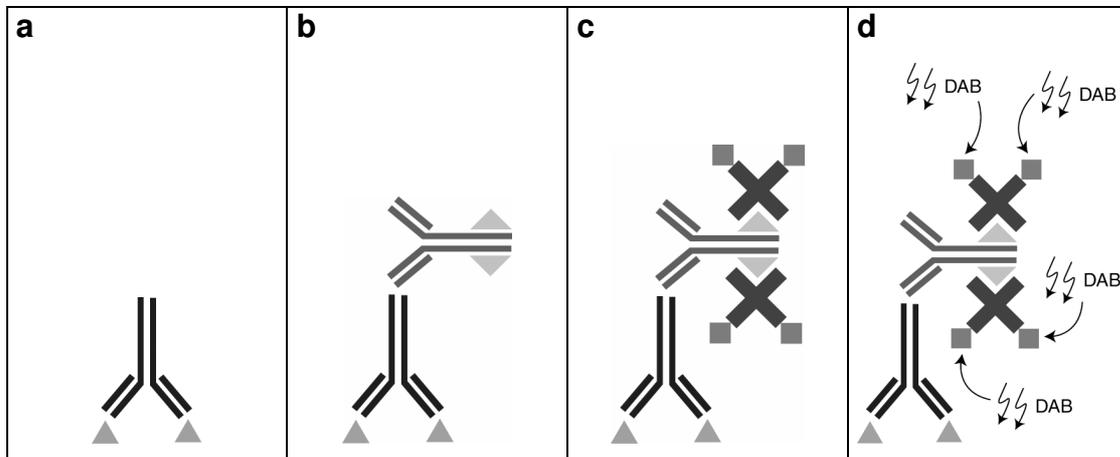
Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden mit Hilfe der enzymgekoppelten Streptavidin-Biotin Methode („labeled avidin-biotin technique“), an neutral gepuffertem, formalinfixiertem, in paraffin-eingebettetem Gewebe, durchgeführt.

Diese Methode nützt die starke Affinität von Avidin zu Biotin (Dissoziationskonstante  $10^{-19}\text{M}$ ). Avidin besitzt vier Bindungsstellen für Biotin, das ein wichtiges Vitamin und Coenzym ist. Zuerst wird ein unkonjugierter Primärantikörper auf das Präparat aufgetragen, der nach dem Grundprinzip der Antigen-Antikörperreaktion spezifisch an das zu untersuchende Gewebsantigen bindet. Um diese Reaktion sichtbar machen zu können wird die indirekte Avidin-Biotin Methode angewandt. Dazu wird ein mit Biotin konjugierter Sekundärantikörper, der gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers gerichtet ist, aufgetragen. Dann wird peroxidasegekoppeltes Avidin zugegeben, das mit den freien Bindungsstellen des Biotins kovalent bindet (Abbildung 3). An einen Sekundärantikörper können mehrere solcher Komplexe binden, was eine Erhöhung der Sensitivität bewirkt. Das Enzym Peroxidase bildet mit dem Substrat Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) einen Komplex, der zusammen mit einem Chromogen als Elektronendonator die Endprodukte der Reaktion produziert: das farbige Reaktionsprodukt und  $\text{H}_2\text{O}$ . Als Chromogen wird 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB) verwendet, welches ein braunes Reaktionsprodukt ergibt.

Die peroxidasegekoppelte Avidin-Biotin Technik zeichnet sich im Vergleich zum Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex Verfahren (ABC-Komplex) durch eine vier- bis achtfach höhere Empfindlichkeit aus (Giorno, 1984).

Da manche Gewebe endogenes Biotin enthalten und unspezifisch peroxidasegekoppeltes Avidin binden und so eine Färbung vortäuschen können (Bussolati et al., 1997), erwies es sich in der vorliegenden Arbeit als günstig diese endogene Aktivität mit Avidin-Biotin zu blocken. Dabei wird zuerst Avidin

aufgetragen, um endogenes Biotin zu binden. Danach wird Biotin zugegeben, um noch eventuell freiliegende Bindungsstellen des Avidins zu besetzen.



**Abbildung 3a-d: indirekte Avidin-Biotin-Methode**

**a: Primärantikörper bindet an Antigen**

**b: biotinylierter Sekundärantikörper bindet an das Fc-Fragment des Primärantikörpers**

**c: Peroxidase gekoppeltes Avidin reagiert kovalent mit Biotin**

**d: Reaktion der Peroxidase mit DAB, um braune Anfärbung zu erhalten**

## 2.4.2 Durchführung der immunhistochemischen Färbungen

### 2.4.2.1 Anfertigung der Schnitte

Von den in paraffin-eingebetteten Tumorblöcken wurden mittels eines Rotationsmikrotoms für die immunhistochemischen Färbungen 4 µm dicke und für die molekulargenetischen Untersuchungen 2 x 10 µm dicke Schnitte angefertigt. Waren von einem Tumor mehrere Blöcke vorhanden, wurde darauf geachtet, dass immer derselbe Block Verwendung fand.

Für die molekulargenetischen Untersuchungen musste das Probenmaterial direkt in ein Eppendorfgefäß gefüllt werden. Die Schnitte für die immunhistochemischen Färbungen wurden zur besseren Anhaftung auf einen mit APES (3-Aminopropyl-triethoxysilan) beschichteten Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 37°C getrocknet. Danach erfolgte eine Lagerung bei Raumtemperatur.

#### 2.4.2.2 Immunhistochemische Darstellung der Thymidylat-Synthase mit dem monoklonalen Primärantikörper TS 106

Thymidylat-Synthase (EC: 2.1.1.45) ist ein zytosolisches Enzym, das aus zwei identischen Untereinheiten mit einer molekularen Masse von ungefähr 36 kD besteht. Der monoklonale Antikörper TS 106 bindet spezifisch an humane Thymidylat-Synthase und zeigt unwesentliche Kreuzreaktionen mit anderen zellulären Proteinen. In humanen Kolonkarzinomzelllinien und –geweben ergab sich ein granuläres zytoplasmatisches Färbemuster (Johnston et al., 1991).

Das Färbeprotokoll in dieser Untersuchung wurde mit leichter Modifizierung an das von Johnston et al. angelegt. Jede Färbereihe enthielt sowohl eine Positiv- als auch eine Negativkontrolle. Waschschrte bestanden, falls nicht anders ausgewiesen, aus dem Spülen der Präparate in PBS für 2 x 5 min.

Praktische Vorgehensweise:

##### Entparaffinisierung und Rehydrierung:

Eintauchen der Präparate in:

- 2 x 10 min Xylol
- 2 x 2 min absoluter Ethanol
- 2 x 2 min 95% Ethanol
- 1 x 2 min 80% Ethanol
- 1 x 2 min 70% Ethanol
- 1 x 2 min Aqua dest.

##### Blockade der endogenen Peroxidase:

Um eine unspezifische Hintergrundfärbung zu verhindern, muss die endogene Peroxidaseaktivität des Gewebes unterdrückt werden. Durch Inkubation mit einem Substratüberschuss an  $H_2O_2$  kann das katalytische Zentrum der Peroxidase blockiert und reversibel gehemmt werden (10 min in 3%  $H_2O_2$ ). Danach wurden die Präparate für 3 min unter fließendem Wasser (destilliert) gespült.

Demaskierung der Gewebsantigene:

Durch die Fixierung des Gewebes mit Formalin bilden sich quervernetzende Aldehydverbindungen, die Gewebsantigene maskieren und so eine Anlagerung des Primärantikörpers erschweren. Diese Verbindungen können durch Kochen in Citratpuffer gelöst werden und ermöglichen so eine ungehinderte Antigen-Antikörperreaktion (Cuevas et al., 1994).

Genaueres Vorgehen: Nach dem Erhitzen des Citratpuffers ohne Präparate in der Mikrowelle bei 780 W, wurden die Präparate dazugegeben und für weitere 10 min bei 150 W gekocht.

Danach ließ man die Objektträger für 20 min abkühlen, spülte sie zweimal kurz in Wasser und für 2 x 5 min in PBS.

Avidin-Biotin-Komplex:

Endogenes Biotin sollte mit diesem Schritt blockiert werden.

Zu Beginn wurden 1-2 Tropfen Avidin auf die Präparate getropft (15 min), dann folgte Waschen in PBS und erneutes Inkubieren mit Biotin (15 min) mit anschließendem Spülen in PBS.

Blockade von unspezifischen Kreuzreaktionen:

Eine Adsorption des Primärantikörpers an geladenes Kollagen und andere Bindegewebelemente kann durch Vorbehandlung der Probe mit tierischem Serum vermieden werden. Dabei lagert sich tierisches Serumalbumin an die geladenen Elemente an. In dieser Untersuchung wurden die Präparate mit 5% Ziegen Serum (in PBS) für 30 min behandelt.

Primärantikörper:

Der Primärantikörper TS 106 wurde in einer Verdünnung von 1:50 in PBS auf die Proben aufgetragen und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Bei der Negativkontrolle wurde hier statt des Primärantikörpers PBS verwendet. Dann folgte wiederum Waschen in PBS.

Biotin-Streptavidin-Peroxidase Reaktion:

Die Sichtbarmachung des Primärantikörpers mittels einer braunen Farbreaktion erfolgte nach folgendem Schema:

**Tabelle 6: Schritte zur farblichen Darstellung des Primärantikörpers**

Reagenz	Inkubationszeit
Biotinylierter Sekundärantikörper (Lösung A)	30 min
Waschen in PBS	2 x 5 min
Peroxidase gekoppeltes Streptavidin (Lösung B)	30 min
Waschen in PBS	2 x 5 min
DAB (immer frisch angesetzt)	10 min
2 x Waschen in H <sub>2</sub> O	1 min
Gegenfärben mit Hämalaun	10 s
Waschen unter fließendem Wasser	Einige Minuten

Zum Schluss wurden die Präparate mit Glycerolgelatine abgedeckt.

#### 2.4.2.3 Immunhistochemische Darstellung der Thymidin-Phosphorylase (TP) mit dem monoklonalen Antikörper 1C6-203

Das Enzym Thymidin-Phosphorylase (EC 2.4.2.4) besteht aus zwei identischen Untereinheiten, von denen jede ein Molekulargewicht von 55 kD besitzt. Es wurde gezeigt, dass Thymidin-Phosphorylase identisch zum so genannten „platelet-derived endothelial cell growth factor“ (PD-ECGF) ist (Moghaddam, Bicknell, 1992; Usuki et al., 1992; Furukawa et al., 1992; Sumizawa et al., 1993).

In der vorliegenden Studie wurde mit einem monoklonalen Antikörper (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) gearbeitet, der spezifisch an Thymidin-Phosphorylase bindet und besonders gut für in paraffin-eingebettetes Gewebe geeignet ist (Kono et al., 2001).

Das Färbeprotokoll der Thymidin-Phosphorylase wurde entsprechend dem oben genannten Protokoll der Thymidylat-Synthase durchgeführt. Den Empfehlungen des Herstellers entsprechend wurden folgende Modifikationen vorgenommen:

- Die Blockade der endogenen Peroxidase erfolgte erst nach der Antigen-Demaskierung mit 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in absolutem Methanol für 5 min.
- Unspezifische Kreuzreaktionen wurden mit 20% Ziegen Serum verhindert.
- Der Primärantikörper verblieb in einer Verdünnung von 1:100 (in im Kit enthaltenem Verdünnungspuffer) für 1 h bei Raumtemperatur auf den Präparaten.

Eine in jedem Lauf mitgeführte Negativ- (statt Primärantikörper PBS) und Positivkontrolle diente dazu, mögliche Intensitätsunterschiede zwischen den Färbereihen und unspezifische Hintergrundfärbungen zu detektieren.

#### 2.4.2.4 Immunhistochemische Darstellung der Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPD) mit dem monoklonalen Antikörper 2H9-1b

Das Enzym Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (EC:1.3.1.2) besteht aus zwei identischen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von je 105 kD. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Antikörper (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) bindet spezifisch an DPD und ist für in paraffin-eingebettetes Gewebe geeignet.

Das Färbeprotokoll entsprach dem der Thymidin-Phosphorylase. Der Primärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:75 in Verdünnungspuffer (im Kit enthalten) aufgetragen und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Auch hier sicherte eine mitgeführte Positiv- und Negativkontrolle (ohne Primärantikörper) die Qualität jeder Färbereihe.

#### **2.4.3 Mikroskopische Analyse**

Die mikroskopische Analyse erfolgte mit bis zu 10- x 100-facher Vergrößerung. Die Auswertung erfolgte „einfach blind“, das bedeutet, dass der Auswerter die Präparate ohne Kenntnis von klinischen Daten beurteilte. Bei zweifelhaften Fällen wurde ein zweiter Untersucher hinzugezogen und eine konsensuelle Entscheidung getroffen.

Eine Übersicht über die verwendeten Auswertungsschemata gibt Tabelle 7.

#### 2.4.3.1 Thymidylat-Synthase

Hier wurde die zytoplasmatische Färbung der Tumorzellen qualitativ entsprechend der Intensität nach vier Graden eingeteilt: 1 (negativ), 2 (schwach), 3 (mittel), 4 (stark). Maßgebend dafür waren die Tumoreareale, die am stärksten angefärbt waren.

Zur statistischen Analyse wurde die Intensität in zwei Gruppen zusammengefasst: TS negativ (1) versus TS positiv (2-4).

#### 2.4.3.2 Thymidin-Phosphorylase

Auch hier wurde die zytoplasmatische Färbung der Tumorzellen qualitativ nach der Intensität bewertet: 1 (negativ), 2 (schwach), 3 (mittel), 4 (stark). Außerdem wurde noch der Prozentsatz an angefärbtem Tumorgewebe semi-quantitativ abgeschätzt und in vier Gruppen aufgeteilt. (0-10% (1), 11-25% (2), 26-50% (3), 51-100% (4)). Die Dichotomisierung erfolgte in beiden Gruppen in niedrig (1 und 2) versus hoch (3 und 4). Um beide Auswertungsschemata miteinander zu verbinden, wurde ein Index aus dem Produkt von Intensität und Zellzahl gebildet. Da in der Literatur auch eine Färbung von Stromagewebe beschrieben wird (Saito et al., 2000; Takebayashi et al., 1996; Triest et al., 2000), erschien es als günstig, auch das Bindegewebe nach den gleichen Kriterien wie das Tumorgewebe zu beurteilen.

#### 2.4.3.3 Dihydropyrimidin-Dehydrogenase

Die Auswertung erfolgte qualitativ nach der Intensität (negativ, schwach, mittel, stark) und semi-quantitativ nach der Zellzahl gefärbter Tumorzellen (0-10%, 11-25%, 26-50%, 51-100% angefärbt). Ebenso wie bei der Thymidin-Phosphorylase wurde ein Index aus dem Produkt von Intensität und Zellzahl gebildet. Auch die Dichotomisierung zur statistischen Auswertung wurde gleich wie für die Thymidin-Phosphorylase vorgenommen.

Tabelle 7: Übersicht über die mikroskopische Auswertung von TS, TP und DPD

	Intensität	Zellzahl	Index
<b>TS</b> Tumor	1 (negativ) 2 (schwach) 3 (mittel) 4 (stark)	Keine Auswertung	Keine Auswertung
<b>TP</b> Tumor und Stroma	1 (negativ) 2 (schwach) 3 (mittel) 4 (stark)	1 (0-10%) 2 (11-25%) 3 (26-50%) 4 (51-100%)	Intensität x Zellzahl
<b>DPD</b> Tumor	1 (negativ) 2 (schwach) 3 (mittel) 4 (stark)	1 (0-10%) 2 (11-25%) 3 (26-50%) 4 (51-100%)	Intensität x Zellzahl

## 2.5 Molekulargenetische Untersuchungen

### 2.5.1 RNA Isolation aus in paraffin-eingebettetem Gewebe

Die Isolation der Gesamt-RNA aus 2 x 10 µm dicken Paraffinschnitten erfolgte mittels des „High Pure RNA Paraffin Kit“ auf die vom Hersteller beschriebene Art und Weise. Dabei wird nach einer anfänglichen Entparaffinisierung und Lyse des Gewebes über ein System aus Wasch- und Trennsäulen mit Hilfe verschiedener Pufferlösungen und mehreren Zentrifugationsschritten die RNA extrahiert.

Alle Arbeitsschritte fanden bei Raumtemperatur statt. Die isolierte RNA wurde sofort bei -80 °C gelagert.

#### Entparaffinisierung:

In mehreren Schritten wurden Xylol und Ethanol zugegeben und nach Zentrifugation der jeweilige Überstand verworfen. Diese Prozedur wurde zweimal

wiederholt, um Paraffinrückstände zu vermeiden. Anschließend wurde die Gewebeprobe bei 55 °C 10 min getrocknet.

#### Lyse:

Die Gewebeprobe wurde mit 40 µl Proteinase K in einer Pufferlösung über Nacht bei 55 °C inkubiert. Dieser Schritt diente der Homogenisierung der Proben und der Inaktivierung endogener Nuklease.

#### Binden der RNA:

Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von Bindungspuffer, der Guanidinthiocyanat enthält, das eine Inaktivierung von RNase gewährleistet. Das Gemisch wurde in den „High Pure filter tube“ eingebracht, der eine Membran aus Glasfaservlies enthält und damit Nukleinsäuren selektiv adsorbieren kann. Durch eine anschließende Zentrifugation bei 8000 rpm und 14000 rpm für 30 s konnte der Durchfluss verworfen werden.

#### Erstes Waschen:

Die nun erforderlichen Waschschritte dienten der Entfernung von verunreinigenden Substanzen, in der Hauptsache Salze oder Proteine.

Hierfür wurden zuerst 500 µl Waschpuffer I in das Tube pipettiert und anschließend für 15 s bei 8000 rpm zentrifugiert. In einem zweiten und dritten Schritt mussten jeweils 500 und 300 µl Waschpuffer II zugegeben und bei 8000 rpm (15 s) und 14000 rpm (2 min) wieder abzentrifugiert werden.

#### Erste Elution:

Mittels 90 µl Elutionspuffer und Zentrifugation bei 8000 rpm für eine Minute wurden die Nukleinsäuren vom Filter wieder gelöst und in einem 1,5 ml Tube aufgefangen. Die Inkubation des Eluats mit DNase für 45 min bei 37 °C und Proteinase K für 1 h bei 55 °C trug dazu bei, reine RNA zu gewinnen.

#### Zweites Waschen:

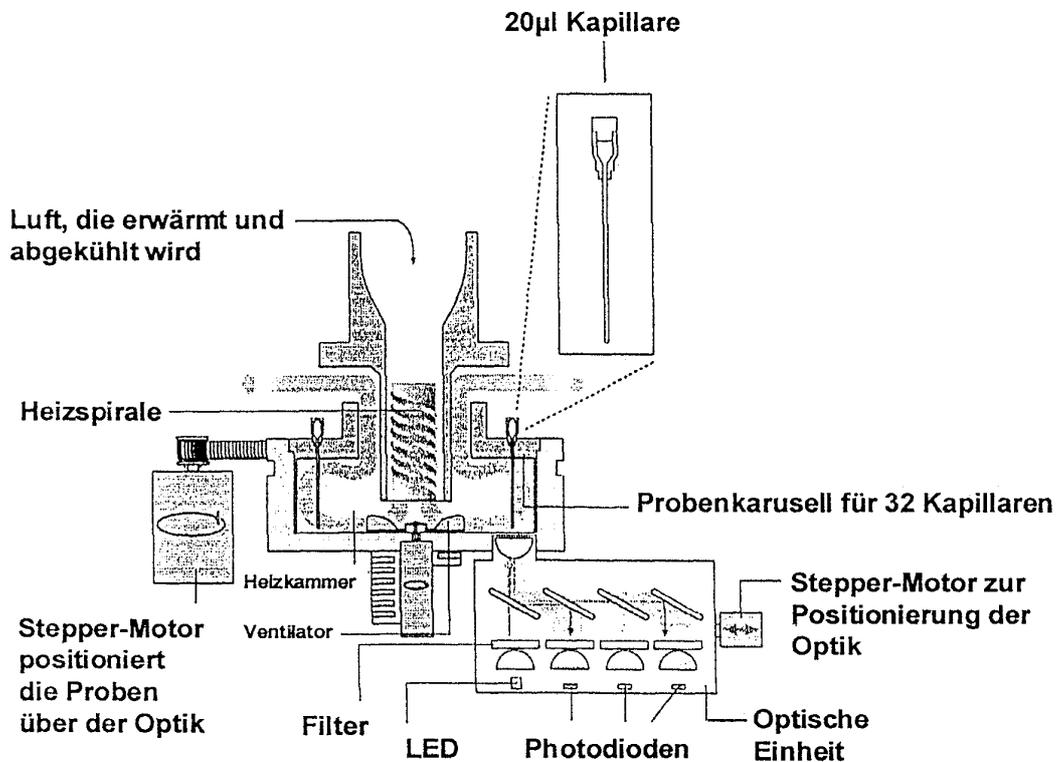
Erneutes Waschen in einem „High Pure filter tube“ erfolgte wie in der bereits oben beschriebenen Prozedur.

#### Zweite Elution:

Die erneute Anwendung von 50 µl Elutionspuffer und Abzentrifugation bei 8000 rpm für 1 min führte schließlich zur Gewinnung von hochkonzentrierter RNA.

## 2.5.2 Real-time-PCR (Echt-Zeit-Polymerasekettenreaktion) im LightCycler

### 2.5.2.1 Das LightCycler Instrument



**Abbildung 4: Das LightCycler Instrument**  
(mit freundlicher Genehmigung von Roche Diagnostics)

Das LightCycler Instrument basiert im Wesentlichen auf einem Thermocycler und einer optischen Einheit (Abbildung 4). Im Gegensatz zu einer konventionellen PCR, bei der die Temperatur der einzelnen PCR Schritte durch einen Heizblock reguliert wird, wird beim LightCycler Raumluft verwendet. Diese wird mit Hilfe eines Ventilators über eine Heizspirale geleitet und erwärmt. Aufgrund der geringeren Wärmespeicherkapazität der Luft ermöglicht diese Methode eine sehr schnelle Temperaturänderung des Probenmaterials von bis zu 20 °C pro Sekunde sowie einer Genauigkeit von  $\pm 0,3$  °C.

Außerdem begünstigt das große Verhältnis von Oberfläche zu Volumen der Borosilikat-Glaskapillaren einen schnelleren Wärmetransport. Im Probenkarussell finden 32 Proben à 20 µl Platz. Es wird durch einen Motor bewegt, um die Kapillaren in eine korrekte Position zur optischen Einheit zu bringen. Über

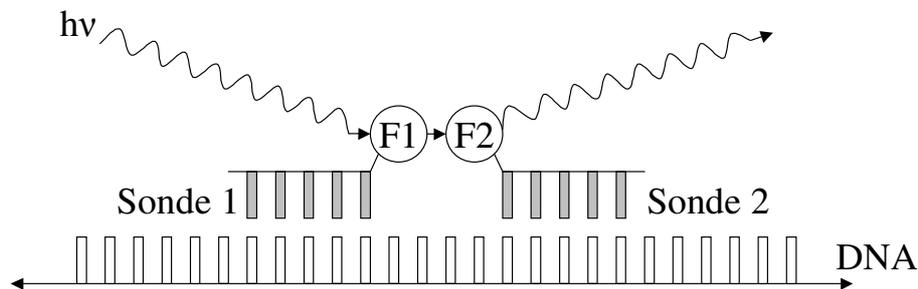
Photodioden findet dort die Detektion der PCR Produkte statt. Über die Messung der Fluoreszenz, die auf die Spitze der Kapillare gebündelt wird, kann die Amplifikation (Vermehrung) in Echtzeit simultan am Computermonitor dargestellt werden. Die Messzeit pro Kapillare beträgt annähernd 20 Millisekunden, für einen PCR Zyklus werden ca. 15-20 Sekunden benötigt. Die Aufzeichnung und Analyse der Daten erfolgt durch die LightCyclersoftware (Version 3.5).

#### 2.5.2.2 Detektion der PCR-Produkte über Hybridisierungs-Sonden

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Detektion der PCR Produkte über Hybridisierungs-Sonden. Dabei handelt es sich um zwei für die Ziel-DNA sequenzspezifische Oligonukleotide, an die Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind.

Fluorescein ist am 3'-Ende von Sonde 1 gebunden, Sonde 2 trägt am 5'-Ende den Farbstoff LightCycler Red 640 (N-hydroxysuccinimideester). Die Sequenz der Sonden ist so gewählt, dass sie in engem Abstand nebeneinander (1-5 Nukleotide) mit der Ziel-DNA hybridisieren. Dies kann nur in der Annealing-Phase (Anlagerungsphase) geschehen, wenn die DNA einzelsträngig vorliegt. Zum Messzeitpunkt am Ende jeder Annealing-Phase wird das Fluorescein durch von der optischen Einheit emittiertem blauem Licht (470nm) angeregt, so dass es Licht grüner Wellenlänge aussendet (530 nm). Diese abgestrahlte Energie regt schließlich LightCycler Red 640 an, rotes Licht der Wellenlänge 640 nm abzugeben (Abbildung 5). Dieses Phänomen tritt nur auf, wenn die Fluoreszenzfarbstoffe der beiden Sonden eng aneinander liegen und wird als FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) bezeichnet (Wittwer et al., 1997).

Das abgestrahlte rote Licht kann dann im Kanal F2 der optischen Einheit registriert werden. Das emittierte Licht ist proportional zur Menge der gesuchten Ziel-DNA.



**Abbildung 5: Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET)**

**F1=Fluorescein; F2=LC Red 640; DNA=Desoxyribonukleinsäure;**

**hv=Energie der Lichtquanten mit  $h$ =Plancksches Wirkungsquantum und  $\nu$ =Frequenz**

### 2.5.2.3 Relative Quantifizierung („Calibrator normalized relative Quantification“)

Bei der Untersuchung des mRNA-Gehalts einer Zelle wird häufig nicht die absolute Menge, sondern nur das Verhältnis zu einem anderen Genprodukt, des sogenannten „Housekeeping“-Gens, bestimmt. Dabei geht man davon aus, dass die Menge an mRNA dieses „Referenzgens“ in einer Zelle konstant ist und nur der Gehalt an mRNA des zu untersuchenden Genes variiert. In der vorliegenden Arbeit wurde als „Housekeeping“-Gen G6PDH (Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase) verwendet. Der Vergleich mit einem Referenzgen hat den Vorteil, dass mögliche Schädigungen des Präparates oder auch Pipettierungenauigkeiten, dann sowohl das Referenz- als auch das Zielgen betreffen und so wieder ausgeglichen werden, da nur der Quotient aus Ziel- und Referenzgen und nicht die absolute Menge bestimmt wird. Das „Housekeeping“-Gen übernimmt somit die Funktion einer internen Kontrolle.

Außerdem wurde in jedem Lauf immer noch eine Eichprobe (calibrator), die eine konstante Menge an der zu untersuchenden mRNA enthielt, mitgeführt. Dies ermöglicht nicht nur eine Normierung zwischen den einzelnen Proben innerhalb eines Laufs, sondern führt auch zu einer Vereinheitlichung zwischen verschiedenen PCR-Läufen.

Der genormte Quotient NR (Normalized Ratio) berechnet sich wie folgt:

$$\text{NR} = \frac{\text{Konzentration Zielgen (Probe)}}{\text{Konzentration Referenzgen (Probe)}} \div \frac{\text{Konzentration Zielgen (calibrator)}}{\text{Konzentration Referenzgen (calibrator)}}$$

Die Berechnung der relativen Menge von Ziel- und Referenzgen beruht auf dem Übergangspunkt („crossing point“) jeder Probe. Um zu verstehen, wie der Übergangspunkt berechnet wird, muss man wissen, dass bei einer PCR die Menge des PCR Produktes einem exponentiellen Wachstum folgt. Trägt man die Menge des amplifizierten Materials bzw. des Fluoreszenzsignals gegen die Zahl der Zyklen auf, erhält man eine logarithmische Kurve mit einer flachen Anstiegsphase, einer steilen log-Phase und einer Plateauphase (Abbildung 6). Der Übergangspunkt ist definiert als die Zyklenzahl, bei der die Amplifikation ihre exponentielle Phase beginnt und proportional zur initialen Konzentration ist. Der Crossing Point ist also abhängig von der Ausgangsmenge an Ziel-DNA im Reaktionsansatz.

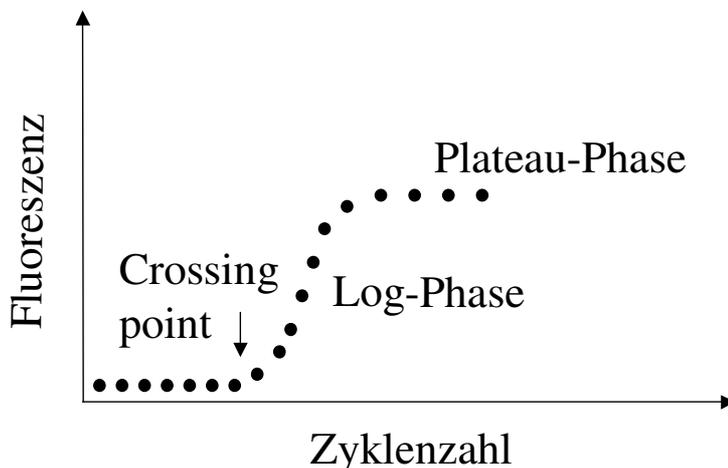


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Phasen der PCR-Produkt-Anhäufung

Hinzu kommt, dass nicht alle Primer und Sonden die gleiche Effizienz aufweisen. Die Effizienz kann Werte zwischen 1 und 2 annehmen, wobei bei einer Effizienz von 1 kein Material amplifiziert würde, und eine Effizienz von 2 den Idealfall mit einer Verdoppelung des DNA Gehalts bedeutete.

Eine PCR folgt somit folgender Gleichung ( $cp$ =crossing point):

Anzahl der Kopien = initiale Menge an Kopien  $\times$  Effizienz<sup>cp</sup>

Bei der Auswertung mit der LightCycler Relative Quantification Software wurde dies berücksichtigt, indem für jede Calibrator RNA ein kit-spezifischer Korrekturfaktor eingegeben wurde.

### 2.5.3 Reverse Transkription

Die reverse Transkription wurde für spezifisch für TS-, TP- und DPD-mRNA durchgeführt. Außerdem wurde parallel dazu die mRNA des „Housekeeping“-Gens G6PDH spezifisch in cDNA umgeschrieben. Hierzu wurden die LightCycler TS/TP/DPD mRNA Quantification Kits<sup>PLUS</sup> verwendet und die Anweisungen des Herstellers eingehalten.

Bei der reversen Transkription bindet ein spezifisches Oligonukleotid (=Primer) an Sequenzen der Ziel-mRNA. Dies ermöglicht der RNA-abhängigen Polymerase (AMV Reverse Transkriptase= avian myeloblastosis virus reverse transkriptase) an der RNA anzusetzen und in DNA umzuschreiben. Hierzu stehen dem Enzym die im Reaktionsansatz vorhandenen Trinukleotide (dNTPs) zur Verfügung.

In jedem Umschrieb wurden sowohl eine Calibrator-RNA als auch eine Negativkontrolle mitgeführt.

Der Master Mix wurde wie folgt angesetzt:

**Tabelle 8: Ansatz des Master Mix**

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
Nuklease freies H <sub>2</sub> O	2 µl	
10 x konz. Reaktionspuffer	2 µl	1x
TS/TP/DPD /G6PDH spezifischer Primer	2 µl	0,2 µM
dNTP Mix	2 µl	1 mM
Rnase-Inhibitor	1 µl	40 U
Reverse Transkriptase	1 µl	25 U
Gesamtvolumen	10 µl	

Für jede cDNA Herstellung wurden 10 µl Mastermix und 10 µl RNA in ein Eppendorfgefäß pipettiert.

Um ein Anlagern der spezifischen Primer an die RNA zu ermöglichen, mussten die Proben 10 min bei Raumtemperatur inkubiert werden. Der eigentliche Umschrieb erfolgte für 60 min bei 42°C im Wasserbad. Um die Reaktion zu beenden, bewährte sich die Inkubation der Proben bei 94°C, da dadurch die Reverse Transkriptase denaturiert und eine weitere Interaktion des Enzyms mit der RNA verhindert wird.

Eine Lagerung der Proben erfolgte bei –20°C.

#### **2.5.4 LightCycler PCR Protokoll zur Amplifikation von TS, TP und DPD**

Auch hier wurde den Anweisungen des Herstellers Folge geleistet. Die PCR Primer sind in Exons lokalisiert um die Co-Amplifikation von genomischer DNA zu vermeiden.

Die im Kit enthaltene thermostabile FastStart Taq Polymerase basiert auf der „Hot Start“ Technologie und minimiert die Amplifikation von unspezifischen PCR Produkten (Kellogg et al., 1994).



Zur Überprüfung von Korrelationen zwischen klinischen Parametern und experimentell ermittelten Ergebnissen, wurde der Chi-Quadrat-Test angewandt. Als signifikant wurden p-Werte von  $< 0.05$ , entsprechend einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% beurteilt. War die erwartete Häufigkeit in einer Zelle der Vierfelder-Tafel kleiner als fünf, wurden die p-Werte nach dem Exakten Test nach Fisher korrigiert.

Das Prinzip der Vierfeldertafel wurde auch für den Methodenvergleich angewandt. Beide Methoden wurden für die entsprechenden Marker in hoch und niedrig dichotomisiert und gegenübergestellt. Die Zahl der übereinstimmenden Patienten lässt sich an den diagonalen Feldern ablesen.

Um einen Unterschied bei nicht dichotomisierter Aufteilung der Daten in der RT-PCR zu detektieren, wurde der Whitney-U-Test angewandt. Dies ist ein Rangsummentest, der jedem Messwert einen Rangplatz zuordnet. Über einen Vergleich der Rangplätze kann dieses Verfahren eine Aussage treffen, ob sich zwei Stichproben in der Verteilung der Größe der Messwerte signifikant unterscheiden.

Die Überlebenszeitanalyse erfolgte nach dem Verfahren nach Kaplan-Meier (Kaplan et Meier, 1958). Alle Patienten, die bis zum Stichtag (31.7.2001) überlebten und diejenigen, die nicht tumorbedingt verstorben waren, wurden als zensierte Daten behandelt. Zensierte Daten sind Daten mit noch vorläufigem Charakter, da das erwartete Ereignis (tumorbedingter Tod) nicht eingetreten ist. Die Information aus diesen Daten gingen als Schätzwerte in die Berechnungen mit ein, da für jeden Tag die Wahrscheinlichkeit errechnet wurde, diesen lebend zu überstehen. Die Methode nach Kaplan-Meier berücksichtigt die Informationen aller Patienten so lange, wie diese beobachtet worden sind. Der erste Teil der Kurve stellt eine relativ genaue Schätzung dar, da er sich auf viele Patienten stützt. Der letzte Teil der Kurve ist dagegen mit einer größeren Ungenauigkeit behaftet.

Unterschiede in den Überlebenskurven einzelner Parameter wurden nach Breslow (Breslow, 1970) und Log Rank (Peto et Pike, 1973) mit einem

Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  ermittelt. Beide Verfahren unterscheiden sich in der Gewichtung des Beobachtungszeitraumes. Der Breslow Test legt ein größeres Gewicht auf frühe Beobachtungen und ist somit weniger sensitiv für Spätereignisse am Ende der Überlebenskurve, wenn nur noch wenige Patienten am Leben sind. Für die Bewertung des letzten Teils der Kurve ist daher der Log Rank Test besser geeignet. Angegeben sind jeweils die 5-Jahresüberlebensraten mit den medianen Überlebenszeiten.

Ebenfalls mit der Methode nach Kaplan-Meier wurde das krankheitsfreie Überleben berechnet. Hier galt der Eintritt eines Rezidivs ab dem Datum der Operation als das zu zensierende Ereignis. Auch hier wurden die krankheitsfreien 5-Jahresraten mit den medianen krankheitsfreien Zeiten angegeben.

Zur Prüfung der Unabhängigkeit der einzelnen Variablen untereinander bezüglich der prognostischen Aussagekraft, wurde eine multivariate Analyse nach dem Cox'schen Regressionsmodell durchgeführt (Cox, 1972).

Auch hier wurden p-Werte von  $<0,05$ , entsprechend einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% als signifikant beurteilt.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Auswertbares Material

Drei von 46 Proben waren in Bezug auf die immunhistochemisch bestimmte DPD-Expression aufgrund von unzureichendem Tumormaterial nicht auswertbar. Bei der Analyse der TS-Genexpression mittels PCR wurden zwei Proben wegen Abweichungen in der Kalibrator RNA von der Auswertung ausgeschlossen. Nur für 41 Proben gelang die Durchführung der PCR-Untersuchung der DPD-Genexpression, da bei fünf Proben das Zielgen nicht amplifiziert wurde und somit kein Quotient berechenbar war.

Tabelle 10 gibt für jeden Marker einen Überblick über die jeweils auswertbaren Fallzahlen.

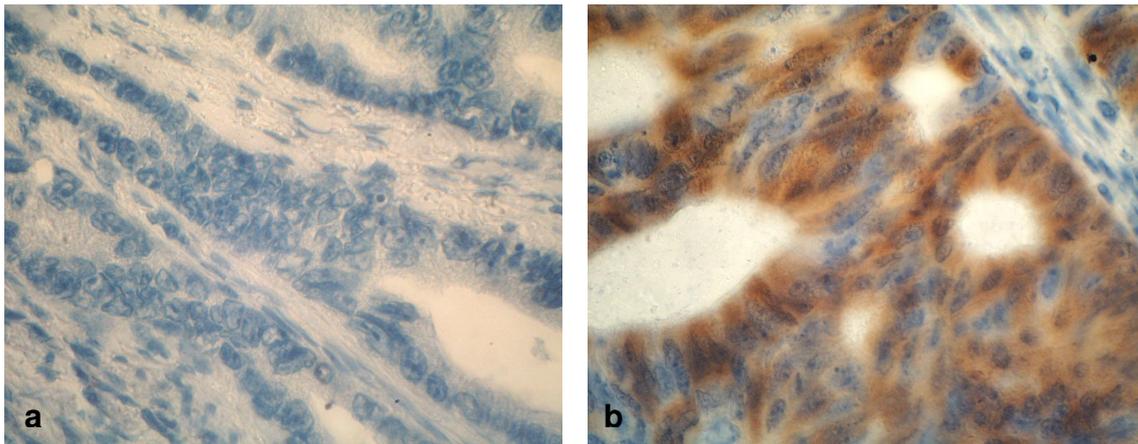
**Tabelle 10: Übersicht über die auswertbaren Fallzahlen**

<b>Methode</b>	<b>TS</b>	<b>TP</b>	<b>DPD</b>
<b>Immunhistochemie</b>	46	46	43
<b>RT-PCR</b>	44	46	41

### 3.2 Immunhistochemische Ergebnisse

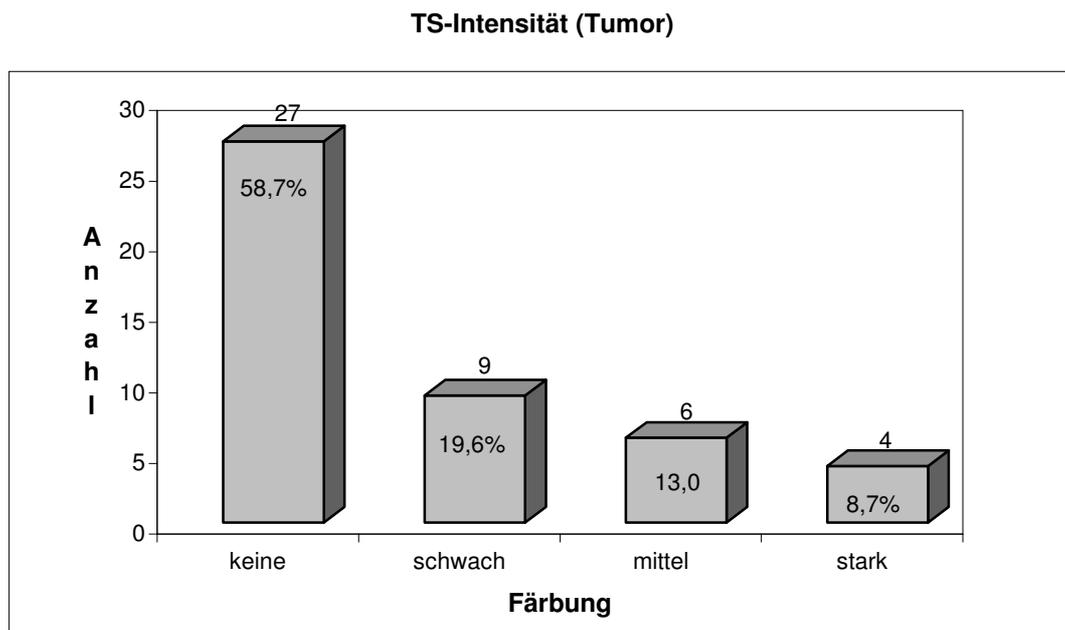
#### 3.2.1 Proteinexpression der Thymidylat-Synthase (TS)

Es zeigte sich eine hauptsächlich zytosolische Färbung des Tumorgewebes. Zum Teil lies sich eine leichte Anfärbung von Muskelgewebe und auch von Lymphozyten erkennen. Normalgewebe, das in jedem Schnitt mit enthalten war, färbte sich nicht an (Abbildung 7).



**Abbildung 7: Immunhistochemische Färbung TS (40-fache Vergrößerung).  
a negative TS Färbeintensität des Tumors; b starke TS Färbeintensität des Tumors**

Die Färbung fiel bei 27 (58,7%) Präparaten negativ, bei 9 (19,6%) schwach, bei 6 (13%) mittel und bei 4 (8,8%) stark aus. Somit wurden 27 (58,7%) als negativ und 19 (41,3%) als positiv deklariert (Abbildung 8).

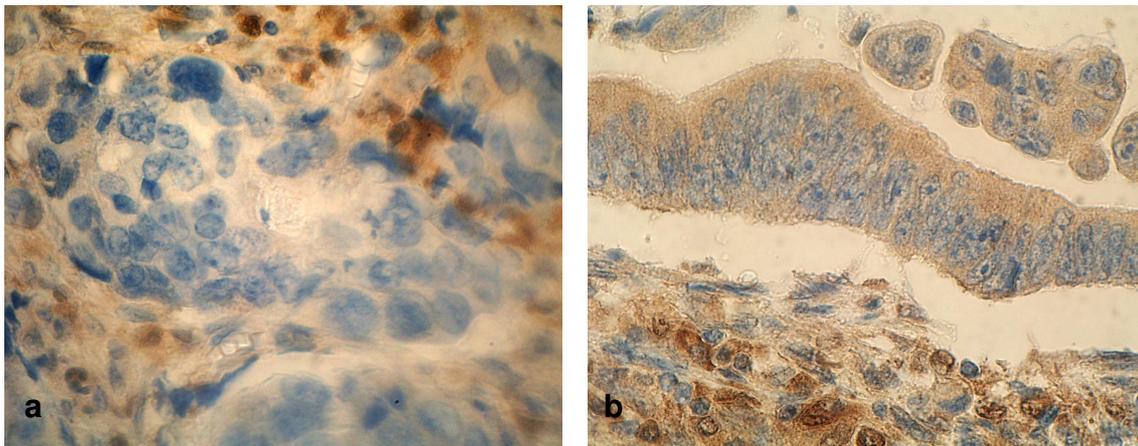


**Abbildung 8: Verteilung der TS-Proteinexpression**

### 3.2.2 Proteinexpression der Thymidin-Phosphorylase (TP)

Das Tumorgewebe wies eine zytosolische Färbung auf. Das Stroma war im Vergleich zum Tumor bei allen Präparaten sehr stark angefärbt. Neben Fibrozyten färbten sich im Stroma auch sehr viele Makrophagen stark an, so dass die Intensität des Stromagewebes immer mit 4 (starke Färbung) bewertet wurde (Abbildung 9).

In normalen Krypten hingegen zeigte sich keine Färbung.

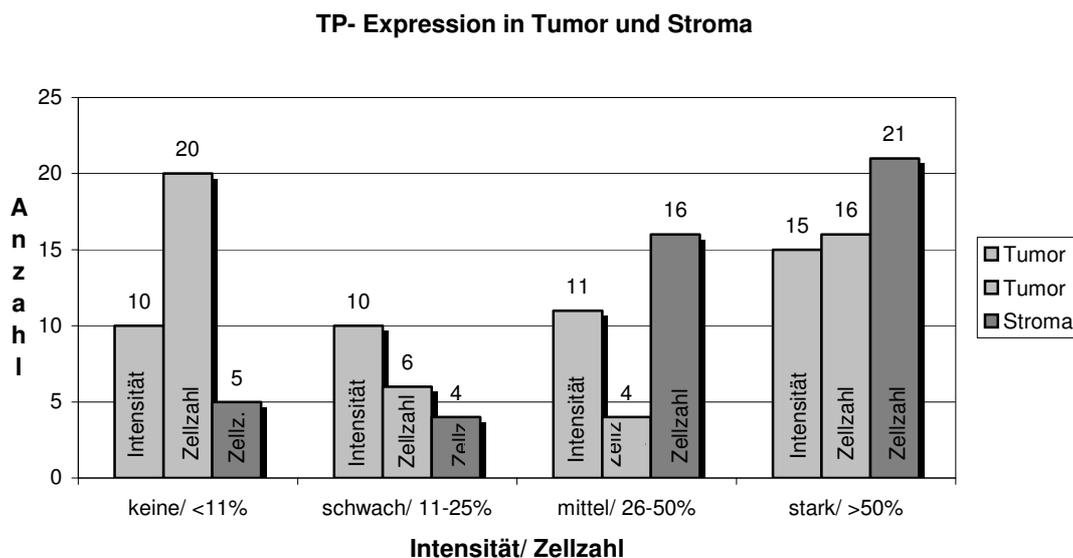


**Abbildung 9: Immunhistochemische Färbung TP (40-fache Vergrößerung).  
a negative TP-Färbeintensität des Tumors; b starke TP-Färbeintensität des Tumors**

Bei jeweils 10 (21,7%) Proben lag keine bzw. eine schwache, bei 11 (23,9%) und 15 (32,6%) lag ein mittlere und starke Immunreaktivität vor. Nach der Dichotomisierung wurden somit 20 (43,5%) Präparate als niedrige und 26 (56,5%) als hohe Färbeintensität eingestuft.

Bei 20 (43,5%) der Proben war weniger als 10% des Tumors gefärbt, bei 6 (13,0%) lag der Anteil bei 11-25%, 4 (8,7%) lagen zwischen 26-50% und 16 (34,8%) Präparate zeigten eine Anfärbung >50% des Tumors.

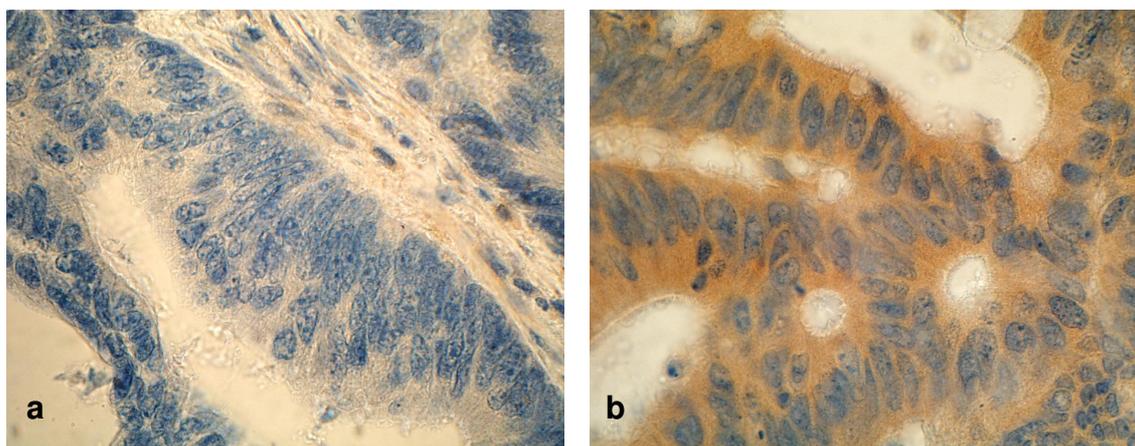
Für die Zellzahl des Stromas ergaben sich folgende Ergebnisse: ≤10% 5 (10,9%) Präparate, bei 11-25% 4 (8,7%), zwischen 26 und 50% 16 (34,8%) und >50% 21 (45,7%) Proben.



**Abbildung 10: TP-Proteinexpression in Tumor und Stroma (n=46)**

### 3.2.3 Proteinexpression der Dihydropyrimidin-Dehydrogenase

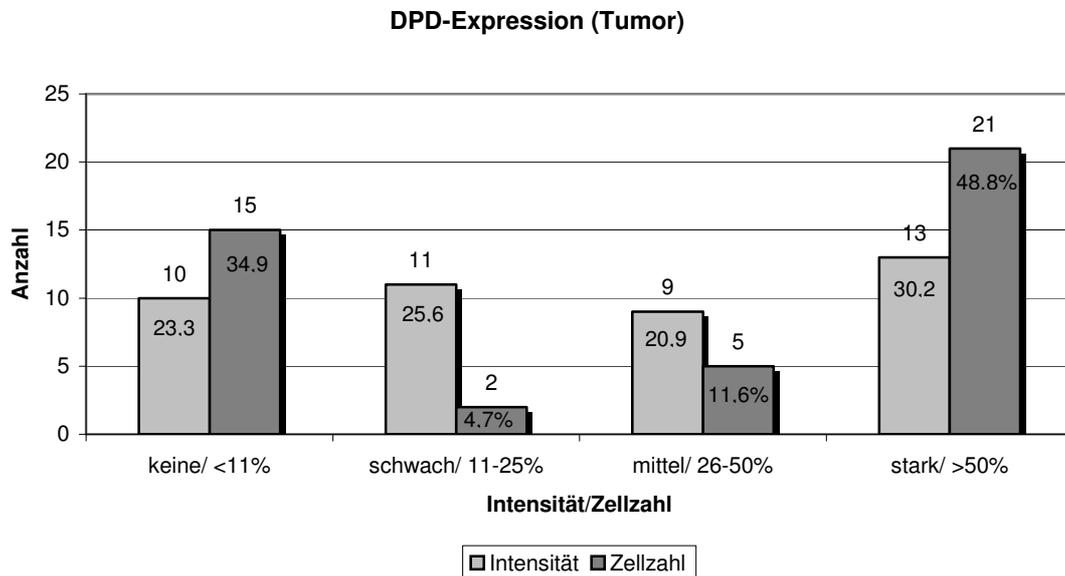
Hier ließ sich eine zytosolische Färbung der Tumorkrypten und bei manchen Präparaten auch eine Immunreaktivität mit Stromagewebe, vor allem von Lymphozyten beobachten. Im Normalgewebe ließ sich keine Proteinexpression nachweisen (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Immunhistochemische Färbung DPD (40-fache Vergrößerung). a negative DPD-Färbeintensität des Tumors; b starke DPD-Färbeintensität des Tumors**

Die Verteilung der Färbeintensität war wie folgt: 10 (23,3%) keine, 11 (25,6%) schwach, 9 (20,9%) mittel und 13 (30,2%) Präparate stark. So wurden 21 (48,8%) Proben als niedrig und 22 (51,2%) als hoch eingestuft.

Bei 15 (34,9%) Präparaten waren  $\leq 10\%$ , bei 2 (4,7%) 11-25%, bei 5 (11,6%) 26-50% und bei 21 (48,8%) mehr als 50% angefärbt (Abbildung 12).



**Abbildung 12: DPD-Proteinexpression im Tumor (n=43)**

### 3.2.4 Korrelation der Enzymexpression mit klinischen und histopathologischen Variablen

Zur Klärung der Frage, ob klinische oder histopathologische Faktoren einen Zusammenhang mit der Enzymexpression aufweisen, wurde der Chi-Quadrat-Test eingesetzt. Als signifikanter Unterschied wurde ein p-Wert von  $< 0,05$  angesetzt, entsprechend einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%.

Bei jedem Marker wurden das Alter, das Geschlecht, die Tumordinfiltrationstiefe, der Lymphknotenstatus, der Differenzierungsgrad, die Lokalisation des Tumors und das Behandlungsregime getestet.

Agrund der geringen Fallzahlen wurden bestimmte Parameter gruppiert bewertet. So wurde bezüglich der Tumordinfiltrationstiefe die Kategorie T2 (T1 war nicht vorhanden) versus T3 und T4 und hinsichtlich des Lymphknotenstatus die Kategorie N1 gegenüber N2 und N3 verglichen.

#### 3.2.4.1 Korrelation der Thymidylat-Synthase Expression mit klinischen und histopathologischen Variablen

Als statistisch nicht signifikant und somit in keinem Zusammenhang mit der Expression der Thymidylat-Synthase, erwiesen sich die Merkmale Alter,

Geschlecht, Tumordinfiltrationstiefe, Lymphknotenstatus, Differenzierungsgrad, Lokalisation des Tumors und das Behandlungsregime.

In Tabelle 11 sind die Häufigkeiten und statistischen Zusammenhänge aufgeführt.

**Tabelle 11: Korrelation zwischen klinischen Parametern und TS-Proteinexpression (n=46)**

	TS-Intensität		p-Wert
	<i>negativ</i>	<i>positiv</i>	
<b>Geschlecht</b>			
<b>Männlich</b>	11	5	0,31
<b>Weiblich</b>	16	14	
<b>Medianes Alter</b>			
<b>&lt; 62 Jahre</b>	15	8	0,37
<b>≥ 62 Jahre</b>	12	11	
<b>Tumordinfiltrationstiefe</b>			
<b>T2</b>	2	1	1,00*
<b>T3/T4</b>	25	18	
<b>Lymphknotenkategorie</b>			
<b>N1</b>	15	11	0,88
<b>N2/N3</b>	12	8	
<b>Differenzierungsgrad</b>			
<b>G1/G2</b>	19	11	0,38
<b>G3/G4</b>	8	8	
<b>Lokalisation</b>			
<b>Rechts</b>	13	8	0,69
<b>Links</b>	14	11	
<b>Behandlungsregime</b>			
<b>Arm A (5-FU/LV)</b>	13	7	0,45
<b>Arm B (5-FU/LEV)</b>	14	12	

\*Exakter Test nach Fisher

#### 3.2.4.2 Korrelation der Thymidin-Phosphorylase Expression mit klinischen und histopathologischen Variablen

Die Proteinexpression der Thymidin-Phosphorylase in Tumor und Stroma zeigte keinen signifikanten Zusammenhang mit den Parametern Alter, Geschlecht, Tumordinfiltrationstiefe, Lymphknotenstatus, Differenzierungsgrad, Lokalisation des Tumors und Behandlungsregime.

In Tabelle 12 sind die Häufigkeiten und statistischen Zusammenhänge aufgeführt.

Tabelle 12: Korrelation der TP-Proteinexpression in Tumor und Stroma mit klinischen Parametern (n=46)

Variable	Tumor						Stroma					
	TP-Intensität		p-Wert	TP-Zellzahl		p-Wert	TP-Index		p-Wert	TP-Zellzahl		p-Wert
niedrig	hoch	≤ 10%		> 10%	niedrig		hoch	≤ 25%		> 25%		
<b>Geschlecht</b>												
Männlich	8	8	0,52	9	7	0,2	10	6	0,15	3	13	1,00*
Weiblich	12	18		11	19		12	18		6	24	
<b>Medianes Alter</b>												
< 62 Jahre	11	12	0,55	11	12	0,55	12	11	0,56	4	19	1,00*
≥ 62 Jahre	9	14		9	14		10	13		5	18	
<b>Tumorinfiltrationstiefe</b>												
T2	1	2	1,00*	2	1	0,57*	2	1	0,60*	1	2	0,49*
T3/T4	19	24		18	25		20	23		8	35	
<b>Lymphknotenkategorie</b>												
N1	10	16	0,43	10	16	0,43	12	14	0,80	4	22	0,47*
N2/N3	10	10		10	10		10	10		5	15	
<b>Differenzierungsgrad</b>												
G1/G2	14	16	0,55	15	15	0,22	17	13	0,10	4	26	0,24*
G3/G4	6	10		5	11		5	11		5	11	
<b>Lokalisation</b>												
Rechts	10	11	0,6	8	13	0,5	9	12	0,54	3	18	0,48*
Links	10	15		12	13		13	12		6	19	
<b>Behandlungsregime</b>												
Arm A (5-FU/LV)	10	10	0,43	11	9	0,17	11	9	0,39	4	16	1,00*
Arm B (5-FU/LEV)	10	16		9	17		11	15		5	21	

\*Exakter Test nach Fisher

### 3.2.4.3 Korrelation der Dihydropyrimidin-Dehydrogenase Expression mit klinischen und histopathologischen Variablen

Es konnte keine statistisch signifikante Korrelation zwischen den Merkmalen Alter, Geschlecht, Tumordinfiltrationstiefe, Lymphknotenstatus, Differenzierungsgrad, Lokalisation des Tumors und Behandlungsregime und der Expression der Dihydropyrimidin-Dehydrogenase beobachtet werden.

In Tabelle 13 sind die Häufigkeiten und statistischen Zusammenhänge aufgeführt.

**Tabelle 13: Korrelation der DPD-Proteinexpression mit klinischen Parametern (n=43)**

	DPD-Intensität		p-Wert	DPD-Zellzahl		p-Wert	DPD-Index		p-Wert
	<i>niedrig</i>	<i>hoch</i>		<i>≤25%</i>	<i>&gt;25%</i>		<i>niedrig</i>	<i>hoch</i>	
<b>Geschlecht</b>									
<b>Männlich</b>	8	7	0,67	7	8	0,48	8	7	0,67
<b>Weiblich</b>	13	15		10	18		13	15	
<b>Medianes Alter</b>									
<b>&lt; 62 Jahre</b>	10	12	0,65	7	15	0,29	10	12	0,65
<b>≥ 62 Jahre</b>	11	10		10	11		11	10	
<b>Tumordinfiltrations-tiefe</b>									
<b>T2</b>	2	1	0,61*	1	2	1,00*	2	1	0,61*
<b>T3/T4</b>	19	21		16	24		19	21	
<b>Lymphknoten-kategorie</b>									
<b>N1</b>	11	14	0,46	9	16	0,58	11	14	0,46
<b>N2/N3</b>	10	8		8	10		10	8	
<b>Differenzierungs-grad</b>									
<b>G1/G2</b>	15	13	0,40	14	14	0,06	15	13	0,40
<b>G3/G4</b>	6	9		3	12		6	9	
<b>Lokalisation</b>									
<b>Rechts</b>	11	9	0,45	9	11	0,49	11	9	0,45
<b>Links</b>	10	13		8	15		10	13	
<b>Behandlungs-regime</b>									
<b>Arm A (5-FU/LV)</b>	11	7	0,17	9	9	0,23	11	7	0,17
<b>Arm B (5-FU/LEV)</b>	10	15		8	17		10	15	

\*Exakter Test nach Fisher

### **3.3 Molekulargenetische Ergebnisse**

#### **3.3.1 mRNA-Gehalt der Thymidylat-Synthase**

Der Kurvenverlauf der amplifizierten PCR Produkte entsprach einer logarithmischen Verteilung mit einer steilen log-Phase, so dass für jede Probe ein crossing point ermittelt werden konnte. Durch den Vergleich zwischen Referenz- und Zielgen konnte der relative mRNA-Gehalt berechnet werden. Eine beispielhafte Darstellung eines erhaltenen Kurvenverlaufs gibt Abbildung 13.

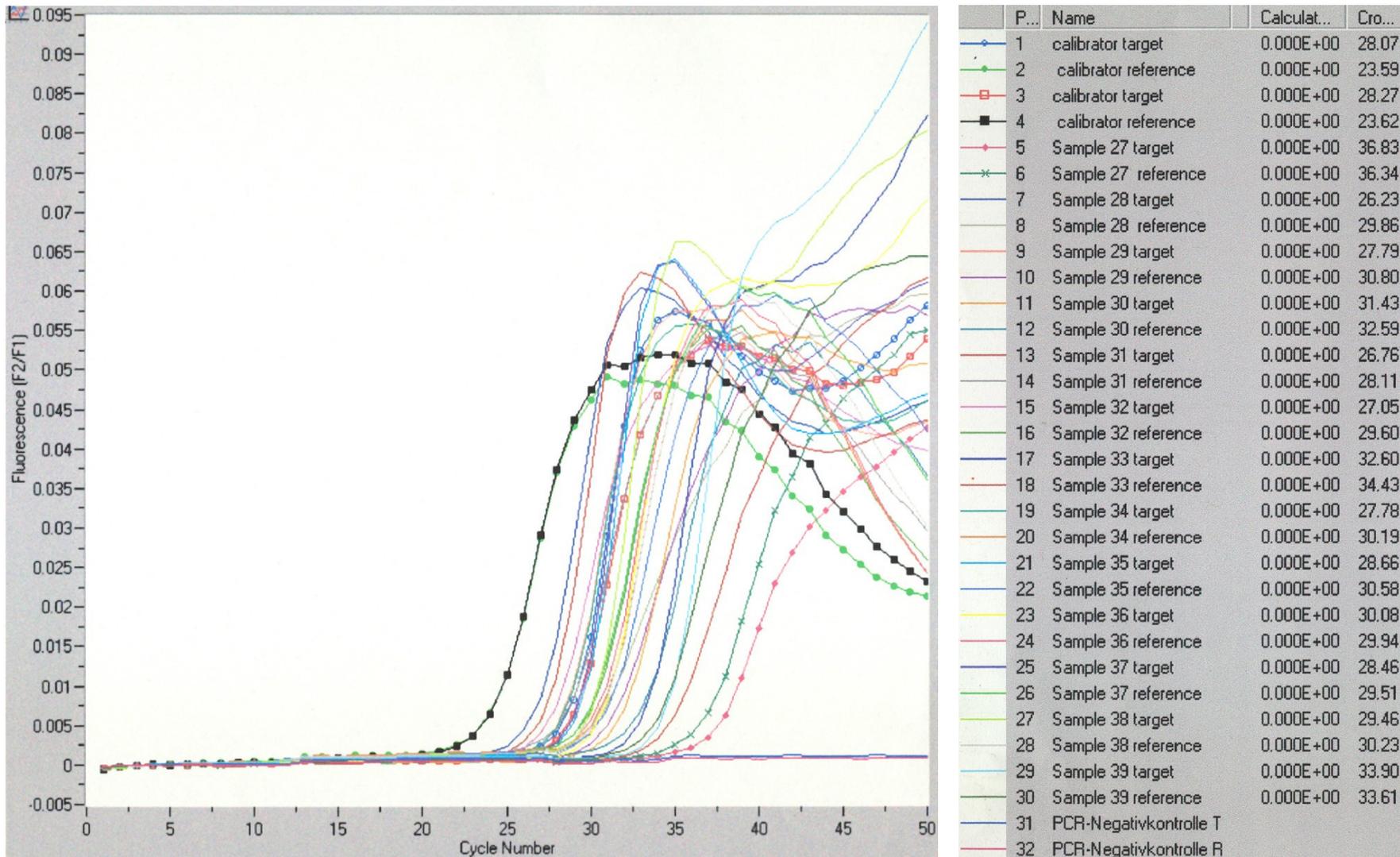


Abbildung 13: Kurvenverlauf eines LightCycler Durchgangs

Der relative mRNA-Gehalt der Thymidylat-Synthase erreichte Werte im Bereich von 0,00 bis 50,63. Der Mittelwert lag bei  $3,31 \pm 8,54$ , der Median bei 1,12. Einen Überblick über die erhaltenen Werte gibt Abbildung 14.

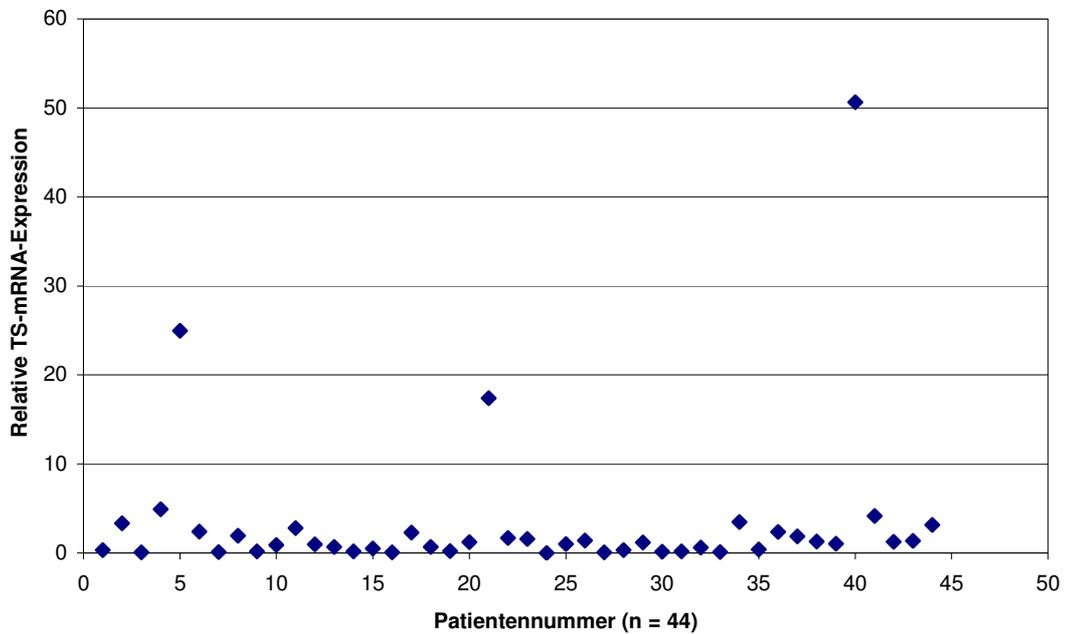


Abbildung 14: Verteilung der Messwerte der relativen TS-mRNA-Expression

### 1. mRNA-Gehalt der Thymidin-Phosphorylase

Der relative mRNA-Gehalt der Thymidin-Phosphorylase erstreckte sich über einen Bereich von 0,42 bis 363,85. Der Mittelwert lag hier bei  $31,60 \pm 68,75$ , der Median bei 13,13. Einen Überblick über die erhaltenen Werte gibt Abbildung 15.

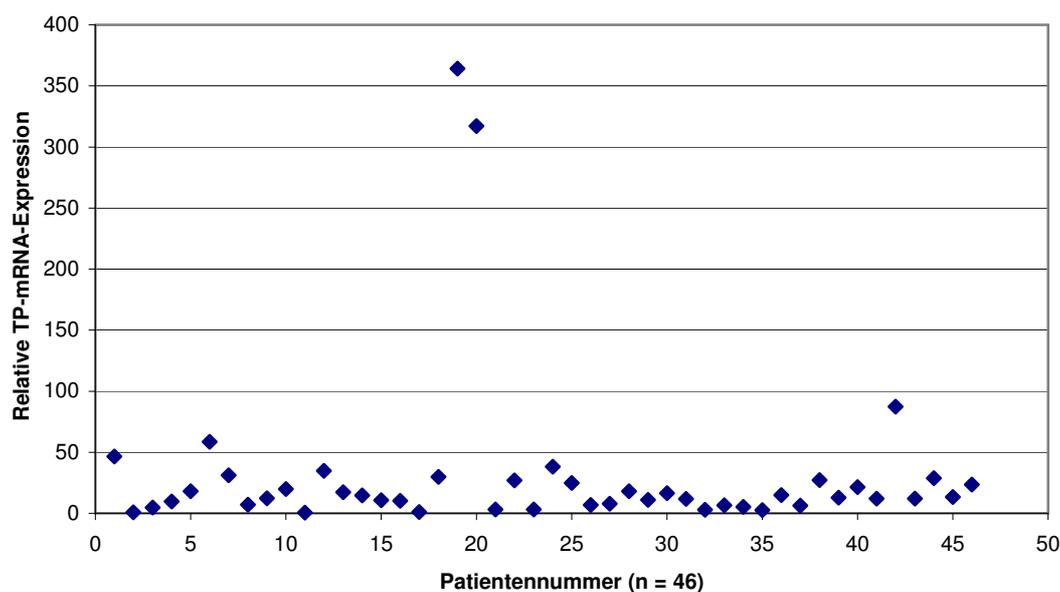


Abbildung 15: Verteilung der Messwerte der relativen TP-mRNA-Expression

### 3.3.2 mRNA-Gehalt der Dihydropyrimidin-Dehydrogenase

Die Spannweite der erhaltenen Daten umfasste einen Bereich zwischen 0,09 und 81,19 mit einem Median von 4,36 (Mittelwert  $8,77 \pm 13,90$ ). Einen Überblick über die Verteilung der Werte gibt Abbildung 16.

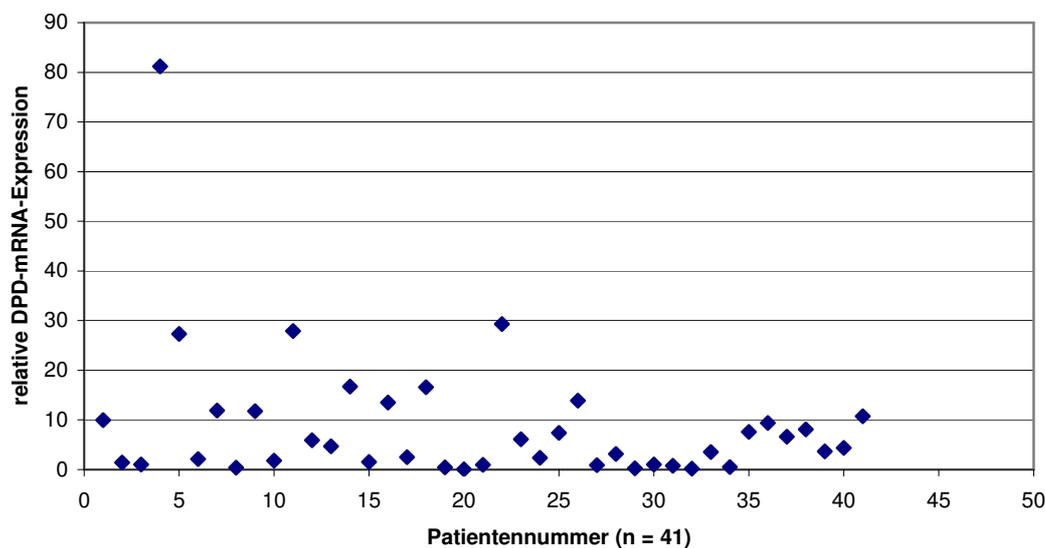


Abbildung 16: Verteilung der Messwerte der relativen DPD-mRNA-Expression

### 3.3.3 Korrelation des mRNA-Gehalts mit klinischen und histopathologischen Variablen

Entsprechend zur Immunhistochemie wurde mit Hilfe des Chi-Quadrat-Verfahrens geprüft, ob sich Assoziationen zwischen klinischen bzw. histopathologischen Variablen und dem mRNA-Gehalt von TS, TP und DPD ergeben. Bei jedem Marker wurden das Alter, das Geschlecht, die Tumordinfiltrationstiefe, der Lymphknotenstatus, der Differenzierungsgrad, die Lokalisation des Tumors und das Behandlungsregime getestet.

Agrund der geringen Fallzahlen wurden bestimmte Parameter gruppiert bewertet. So wurde bezüglich der Tumordinfiltrationstiefe die Kategorie T2 (T1 war nicht vorhanden) versus T3 und T4 und hinsichtlich des Lymphknotenstatus die Kategorie N1 gegenüber N2 und N3 verglichen.

Signifikante Zusammenhänge zwischen Genexpression und klinischen bzw. histopathologischen Variablen zeigten sich bei keinem der untersuchten Parameter. Es fiel lediglich ein tendenzieller Zusammenhang zwischen gutem Differenzierungsgrad und niedrigem TP-mRNA-Gehalt auf ( $p = 0,063$ ).

Eine Übersicht über die geprüften Parameter mit Angabe des Signifikanzniveaus gibt Tabelle 14.

Tabelle 14: mRNA-Expression von TS, TP und DPD in Abhängigkeit von klinischen Parametern.

	TS (n=44)		p-Wert	TP (n=46)		p-Wert	DPD (n=41)		p-Wert
	<i>niedrig</i>	<i>hoch</i>		<i>niedrig</i>	<i>hoch</i>		<i>niedrig</i>	<i>hoch</i>	
<b>Geschlecht</b>									
<b>Männlich</b>	8	7	0,75	9	7	0,54	9	7	0,44
<b>Weiblich</b>	14	15		14	16		11	14	
<b>Medianes Alter</b>									
<b>&lt; 62 Jahre</b>	11	9	1,00*	15	8	1,00*	13	8	0,09
<b>≥ 62 Jahre</b>	11	13		8	15		7	13	
<b>Tumordinfiltrationstiefe</b>									
<b>T2</b>	1	2	1,00*	2	1	1,00*	2	1	0,61*
<b>T3/T4</b>	21	20		21	22		18	20	
<b>Lymphknotenkatgorie</b>									
<b>N1</b>	13	13	1,00	15	11	0,23	9	13	0,28
<b>N2/N3</b>	9	9		8	12		11	8	
<b>Differenzierungsgrad</b>									
<b>G1/G2</b>	16	13	0,34	18	12	0,06	15	13	0,37
<b>G3/G4</b>	6	9		5	11		5	8	
<b>Lokalisation</b>									
<b>Rechts</b>	12	7	0,13	11	10	0,77	10	8	0,44
<b>Links</b>	10	15		12	13		10	13	
<b>Behandlungsregime</b>									
<b>Arm A (5-FU/LV)</b>	9	10	0,76	11	9	0,55	10	8	0,44
<b>Arm B (5-FU/LEV)</b>	13	12		12	14		10	13	

\* = Fisher's exakter Test

### 3.4 Methodenvergleich

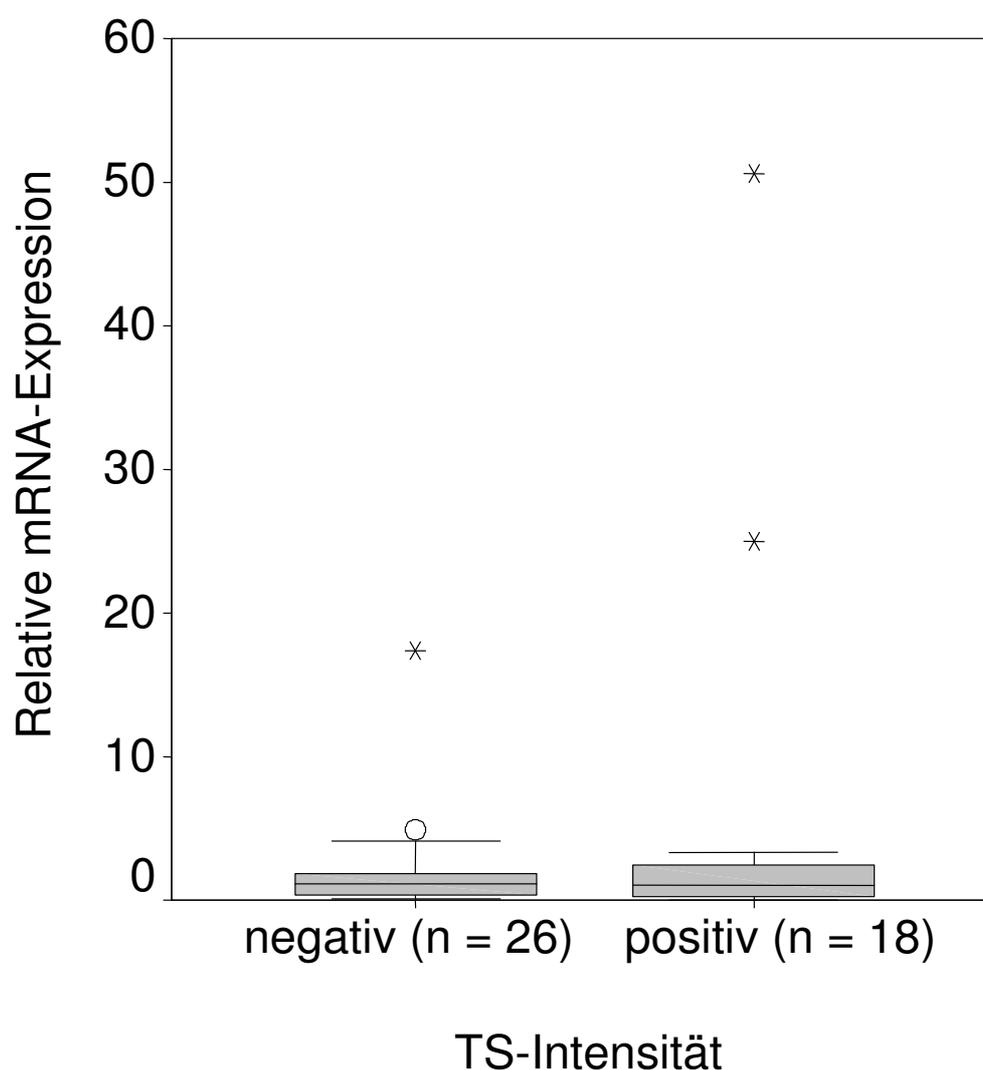
Zur Beurteilung der Übereinstimmung beider Methoden wurde eine Vierfeldertafel erstellt. Dazu wurden die bereits dichotomisierten Ergebnisse der Protein- bzw. Genexpression verwendet. Liest man die Vierfeldertafel diagonal ab, erhält man die Zahl der korrespondierenden Patienten. Für jeden Marker wurde das entsprechende 95%-Konfidenzintervall mit angegeben.

Der Whitney-U-Test wurde angewandt, um Unterschiede im Verteilungsmuster der mittels PCR ermittelten Daten zu detektieren ohne dass diese vorher dichotomisiert wurden.

#### 3.4.1 Vergleich der relativen TS-mRNA-Expression mit der TS-Proteinexpression

13 Patienten ließen sowohl in der Immunhistochemie als auch in der RT-PCR einen negativen (niedrigen) und 9 einen hohen Wert erkennen. Dies bedeutet, dass die mittels Immunhistochemie und PCR gewonnenen Expressiondaten bei 22 von 44 Patienten (50%) mit einem 95%-Konfidenzintervall von 34,6%-65,4% übereinstimmten.

Gemäß dem Mann-Whitney-U-Test zeigte sich im Vergleich der relativen TS-mRNA-Expression gegenüber der TS-Färbeintensität (negativ versus positiv) kein signifikanter Unterschied ( $p=0,92$ ) (Abbildung 17).

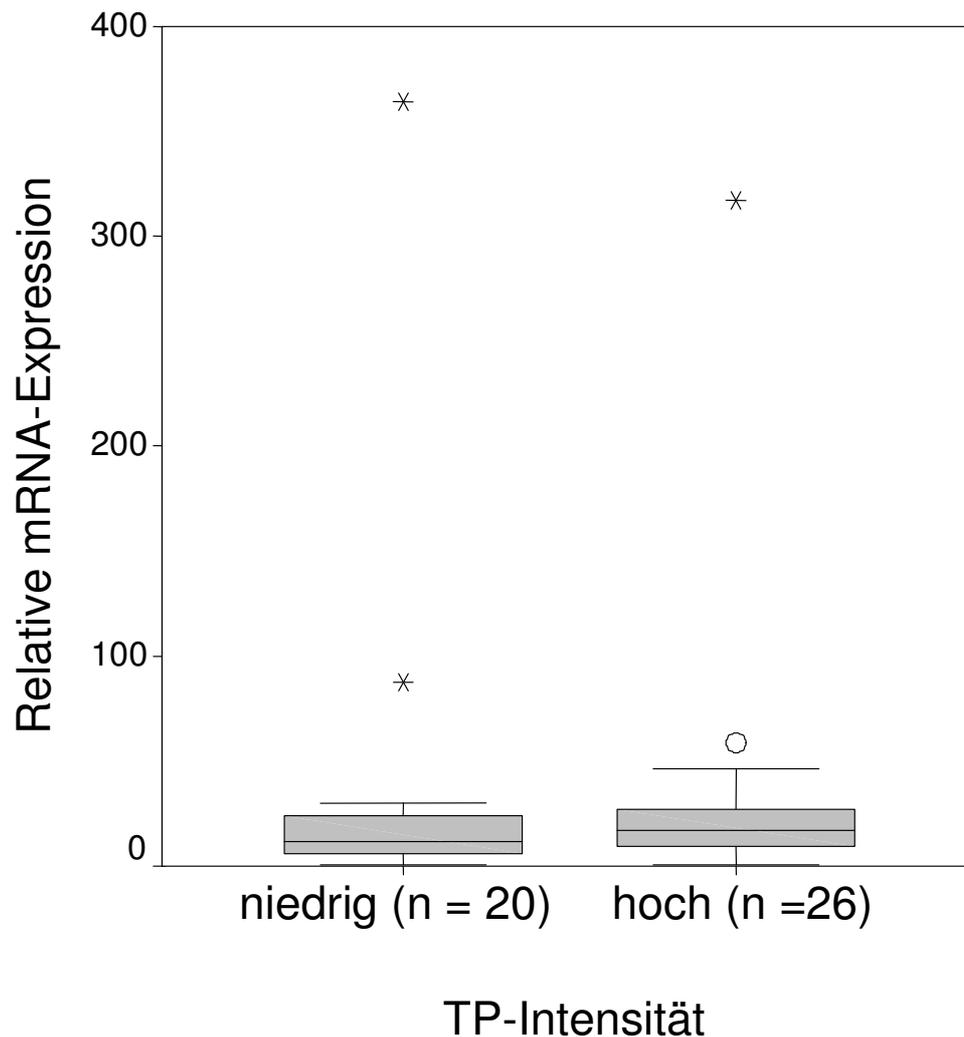


**Abbildung 17: Verhältnis der relativen mRNA-Expression zur TS-Färbeintensität. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte mit einer Standardabweichung. Ausreißer und Extremwerte sind mit  $\circ$  und  $*$  gekennzeichnet**

### 3.4.2 Vergleich der relativen TP-mRNA-Expression mit der TP-Proteinexpression

Bei 29 von 46 Patienten (63%) stimmten die Ergebnisse (hohe versus niedrige Expression) der TP-mRNA- und Proteinexpression überein (95%-Konfidenzintervall: 47,5%-76,8%). Davon ergab sich mit beiden Methoden bei 13 eine niedrige und bei 16 Tumoren eine hohe Expression.

Im Mann-Whitney-U Test reichte diese Übereinstimmung aber nicht aus, um einen signifikanten Unterschied zu detektieren ( $p = 0,29$ ) (Abbildung 18).



**Abbildung 18:** Verhältnis der relativen mRNA-Expression zur TP-Färbeintensität. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte mit einer Standardabweichung. „Ausreißer“ und Extremwerte sind mit ○ und \* gekennzeichnet

### 3.4.3 Vergleich der relativen DPD-mRNA-Expression mit der DPD-Proteinexpression

Sowohl mittels RT-PCR als auch immunhistochemisch, konnte bei 12 Proben übereinstimmend eine niedrige bzw. bei 11 Proben eine hohe DPD-Expression festgestellt werden. Somit bestand eine Kongruenz zwischen mRNA- und Proteinexpression in 23 von 38 Fällen (60,5%) (95%-Konfidenzintervall: 43,4%-76,0%). Dies zeigte sich auch im Mann-Whitney-U Test, der keine signifikanten Unterschiede detektieren konnte ( $p = 0,19$ )(Abbildung 19).

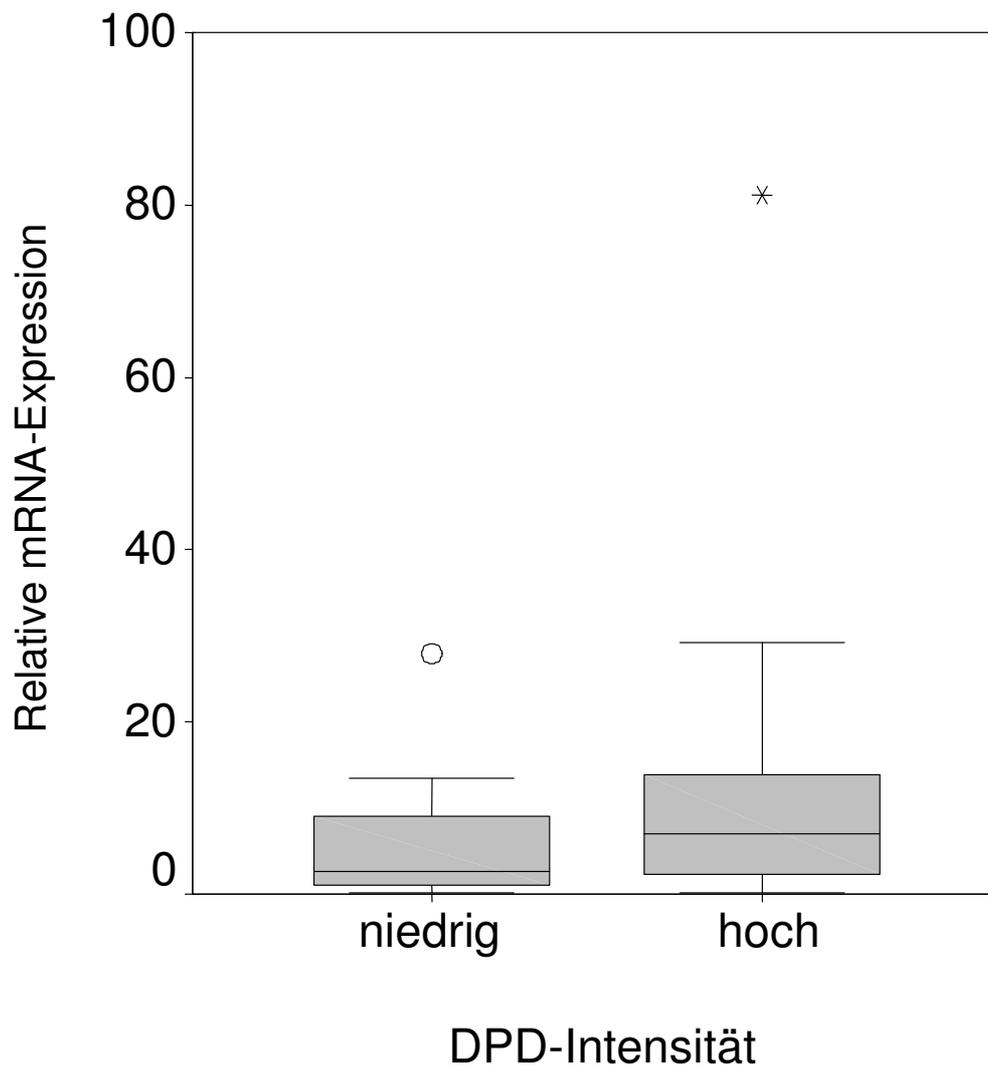


Abbildung 19: Verhältnis der relativen mRNA-Expression zur DPD-Färbeintensität. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte mit einer Standardabweichung. Ausreißer und Extremwerte sind mit  $\circ$  und  $*$  gekennzeichnet

### 3.5 Univariate Überlebenszeitanalyse

#### 3.5.1 Allgemeine Analyse der Überlebenszeit und der rezidivfreien Zeit

Von den 46 Patienten waren bei Studienende 20 (43,5%) verstorben, 25 (54,3%) lebten. Ein Patient (2,1%) verstarb nicht tumorbedingt.

Den zensierten Daten wurden die lebenden und die nicht tumorassoziiert verstorbenen Patienten zugeordnet.

Die Berechnungen zur Überlebenszeit bezogen sich auf die Gruppe der tumorbedingt verstorbenen versus der Gruppe der zensierten Patienten. Somit wurde der Einfluss eines nicht tumorbedingten Todes ausgeschlossen.

Die mittlere Überlebensrate betrug  $71,8 \pm 5,4$  Monate bei einer maximalen Beobachtungszeit von 103,4 Monaten. Eine mediane Überlebenszeit konnte nicht berechnet werden, da weniger als die Hälfte der Patienten verstorben waren. Nach 5 Jahren waren noch 60,9% der Erkrankten am Leben.

Für das rezidivfreie Überleben nach kurativer Resektion des Kolonkarzinoms wurde eine entsprechende Analyse durchgeführt. Als zensierte Fälle wurden Patienten ohne Rezidiv in der Beobachtungsperiode behandelt.

24 (52,2%) Patienten erlitten im Beobachtungszeitraum von maximal 95,5 Monaten ein Rezidiv. Die mediane krankheitsfreie Zeit belief sich auf 39,2 Monate, nach 5 Jahren waren noch 48,3% der Patienten rückfallsfrei.

Zur Abschätzung der prognostischen Bedeutung verschiedener klinischer und der experimentell bestimmten Parameter wurde das Verfahren nach Kaplan-Meier verwendet. Signifikante Unterschiede in den Überlebenszeiten wurden nach Breslow und Log Rank bestimmt. Da die mRNA-Expression und der Proteingehalt nicht deckungsgleich waren, wurden sie jeweils einer getrennten Analyse unterzogen.

### **3.5.2 Überlebenszeitanalyse und Analyse der rezidivfreien Zeit verschiedener klinischer und histopathologischer Parameter**

Tabelle 15 gibt die medianen bzw. mittleren Überlebenszeiten, die 5-Jahresüberlebensrate und das Signifikanzniveau der klinischen und histopathologischen Parameter nach Breslow und Log Rank an.

Aufgrund der geringen Fallzahlen wurden die T- Kategorie, der Lymphknotenstatus und der Differenzierungsgrad gruppiert gewertet (T2 versus T3/4; N1 versus N2/3; G1/2 versus G3/4).

Von den getesteten Variablen Geschlecht, Alter, T- und N- Kategorie, Differenzierungsgrad, Primärtumorlokalisation und Behandlungsarm erwies sich nur der Lymphknotenstatus mit einem p-Wert von 0,032 nach Log Rank und von 0,030 nach Breslow als signifikant.

Entsprechend lag das mittlere Überleben in der Gruppe mit N1 Tumoren bei  $81,2 \pm 6,3$  Monaten mit einer 5-Jahresüberlebensrate von 72,7%, im Gegensatz zu einer signifikant kürzeren mittleren Überlebensdauer ( $54,6 \pm 7,8$  Monate) für Patienten mit einem Lymphknotenstadium N2/N3. Auch die 5-Jahresüberlebensrate ist in dieser Gruppe mit 43,5% deutlich geringer.

**Tabelle 15: Ergebnisse der univariaten Überlebensanalyse klinischer und histopathologischer Variablen**

	n	mediane Überlebenszeit (Monate)	5-Jahres-Überleben (%)	Signifikanz nach Breslow und Log Rank
<b>Geschlecht</b>				
Männlich	16	66,7	72,2	0,32
Weiblich	30	67,2* $\pm$ 7,0	54,7	0,69
<b>Medianes Alter</b>				
< 62 Jahre	23	71,8* $\pm$ 7,1	58,6	0,64
$\geq$ 62 Jahre	23	70,2* $\pm$ 8,0	63,3	0,80
<b>Tumorinfiltrationstiefe</b>				
T2	3	94,3**	100,0	0,23
T3/T4	43	70,0* $\pm$ 5,6	58,7	0,22
<b>Lymphknotenkategorie</b>				
N1	23	81,2* $\pm$ 6,3	72,7	<b>0,03</b>
N2/N3	20	39,8	43,5	<b>0,03</b>
<b>Differenzierungsgrad</b>				
G1/G2	30	72,6* $\pm$ 6,3	62,1	0,74
G3/G4	16	67,2* $\pm$ 9,1	60,2	0,98
<b>Lokalisation</b>				
Rechts	21	72,4* $\pm$ 7,2	63,3	0,60
Links	25	70,0* $\pm$ 7,7	58,8	0,84
<b>Behandlungsregime</b>				
Arm A (5-FU/LV)	20	78,7* $\pm$ 7,6	65,0	0,27
Arm B (5-FU/LEV)	26	64,4 $\pm$ 8,6	57,8	0,23

\*= mittlere Überlebenszeit; \*\*= Beobachtungszeit, da niemand verstorben

Zur Analyse der rezidivfreien Zeit wurden dieselben klinischen und histopathologischen Parameter getestet. Die Ergebnisse stellt Tabelle 16 dar. Bei keiner der untersuchten Variablen konnte ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Dauer der krankheitsfreien Zeit gezeigt werden.

Tabelle 16: Ergebnisse der univariaten Analyse der rezidivfreien Zeit klinischer und histopathologischer Variablen

	n	Medianes rezidivfreies Überleben (Monate)	5-Jahres-rezidivfreie Zeit (%)	Signifikanz nach Breslow und Log Rank
<b>Geschlecht</b>				
Männlich	16	39,2	47,4	0,62
Weiblich	30	35,1 ± 48,0	48,5	0,72
<b>Medianes Alter</b>				
< 62 Jahre	23	87,8 ± 54,2	51,0	0,94
≥ 62 Jahre	23	39,2	45,3	0,93
<b>Tumordinfiltrationstiefe</b>				
T2	3	94,3**	100,0	0,16
T3/T4	43	35,3 ± 29,5	45,3	0,14
<b>Lymphknotenkategorie</b>				
N1	26	87,8	53,9	0,55
N2/N3	20	35,1 ± 6,3	39,3	0,60
<b>Differenzierungsgrad</b>				
G1/G2	30	30,8 ± 9,9	41,5	0,61
G3/G4	16	87,8 ± 47,9	61,9	0,54
<b>Lokalisation</b>				
Rechts	21	55,3* ± 8,9	50,4	0,98
Links	25	39,2 ± 40,2	46,9	0,83
<b>Behandlungsregime</b>				
Arm A (5-FU/LV)	20	65,3* ± 8,2	60,0	0,15
Arm B (5-FU/LEV)	26	24,3 ± 13,3	38,7	0,10

\*= mittleres rezidivfreies Überleben; \*\*= Beobachtungszeit, da niemand verstorben

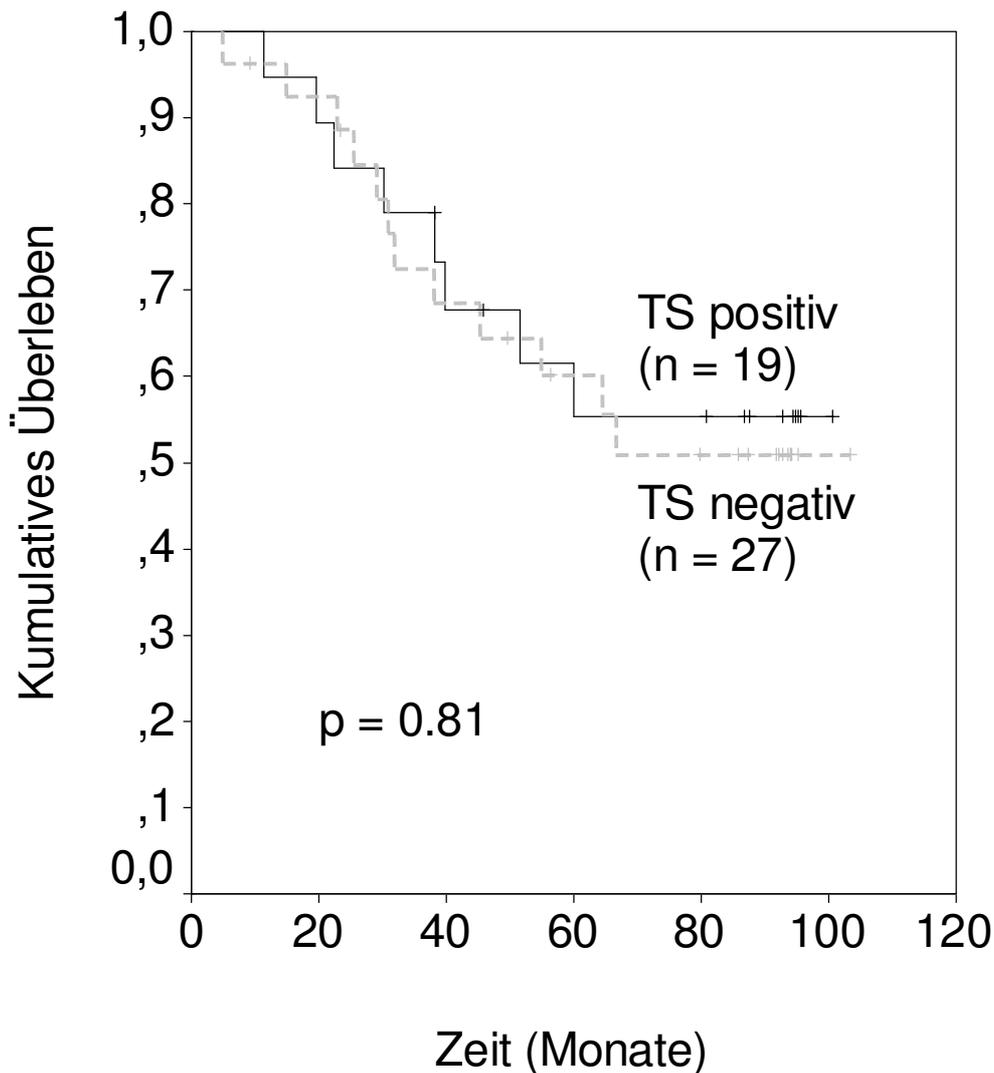
### 3.5.3 Überlebenszeitanalyse und Analyse der rezidivfreien Zeit in Korrelation zur TS-Proteinexpression

Zur Abschätzung der prognostischen Bedeutung der Thymidylat-Synthase Proteinexpression wurde auch hier eine univariate Überlebenszeitanalyse nach Kaplan-Meier durchgeführt.

Die mittlere Überlebenszeit für Patienten mit Tumoren, die eine fehlende TS-Immunreaktivität aufwiesen, betrug 70,7 Monate und 71,4 Monate für die TS positive Gruppe. Die mediane Überlebenszeit ließ sich nicht berechnen, da weniger als die Hälfte der Patienten innerhalb des Beobachtungszeitraums

(103,4 Monate) tumorbedingt verstorben waren. Aufgrund des geringen Unterschieds der Überlebenszeiten war weder der Test nach Log Rank ( $p=0,81$ ) noch nach Breslow ( $p=0,84$ ) signifikant.

Die 5-Jahresüberlebensraten lagen entsprechend bei 60,1% bzw. bei 61,5% für Patienten mit Tumoren, die als TS negativ bzw. als TS positiv eingestuft worden waren (Abbildung 20).



**Abbildung 20: Tumorspezifisches Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der TS-Proteinexpression.**

Angegeben ist das Signifikanzniveau nach Log Rank.

Die Dauer des rezidivfreien Überlebens lag bei Patienten mit TS negativen Tumoren im Mittel bei  $54,9 \pm 7,9$  (Median:  $39,2 \pm 41,3$ ), für Patienten mit als TS positiven klassifizierten bei  $55,5 \pm 8,9$  Monaten (Median:  $35,1$ ). Auch diese

Ergebnisse unterschieden sich nicht signifikant (Breslow:  $p=0,78$ ; Log Rank:  $p=0,84$ ). Entsprechend zeigten die 5-Jahresraten zum krankheitsfreien Überleben nur eine unwesentliche Differenz (49,6% TS negativ versus 47,4% TS positiv).

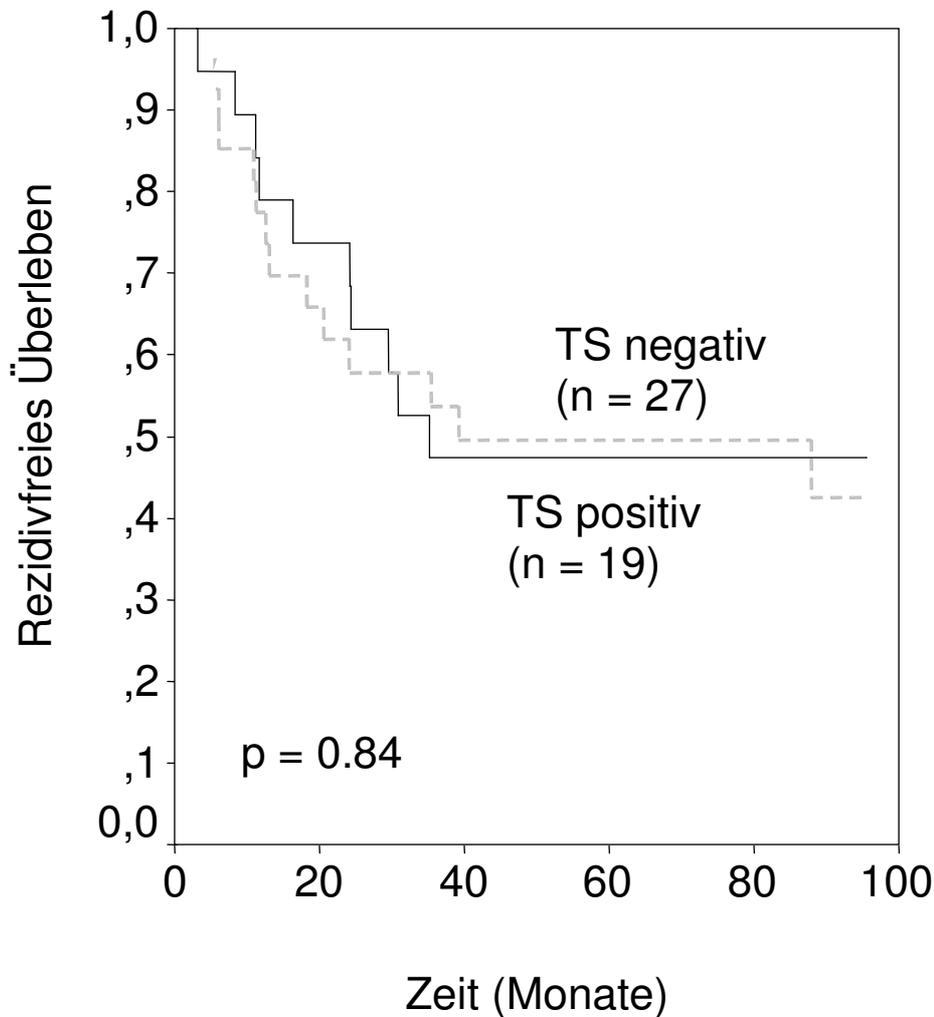


Abbildung 21: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von der TS-Proteinexpression. Angegeben ist das Signifikanzniveau nach Log Rank.

### 3.5.4 Überlebenszeitanalyse und Analyse der rezidivfreien Zeit in Korrelation zur TS-mRNA-Expression

Die mediane Überlebenszeit bei einer niedrigen TS-mRNA-Expression betrug 64,4 Monate im Vergleich zu einer mittleren Überlebenszeit von 69,2 Monaten bei Patienten mit einem hohen TS-mRNA-Gehalt. 56,1% waren in der ersten

Gruppe nach fünf Jahren noch am Leben gegenüber 63,3% in der zweiten. Diese Abweichung war statistisch nicht signifikant (Breslow:  $p=0,78$ ; Log Rank:  $p=0,59$ ).

Bezüglich des rezidivfreien Überlebens ergaben sich dagegen größere Differenzen: eine mediane krankheitsfreie Zeit von 24,3 Monaten bei Patienten mit Tumoren mit niedrigem TS im Vergleich zu 62,9 Monaten bei hohem TS. Die 5-Jahresraten waren in der gleichen Reihenfolge 33,6% zu 59,1% (Abbildung 22). Im Test nach Breslow ergab sich aber nur ein  $p$ -Wert von 0,19, im Test nach Log Rank von 0,09 (nicht signifikant).

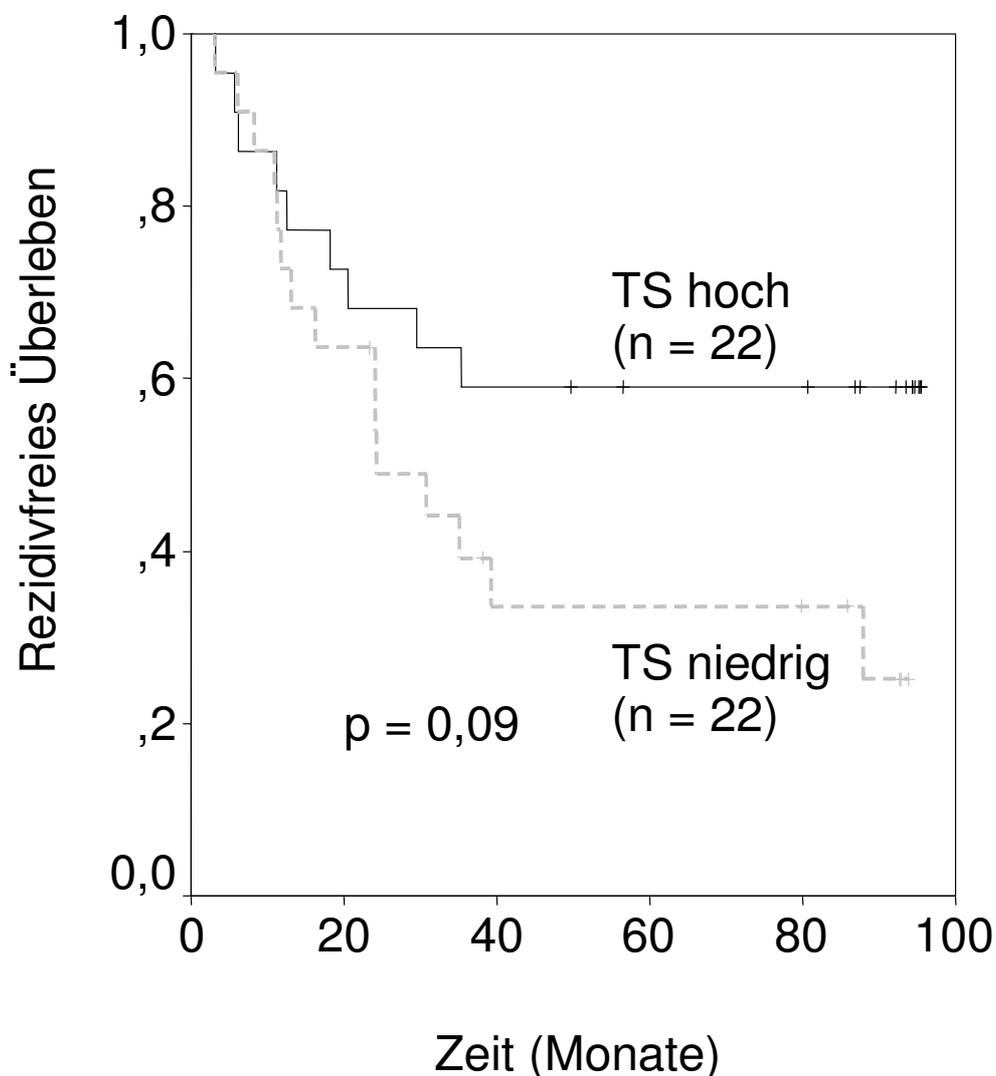
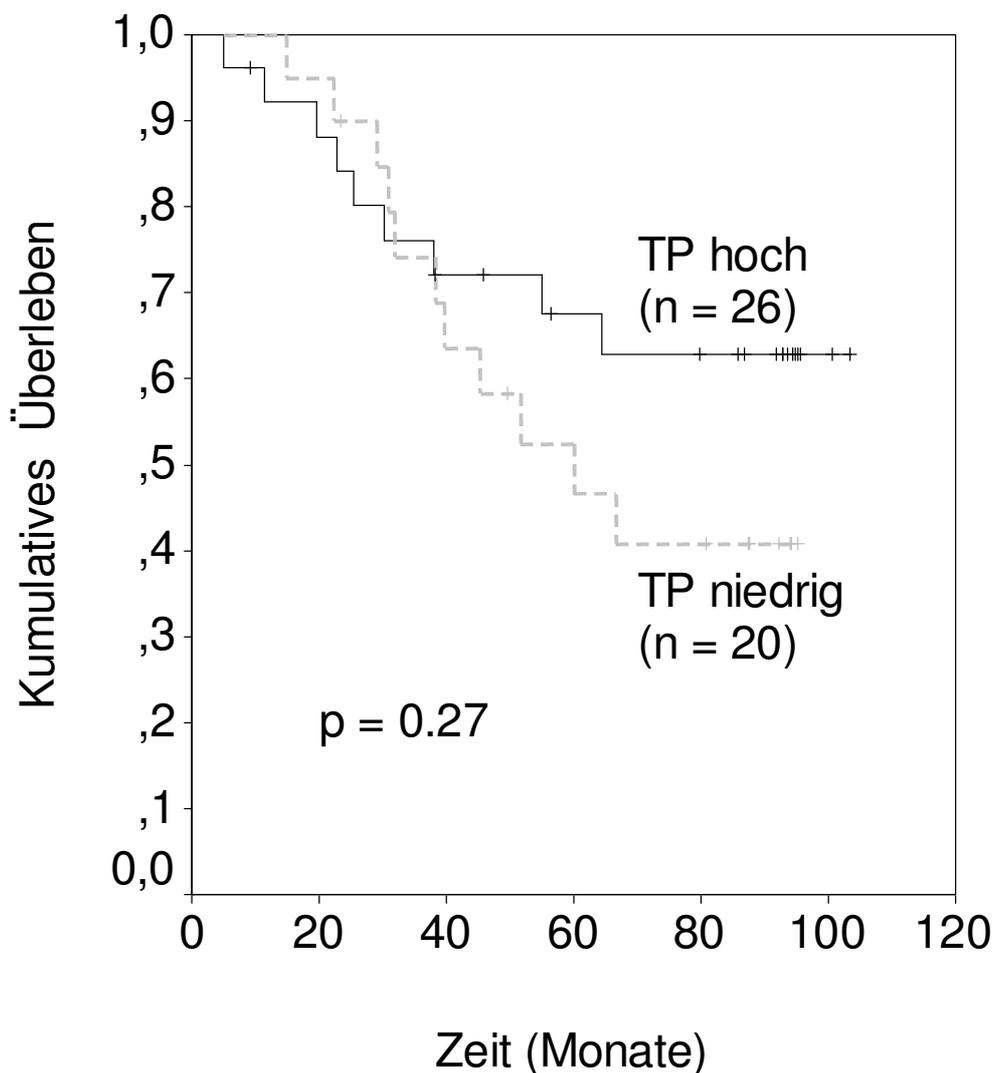


Abbildung 22: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom TS-mRNA-Gehalt. Signifikanzniveau nach Log Rank.

### **3.5.5 Überlebenszeitanalyse und Analyse der rezidivfreien Zeit in Korrelation zur TP-Proteinexpression**

Die Analyse zur Abschätzung der prognostischen Bedeutung der Thymidin-Phosphorylase wurde nach den gleichen Kriterien wie die der Thymidylat-Synthase durchgeführt.

Für die TP-Intensität im Tumor ergab sich eine mittlere Überlebenszeit von 62,48 Monaten von Patienten mit niedrig exprimierenden und von 76,61 Monaten in der Gruppe von Patienten mit hoch exprimierenden Tumoren. Dieser Unterschied erreichte aber weder in der Analyse nach Breslow ( $p=0,47$ ) noch nach Log Rank ( $p=0,27$ ) statistische Signifikanz. Die 5-Jahresüberlebensrate betrug für Patienten, die eine niedrige TP-Intensität aufwiesen 52,4% und für jene mit hoher 61,5% (Abbildung 23).



**Abbildung 23: Tumorspezifisches Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der TP-Proteinexpression. Signifikanz nach Log Rank.**

Um festzustellen, ob auch die Heterogenität eines Tumors Einfluss auf das Überleben haben könnte, wurden die Patienten hinsichtlich des prozentualen Anteils der gefärbten Zellen ( $\leq 10\%$  versus  $>10\%$ ) im Tumor der Überlebenszeitanalyse unterzogen. Hier fand sich eine mittlere Überlebenszeit von 73,85 Monaten für Patienten mit niedriger Anfärbung ( $\leq 10\%$ ), im Gegensatz zu 66,06 Monaten für Patienten mit  $>10\%$ iger Anfärbung. Jedoch erreichte auch diese Differenz keine Signifikanz (Breslow:  $p=0,85$ ; Log Rank  $p=0,60$ ).

Schließlich wurde noch ermittelt, ob eine Kombination aus Färbeintensität und prozentualem Färbemuster eine bessere Aussagekraft entfalten kann. Dieser Index wurde aus dem Produkt von Intensität und Zellzahl gebildet.

Für einen niedrigen Index ( $<6$ ) betrug die mittlere Überlebenszeit 74,08 Monate gegenüber 65,62 Monaten bei hohem Index ( $\geq 6$ ). Die Analyse nach Breslow ( $p=0,51$ ) und Log Rank ( $p=0,82$ ) zeigte aber, dass damit keine erhöhte Trennschärfe erreicht wurde. Aufgrund eines ähnlichen Kurvenverlaufs wird deshalb auf eine Abbildung verzichtet.

Da nicht nur das Tumorgewebe, sondern auch das Stroma sehr stark TP exprimierte, wurde zur Überlebenszeitanalyse noch das Färbemuster (Zellzahl) des Bindegewebes herangezogen. Eine mittlere Überlebenszeit von 71,17 Monaten fiel auf Patienten mit niedrigem Anteil ( $<25\%$ ), gegenüber 70,77 Monaten mit hohem Anteil. Auch dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant (Breslow  $p=0,63$ ; Log Rank  $p=0,66$ ).

Für das rezidivfreie Überleben wurde aufgrund ähnlicher zu erwartender Ergebnisse nur die Intensität der TP-Expression im Tumor einer weiteren Analyse unterzogen.

Es ergab sich ein medianes krankheitsfreies Überleben von  $24,3 \pm 5,4$  Monaten für niedrig und von 87,8 Monaten für hoch exprimierende Tumoren. Nach 5 Jahren hatten in der erstgenannten Gruppe noch 37,9% der Patienten kein Rezidiv erlitten, im Gegensatz zu 56,1% in der letztgenannten (Abbildung 24). Diese Differenz war statistisch nicht signifikant und erreichte p-Werte von 0,42 (Breslow) und 0,37 (Log Rank).

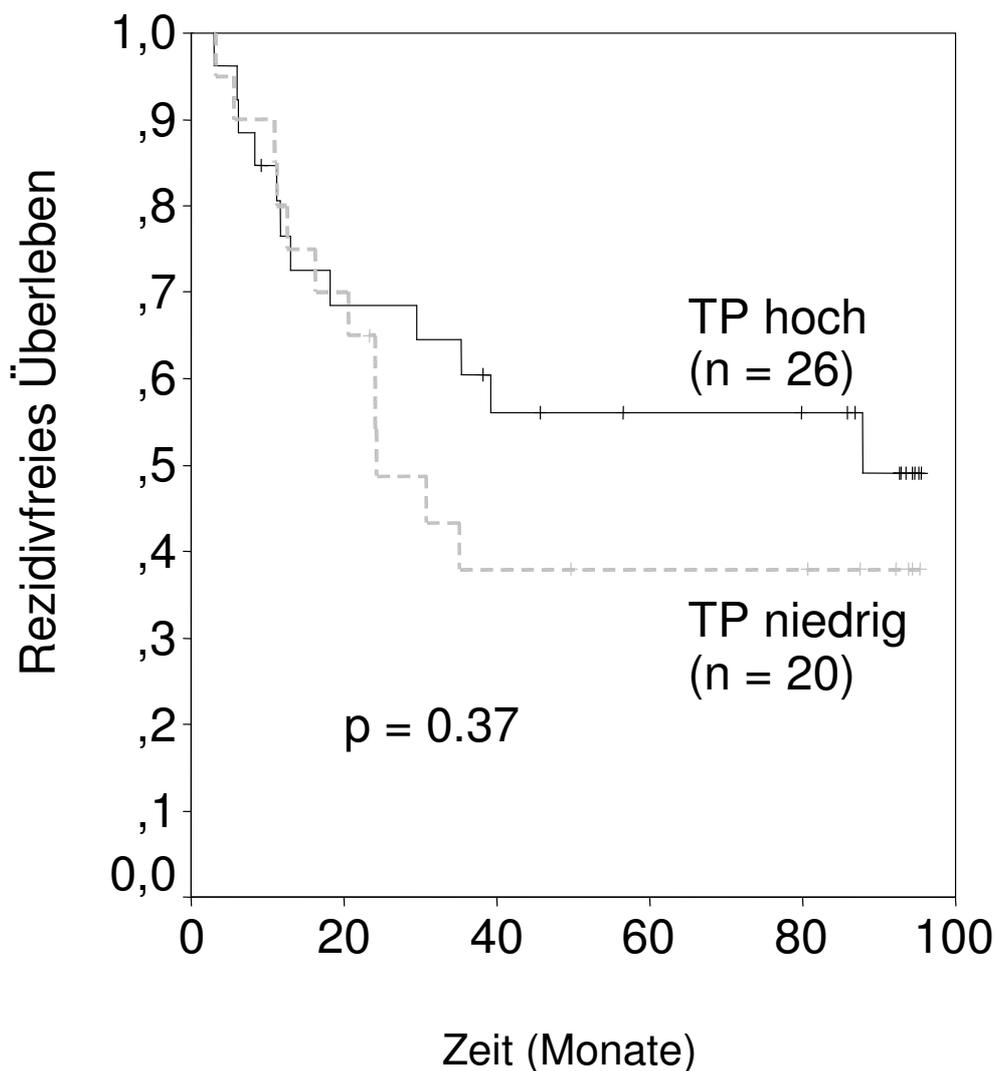


Abbildung 24: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von der TP-Proteinexpression  
Signifikanz nach Log Rank.

### 3.5.6 Überlebenszeitanalyse und Analyse der rezidivfreien Zeit in Korrelation zur TP-mRNA-Expression

Die Analyse zur Überlebenszeit ergab eine mediane Überlebenszeit von 64,4 Monaten für Patienten mit einem niedrigen und von  $68,6 \pm 7,1$  (Mittelwert) für einen hohen TP-Gehalt. Auch die 5-Jahresüberlebensraten stellten sich als entsprechend ähnlich heraus: 59,0% (niedrig) versus 62,8% (hoch). Die p-Werte von 0,92 nach Breslow und von 0,75 nach Log Rank waren damit nicht signifikant.

Beim rezidivfreien Überleben waren die Unterschiede in der mittleren Überlebenszeit zwar größer (47,3 Monate bei Patienten mit niedrigem TP zu 62,9 Monaten bei hohem TP-Anteil), erreichten aber trotzdem keine statistische Signifikanz ( $p=0,36$  nach Breslow und  $p=0,28$  nach Log Rank).

### **3.5.7 Überlebenszeitanalyse und Analyse der rezidivfreien Zeit in Korrelation zur DPD-Proteinexpression**

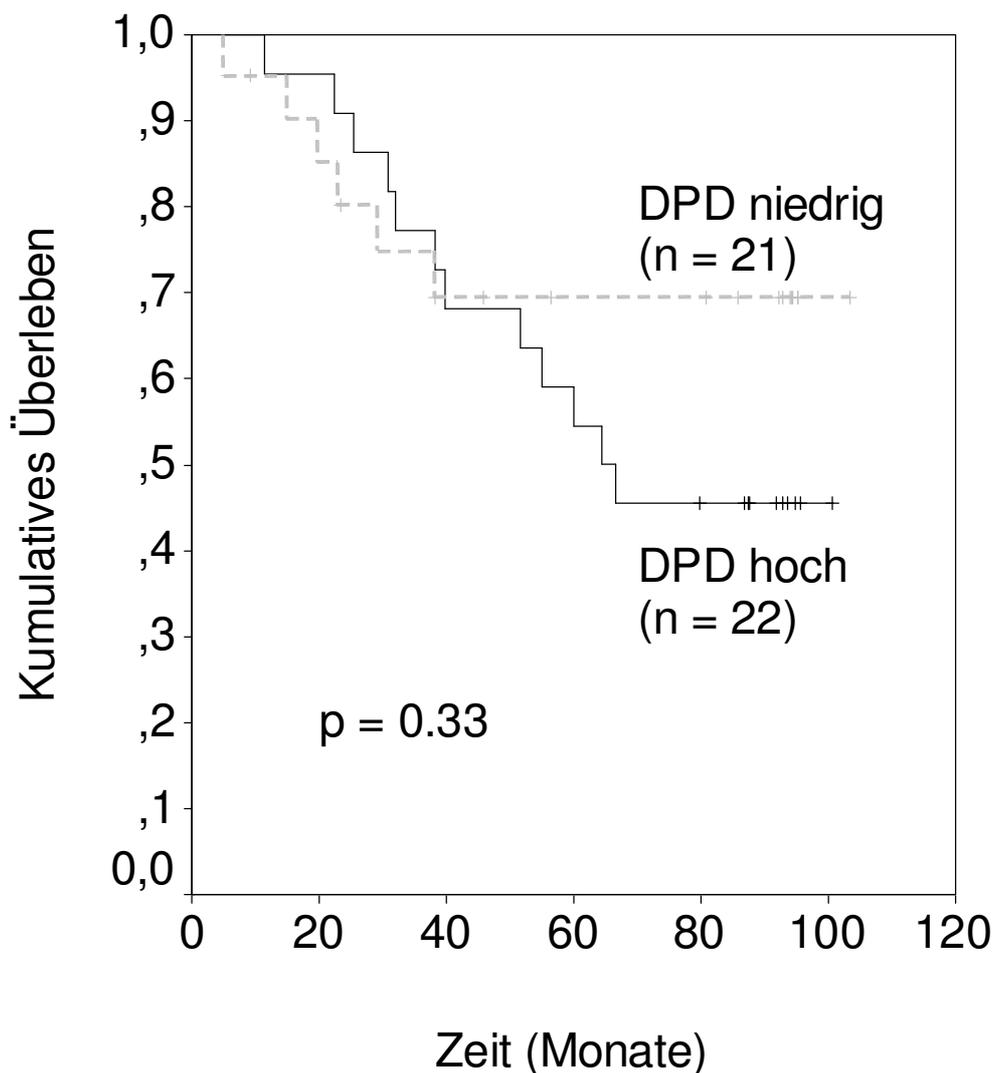
Entsprechend zur prognostischen Bedeutung der Expression von TS und TP wurde auch die DPD-Proteinexpression in Korrelation zum Gesamtüberleben untersucht. Analog zur TP-Analyse wurden hier sowohl Färbeintensität, als auch der prozentuale Anteil gefärbter Zellen sowie der daraus gebildete Index einbezogen.

Patienten mit niedrig exprimierenden Tumoren erreichten eine mittlere Überlebenszeit von  $78,6 \pm 8,54$  Monaten gegenüber  $68,4 \pm 6,84$  (Median 64,4) Monaten derer mit hoher DPD-Intensität im Tumor.

Die 5-Jahresüberlebenszeiten beliefen sich auf 69,5% in der ersten Gruppe im Unterschied zu 59,1% in der zweiten. Diese Abweichung war aber nicht statistisch signifikant ( $p=0,61$  (Breslow),  $p=0,33$  (Log Rank) (Abbildung 25).

Ähnliche Ergebnisse ergaben sich für Patienten, deren Tumoren eine niedrige bzw. hohe Zellzahl aufwiesen mit mittleren Überlebenszeiten von  $78,2 \pm 9,4$  bzw.  $69,2 \pm 6,7$  (Median 66,7) Monaten ( $p=0,68$  (Breslow) und  $p=0,47$  (Log Rank).

Analog zur Analyse hinsichtlich der Intensität, wiesen Patienten mit niedrigem DPD Index ( $<9$ ) mittlere Überlebenszeiten von  $78,6 \pm 8,5$  gegenüber  $68,4 \pm 6,84$  (Median 64,4) Monaten bei hohem Index ( $\geq 9$ ) auf (Breslow:  $p=0,61$ ; Log Rank:  $p=0,33$ ).



**Abbildung 25: Tumorspezifisches Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der DPD-Proteinexpression. Signifikanzniveau nach Log Rank.**

Die Analyse zum krankheitsfreien Überleben wurde deshalb nur für die Tumorentensität durchgeführt. Für niedrige Intensität lag ein mittleres rezidivfreies Überleben von  $66,0 \pm 9,0$  Monaten vor, bei hoher ergab sich ein Median von  $30,8 \pm 6,6$  Monaten.

Bei niedriger Immunreaktivität waren nach 5 Jahren noch 65,3% der Patienten ohne Rezidiv, während in der Gruppe der hoch exprimierenden Tumoren nur noch 36,4% ohne Rückfall blieben. Trotzdem war die Abweichung beider Gruppen nicht signifikant ( $p=0,22$  (Breslow) und  $p=0,09$  (log Rank) (Abbildung 26).

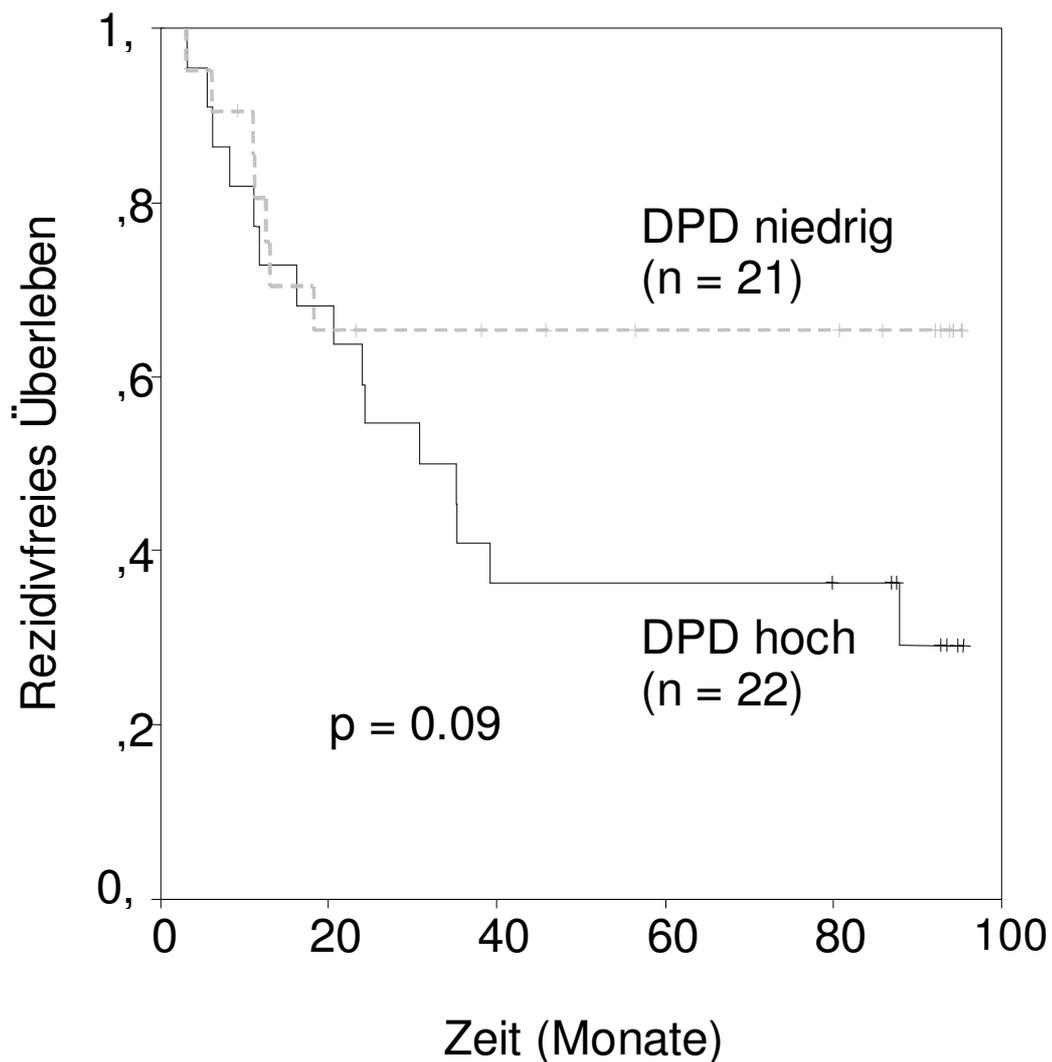


Abbildung 26: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von der DPD-Proteinexpression. Signifikanzniveau nach Log Rank.

### 3.5.8 Überlebenszeitanalyse und Analyse der rezidivfreien Zeit in Korrelation zur DPD-mRNA-Expression

Bei der Untersuchung zum Gesamtüberleben zeigte sich bezüglich der DPD-Expression bei Patienten mit niedrig exprimierenden Tumoren ein mittleres Überleben von  $71,0 \pm 8,0$  Monaten, im Gegensatz zu einem mittleren Überleben von  $70,0 \pm 7,3$  Monaten bei hoch exprimierenden Tumoren. Nach 5 Jahren waren bei den erstgenannten noch 61,6%, bei den letztgenannten noch 64,6% am Leben. Diese Abweichungen waren nicht statistisch signifikant ( $p=0,85$  nach Breslow und  $p=0,68$  nach Log Rank).

Die mediane Zeit bis zum Eintritt eines Rückfalls betrug bei Patienten mit niedrigem DPD-mRNA-Gehalt 35,1 Monate gegenüber 87,8 Monaten bei jenen mit hohem DPD-Gehalt. Diese scheinbar große Differenz war aber weder im Breslow ( $p=0,40$ ) noch im Log Rank ( $p=0,53$ ) Verfahren statistisch signifikant.

### **3.6 Überlebenszeitanalyse und Analyse der rezidivfreien Zeit in Korrelation zur kombinierten Betrachtung von TS, TP und DPD**

#### **3.6.1 Kombinierte Analyse der Proteinexpression von TS, TP und DPD**

Zur Überprüfung, ob die kombinierte Analyse aller drei Marker eine bessere prognostische Aussagekraft als die isolierte Betrachtung jeweils nur eines Markers entfalten kann, wurde anhand der bereits ermittelten Überlebenskurven, die scheinbar günstigste Kombination ausgewählt.

Am günstigsten für das Gesamtüberleben schien die Verknüpfung aus positiver TS-Intensität, hohem TP- und niedrigem DPD-Gehalt. Da aber zu wenig Patienten diese Bedingungen erfüllten, um eine statistische Aussagekraft zu erreichen, wurde auf eine kombinierte Testung aller drei Faktoren verzichtet. Stattdessen wurde eine Überlebenszeitanalyse mit der Kombination von jeweils zwei Markern durchgeführt, da hier größere Fallzahlen auftraten.

Für die Verbindung positive TS-/ niedrige DPD-Proteinexpression konnten 5 Patienten ermittelt werden, mit einer mittleren Überlebensrate von  $80,0 \pm 13,5$  Monaten gegenüber  $70,6 \pm 6,2$  bei den restlichen 36 Patienten. Dieser Unterschied war weder im Test nach Breslow ( $p = 0,48$ ) noch nach Log Rank ( $p = 0,38$ ) signifikant.

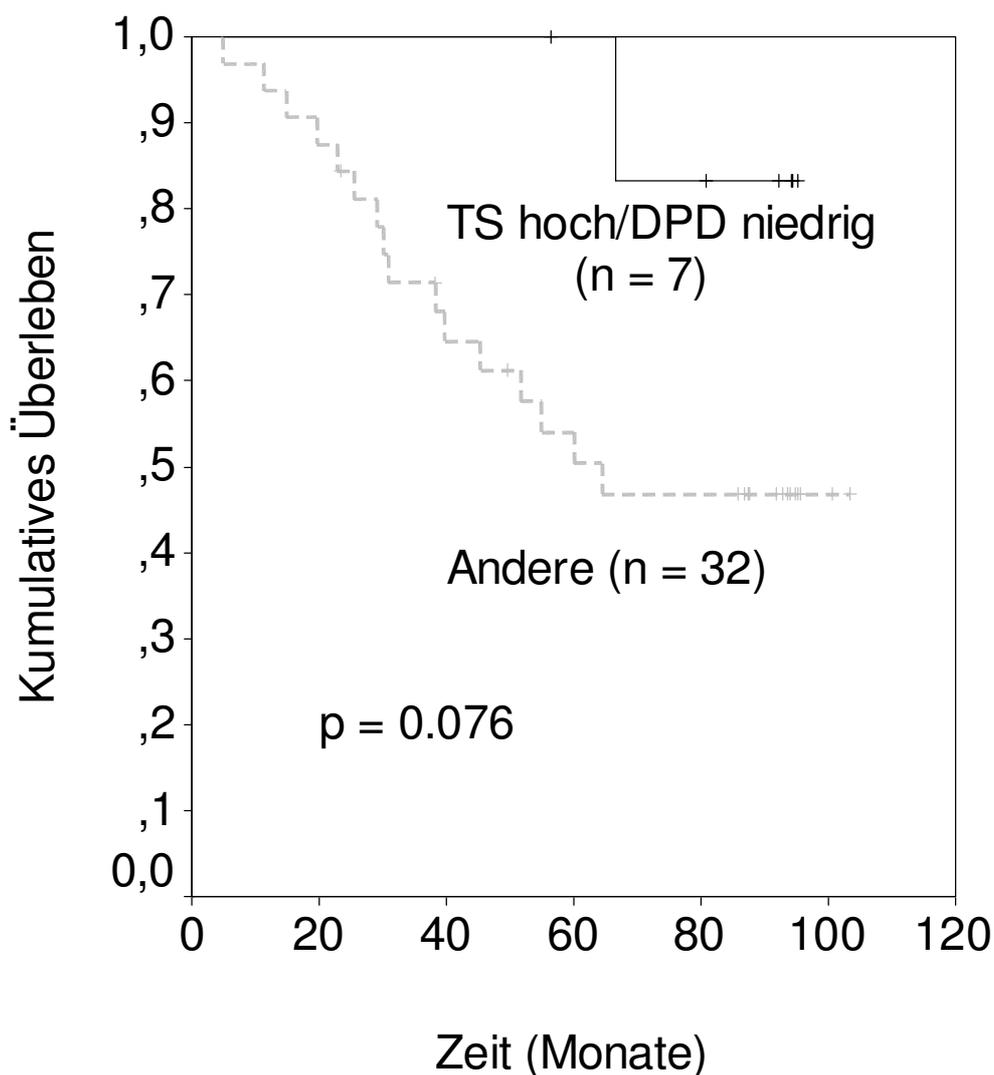
Für das rezidivfreie Überleben ergaben sich ähnliche Ergebnisse, mit einer mittleren rezidivfreien Zeit von  $78,4 \pm 15,0$  Monaten bei 5 Patienten mit positiver TS-/ niedrige DPD-Proteinexpression gegenüber  $51,3 \pm 6,7$  Monaten bei den anderen 36 Patienten. Diese Differenz erreichte aber weder im Test nach Breslow ( $p=0,24$ ) noch nach Log Rank ( $p=0,20$ ) statistische Signifikanz.

11 Patienten wiesen die Kombination hohe TP-/niedriges DPD-Färbeintensität auf. Die mittleren Überlebenszeiten waren hier nahezu entsprechend mit  $73,6 \pm 12,1$  in dieser Gruppe gegenüber  $71,0 \pm 6,1$  Monaten bei den Patienten, die diese Kombination nicht erfüllten. Als p-Werte ergaben sich 0,90 (Breslow) und 0,84 (Log Rank). Für das krankheitsfreie Überleben fanden sich mittlere rückfallsfreie Zeiten von  $56,6 \pm 12,8$  Monaten für Patienten mit hoher TP-/niedriger DPD-Expression gegenüber  $53,4 \pm 7,2$  Monaten bei Patienten mit einem dazu unterschiedlichen Expressionsprofil ( $p=0,97$  nach Breslow und  $p= 0,76$  nach Log Rank).

### **3.6.2 Kombinierte Analyse der mRNA-Expression von TS, TP und DPD**

Analog zur Immunhistochemie wurde als günstigste Kombination eine hohe TS-/hohe TP-/niedrige DPD-mRNA-Expression angesehen. Leider musste auch hier aufgrund der geringen Fallzahlen auf eine statistische Auswertung unter Einschluss aller drei Marker verzichtet werden.

Die Verknüpfung aus hoher TS- und niedriger DPD-Expression erfüllten 7 Patienten. Sie erreichten eine mittlere Überlebenszeit von  $90,5 \pm 4,4$  zu  $67,0 \pm 6,6$  Monaten bei den Patienten mit dazu unterschiedlichem Expressionsprofil. Nach 5 Jahren waren in der ersten Gruppe noch alle Patienten am Leben gegenüber 54% in der letzteren ( $p=0,059$  nach Breslow und  $p= 0,076$  nach Log Rank) (Abbildung 27).



**Abbildung 27: Tumorspezifisches Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom TS- und DPD-mRNA-Gehalt  
Signifikanzniveau nach Log Rank.**

Für das rezidivfreie Überleben ergaben sich mittlere Überlebenszeiten von  $82,55 \pm 11,9$  Monaten für Tumore, die sowohl eine hohe TS- als auch eine niedrige DPD-mRNA-Expression aufzeigten versus  $48,6 \pm 7,5$  Monaten bei Tumoren mit anderem TS/DPD-Expressionsmuster. Nach fünf Jahren hatten 85,7% der erstgenannten Patienten noch kein Rezidiv erlitten gegenüber 39,1% in der letzteren (Abbildung 28). Diese Abweichungen erreichten am Anfang der Kurve noch keine Signifikanz (Breslow:  $p= 0,099$ ) (ein Patient erlitt ein frühes Rezidiv), der Test nach Log Rank fiel aber knapp signifikant aus ( $p=0,048$ ).

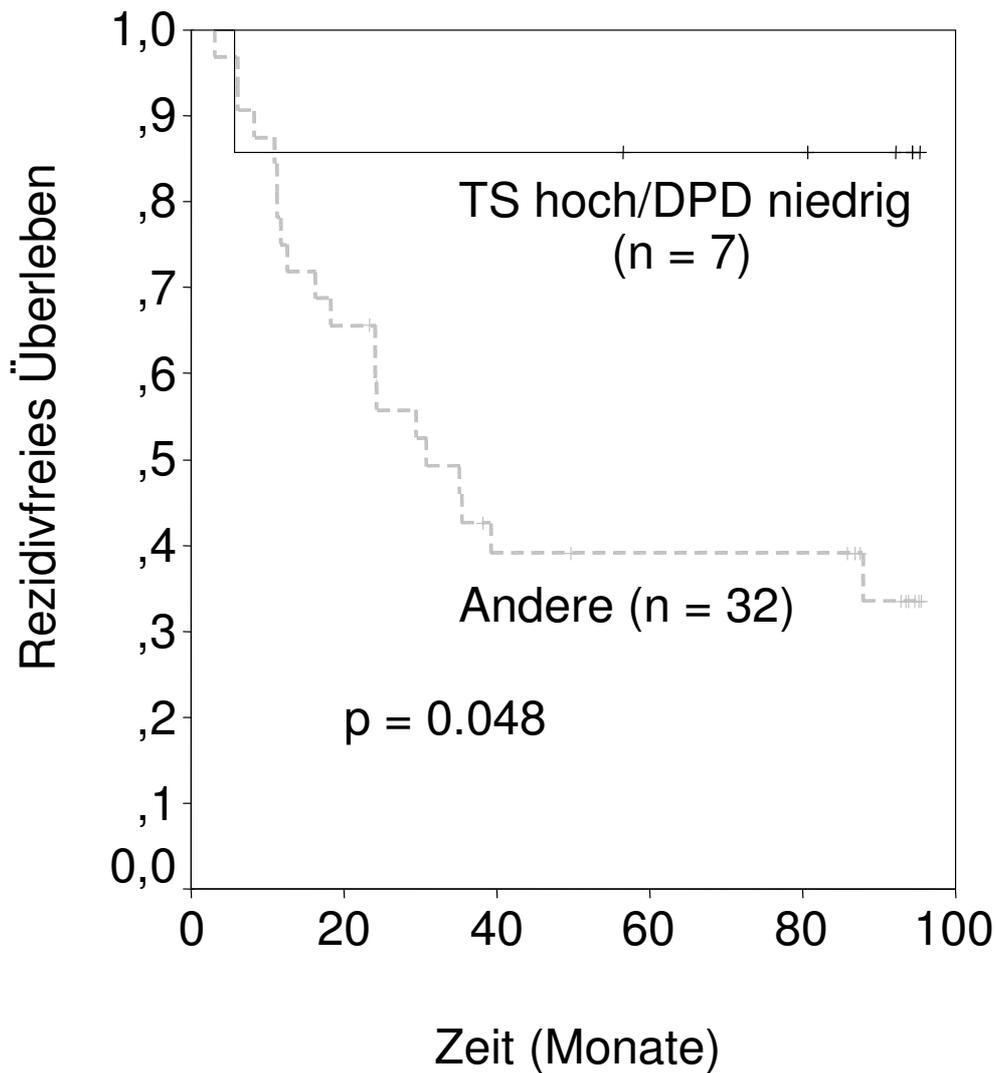


Abbildung 28: krankheitsfreies Überleben in Abhängigkeit vom TS- und DPD-mRNA-Gehalt. Signifikanzniveau nach Log Rank.

### 3.7 Multivariate Analyse nach dem Cox'schen Regressionsmodell

Zur Untersuchung, ob ein klinischer, histopathologischer oder experimentell bestimmter Faktor eine unabhängige prognostische Aussage erreichen kann, wurde ein Modell angewandt, das den Lymphknotenstatus, das Behandlungsregime, die Tumordinfiltrationstiefe und einen experimentell bestimmten Marker

enthielt. Diese hatten sich in der univariaten Analyse am ehesten als prognostisch relevant ausgewiesen.

Bei der Durchführung zeigte sich aber, dass die Modelle nicht konvergierten und so eine Berechnung nicht möglich war. Auf weitere Modelle wurde deshalb verzichtet.

## 4. Diskussion

### 4.1 Übersicht

In der adjuvanten Therapie des kolorektalen Karzinoms ist der Stellenwert des Antimetaboliten 5-FU bislang unbestritten. Selbst innerhalb des gegenwärtig wirksamsten Therapieprotokolls im adjuvanten Bereich, dem FOLFOX-Schema (5-FU, Folinsäure, Oxaliplatin), bildet 5-FU eine tragende Säule (André et al., 2004).

Trotzdem profitieren beim Kolonkarzinom im UICC Stadium III derzeit nur etwa 5-15% der Patienten von einer 5-FU-basierten Therapie (IMPACT, 1995; Moertel et al., 1990). Um bei einem Großteil der Patienten eine Übertherapie mit den damit verbundenen Nebenwirkungen und Kosten zu vermeiden, wäre es deshalb wünschenswert, Faktoren zu identifizieren, die eine Vorhersage bezüglich des Therapieansprechens erlauben. Umgekehrt ließen sich auch Patienten mit Kolonkarzinomen im UICC Stadium II erkennen, die von einer Therapie mit 5-FU profitieren würden und derzeit nicht therapiert werden.

5-FU entfaltet seine zytotoxische Wirkung hauptsächlich über die Hemmung der Thymidylat-Synthase, einem Enzym, das essentiell für die DNA Synthese ist und beim kolorektalen Karzinom schon lange im Blickfeld der Forschungen steht. Beim bereits metastasierten Karzinom scheint eine niedrige TS-Expression mit einem besseren Therapieansprechen einherzugehen. In der adjuvanten Situation ist die Datenlage dagegen nicht eindeutig. So finden sich auch Arbeiten, die für eine niedrige TS-Expression ein schlechteres Überleben postulieren (Edler et al., 2002).

Andere am Metabolismus von 5-FU beteiligten Schlüsselenzyme wie die Thymidin-Phosphorylase, die 5-FU erst in einen wirksamen Metaboliten überführt und Dihydropyrimidin-Dehydrogenase, die maßgeblich am Abbau beteiligt ist, wurden bislang nur wenig untersucht. Eine Pilotstudie mit 33 Patienten deutet jedoch darauf hin, dass beim kolorektalen Karzinom die kombinierte Betrachtung dieser Marker (TS, TP, DPD) gegenüber monogenetischen

Analysen möglicherweise eine erhöhte prognostische Aussagekraft besitzt (Salonga et al., 2000).

Grundsätzlich erlauben neue PCR-Technologien eine quantitative Einschätzung der Expressionsstärke von spezifischen Proteinen in Geweben. Die immunhistochemische Färbung kann ebenfalls eine adäquate Einschätzung der Expressionsstärke liefern und ermöglicht die Korrelation von Expression und morphologischer Lokalisation.

Vor diesem Hintergrund war die Möglichkeit der quantitativen Enzym-Analyse mittels relativer mRNA-Expressionsbestimmung über eine Real-time-PCR aus in paraffin-eingebettetem Tumormaterial für die genannten Enzyme zu klären. Diese Ergebnisse sollten mit einer zu etablierenden semiquantitativen immunhistochemischen Analyse im Sinne einer Äquivalenzprüfung verglichen werden.

Schliesslich sollte ein erster Vergleich der mit den jeweiligen Methoden gefundenen Aktivitäten mit klinischen bzw. histopathologischen Eigenschaften und prognostischem Verlauf, eine Rangliste der in weiteren Untersuchungen zu adressierenden Enzyme und Methoden aufzeigen.

Den Untersuchungen wurde eine Stichprobe von 46 in paraffin-eingebetteten Tumorsektaten aus einem Kollektiv von 204 kurativ operierten und anschließend mit 5-FU adjuvant behandelten Kolonkarzinompatienten im Stadium III (UICC) zugrundegelegt.

Es folgt eine kurze Darstellung der wichtigsten Ergebnisse dieser Studie:

- Es gelang, aus paraffin-eingebettetem Gewebe die mRNA-Expression von TS, TP und DPD mittels Real-time RT-PCR quantitativ zu bestimmen. Weiter wurde eine immunhistochemische Färbung für diese Enzyme etabliert und die Proteinexpression semiquantitativ bestimmt.
- In der univariaten Analyse des tumorspezifischen Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von klinischen und histopathologischen Variablen zeigte sich

erwartungsgemäß der Lymphknotenstatus als prognostisch relevant (pN1 versus pN2/3:  $p=0,03$ ) (Tabelle 15).

- Immunhistochemisch ergab sich keine Korrelation zwischen der Thymidylat-Synthase Proteinexpression und der Prognose, während auf mRNA-Ebene für Patienten mit hoher TS-mRNA-Expression eine (statistisch nicht signifikante) Tendenz für ein längeres rezidivfreies Überleben auffiel ( $p=0,09$ )(Abbildung 22).
- Bei der Überprüfung der Thymidin-Phosphorylase fand sich ein (statistisch nicht signifikanter) Überlebensvorteil sowohl für eine hohe mRNA- als auch für eine hohe Proteinexpression ( $p=0,27$ )(Abbildung 23).
- Für die Dihydropyrimidin-Dehydrogenase bestand eine (statistisch nicht signifikante) Tendenz zwischen einer niedrigen Protein- bzw. mRNA-Expression und einem längeren rezidivfreien Überleben ( $p=0,09$ )(Abbildung 26).
- Ein statistisch belegbarer Unterschied fand sich bei der kombinierten Betrachtung von TS und DPD. Danach war die Verknüpfung aus hoher TS-/niedriger DPD-mRNA-Expression statistisch signifikant mit einem längeren rezidivfreien Überleben ( $p=0,048$ ) (Abbildung 28) und tendenziell auch mit einem längeren Gesamtüberleben ( $p=0,076$ ) korreliert. Immunhistochemisch bestand für diese Kombination dagegen kein statistisch signifikanter prognostischer Zusammenhang ( $p=0,38$ ).
- Der Methodenvergleich zwischen Immunhistochemie und Real-time-PCR zeigte eine Übereinstimmung der Ergebnisse für die Thymidylat-Synthase, Thymidin-Phosphorylase und Dihydropyrimidin-Dehydrogenase in 50,0%, 63,0% und 60,5% der untersuchten Proben.

## 4.2 Bewertung des Patientenkollektivs

Aufgrund der studienbedingten Selektion des Patientenkollektivs auf kurativ operierte Tumorstadien und der zufallsbedingten Auswahl der Stichprobe nach chronologischen Kriterien, soll im folgenden ein Vergleich mit ähnlichen Studienpopulationen erfolgen, um eine Orientierung über die allgemeine Beschaffenheit der Patientenauswahl zu erhalten.

Das durchschnittliche Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation entspricht mit 62 Jahren den Beobachtungen zahlreicher Autoren, die das Kolonkarzinom als eine Erkrankung des fortgeschritteneren Alters darstellen. So lag das mittlere Alter im UICC Stadium III sowohl nach Daten der IMPACT Studie, die 1526 Patienten einschloss, (IMPACT, 1995) als auch nach Angaben der Moertel Studie (Moertel et al., 1990) mit 929 Patienten, bei 62 bzw. 61 Jahren.

In der vorliegenden Studie betrug das Verhältnis von männlichen zu weiblichen Erkrankten 1:1,88 (34,8% zu 65,2%). Damit ist das Geschlechterverhältnis im Vergleich zur 680 Patienten umfassenden Ausgangspopulation (1:1,25) noch weiter zugunsten des Frauenanteils verschoben. Dies lässt sich dadurch erklären, dass diese Tendenz schon in der 204 Patienten betragenden Teilpopulation des archiviert verfügbaren Materials vorhanden war (1:1,45). Ebenfalls ein leichter Überhang des Frauenanteils (Verhältnis von 1:1,12) ist in einer Analyse von 50.042 Patienten im UICC Stadium III der NCDB (National Cancer Data Base) vorzufinden (Greene et al., 2002). In der Moertel- und IMPACT-Studie zeigte sich eine annähernd gleiche Verteilung mit 1,1:1 (männlich zu weiblich) (Moertel et al., 1990, IMPACT, 1995). Im Gegensatz dazu finden O'Connell und Mitarbeiter (O'Connell et al., 1997) bei 317 Patienten ein Überwiegen der männlichen Population mit einem Verhältnis von 1,33:1. Ein signifikanter prognostischer Einfluss des Geschlechts ist bisher aber in keiner der aufgeführten Untersuchungen beschrieben worden.

In der Verteilung der Tumordinfiltrationstiefe nimmt die pT3 Kategorie in der dieser Arbeit zugrunde liegenden Studienpopulation mit 82,6% den überwiegenden Teil ein. Diesen stehen 6,5% als pT2 und 10,5% als pT4 einzustufende Tumoren gegenüber. Dieser Anteil des pT3 Stadiums entspricht weitgehend den Angaben in anderen groß angelegten Untersuchungen zur postoperativen adjuvanten Chemotherapie beim Kolonkarzinom (O'Connell et al., 1997). O'Connell und Mitarbeiter geben für 891 Patienten folgende Verteilung an: 10,7% pT2, 75,3% pT3 und 14% pT4 klassifizierte Tumoren.

Dies verlangt deshalb Beachtung, da gezeigt werden konnte, dass die 5-Jahresüberlebensrate beim Kolonkarzinom im Stadium III auch von der Tumoreindringtiefe abhängig ist. So konnten Merkel und Mitarbeiter zeigen, dass bei pT1/2 lymphknotenpositiven Tumoren nach 5 Jahren noch 78,3% der Patienten am Leben sind, diese Rate aber mit zunehmender Infiltrationstiefe abnimmt, so dass sie in der pT3 48,3% und in der pT4 Kategorie 30% erreicht (Merkel et al., 2001).

Ähnlichen Einfluss scheint die Tumoringfiltrationstiefe auch auf das Gesamtüberleben auszuüben, bei der sich die 5-Jahresüberlebensraten von 59,8% (T1/2, N1, M0) auf 42% (T3/4, N1, M0) verschlechtert haben (Greene et al., 2002).

Als weiterer prognostischer Faktor gilt der Lymphknotenstatus. In dieser Untersuchung wiesen 56,5% Patienten einen Lymphknotenbefall von weniger als drei benachbarten Lymphknoten (pN1) auf. Bei 26,1% wurden ein pN2 und bei 17,4% ein pN3-Stadium diagnostiziert. Dies deckt sich gut mit Beobachtungen von Francini und Mitarbeitern (Francini et al., 1994), die in einer Studie mit 118 Patienten im Dukes Stadium C (UICC-Stadium III) in 54,2% der Fälle ein pN1 und in 45,8% ein höheres Lymphknotenstadium vorfanden.

Im Hinblick auf den histologischen Differenzierungsgrad ergab sich in Übereinstimmung mit anderen Arbeiten bei der Auswertung, dass der weitaus größte Teil mäßig (63,0%) bis schwach (34,8%) differenziert war (Riethmueller et al., 1998; Moertel et al., 1990).

Die in dieser Studie untersuchten Tumore waren zu 45,7% rechts von der Flexura coli sinistra und zu 54,3% links davon lokalisiert. Moertel und Mitarbeiter berichten in ihrer Studie mit 929 Patienten von 49,6% rechtseitigen und 50,5% linksseitigen Tumoren. Die IMPACT Studie gibt die Häufigkeit der linksseitigen Lokalisation bei 1526 eingebrachten Patienten mit 55,3% an, was gut mit dem eigenen Kollektiv korreliert.

Zusammenfassend geht aus den oben ausgeführten Daten hervor, dass die vorliegende Stichprobenpopulation, trotz kleiner Fallzahl, hinsichtlich klinischer und pathologischer Parameter gut mit Patientenkollektiven aus früheren großen Studien zum Kolonkarzinom im Stadium III übereinstimmt. Dies bildet die Grundlage zur Bewertung der immunhistochemischen und molekularbiologischen Untersuchungen.

### **4.3 Bewertung der immunhistochemischen Ergebnisse**

#### **4.3.1 TS-Proteinexpression**

Die Angaben in der Literatur hinsichtlich des Anteils an TS positiven kolorektalen Tumoren variieren erheblich. Edler und Mitarbeiter (2002) beschreiben bei einem Kollektiv mit 862 Patienten im Dukes B und C Stadium den größten Teil als immunhistochemisch hoch exprimierende (72%) Primärtumore, während Takenoue und Kollegen bei 148 Patienten (Dukes A-C) nur einen Anteil von 28% als TS positiv einstufen (Takenoue et al., 2000). Eine mögliche Erklärung für die markante quantitative Differenz in puncto der TS-Immunpositivität der beiden oben aufgeführten Studien, könnte in der Anwendung unterschiedlicher Antikörper liegen (Edler et al.: monoklonaler Antikörper TS 106, Takenoue et al.: polyklonaler Antikörper). Andererseits wurden auch unter Gebrauch des monoklonalen Antikörpers TS 106 in einer Studie mit 108 Patienten im Dukes Stadium D nur Färberaten von 50% im Primärtumor gefunden (Paradiso et al., 2000), was eher dem in dieser Untersuchung ermittelten Anteil von 41,3% an immunopositiven Tumoren entspricht. Denkbar wäre, dass die in der Literatur beschriebenen Unterschiede in der TS-Immunreaktivität trotz ähnlichem Färbeprotokoll möglicherweise auf eine unterschiedliche Durchführung der Formalinfixierung und auf Unterschiede im Alter der Präparate zurückzuführen sein könnte.

#### **4.3.2 TP-Proteinexpression**

In der vorliegenden Arbeit zeigten 78,3% der Tumoren eine TP-Proteinexpression. Geringfügig niedrigere Expressionsraten (68% TP-positive Präparate) wurden in einer Studie an 80 Patienten mit kolorektalen Tumoren (Stadium II-IV) unter Anwendung desselben Antikörperklons (1C6-203)

gefunden (Tokunaga et al., 2002). Eine mögliche Erklärung bietet ein etwas anderes Bewertungsschema der letztgenannten Studie. Im Unterschied zur vorliegenden Arbeit wurden hier die Proben erst bei einer Immunreaktivität von >10% als positiv bewertet.

In starkem Gegensatz dazu stehen Angaben von anderen Autoren, die im Primärtumorgewebe (Dukes A-D bzw. pT2/3 Tumoren) nur eine TP-Färbung von 2,3% bzw. 5% nachweisen können (Saito et al., 2000; Takahashi et al., 1996). Diese Ergebnisse könnten auf die Verwendung eines anderen Antikörpers zurückzuführen sein (Anti-PD-ECGF, nicht näher spezifiziert).

Unabhängig vom eingesetzten Antikörper und in Übereinstimmung mit den Beobachtungen dieser Studie, beschreiben alle Autoren eine starke Anfärbung des Stromas (Takebayashi et al., 1996; Matsuura et al., 1999; Saito et al., 2000; van Triest et al., 2000; Takahashi et al., 1996).

#### **4.3.3 DPD-Proteinexpression**

Zur DPD-Proteinexpression kolorektaler Karzinome liegen nur wenige Daten vor, da erst seit kurzem ein entsprechender Antikörper zur Verfügung steht. Derzeit sind erst zwei Studien publiziert, in denen die DPD-Proteinexpression mittels Immunhistochemie bestimmt wurde (Tokunaga et al., 2003; Oi et al., 2004). Erstere Arbeit detektierte unter Anwendung desselben Antikörperklons (2H9-1b) wie in der eigenen Studie auch eine vergleichbare Färberate (75% gegenüber 76,7% Immunopositivität in der vorliegenden Untersuchung).

Oi und Mitarbeiter (2004) ermitteln dagegen mit einem polyklonalen Antikörper eine positive Immunreaktivität in 43,8% der kolorektalen Tumore.

### **4.4 Bewertung der molekulargenetischen Ergebnisse**

#### **4.4.1 Relative TS-mRNA-Expression**

In der vorliegenden Arbeit wurde eine mediane TS-Expression von 1,12 (Bereich: 0,00 bis 50,63) ermittelt. Zur Bewertung der relativen TS-mRNA-Expression liegen nur wenige mit der eigenen Untersuchung vergleichbare Daten vor, da die RNA Isolation aus in paraffin-eingebetteten Tumoren bisher noch keine verbreitete Methode darstellt. Die einzige vergleichbare Studie, die ebenfalls in paraffin-eingebettete kolorektale Karzinome verwendet und 309

Patienten im UICC Stadium II und III untersucht hat, findet einen ähnlichen medianen TS-Gehalt von 0,75 (Kornmann et al., 2003). Zu bemerken ist, dass, übereinstimmend mit den eigenen Ergebnissen, auch Studien, die mit gefrorenem Material gearbeitet haben, eine relativ hohe Spannweite der mRNA-Expression fanden. So stellen Lenz und Mitarbeiter bei 36 metastasierten kolorektalen Tumoren mit Biopsien aus dem Primärtumor eine Bandbreite von  $0,3-39 \times 10^{-3}$  fest (Lenz et al., 1998).

#### **4.4.2 Relative TP-mRNA-Expression**

In dieser Arbeit erreichte die relative mRNA-Expression einen medianen Wert von 13,13 (Bereich: 0,42 bis 363,85). Diese Ergebnisse lassen sich leider nur beschränkt mit den Angaben anderer Autoren vergleichen, da diese mit kryokonserviertem Material und mit bereits metastasierten Tumorstadien gearbeitet haben (Ichikawa, et al., 2003; Farrugia et al., 2003). Auffällig ist, dass auch andere Autoren eine große Bandbreite mit einer relativen TP-mRNA-Expression von 10-165,6 (Ichikawa et al., 2003) und  $1,9-194 \times 10^3$  (Farrugia et al., 2003) ermitteln. Es wäre denkbar, dass bei diesen hohen Spannweiten ein unterschiedlicher Stromaanteil des Präparates eine Rolle spielt, da TP auch recht stark von Makrophagen exprimiert wird (Takahashi et al., 1996).

#### **4.4.3 Relative DPD-mRNA-Expression**

Die relative DPD-mRNA-Expression lässt sich ebenso wie die TS-mRNA-Expression nur mit der Studie von Kornmann und Mitarbeitern vergleichen, in der mRNA aus in paraffin-eingebettetem Gewebe bestimmt wurde (Kornmann et al., 2003). Diese Arbeitsgruppe erhält einen medianen DPD-Gehalt von 0,28 (Bereich 0-1,62). In der vorliegenden Studie ergaben sich deutlich höhere Werte von 0,09 bis 81,19 mit einem Median von 4,36. Möglich, dass hier analog zu TP ein unterschiedlicher Stromaanteil zum Tragen kommt. Denkbar wäre auch, dass in der vorliegenden Studie nur UICC Stadium III Tumoren untersucht wurden, im Gegensatz zu der vorgenannten Arbeit, in der auch UICC Stadium II Tumoren mit in die Analyse einbezogen wurden.

#### **4.4.4 Erklärung für unterschiedliche Expressionslevel der untersuchten Marker**

Im Vergleich der einzelnen Marker untereinander zeigte sich in der vorliegenden Untersuchung, dass die TP- bzw. DPD- mRNA-Level gegenüber der TS-mRNA-Expression durchschnittlich höhere Werte aufwiesen. Eine mögliche Erklärung bietet die in der Immunhistochemie gezeigte Anfärbung des Stromas, die bei TP am stärksten und bei TS am geringsten war. Da initial keine Mikrodissektion der Tumorproben durchgeführt worden war, wurde die mRNA-Expression des Stromas jeweils mitbestimmt und könnte entsprechend für die konstatierten Unterschiede des mRNA-Gehalts zwischen den untersuchten Markern maßgeblich gewesen sein.

#### **4.4.5 Bewertung der Korrelation der experimentell bestimmten Parameter mit klinischen Variablen**

Weder in der Protein- noch in der mRNA-Expression von TS, TP und DPD fand sich eine Korrelation mit klinischen Variablen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Expression der experimentell bestimmten Faktoren nicht von klinisch-histopathologischen Variablen beeinflusst wird. Somit kann davon ausgegangen werden, dass es zu keiner Überlagerung der prognostischen Aussagekraft von TS, TP und DPD durch klinische Parameter kommt.

### **4.5 Bewertung der Überlebenszeitanalyse und des rezidivfreien Überlebens**

#### **4.5.1 Bewertung der allgemeinen Analyse**

Erwartungsgemäß zeigte sich der Lymphknotenstatus in der Überlebenszeitanalyse zugunsten eines Überlebensvorteils bei geringerem Lymphknotenbefall als prognostisch relevant (pN1 versus pN2/3: 5-Jahresgesamtüberleben 72,7% versus 43,5%,  $p=0,03$ ). Dies stimmt mit Beobachtungen anderer Studien an großen Kollektiven von im Stadium III kurativ operierten Kolonkarzinompatienten überein (Hermanek et al., 1995). Andere Faktoren wie Alter, Infiltrationstiefe und Differenzierungsgrad des Primärtumors erlangen in diesen Arbeiten auch prognostische Wertigkeit, konnten in der vorliegenden Studie aber nicht gefunden werden. Dies ist wohl hauptsächlich auf die kleine Fallzahl

der Stichprobe zurückzuführen, da sich die genannten Faktoren im Gesamtkollektiv mit 204 Patienten ebenfalls als prognostisch relevant auszeichnen. Je geringer die Unterschiede der Überlebensraten in den einzelnen Untergruppen sind, desto größer muss die Fallzahl sein, damit diese als nicht zufallsbedingt, also als statistisch signifikant nachzuweisen sind. Damit hat sich ein progredienter Lymphknotenstatus in der vorliegenden Studie als starker negativer prognostischer Faktor erwiesen, da er schon bei einer Fallzahl von 46 Patienten im Hinblick auf das Gesamtüberleben signifikante Werte aufwies.

In der univariaten Analyse zum rezidivfreien Überleben erreichte der Lymphknotenstatus trotz eines Unterschieds zugunsten eines weniger fortgeschrittenen Befallsmusters (pN1 versus pN2/3: 53,9% versus 39,3%,  $p=0,6$ ) nicht das Signifikanzniveau. Dies ist am ehesten durch die kleine Fallzahl zu erklären.

Eine wichtige Bedeutung zur Bewertung der experimentell bestimmten Parameter nimmt die Prüfung des Behandlungsarmes in der Überlebenszeitanalyse ein. In der Stichprobe von 46 Patienten ergaben sich keine Unterschiede bezüglich des Gesamtüberlebens und des rezidivfreien Überlebens zwischen beiden Behandlungsarmen. Deshalb ist von einer Einflussnahme des Therapieregimes auf das krankheitsfreie bzw. Gesamtüberleben abzusehen.

#### **4.5.2 Bewertung der mRNA und Proteinexpression der Thymidylat-Synthase**

Die Studienlage zur prognostischen Aussagekraft der Thymidylat-Synthase ist hinsichtlich Stadienverteilung, Probenmaterial, verwendeter Methoden und Therapieregime sehr heterogen. Bei genauerer Auswertung der Literatur kann man aber doch einige Tendenzen erkennen:

##### **4.5.2.1 Metastasiertes Stadium (UICC Stadium IV, Dukes D); palliative Therapie**

###### **Einfluss der Methode**

Mit nur einer Ausnahme (Findlay et al., 1997) konnten alle Studien im bereits metastasierten Stadium – unabhängig von der Methode – nachweisen, dass eine niedrige TS-Expression mit einem Therapieansprechen oder sogar mit

einem besseren Gesamtüberleben einhergeht (Lenz et al., 1998; Johnston et al., 1995; Paradiso et al., 2000; Shirota et al., 2001; Wong et al., 2001; Etienne et al., 2002; Kornmann et al., 1997; Aschele et al., 1999; Leichman et al., 1997). So berichten Lenz und Mitarbeiter in einer prospektiven Studie mit 36 eingebrachten Patienten, dass die Patienten mit einem niedrigen mRNA-Gehalt an TS sowohl ein signifikant besseres Ansprechen ( $p=0,003$ ) als auch eine signifikant verlängerte Gesamtüberlebenszeit ( $p=0,002$ ) aufweisen (Lenz et al., 1998). Eine ebenso hohe Vorhersagekraft der TS-Proteinexpression, demonstriert eine retrospektive Untersuchung an 48 Tumormetastasen, bei denen ein Response auf 5-FU/Methotrexat ( $p=0,003$ ) und ein verlängertes Gesamtüberleben ( $p=0,02$ ) bei niedriger TS-Proteinexpression auftritt (Aschele et al., 1999). Allerdings basieren diese Resultate hinsichtlich eines Überlebensvorteils bei niedriger TS-Expression allein auf der univariaten Analyse. Eine multivariate Bestätigung blieb bei oben genannten Autoren leider aus.

#### Einfluss des Therapieregimes

Nicht nur die verwendeten Methoden, auch das Therapieregime scheint im fortgeschrittenen Tumorstadium eine untergeordnete Rolle zu spielen. Obwohl alle oben genannten Studien entweder ein kontinuierliches Applikationsschema oder gemischte Regime aus kontinuierlicher Infusion und Bolusinjektion verwenden, kann in einer Studie mit 41 Patienten, die 5-FU als Bolusinjektion erhielten, der Nachweis einer positiven Korrelation zwischen einer niedrigen TS-Proteinexpression und einer höheren Tumoransprechrates erbracht werden (Cascinu et al., 1999).

#### Einfluss des Probenmaterials: Primärtumor versus Metastasen

Die oben erwähnte Studie von Findlay und Kollegen (Findlay et al., 1997) scheint diesen Beobachtungen zu widersprechen, da sie bei einem heterogenen Kollektiv (Dukes A-D) mit 134 kolorektalen Tumoren keine Korrelation des TS-Spiegels mit dem Therapieansprechen findet. Allerdings wurde der TS-Gehalt hier in den Primärtumoren und nicht direkt in den Metastasen bestimmt. Eine mögliche Erklärung für die hier – gegenüber den oben aufgeführten Studien – nicht nachweisbare Korrelation zwischen TS-Gehalt und Tumoransprechen wäre, dass im Primärtumor und in den

korrespondierenden Metastasen TS unterschiedlich stark exprimiert wird. Die fehlende Übereinstimmung zwischen Primärtumor und Metastasen wird von zwei späteren Studien bestätigt (Aschele et al., 2000; Etienne et al., 2002).

#### Fazit für metastasiertes Stadium

In Tumormetastasen von kolorektalen Karzinomen scheint demnach eine Assoziation zwischen hoher TS-Expression und einer Resistenz gegenüber 5-FU zu bestehen. Durch eine Art Escape-Mechanismus könnten die Tumorzellen mit einer TS-Überproduktion der Hemmung der Thymidylat-Synthase durch FdUMP entgegenwirken und dadurch den Hauptwirkungsmechanismus von 5-FU umgehen. Die DNA Synthese und das damit verbundenen Zellwachstum bliebe so unbeeinträchtigt. Demnach würden nur Patienten mit einer niedrigen TS-Expression von einer 5-FU basierten Chemotherapie profitieren.

#### 4.5.2.2 Kurativ operierte Tumore (UICC Stadien I-III, Dukes A-C); adjuvante Therapie

Die Studienlage bei kurativ operierten Tumoren ist nicht nur bezüglich der verwendeten Methoden, Stadien und Therapieregime, sondern auch betreffend der ermittelten Ergebnisse sehr uneinheitlich.

#### Negative Korrelation zwischen TS-Expression und Prognose

Nur ungefähr die Hälfte der Studien kann, analog zum fortgeschrittenen Tumorstadium, untermauern, dass eine niedrige TS-Expression mit einem längeren krankheitsfreien oder Gesamtüberleben einhergeht (Edler et al., 2000; Triest et al., 2000; Takenoue et al., 2000; Cascinu et al., 2001; Kralavanszky et al., 2002; Allegra et al., 2003; Sakamoto et al., 2003). Die untersuchten Patientenkollektive sind dabei aber zum Teil sehr heterogen. So werden in der Studie von Edler und Mitarbeitern (Edler et al., 2000) 70 und in der Arbeit von Kralovansky und Kollegen (Kralovansky et al., 2002) 72 kolorektale Tumore im Dukes Stadium A-D auf ihre prognostische Aussagekraft hin überprüft. Nur eine Studie befasst sich analog dem hier untersuchten Kollektiv ausschließlich mit kolorektalen Tumoren im Stadium III (Cascinu et al., 2001).

#### Keine Assoziation zwischen TS-Expression und Prognose

Im Gegensatz dazu konnte in der vorliegenden Arbeit unter Anwendung des monoklonalen Antikörpers TS 106 keine Assoziation zwischen der TS-Proteinexpression und der Prognose nachgewiesen werden (Abbildung 20). Übereinstimmend mit den eigenen Beobachtungen, berichten noch zahlreiche weitere Studien über eine fehlende Korrelation zwischen der TS-Expression und dem krankheitsfreien bzw. dem Gesamtüberleben im adjuvanten Bereich (Yamachika et al., 1998; Sugiyama et al., 2002; Nanni et al., 2002; Allegra et al., 2002). Beispiele für große Studien, die analog der eigenen Studie den monoklonalen Antikörper TS 106 verwenden und ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen der TS-Proteinexpression und der Prognose finden, sind die Publikationen von Allegra und Mitarbeitern (2002) sowie die von Nanni und Kollegen (2002), die Tumorproben von jeweils 465 bzw. 263 Patienten in den Stadien Dukes B und C untersuchten.

#### Positive Korrelation zwischen TS-Expression und Prognose

In einer weiteren Studie wurden 862 Patienten mit kolorektalen Karzinomen der Dukes' Stadien B und C im randomisierten Vergleich einer 5-FU-basierten adjuvanten Therapie (n=420) versus einer ausschließlich chirurgischen Therapie (n=442) zugeordnet (Edler et al 2002). Darin wird für die Gruppe der nur chirurgisch behandelten Patienten berichtet, dass Patienten mit einer niedrigen TS-Expression im Primärtumor einen signifikanten Überlebensvorteil haben. Konträr dazu findet diese Arbeit aber, dass nur Patienten mit einem sehr hohen TS-Gehalt von einer adjuvanten Chemotherapie profitieren (multivariate Analyse zum rezidivfreien Überleben  $p=0,02$ ), während die mit einer niedrigen TS-Expression sogar ein schlechteres Überleben haben als ohne zytostatische Behandlung. Auch die Arbeitsgruppe um Takenoue zeigt eine positive Korrelation zwischen TS-Expression und dem Ansprechen auf eine orale 5-FU Therapie auf (Takenoue et al., 2000). Diese Befunde werden von einer weiteren Untersuchung gestützt, bei der bei 309 kolorektalen Tumoren im Stadium II und III, für eine hohe TS-mRNA-Expression ebenfalls ein signifikant besseres Überleben deutlich wird (Kornmann et al., 2003).

*Eigene Ergebnisse und Einfluss des Therapieregimes: kontinuierliche Infusion versus Bolus Injektion*

Die eigenen Ergebnisse zeigen, dass weder die TS-Proteinexpression noch die TS-mRNA-Expression mit einem Überlebensvorteil assoziiert sind. Im Gegensatz zur TS-Proteinexpression ließ sich allerdings zwischen einer hohen TS-mRNA-Expression und dem rezidivfreien Überleben eine nicht signifikante positive Tendenz eruieren ( $p=0,09$ , Abbildung 22). Diese Resultate fügen sich zwar gut in die aktuelle Studienlage mit vergleichbaren Kollektiven ein, trotzdem scheinen sie nicht der aus dem Metabolismus von 5-FU abgeleiteten theoretischen Überlegung zu entsprechen. Laut dieser Hypothese müsste, analog den Ergebnissen im metastasierten Stadium, eine niedrige TS-Expression zu einem Überlebensvorteil führen, da Tumorzellen mit einer hohen TS-Expression durch eine Art Escape-Mechanismus der Wachstumshemmung durch FdUMP entgehen könnten. Diese Hypothese konnte aber im nicht-metastasierten Stadium, wie oben aufgeführt, von nur ungefähr der Hälfte der Studien untermauert werden. Um dies genauer zu beleuchten, ist es wichtig auch die Applikationsart von 5-FU zu erheben, da in der eigenen Arbeit 5-FU als Bolusinjektion verabreicht wurde. So haben präklinische Studien gezeigt, dass 5-FU seine zytotoxische Wirkung in Abhängigkeit der Infusionskinetik über unterschiedliche zelluläre Mechanismen entfaltet. Während eine 5-FU-Bolus-Injektion ihren zellschädigenden Effekt hauptsächlich über den vom Zellzyklus unabhängigen Einbau von FUDP in RNA entfalten soll, scheint die Applikation von 5-FU als kontinuierliche Infusion eine Zellzyklus abhängige Hemmung der Thymidylat-Synthase zu bewirken (Aschele et al., 1992). Demnach wäre - korrespondierend zu den eigenen Daten - die Wirkung einer Bolusinjektion von 5-FU unabhängig von der TS-Expression.

Analysiert man die aktuelle Studienlage nach diesen Gesichtspunkten, so findet sich, dass bis auf eine Ausnahme (Allegra et al., 2003), bei allen Studien, die einen Zusammenhang mit einer niedrigen TS-Expression und einem besseren Gesamtüberleben nahe legen, entweder eine kontinuierliche Infusionstherapie mit 5-FU durchgeführt wurde oder gar keine Angabe zum Therapieregime erhältlich ist (z.B. Cascinu et al., 2001).

Bei den Arbeiten, die keine Korrelation zwischen der TS-Expression und der Prognose fanden, handelt es sich vorwiegend um Kollektive, die mit 5-FU als Bolus-Injektion oder mit einer oralen Gabe behandelt worden sind. Nur in einer Studie ist keine Applikationsart zu erheben (Allegra et al., 2002).

Entsprechend wäre die fehlende Korrelation zwischen TS-Expression und Prognose durch die Kinetik der verabreichten Therapie erklärbar.

#### Widersprüchliche Ergebnisse bei metastasierten und nicht metastasierten

##### Stadien

Die Beobachtung von Edler und Mitarbeitern, dass im adjuvanten Bereich ein erhöhter TS-Spiegel mit einer besseren Prognose einhergehen soll, widerspricht den Berichten beim metastasierten kolorektalen Karzinom, bei dem ein niedriger TS-Gehalt Bedingung für ein Ansprechen ist. Auch in der eigenen Untersuchung zeigte sich bei der TS-mRNA-Expression eine Tendenz einer Assoziation eines hohen TS-Spiegels mit der Prognose. Dies könnte sowohl mit unbekanntem Einflüssen des mitbestimmten Bindegewebes als auch am bisher noch nicht genauer untersuchten komplexen Zusammenspiel mit anderen zellulären Mechanismen bei Tumoren im adjuvanten Bereich zusammenhängen.

Generell bietet eine unterschiedliche Tumorbiologie der primär metastasierten und der potentiell kurativen Situation eine mögliche Erklärung für die widersprüchlichen Beobachtungen in diesen Tumorstadien. So wird der Nutzen einer chemotherapeutischen Behandlung im adjuvanten Bereich hauptsächlich in der Entfernung von schon im Kreislauf zirkulierenden entarteten Zellen gesehen (Midgley et Kerr, 1999). Diese Situation ist tumorbiologisch anders als bei bereits angesiedelten, soliden Tumoren und möglicherweise erlangen hier zellzyklusunabhängige zytotoxische Effekte von 5-FU eine größere Bedeutung. So zeigt sich im Mausmodell, dass eine Bolus-Injektion von 5-FU zu einer Induktion des Tumorsuppressorproteins p53 und damit, unabhängig von einer TS-Inhibition, zu einem p53 abhängigen Zelltod führt (Pritchard et al., 1997). Die Beobachtung einer durch 5-FU vermittelten Apoptose unabhängig von der TS-Expression wurde auch an der humanen Brustkrebs-Zelllinie MCF-7 beschrieben, bei der das Absterben über einen p53- und Fas-abhängigen

Aktivierungsweg verläuft (Longley et al., 2002; Longley et al., 2004). Außerdem wird angenommen, dass es über den vermehrten Einbau von „falschen“ Nukleotiden wie FdUTP zu Strangabbrüchen kommt, die wiederum eine Apoptose der Zelle auslösen können (Van Triest et al., 2000). Die einzelnen Aktivierungswege sind dabei aber noch unklar und Gegenstand laufender Forschungen.

Inwieweit eine Interaktion von TS-Protein mit anderen zellzyklusregulierenden Proteinen, wie dem Onkogen c-myc, einen Einfluss auf das Tumorwachstum nehmen kann ist ebenfalls noch unklar. In einer „in vitro“ Studie an humanen Kolonkarzinomzelllinien konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass TS-Protein an c-myc mRNA bindet und so zu einer Translationshemmung von c-myc führt (Chu et al., 1995). Ob eine hohe TS-Expression im komplexen Zusammenspiel der Zellzyklusregulation dann auch zu einer Wachstumshemmung führt, muss in weiteren Untersuchungen genauer evaluiert werden.

#### **4.5.3 Bewertung der mRNA und Proteinexpression der Thymidin-Phosphorylase**

Das Enzym Thymidin-Phosphorylase ist identisch zu „platelet-derived endothelial cell growth factor“ (PD-ECGF) (Moghaddam, Bicknell, 1992; Usuki et al., 1992; Furukawa et al., 1992; Sumizawa et al., 1993). Dadurch erhält dieses Enzym neben seinen Funktionen im Nukleotidmetabolismus noch zusätzliche Potenz als Wachstumsfaktor. In Übereinstimmung dazu, finden zwei Studien mit 64 (Dukes A-D) bzw. 163 evaluierten Patienten (Dukes A-C) mit kolorektalem Karzinom, dass eine hohe TP-Expression mit der Dichte an kleinsten Blutgefäßen korreliert (Matsura et al., 1999; Takebayashi et al., 1996). Die Bildung neuer Blutgefäße ist Voraussetzung für Wachstum und Metastasierung. Folglich legen einige Studien nahe, dass eine niedrigere TP-Expression mit einem Überlebensvorteil assoziiert sein könnte (Van Triest et al., 2000; Aoki et al., 2002; Matsura et al., 1999; Takebayashi et al., 1996; Ichikawa et al., 2003; Tokunaga et al., 2002).

Betrachtet man aber die Funktion der Thymidin-Phosphorylase im Nukleotidmetabolismus, so ergibt sich eine entgegengesetzte Hypothese: hier geht man davon aus, dass eine hohe TP-Expression mit einer besseren Prognose

einhergeht. 5-FU ist selbst inaktiv und kann seine zytotoxische Wirkung erst entfalten, wenn es metabolisiert wird (Abbildung 1). Dem Enzym Thymidin-Phosphorylase wird dabei eine maßgebliche Rolle zugesprochen. Diese Hypothese wird von in-vitro-Versuchen untermauert, die an Kolonkarzinomzelllinien zeigen können, dass ein höherer Gehalt an TP mit einer erhöhten Chemosensibilität gegenüber 5-FU einhergeht (Schwartz et al., 1995; Kato et al., 1997; Evrard et al., 1999).

So konstatieren Nishimura und Mitarbeiter bei einem mittels 5'-Desoxy-5-fluorouridin (5'-DFUR) (5'-DFUR ist eine Vorstufe von 5-FU und kann oral appliziert werden) therapierten Kollektiv von 88 kolorektalen Tumoren in Dukes Stadien B und C eine positive Assoziation zwischen TP-Gehalt und Prognose (Nishimura et al., 2002). Ebenso schreibt eine Studie mit 124 Patienten (Stadium II, III) einer hohen TP-Expression ein besseres Gesamtüberleben zu (Yamaue et al., 2003).

Es gibt nur eine publizierte Studie mit 189 Dukes A-D Patienten, die keine prognostische Aussagekraft von TP dokumentiert (Ikeguchi et al., 2002).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, obwohl statistisch nicht signifikant, weisen ebenfalls darauf hin, dass eine erhöhte TP-mRNA- und Proteinexpression im Tumor mit einem längeren krankheitsfreien und Gesamtüberleben assoziiert sein könnte ( $p=0,27$ ) (Abbildung 23) und fügen sich damit gut in die Beobachtungen der obengenannten Studien ein, da hier ein ähnliches Kollektiv analysiert wurde und der Hypothese einer erhöhten Zytotoxizität durch erhöhte Metabolisierung von 5-FU entspricht.

Weiterhin unklar bleibt, bei welchen Kollektiven und Therapieregimen die Rolle von TP im Nukleotidmetabolismus über die Funktion von TP als angiogenetischem Faktor überwiegt. Denkbar wäre, dass vergleichbar mit der Situation der Thymidylat-Synthase, solide metastasierte Tumoren ein höheres angiogenetisches Potential zum Wachstum benötigen, als einzelne hämatogen zirkulierende Zellen, die ihre Nährstoffe unabhängig von neugebildeten Blutgefäßen direkt aus der Blutbahn beziehen können. Dies könnte die Beobachtung von Ichikawa und Kollegen bei 37 Tumoren im Dukes Stadium D und von der Arbeitsgruppe um Salonga mit 33 Biopsien aus Lebermetastasen

erklären, bei denen eine niedrige TP-Expression mit einem besseren Überleben einhergeht (Ichikawa et al., 2003; Salonga et al., 2000).

Ein weiterer Punkt ist der Einfluss von nicht chemotherapeutisch behandelten Patienten in heterogenen Kollektiven, da bei unbehandelten Patienten nur die Funktion der Angiogenese eine Bedeutung haben kann. Analysiert man die Studienlage nach diesem Gesichtspunkt so zeigt sich, dass zwei der Studien, die die angiogenetische Potenz von TP hinsichtlich der Prognose aufzeigen (Van Triest et al., 2000; Tokunaga et al., 2002) auch unbehandelte Patienten mit einschlossen. Bei den anderen Studien im adjuvanten Bereich, die postulieren, dass ein niedriger Gehalt an TP prognostisch günstiger sei, werden leider keine Angaben über das verabreichte Therapieregime gemacht (Aoki et al., 2002; Matsuura et al., 1999; Takebayashi et al., 1996). Deshalb lässt sich bei diesen Studien, die auch die Dukes Stadien A und B mit untersuchten, leider nicht eruieren, wie hoch der Anteil an unbehandelten Patienten ist.

Um abschließend abschätzen zu können, welche Funktion der Thymidin-Phosphorylase schließlich überwiegt ist es deshalb erforderlich, die prognostische Bedeutung der Thymidin-Phosphorylase an definierten Kollektiven zu untersuchen. Die Ergebnisse der eigenen Arbeit legen nahe, die prognostische Aussagekraft am Gesamtkollektiv zu untersuchen, um die hier aufgestellte Hypothese eines Überwiegens der „metabolischen“ Funktion von TP im nicht metastasierten Stadium zu überprüfen.

Ein weiteres interessantes Ergebnis findet eine Arbeit mit 86 unbehandelten Patienten, die eine Korrelation der im Stroma gemessenen TP-Expression und dem Gesamtüberleben aufweist (Saito et al., 2000). Diese Studie zeigt außerdem, dass TP dort hauptsächlich von Makrophagen exprimiert wird. In dieser Arbeit wird deshalb ein möglicher Einfluss des Immunsystems diskutiert. In der vorliegenden Arbeit ergab sich kein Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der TP-Stromazelleexpression und der Prognose ( $p=0,66$ ). Die derzeitige Studienlage lässt keine genaueren Aussagen zu, inwieweit auch immunmodulatorische Adjuvantien wie Levamisol eine Rolle spielen könnten.

#### 4.5.4 Bewertung der mRNA und Proteinexpression der Dihydropyrimidin-Dehydrogenase

Der Abbau von 5-FU erfolgt durch das Enzym Dihydropyrimidin-Dehydrogenase in den inaktiven Metaboliten Dihydrofluracil (Heggie et al., 1987). Bei Patienten, die aufgrund von molekularen Defekten eine verminderte Stoffwechselaktivität der Dihydropyrimidin-Dehydrogenase aufweisen, wurden schwere toxische Reaktionen auf 5-FU beschrieben (Milano et al., 1999, Morison et al., 1997). Umgekehrt müsste aus theoretischen Überlegungen eine erhöhte DPD-Expression mit einem schnelleren Abbau und damit einer geringeren Wirksamkeit von 5-FU assoziiert sein.

Diese Hypothese wurde erstmals in einer Studie, in der 33 Biopsieproben aus Lebermetastasen von kolorektalen Tumoren untersucht wurden, bestätigt. Danach besteht eine positive Assoziation zwischen einer niedrigen DPD-mRNA-Expression und dem Ansprechen auf eine 5-FU-basierte Therapie (Salonga et al., 2000). Nachfolgende Studien bekräftigen, dass eine niedrige DPD-Expression beim kolorektalen Karzinom auch mit einem Überlebensvorteil einhergeht (Ichikawa et al., 2003; Nishimura et al., 2002; Tokunaga et al., 2003; Tsuji et al., 2004; Oi et al., 2004; Kornmann et al., 2003). Die meisten dieser Studien ermittelten die Enzymaktivität mittels ELISA (enzyme linked immunosorbent assay). Nur in einer Studie wurde die DPD-Expression mit Hilfe desselben Antikörpers, der auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, untersucht (Tokunaga et al., 2003).

Die eigene Untersuchung ergab eine tendenzielle Korrelation zwischen niedriger DPD-Expression und längerem krankheitsfreien Überleben (DPD-Proteinexpression 65,3% versus 36,4%,  $p=0,09$ , Abbildung 26), die wahrscheinlich durch die zu geringe Fallzahl bedingt das Signifikanzniveau knapp verfehlte. In Bezug auf das 5-Jahresüberleben war der Unterschied jedoch nicht so deutlich (69,5% versus 59,1%,  $p=0,33$  Abbildung 25).

In einer prospektiven Studie mit 103 Patienten mit metastasierten kolorektalen Tumoren findet sich unter Anwendung eines Hybrid-Regimes bestehend aus kontinuierlicher- und Bolus-5-FU Therapie kein Zusammenhang zwischen der DPD-Enzymaktivität und einem Therapieansprechen (Etienne et al., 2002). In

einer weiteren Untersuchung ist an einem Kollektiv von 189 Patienten mit Tumoren der Dukes Stadien A-D unter verschiedenen Therapieregimen (kontinuierliche Infusion, transarterielle intrahepatische Chemotherapie, keine adjuvante Therapie) ebenfalls keine prognostische Vorhersagekraft im Hinblick auf die DPD-Enzymaktivität nachweisbar (Ikeguchi et al., 2002).

Ob sich die unter theoretischen Überlegungen plausible prognostische Aussagekraft der DPD-Expression bestätigen lässt, muss zunächst prospektiv an größeren Kollektiven untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass die Immunhistochemie auch eine adäquate Methode sein könnte, um Unterschiede in der DPD-Proteinexpression zu detektieren.

#### **4.6 Bewertung der multivariaten Analyse**

Eine multivariate Analyse war nicht durchführbar, da die Modelle nicht konvergierten. Dies ist auf die geringe Fallzahl zurückzuführen.

#### **4.7 Bewertung der Überlebenszeitanalyse und Analyse der rezidivfreien Zeit bei Kombination der Marker**

Da die Analyse einzelner genetischer Marker wahrscheinlich nicht der Komplexität von genetischen Signalwegen Rechnung trägt, werden zunehmend Kombinationen mehrerer Marker untersucht. Jüngst gelang es, in einer Untersuchung an Lebermetastasen von 33 Patienten mit kolorektalen Tumoren zu zeigen, dass die Kombination mehrerer Marker die prognostische Fähigkeit eines einzelnen übersteigt und so eine erhöhte Aussagekraft besitzt (Salonga et al., 2000). In dieser retrospektiven Studie lies sich anhand der relativen TS-, TP- und DPD-mRNA-Expression eine Vorhersage hinsichtlich des Therapieansprechens bei allen Patienten treffen.

In der vorliegenden Arbeit konnte aufgrund der begrenzten Fallzahl nur eine Kombination von jeweils zwei Markern untersucht werden. Dennoch erwies sich die Verbindung aus hohem TS- und niedrigem DPD-mRNA-Gehalt als prognostisch am günstigsten. Hier war der Unterschied im krankheitsfreien Überleben trotz der geringen Fallzahl statistisch signifikant ( $p=0,048$ ).

Hinsichtlich der Proteinexpression konnte die prognostische Bedeutung dieser Kombination jedoch nicht untermauert werden.

Dagegen fand sich für die Kombination aus hohem TP- und niedrigem DPD-Gehalt keine prognostische Relevanz. Im Gegenteil, hier schien die prognostische Aussagekraft der DPD-Expression sogar aufgehoben zu werden. Vielleicht erhalten zirkulierende Tumorzellen keinen erheblichen Wachstumsvorteil davon, wenn sie zum einen 5-FU schneller abbauen und zum anderen 5-FU langsamer aktivieren. Hier scheint der Selektionsvorteil eines schnelleren 5-FU Abbaus, dem einer verminderten Aktivierung überlegen zu sein. Hier könnte zum Tragen kommen, dass der Abbau von 5-FU hauptsächlich durch DPD erfolgt, während für die Aktivierung von 5-FU drei Metabolisierungswege zur Verfügung stehen (Abbildung 2). Eine Tumorzelle könnte also schon mit der Überexpression von nur einem Enzym der zytotoxischen Wirkung von 5-FU entgehen und dadurch einen Wachstumsvorteil gegenüber anderen Tumorzellen erhalten. Es wäre denkbar, dass die gemeinsame Betrachtung von TP und DPD als prädiktivem Marker nur dann sinnvoll ist, wenn die angiogenetische Potenz von TP im Vordergrund steht.

#### **4.8 Methodenvergleich**

Lange Zeit galt es als Dogma, dass eine RNA Isolation aus in paraffin-eingebettetem Gewebe nicht möglich ist, da bei der Formalinfixierung die Struktur der RNA verändert wird (Masuda et al., 1999). In jüngster Zeit stellte sich jedoch immer mehr heraus, dass die RNA-Isolation auch aus formalinfixiertem, in paraffin-eingebettetem Gewebe gute Ergebnisse erzielt (Koopmans et al., 1993; Mies 1994; Godfrey et al., 2000). Beim kolorektalen Karzinom gibt es dazu noch keine ausreichenden Daten. So wurde bislang nur innerhalb von drei Studien der TS-mRNA-Gehalt aus Paraffinblöcken bestimmt (Wong et al., 2001; Shirota et al., 2001; Kornmann et al., 2003). Einen Vergleich zwischen der TS-Proteinexpression und dem TS-mRNA-Gehalt nehmen nur Wong an 10 und Kornmann an 33 Präparaten vor. Sie finden eine gute Übereinstimmung beider Methoden, wobei eine genaue Prozentzahl nicht genannt wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde für die TS-mRNA- und Proteinexpression eine Kongruenz von 50,0% ermittelt. Auch für TP und DPD fand sich nur eine Entsprechungsquote von 63,0% bzw. 60,5%.

Diese Ergebnisse widersprechen der Überlegung, dass die mRNA-Expression mit der Menge an translatiertem Protein einhergeht.

Deshalb müssen noch andere Einflüsse von Bedeutung sein. Die Abweichungen zwischen der mRNA- und Proteinexpression liessen sich vor allem bei TP und DPD gut durch das mitbestimmte Stromagewebe erklären. So war immunhistochemisch insbesondere bei TP eine starke Anfärbung des Bindegewebes darzustellen. Da bei der RNA Isolation der gesamte Paraffinschnitt verwendet wurde, ist für die einzelnen Präparate stets mit einer Verunreinigung durch Bindegewebe auszugehen. Im Gegensatz dazu konnte in der Immunhistochemie spezifisch nur das Tumorgewebe einer Auswertung unterzogen werden.

Warum bei der TS-Expression die Übereinstimmungsrate so gering ist, obwohl hier das Stroma in der Immunhistochemie nur wenig anfärbbar war, bleibt unklar. Möglicherweise ist dies durch das immunhistochemische Färbeprotokoll bedingt. So ergibt sich bei der Durchführung zytoplasmatischer Färbungen immer die Schwierigkeit ein Protokoll zu etablieren, dass eine hohe Sensitivität erreicht, aber dennoch unspezifische Färbungen verhindert. Obwohl der Prozentsatz an angefärbten Tumoren sich durchaus im Rahmen der bisher publizierten Werte bewegte, könnte man annehmen, dass hier die Schwelle zu hoch angesetzt war und eine höhere Antikörperkonzentration möglicherweise eine bessere Übereinstimmungsrate erbracht hätte.

Ziel dieser Studie war es, ein besonderes Augenmerk auf die Praktikabilität zu richten. Deshalb wurde bei der PCR auf eine vorherige Mikrodissektion verzichtet. Unter Mikrodissektion versteht man, dass vor der RNA Isolation nur das Tumorgewebe des Präparates unter dem Mikroskop ausgeschnitten und erst danach der Analyse unterzogen wird, mit dem Ziel nur im Tumor vorhandene RNA zu amplifizieren.

Für TP und DPD fand sich in der Überlebenszeitanalyse zwar der Hinweis, dass diese Marker auch ohne Mikrodissektion eine prognostische Vorhersagekraft

entwickeln können, die Immunhistochemie zeigte sich dort aber sensitiver. Dies ist am wahrscheinlichsten auf den Einfluss des Bindegewebes zurückzuführen. In der kombinierten Betrachtung der untersuchten Enzyme konnte allerdings nur die PCR ein signifikantes Ergebnis liefern, so dass auf die PCR hierbei ein besonderes Augenmerk gelegt werden sollte. Möglicherweise wurde bisher die Bedeutung des Bindegewebes auf die Prognose unterschätzt.

#### **4.9 Ausblick**

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Studie aufgezeigt werden, dass eine RNA Isolation und deren quantitative Analyse aus formalinfixiertem und in paraffin-eingebettetem Tumorgewebe für die untersuchten Enzyme technisch möglich ist. Ebenfalls gelang es, für alle drei Marker eine immunhistochemische Färbung zu etablieren, die eine semiquantitative Aktivitäts-Differenzierung erlaubt und deren Färberaten sich gut in die bisherige Studienlage einfügen. Beide Methoden eröffnen so die Möglichkeit auch archiviertes Material größerer Kollektive auszuwerten. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen auf, dass die Immunhistochemie gegenüber der PCR-Technik praktikabler ist, da sich bei der PCR eine vorherige Mikrodisektion empfehlen würde, um den Einfluss von verunreinigendem Bindegewebe auszuschließen.

Bezüglich der Immunhistochemie konnte nachgewiesen werden, dass die Färbeintensität des Tumors von vorrangiger Bedeutung ist. Somit kann auf eine Bewertung der Zahl gefärbter Tumorzellen mit der Bildung eines Färbeindex bei weiteren Untersuchungen verzichtet werden. Weiterhin ist aufgrund der vorliegenden Ergebnisse eine zusätzliche Analyse der TP-Proteinexpression des Stromagewebes entbehrlich, da sich kein Hinweis auf eine prognostische Vorhersagekraft ergeben hat. Mit dieser Zeitersparnis in der Auswertung dürfte die Immunhistochemie die einfachere, schnellere und kostengünstigere Methode darstellen.

Obwohl es nicht primäres Ziel der vorliegenden Arbeit war, eine auch nur vorläufig abschliessende Einschätzung zur prädiktiven Bedeutung der evaluierten Marker zu geben, ergab sich aber doch der Hinweis, dass alle drei Marker eine prognostische Potenz enthalten. Dabei entsprachen die

gefundenen Tendenzen den theroretischen Überlegungen bezüglich der Prognose: eine hohe TP-Expression und eine niedrige DPD-Expression scheint mit längeren Überlebenszeiten korreliert zu sein. Für die TS-Proteinexpression ergab sich keine Korrelation mit der Prognose, was durch die Bolusapplikation von 5-FU erklärbar ist. Interessant ist die Tendenz, dass eine hohe TS-mRNA-Expression mit einem längeren rezivfreien Überleben assoziiert sein könnte. Dies könnte sowohl am mitbestimmten Bindegewebe als auch am bisher noch nicht genauer untersuchten komplexen Zusammenspiel mit anderen zellulären Mechanismen bei adjuvant chemotherapierten Tumoren liegen.

Außerdem konnte in der vorliegenden Arbeit bei der kombinierten Betrachtung mehrerer Marker ein statistisch signifikant längeres rezidivfreies Überleben bei der Verknüpfung aus hoher TS- und niedriger DPD-mRNA-Expression aufgezeigt werden ( $p= 0,048$ ). Dies deutet darauf hin, dass es einen Vorteil für die prädiktive Einschätzung des klinischen Verlaufs bei der kombinierten Betrachtung von mehreren am 5-FU-Stoffwechsel beteiligten Enzymen geben könnte.

Diese Ergebnisse lassen sowohl eine weitere kombinierte Betrachtung der mittels quantitativer mRNA-Analyse bestimmten Expressionsstärken von TS und DPD als sinnvoll erscheinen, als auch eine immunhistochemische Untersuchung sowohl der TP- als auch der DPD-Expression.

Gerade bei dem hier untersuchten Kollektiv wäre es außerdem interessant auch eine Kombination aus TS und p53 auf die prognostische Vorhersagkraft zu überprüfen, da postuliert wurde, dass gerade bei der Applikation eines Bolus-Regimes der programmierte Zelltod (Apoptose) häufig über einen p53 abhängigen Signalweg verläuft.

Würden die in dieser Arbeit erhobenen Befunde in weiteren Studien bekräftigt werden, so wäre es denkbar, dass in Zukunft für jeden Patienten ein individuelles genetisches Tumorprofil erstellt werden könnte. Durch die Identifikation von „Hochrisikopatienten“ könnte auf eine unnötige zytostatische

Behandlung mit 5-FU bei Patienten im UICC Stadium III verzichtet werden. Mit Hilfe von neueren Medikamenten wie z.B. Irinotecan und Oxaliplatin, deren Zytotoxizität auf einem anderen Wirkungsmechanismus beruht, könnten gezielt die Patienten damit behandelt werden, bei denen eine Resistenz gegen 5-FU anzunehmen wäre. Außerdem könnte es gelingen auch bei Tumorpatienten im UICC Stadium II ein Ansprechen auf eine Therapie mit 5-FU vorherzusagen und so die Subgruppe zu identifizieren, die von einer adjuvanten zytostatischen Therapie profitiert.

## 5. Zusammenfassung

Kolorektale Karzinome stellen die zweithäufigste Karzinom-Entität in Deutschland dar. Während die chirurgische Resektion nach wie vor den Hauptpfeiler der Therapie bildet, gewinnen multimodale Therapiestrategien zunehmend an Bedeutung. So kann durch eine adjuvante zytostatische Behandlung im Stadium III (UICC) eine signifikante Verbesserung des Überlebens erreicht werden. Der Erfolg einer adjuvanten Therapie ist nach heutigem Verständnis von Variablen der Tumorerkrankung, die bis dato noch nicht genauer identifiziert werden können, abhängig. Es ist hierbei anzunehmen, dass die interindividuell unterschiedliche Ausstattung mit für den Stoffwechsel von angewandten Zytostatika entscheidenden Enzymen, für den klinischen Erfolg einer Chemotherapie von Bedeutung ist.

5-Fluorouracil (5-FU) stellt einen unverzichtbaren Bestandteil chemotherapeutischer Strategien beim Kolonkarzinom dar. In den vergangenen Jahren gelang es, etliche am Stoffwechsel von 5-FU beteiligte Enzyme zu identifizieren. Unverändert ist jedoch unklar, ob die quantitative Analyse einzelner oder eine kombinierte Betrachtung mehrerer dieser Enzyme eine Vorhersage des klinischen Erfolges erlaubt und welche Methode hierbei die zuverlässigste Aussage ermöglicht.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle der am 5-FU-Stoffwechsel beteiligten Enzyme Thymidilat-Synthase (TS), Thymidin-Phosphorylase (TP) und Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPD) näher untersucht werden. Nach präklinischen Daten verläuft die Inaktivierung von 5-FU über die DPD, das Enzym TP überführt 5-FU in einen zellschädigenden aktiven Metaboliten, während die TS durch eine Hemmung durch diesen Metaboliten in ihrer Funktion in der DNA Synthese gestört wird.

Grundsätzlich erlauben neue PCR-Technologien eine quantitative Einschätzung der Expressionsstärke von spezifischen Proteinen in Geweben. Die immunhistochemische Färbung kann ebenfalls eine adäquate Einschätzung der

Expressionsstärke liefern und ermöglicht die Korrelation von Expression und morphologischer Lokalisation.

Vor diesem Hintergrund war die Möglichkeit der quantitativen Enzym-Analyse mittels relativer mRNA-Expressionsbestimmung über eine Real-time-PCR aus in paraffin-eingebettetem Tumormaterial für die genannten Enzyme zu klären. Diese Ergebnisse sollten mit einer zu etablierenden semiquantitativen immunhistochemischen Analyse im Sinne einer Äquivalenzprüfung verglichen werden.

Schliesslich sollte ein erster Vergleich der mit den jeweiligen Methoden gefundenen Aktivitäten mit klinischen bzw. histopathologischen Eigenschaften und prognostischem Verlauf, eine Rangliste der in weiteren Untersuchungen zu adressierenden Enzyme und Methoden aufzeigen.

Den Untersuchungen wurde eine Stichprobe von 46 in paraffin-eingebetteten Tumorsektaten aus einem Kollektiv von 204 kurativ operierten und anschließend mit 5-FU adjuvant behandelten Kolonkarzinompatienten im Stadium III (UICC) zugrundegelegt.

Es konnte aufgezeigt werden, dass aus formalinfixiertem und in paraffin-eingebettetem Tumormaterial eine RNA-Isolation und deren quantitative Analyse für die untersuchten Enzyme möglich ist. Ebenfalls konnte für die drei Proteine eine immunhistochemische Färbung etabliert werden, die eine semiquantitative Aktivitäts-Differenzierung erlaubt. Bei der Auswertung stellte sich heraus, dass die Färbeintensität von vorrangiger Bedeutung ist. Auf eine Berücksichtigung der Zahl gefärbter Tumorzellen oder die Bildung eines Färbeindexes kann bei weiteren Untersuchungen verzichtet werden.

Der Methodenvergleich zwischen Immunhistochemie und Real-time-PCR zeigte eine Übereinstimmung der Ergebnisse für die Thymidylat-Synthase, Thymidin-Phosphorylase und Dihydropyrimidin-Dehydrogenase in 50,0 %, 63,0 % und 60,5 % der untersuchten Proben.

Weder für die immunhistochemisch bestimmte Proteinexpression noch für die mRNA-Expression eines der untersuchten Enzyme, fand sich eine signifikante Korrelation mit anderen klinischen oder histopathologischen Parametern.

Im Hinblick auf den klinischen Verlauf ergab sich eine statistisch signifikante Bedeutung bei der kombinierten Betrachtung von TS und DPD. Danach war die Verknüpfung aus hoher TS- und niedriger DPD-mRNA-Expression mit einem längeren rezidivfreien Überleben ( $p=0,048$ ) und tendenziell auch mit einem längeren Gesamtüberleben ( $p=0,076$ ) korreliert. Immunhistochemisch bestand für diese Kombination dagegen kein statistisch signifikanter prognostischer Einfluss ( $p=0,38$ ).

Bei Betrachtung der einzelnen Enzyme zeigte sich auf mRNA-Ebene für Patienten mit hoher TS-Expression eine Tendenz zu einem längeren rezidivfreien Überleben ( $p=0,09$ ). Bei der Überprüfung der Thymidin-Phosphorylase fand sich ein tendenzieller Überlebensvorteil sowohl für eine hohe mRNA- als auch für eine hohe Proteinexpression ( $p=0,27$ ).

Für die Dihydropyrimidin-Dehydrogenase zeigte sich eine Tendenz zwischen einer niedrigen Protein- bzw. mRNA-Expression und einem längeren Gesamtüberleben ( $p=0,09$ ).

Die erarbeiteten Ergebnisse belegen, dass auch im archivierten Tumormaterial von Patienten, deren klinischer Verlauf lange genug dokumentiert ist, um prognostische bzw. prädiktive Aussagen zu erlauben, die quantitative RNA-Bestimmung mittels Real-time-PCR für am 5-FU-Stoffwechsel beteiligte Enzyme möglich ist. Erwartungsgemäss fand sich keinerlei Zusammenhang von Aktivitäten der am 5-FU-Stoffwechsel beteiligten Enzyme mit anderen klinischen oder histopathologischen Tumoreigenschaften. Obwohl es nicht primäres Ziel der vorliegenden Arbeit war, eine auch nur vorläufig abschliessende Einschätzung zur prädiktiven Bedeutung von drei, mittels zweier verschiedener Methoden analysierten, am 5-FU-Stoffwechsel beteiligten Enzymen zu geben, scheinen allerdings die Ergebnisse dieser Arbeit die präklinischen Daten zur Rolle der einzelnen Enzyme zu bestätigen. Weiter zeigt

sich in Übereinstimmung mit präklinischen Überlegungen ein Vorteil für die prädiktive Einschätzung des klinischen Verlaufs bei der kombinierten Betrachtung von mehreren am 5-FU-Stoffwechsel beteiligten Enzymen.

Die hier vorgelegten Daten lassen sowohl eine weitere kombinierte Betrachtung der mittels quantitativer mRNA-Analyse bestimmten Expressionsstärken von TS und DPD als sinnvoll erscheinen, als auch eine immunhistochemische Untersuchung der TP- als auch der DPD-Expression.

## 1. Verzeichnis der Abkürzungen

5-FU	5-Fluorouracil
ABC-Komplex	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex
AMV	avian myeloblastosis virus
APES	3-Aminopropyl-triethoxysilan
Aqua dest.	Aqua destillata
CEA	karzinoembryonales Antigen
CH <sub>2</sub> THF	5,10-Methylen-tetrahydrofolat
CIN	Chromosomeninstabilität
Cp	crossing point
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid
DCC	deleted in colorectal cancer
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Trinukleotid
DPD	Dihydropyrimidin-Dehydrogenase
EC	Enzym Commission
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay
F-β-Ala	5-Fluoro-β-Alanin
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
FdUMP	5'-Fluoro-2'-desoxyuridin-5'-monophosphat
FdUTP	5'-Fluoro-2'-desoxyuridin-5'-triphosphat
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
FUDP	5'-Fluorouridin-5'-diphosphat
FudR	5-Fluoro-2'-desoxyuridin
FUH <sub>2</sub>	Dihydrofluorouracil
FUMP	5'-Fluorouridin-5'-monophosphat
FUR	5-Fluorouridin
FUTP	Fluorouridin 5'-triphosphat
G	histologischer Differenzierungsgrad
G6PDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
H <sub>2</sub> O	Wasser

---

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HNPCC	hereditäres nicht-polypöses Kolonkarzinom
Da	Dalton
LEV	Levamisol
LV	Leucovorin
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MIN	Mikrosatelliteninstabilität
Mo	Monate
mRNA	messenger RNA
n	Anzahl der Messwerte
NCDB	National Cancer Data Base
NR	Normalized Ratio
OPRT	Orotat-Phosphorybosyl-Transferase
p	Wahrscheinlichkeit
PBS	phosphat buffered saline
PD-ECGF	platelet-derived endothelial cell growth factor
PRPP	5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat
Rib-1-P	Ribose-1-phosphat
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkription Polymerasekettenreaktion
S-Phase	Synthesephase des Zellzyklus
TNM	Tumorinfiltrationstiefe-Lymphknotenbefall-Metastasierung
TP	Thymidin-Phosphorylase
TS	Thymidylat Synthase
UICC	Union International Contre Le Cancer
UP	Uridin-Phosphorylase
WHO	World Health Organization

## 2. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

### 2.1 Abbildungen

Abbildung 1: Mehrschritt-Karzinogenese („Adenom-Karzinom-Sequenz“) des kolorektalen Karzinoms _____	3
Abbildung 2: Metabolismus von 5-FU. _____	12
Abbildung 3: indirekte Avidin-Biotin-Methode _____	23
Abbildung 4: Das LightCycler Instrument _____	31
Abbildung 5: Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) _____	33
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Phasen der PCR-Produkt-Anhäufung _____	34
Abbildung 7: Immunhistochemische Färbung TS (40-fache Vergrößerung). _	41
Abbildung 8: Verteilung der TS-Proteinexpression _____	41
Abbildung 9: Immunhistochemische Färbung TP (40-fache Vergrößerung). _	42
Abbildung 10: TP-Proteinexpression in Tumor und Stroma (n=46) _____	43
Abbildung 11: Immunhistochemische Färbung DPD (40-fache Vergrößerung).43	
Abbildung 12: DPD-Proteinexpression im Tumor (n=43) _____	44
Abbildung 13: Kurvenverlauf eines LightCycler Durchgangs _____	49
Abbildung 14: Verteilung der Messwerte der relativen TS-mRNA-Expression	50
Abbildung 15: Verteilung der Messwerte der relativen TP-mRNA-Expression	51
Abbildung 16: Verteilung der Messwerte der rel. DPD-mRNA-Expression____	51
Abbildung 17: Verhältnis der relativen mRNA-Expression zur TS-Färbeintensität. _____	55
Abbildung 18: Verhältnis der relativen mRNA-Expression zur TP-Färbeintensität. _____	56
Abbildung 19: Verhältnis der relativen mRNA-Expression zur DPD-Färbeintensität. _____	57
Abbildung 20: Tumorspezifisches Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der TS-Proteinexpression. _____	61
Abbildung 21: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von der TS-Proteinexpression. _____	62

Abbildung 22: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom TS-mRNA-Gehalt.	63
Abbildung 23: Tumorspezifisches Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der TP-Proteinexpression.	65
Abbildung 24: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von der TP-Proteinexpression	67
Abbildung 25: Tumorspezifisches Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der DPD-Proteinexpression.	69
Abbildung 26: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von der DPD-Proteinexpression.	70
Abbildung 27: Tumorspezifisches Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom TS- und DPD- mRNA-Gehalt	73
Abbildung 28: krankheitsfreies Überleben in Abhängigkeit vom TS- und DPD-mRNA-Gehalt.	74

## 2.2 Tabellen

Tabelle 1: TNM Klassifikation, Klassifikation nach DUKES und UICC Stadien (2002)	4
Tabelle 2: TNM Klassifikation, Klassifikation nach DUKES und UICC Stadien (1992)	5
Tabelle 3: Entwicklung der Studienlage zur adjuvanten Therapie in den 90er Jahren	7
Tabelle 4: 5-Jahresüberlebensraten in Abhängigkeit des TNM Stadiums	9
Tabelle 5: Charakteristika des Patientenkollektivs und der Stichprobe	21
Tabelle 6: Schritte zur farblichen Darstellung des Primärantikörpers	26
Tabelle 7: Übersicht über mikroskopische Auswertung von TS, TP und DPD	29
Tabelle 8: Ansatz des Master Mix	36
Tabelle 9: Ansatz des Master Mix	37
Tabelle 10: Übersicht über die auswertbaren Fallzahlen	40
Tabelle 11: Korrelation zwischen klinischen Parametern und TS-Proteinexpression	45

---

Tabelle 12: Korrelation der TP-Proteinexpression in Tumor und Stroma mit klinischen Parametern _____	46
Tabelle 13: Korrelation der DPD-Proteinexpression mit klin. Parametern ____	47
Tabelle 14: mRNA-Expression von TS, TP und DPD in Abhängigkeit von klinischen Parametern. _____	53
Tabelle 15: Ergebnisse der univariaten Überlebensanalyse klinischer und histopathologischer Variablen _____	59
Tabelle 16: Ergebnisse der univariaten Analyse der rezidivfreien Zeit klinischer und histopathologischer Variablen _____	60

## 3. Anhang

### 3.1 Materialien Immunhistochemie

#### 3.1.1 Herstellung der Medien und Pufferlösungen

Citratpuffer	2,1 g Zitronensäure ad 1000 ml Aqua dest. pH 6
PBS (Phospat-gepufferte Kochsalzlösung)	2 g NaCl 0,2g KCl 1,16g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,2g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Ad 1000 ml Aqua dest. pH 7,4
Neutral gepuffertes Formalin	4,55 g Natriumdihydrogenphoshat 8,14 g Dinatriumhydrogenphosphat 111 ml Formaldehyd 37% Ad 1l Aqua dest.

#### 3.1.2 Verbrauchsgegenstände

Polystren Reagenzglas	12 x 75 mm, Falcon	Becton Dickinson Labware, New Jersey, USA
Deckgläser		Langenbrinck, Emmendingen
Einbettkassetten		Roth, Karlsruhe
Objektträger		Langenbrinck, Emmendingen
Pipettenspitzen	10µl, 100µl, 1000 µl	Roth, Karlsruhe
Eppendorfgefäß	1,7 ml	Eppendorf, Hamburg

#### 3.1.3 Chemikalien

Streptavidin/Meerrettich- peroxydase		Dako GmbH, Hamburg
Biotin-markierter rabbit		Dako GmbH, Hamburg

anti mouse Antikörper		
DAB (Diaminobenzidin)- Lösung		Dako GmbH, Hamburg
Methanol		Merck, Darmstadt
Glyceringelatine		Sigma Diagnostics, Taufkirchen
Avidin-Biotin		Sigma Diagnostics, Taufkirchen
Mayers-Hamalaunlösung		Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid		Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat		Merck, Darmstadt
Paraffin		Vogel, Gießen
Ziegenserum Albumin	100%	Vector, Burlingame, USA
Salzsäure	100%	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid	30%	Fluka, Buchs, Schweiz
Xylol		Merck, Darmstadt
Zitronensäure		Merck, Darmstadt
APES (3-Aminopropyl- triethoxysilane)	98%	Merck, Darmstadt

### 3.1.4 Antikörper

Anti-TS	Mouse monoclonal TS 106 [1mg/mL]	Chemicon International, Temecula, USA
Anti-TP	Mouse monoclonal 1C6-203	Roche Diagnostics, Mannheim
Anti-DPD	Rat monoclonal 2H9-1b	Roche Diagnostics, Mannheim

### 3.1.5 Geräte

Software	SPSS	SPSS Inc. Chicago, USA
Digital pH Meter	761 Calimatic	Knick GmbH & Co., Berlin
Heizplatte		Leica, Dessau

RET-Magnetrührer	IKAMAG	Janke & Kunkel Labortechnik, Staufen
Schüttler	IKA	Janke & Kunkel Labortechnik, Staufen
Mikroskop		Zeiss, Frankfurt
Mikrowelle	Delux M 710	Miele, Erfurt
Pipetten		Eppendorf, Hamburg
Rotationsmikrotom	RM 2145	Leica, Dessau
Waage	AE 240	Mettler, Greifensee, Schweiz

## 3.2 Materialien Real-time-PCR

### 3.2.1 Geräte

Software	LightCycler Software Version 3.5	Roche Diagnostics, Mannheim
PCR Systeme	LightCycler Instrument LightCycler Carousel Centrifuge	Roche Diagnostics, Mannheim
Kühlzentrifuge	5417 R	Eppendorf, Hamburg
Wasserbad		Memmert, Leonberg
Hybridisierungsöfen		Amersham, Freiburg
Vortex	Reax 2000	Heidolph Instruments
Heizblock	95 °C	Boekel, Emersacker
Pipetten	Research 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg

### 3.2.2 Verbrauchsgegenstände

LightCycler Capillaries	20 µl	Roche Diagnostics, Mannheim
Sterilfilterpipettenspitzen	10 µl, 100 µl, 1000 µl	Biozym Diagnostik, Hessisch Oldendorf
Reaktionsgefäße	0,5 ml 1,5 ml, 2ml Tubes 0,2 ml	Eppendorf, Hamburg Peqlab, Erlangen

### 3.2.3 Kits

RNA Extraktion	High Pure RNA Paraffin Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
PCR	LightCycler-TS mRNA Quantification Kit <sup>PLUS</sup>	Roche Diagnostics, Mannheim
	LightCycler-TP mRNA Quantification Kit <sup>PLUS</sup>	Roche Diagnostics, Mannheim
	LightCycler-DPD mRNA Quantification Kit <sup>PLUS</sup>	Roche Diagnostics, Mannheim

## 4. Literaturverzeichnis

Allegra, C.J., Paik, S., Colangelo, L.H., Parr, A.L., Kirsch, I., Kim, G., Klein, P., Johnston, P.G., Wolmark, N., Wieand, H.S. (2003)

Prognostic value of thymidylate synthase, Ki-67, and p53 in patients with Dukes' B and C colon cancer: a National Cancer Institute-National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project collaborative study  
J Clin Oncol, 21, 241-250

Allegra, C.J., Parr, A.L., Wold, L.E., Mahoney, M.R., Sargent, D.J., Johnston, P., Klein, P., Behan, K., O'Connell, M.J., Levitt, R., Kugler, J.W., Tria Tirona, M., Goldberg, R.M. (2002)

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, 1735-1743

Andre, T., Boni, C., Mounedji-Boudiaf, L., Navarro, M., Tabernero, J., Hickish, T., Topham, C., Zaninelli, M., Clingan, P., Bridgewater, J., Tabah-Fisch, I., de Gramont, A.; Multicenter International Study of Oxaliplatin/5-Fluorouracil/Leucovorin in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer (MOSAIC) Investigators (2004)

Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer  
N Engl J Med, 350, 2343-2351

Aoki, T., Katsumata, K., Tsuchida, A., Tomioka, H., Koyanagi, Y. (2002)

Correlation between malignancy grade and p53 gene in relation to thymidine phosphorylase activity in colorectal cancer patients  
Oncol Rep, 9, 1267-1271

Arkenau, H.T., Bermann, A., Rettig, K., Strohmeyer, G., Porschen, R.; Arbeitsgemeinschaft Gastrointestinale Onkologie (2003)

5-Fluorouracil plus leucovorin is an effective adjuvant chemotherapy in curatively resected stage III colon cancer: long-term follow-up results of the adjCCA-01 trial  
Ann Oncol, 14, 395-399

Aschele, C., Debernardis, D., Casazza, S., Antonelli, G., Tunesi, G., Baldo, C., Lionetto, R., Maley, F., Sobrero, A. (1999)

Immunohistochemical quantitation of thymidylate synthase expression in colorectal cancer metastases predicts for clinical outcome to fluorouracil-based chemotherapy  
J Clin Oncol, 17, 1760-1770

Aschele, C., Debernardis, D., Tunesi, G., Maley, F., Sobrero, A. (2000)  
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, 4797-4802

Aschele, C., Sobrero, A., Faderan, M.A., Bertino, J.R. (1992)  
Novel mechanism(s) of resistance to 5-fluorouracil in human colon cancer (HCT-8) sublines following exposure to two different clinically relevant dose schedules  
*Cancer Res*, 52, 1855-1864

Berger, S.H., Jenh, C.H., Johnson, L.F., Berger, F.G. (1985)  
Thymidylate synthase overproduction and gene amplification in fluorodeoxyuridine-resistant human cells  
*Mol Pharmacol*, 28, 461-467

Breslow, N. (1970)  
A generalized Kruskal-Wallis test for comparing k samples subject to unequal patterns of censorship  
*Biometrika*, 57, 579-594

Bussolati, G., Gugliotta, P., Volante, M., Pace, M., Papotti, M. (1997)  
Retrieved endogenous biotin: a novel marker and a potential pitfall in diagnostic immunohistochemistry  
*Histopathology*, 31, 400-407

Cascinu, S., Aschele, C., Barni, S., Debernardis, D., Baldo, C., Tunesi, G., Catalano, V., Staccioli, M.P., Brenna, A., Mureto, P., Catalano, G. (1999)  
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, 1996-1999

Cascinu, S., Graziano, F., Valentini, M., Catalano, V., Giordani, P., Stacciali, M.P., Rossi, C., Balzelli, A.M., Grianti, C., Mureto, P., Catalano, G. (2001)  
Vascular endothelial growth factor expression, S-phase fraction and thymidylate synthase quantitation in node-positive colon cancer: relationships with tumor recurrence and resistance to adjuvant chemotherapy  
*Ann Oncol*, 12, 239-244

Chu, E., Takechi, T., Jones, K.L., Voeller, D.M., Copur, S.M., Maley, G.F., Maley, F., Segal, S., Allegra, C.J. (1995)  
Thymidylate synthase binds to c-myc RNA in human colon cancer cells and in vitro  
*Mol Cell Biol*, 15, 179-185

- Conrad, A.H., Ruddle, F.H. (1972)  
Regulation of thymidylate synthetase activity in cultured mammalian cells  
*J Cell Sci*, 10, 471-486
- Cox, D.R. (1972)  
Regression models and life-tables  
*J Roy Statist Soc*, 34, Series B: 187-220
- Cunningham, D., Pyrhonen, S., James, R.D., Punt, C.J., Hickish, T.F., Heikkila, R., Johannesen, T.B., Starkhammar, H., Topham, C.A., Awad, L., Jacques, C., Herait, P. (1998)  
Randomised trial of irinotecan plus supportive care versus supportive care alone after fluorouracil failure for patients with metastatic colorectal cancer  
*Lancet*, 352, 1413-1418
- Danenberg, P.V., Lockshin, A. (1982)  
Thymidylate synthetase – substrate complex formation  
*Mol Cell Biochem*, 43, 49-57
- de Gramont, A., Figer, A., Seymour, M., Homerin, M., Hmissi, A., Cassidy, J., Boni, C., Cortes-Funes, H., Cervantes, A., Freyer, G., Papamichael, D., Le Bail, N., Louvet, C., Hendler, D., de Braud, F., Wilson, C., Morvan, F., Bonetti, A. (2000)  
Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer  
*J Clin Oncol*, 18, 2938-2947
- Douillard, J.Y., Cunningham, D., Roth, A.D., Navarro, M., James, R.D., Karasek, P., Jandik, P., Iveson, T., Carmichael, J., Alakl, M., Gruia, G., Awad, L., Rougier, P. (2000)  
Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial  
*Lancet*, 355, 1041-1047
- Edler, D., Glimelius, B., Hallstrom, M., Jakobsen, A., Johnston, P.G., Magnusson, I., Ragnhammar, P., Blomgren, H. (2002)  
Thymidylate synthase expression in colorectal cancer: a prognostic and predictive marker of benefit from adjuvant fluorouracil-based chemotherapy  
*J Clin Oncol*, 20, 1721-1728
- Edler, D., Kressner, U., Ragnhammar, P., Johnston, P.G., Magnusson, I., Glimelius, B., Pahlman, L., Lindmark, G., Blomgren, H. (2000)  
Immunohistochemically detected thymidylate synthase in colorectal cancer: an independent prognostic factor of survival  
*Clin Cancer Res*, 6, 488-492

Etienne, M.C., Chazal, M., Laurent-Puig, P., Magne, N., Rosty, C., Formento, J.L., Francoual, M., Formento, P., Renee, N., Chamorey, E., Bourgeon, A., Seitz, J.F., Delpero, J.R., Letoublon, C., Pezet, D., Milano, G. (2002)  
Prognostic value of tumoral thymidylate synthase and p53 in metastatic colorectal cancer patients receiving fluorouracil-based chemotherapy: phenotypic and genotypic analyses  
*J Clin Oncol*, 20, 2832-2843

Evrard, A., Cuq, P., Ciccolini, J., Vian, L., Cano, J.P. (1999)  
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, 1726-1733

Farrugia, D.C., Ford, H.E., Cunningham, D., Danenberg, K.D., Danenberg, P.V., Brabender, J., McVicar, A.D., Aherne, G.W., Hardcastle, A., McCarthy, K., Jackman, A.L. (2003)  
Thymidylate synthase expression in advanced colorectal cancer predicts for response to raltitrexed  
*Clin Cancer Res*, 9, 792-801

Findlay, M.P., Cunningham, D., Morgan, G., Clinton, S., Hardcastle, A., Aherne, G.W. (1997)  
Lack of correlation between thymidylate synthase levels in primary colorectal tumours and subsequent response to chemotherapy.  
*Br J Cancer*, 75, 903-909

Folkman, J., Klagsbrun, M. (1987)  
Angiogenic factors, 235, 442-447

Francini, G., Petrioli, R., Lorenzini, L., Mancini, S., Armenio, S., Tanzini, G., Marsili, S., Equino, A., Marzocco, G., Civitelli, S. et al. (1994)  
Folinic acid and 5-fluorouracil as adjuvant chemotherapy in colon cancer  
*Gastroenterology*, 106, 899-906

Furukawa, T., Yoshimura, A., Sumizawa, T., Haraguchi, M., Akiyama, S., Fukui, K., Ishizawa, M., Yamada, Y. (1992)  
Angiogenic factor, 356, 668

Giacchetti, S., Itzhaki, M., Gruia, G., Adam, R., Zidani, R., Kunstlinger, F., Brienza, S., Alafaci, E., Bertheault-Cvitkovic, F., Jasmin, C., Reynes, M., Bismuth, H., Misset, J.L., Levi, F. (1999)  
Long-term survival of patients with unresectable colorectal cancer liver metastases following infusional chemotherapy with 5-fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin and surgery  
*Ann Oncol*, 10, 663-669

Gill, S., Loprinzi, C.L., Sargent, D.J., Thome, S.D., Alberts, S.R., Haller, D.G., Benedetti, J., Francini, G., Shepherd, L.E., Francois, Seitz, J., Labianca, R., Chen, W., Cha, S.S., Heldebrant, M.P., Goldberg, R.M. (2004)

Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for stage II and III colon cancer: who benefits and by how much?

J Clin Oncol, 22, 1797-1806

Giorno, R. (1984)

A comparison of two immunoperoxidase staining methods based on the avidin-biotin interaction

Diagn Immunol, 2, 161-166

Godfrey, T.E., Kim, S.H., Chavira, M., Ruff, D.W., Warren, R.S., Gray, J.W., Jensen, R.H. (2000)

Quantitative mRNA expression analysis from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using 5' nuclease quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction

J Mol Diagn, 2, 84-91

Goldberg, R.M., Sargent, D.J., Morton, R.F., Fuchs, C.S., Ramanathan, R.K., Williamson, S.K., Findlay, B.P., Pitot, H.C., Alberts, S.R. (2004)

A randomized controlled trial of fluorouracil plus leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin combinations in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer

J Clin Oncol, 22, 23-30

Greene, F.L., Stewart, A.K., Norton, H.J. (2002)

A new TNM staging strategy for node-positive (stage III) colon cancer: an analysis of 50,042 patients

Ann Surg, 236, 416-421

Haraguchi, M., Miyadera, K., Uemura, K., Sumizawa, T., Furukawa, T., Yamada, K., Akiyama, S., Yamada, Y. (1994)

Angiogenic activity of enzymes

Nature, 368, 198

Heggie, G.D., Sommadossi, J.P., Cross, D.S., Huster, W.J., Diasio, R.B. (1987)

Clinical pharmacokinetics of 5-fluorouracil and its metabolites in plasma, urine, and bile

Cancer Res, 47, 2203-2206

Hermanek, P., Scheibe, O., Spiessl, B., Wagner, G.

TNM Klassifikation maligner Tumoren, 4. Auflage, 2. Revision

Springer, Berlin, Heidelberg, 1992

- Hermanek, P. (1995)  
pTNM and residual tumor classifications: problems of assessment and prognostic significance  
*World J Surg*, 19, 184-190
- Hermanek, P.  
Kurzgefasste Interdisziplinäre Leitlinien 2000. Diagnose und Therapie maligner Erkrankungen  
Zuckscherdt-Verlag, München, 2000
- Ichikawa, W., Uetake, H., Shirota, Y., Yamada, H., Takahashi, T., Nihei, Z., Sugihara, K., Sasaki, Y., Hirayama, R. (2003)  
Both gene expression for orotate phosphoribosyltransferase and its ratio to dihydropyrimidine dehydrogenase influence outcome following fluoropyrimidine-based chemotherapy for metastatic colorectal cancer  
*Br J Cancer*, 89, 1486-1492
- Ikeguchi, M., Makino, M., Kaibara, N. (2002)  
Thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase activity in colorectal carcinoma and patients prognosis  
*Langenbecks Arch Surg*, 387,240-245
- International Multicentre Pooled Analysis of Colon Cancer Trials (IMPACT) investigators. (1995)  
Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in colon cancer  
*Lancet*, 345, 939-944
- Ishikawa, F., Miyazono, K., Hellman, U., Drexler, H., Wernstedt, C., Hagiwara, K., Usuki, K., Takaku, F., Risau, W., Heldin, C.H. (1989)  
Identification of angiogenic activity and the cloning and expression of platelet-derived endothelial cell growth factor  
*Nature*, 338, 557-562
- Jemal, A., Murray, T., Ward, E., Samuels, A., Tiwari, R.C., Ghafoor, A., Feuer, E.J., Thun, M.J. (2005)  
Cancer statistics, 2005  
*CA Cancer J Clin*, 55, 10-30
- Johnston, P.G., Drake, J.C., Trepel, J., Allegra, C.J. (1992)  
Immunological quantitation of thymidylate synthase using the monoclonal antibody TS 106 in 5-fluorouracil-sensitive and -resistant human cancer cell lines  
*Cancer Res*, 52, 4306-4312

Johnston, P.G., Lenz, H.J., Leichman, C.G., Danenberg, K.D., Allegra, C.J., Danenberg, P.V., Leichman, L. (1995)

Thymidylate synthase gene and protein expression correlate and are associated with response to 5-fluorouracil in human colorectal and gastric tumors

Cancer Res, 55, 1407-1412

Johnston, P.G., Liang, C.M., Henry, S., Chabner, B.A., Allegra, C.J. (1991)

Production and characterization of monoclonal antibodies that localize human thymidylate synthase in the cytoplasm of human cells and tissue

Cancer Res, 51, 6668-6676

Kaplan, E.L., Meier, P. (1958)

Nonparametric estimation from incomplete observations

J Am Stat Assoc, 53, 457-481

Kato, Y., Matsukawa, S., Muraoka, R., Tanigawa, N. (1997)

Enhancement of drug sensitivity and a bystander effect in PC-9 cells transfected with a platelet-derived endothelial cell growth factor thymidine phosphorylase cDNA

Br J Cancer, 75, 506-511

Kellogg, D.E., Rybalkin, I., Chen, S., Mukhamedova, N., Vlasik, T., Siebert, P.D., Chenchik, A. (1994)

TaqStart Antibody: "hot start" PCR facilitated by a neutralizing monoclonal antibody directed against Taq DNA polymerase

Biotechniques, 16, 1134-1137

Kono, T., Nishida, M., Inagaki, N., Tanaka, Y., Yoneda, M., Kasai, S. (2001)

Development and characterization of 1C6-203, a new monoclonal antibody specific to human thymidine phosphorylase

J Histochem Cytochem, 49, 131-138

Koopmans, M., Monroe, S.S., Coffield, L.M., Zaki, S.R. (1993)

Optimization of extraction and PCR amplification of RNA extracts from paraffin-embedded tissue in different fixatives

J Virol Methods, 43, 189-204

Kornmann, M., Link, K.H., Lenz, H.J., Pillasch, J., Metzger, R., Butzer, U.,

Leder, G.H., Weindel, M., Safi, F., Danenberg, K.D., Beger, H.G., Danenberg, P.V. (1997)

Thymidylate synthase is a predictor for response and resistance in hepatic artery infusion chemotherapy

Cancer Lett, 118, 29-35

Kornmann, M., Schwabe, W., Sander, S., Kron, M., Strater, J., Polat, S., Kettner, E., Weiser, H.F., Baumann, W., Schramm, H., Hausler, P., Ott, K., Behnke, D., Staib, L., Beger, H.G., Link, K.H. (2003)  
Thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase mRNA expression levels: predictors for survival in colorectal cancer patients receiving adjuvant 5-fluorouracil  
*Clin Cancer Res*, 9, 4116-4124

Kralovanszky, J., Koves, I., Orosz, Z., Katona, C., Toth, K., Rahoty, P., Czegledi, F., Kovacs, T., Budai, B., Hullan, L., Jeney, A. (2002)  
Prognostic significance of the thymidylate biosynthetic enzymes in human colorectal tumors,  
*Oncology*, 62, 167-174

Kullmann, F. (2003)  
Karzinogenese und hereditäre Kolonkarzinome  
*Internist (Berl)*, 44, 254-255, 258-267

Le Voyer, T.E., Sigurdson, E.R., Hanlon, A.L., Mayer, R.J., Macdonald, J.S., Catalano, P.J., Haller, D.G. (2003)  
Colon cancer survival is associated with increasing number of lymph nodes analyzed: a secondary survey of intergroup trial INT-0089  
*J Clin Oncol*, 21, 2912-2919

Leichman, C.G., Lenz, H.J., Leichman, L., Danenberg, K., Baranda, J., Groshen, S., Boswell, W., Metzger, R., Tan, M., Danenberg, P.V. (1997)  
Quantitation of intratumoral thymidylate synthase expression predicts for disseminated colorectal cancer response and resistance to protracted-infusion fluorouracil and weekly leucovorin  
*J Clin Oncol*, 15, 3223-3229

Lenz, H.J., Hayashi, K., Salonga, D., Danenberg, K.D., Danenberg, P.V., Metzger, R., Banerjee, D., Bertino, J.R., Groshen, S., Leichman, L.P., Leichman, C.G. (1998)  
p53 point mutations and thymidylate synthase messenger RNA levels in disseminated colorectal cancer: an analysis of response and survival  
*Clin Cancer Res*, 4, 1243-1250

Liotta, L.A., Kleinerman, J., Saidel, G.M. (1974)  
Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation  
*Cancer Res*, 34, 997-1004

Longley, D.B., Allen, W.L., McDermott, U., Wilson, T.R., Latif, T., Boyer, J., Lynch, M., Johnston, P.G. (2004)  
The roles of thymidylate synthase and p53 in regulating Fas-mediated apoptosis in response to antimetabolites  
*Clin Cancer Res*, 10, 3562-3571

- Longley, D.B., Boyer, J., Allen, W.L., Latif, T., Ferguson, P.R., Maxwell, P.J., McDermott, U., Lynch, M., Harkin, D.P., Johnston, P.G. (2002)  
The role of thymidylate synthase induction in modulating p53-regulated gene expression in response to 5-fluorouracil and antifolates  
*Cancer Res*, 62, 2644-2649
- Lu, Z., Zhang, R., Diasio, R.B. (1995)  
Population characteristics of hepatic dihydropyrimidine dehydrogenase activity, a key metabolic enzyme in 5-fluorouracil chemotherapy  
*Clin Pharmacol Ther*, 58, 512-522
- Macdonald, J.S. (1999)  
Adjuvant therapy of colon cancer  
*CA Cancer J Clin*, 49, 202-219
- Masuda, N., Ohnishi, T., Kawamoto, S., Monden, M., Okubo, K. (1999)  
Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples  
*Nucleic Acids Res*, 27, 4436-4443
- Matsuura, T., Kuratate, I., Teramachi, K., Osaki, M., Fukuda, Y., Ito, H. (1999)  
Thymidine phosphorylase expression is associated with both increase of intratumoral microvessels and decrease of apoptosis in human colorectal carcinomas  
*Cancer Res*, 59, 5037-5040
- Merkel, S., Mansmann, U., Papadopoulos, T., Wittekind, C., Hohenberger, W., Hermanek, P. (2001)  
The prognostic inhomogeneity of colorectal carcinomas stage III  
*Cancer*, 92, 2754-2759
- Midgley, R., Kerr, D. (1999)  
Colorectal cancer  
*Lancet*, 353, 391-399
- Mies, C. (1999)  
A simple, rapid method for isolating RNA from paraffin-embedded tissues for reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)  
*J Histochem Cytochem*, 42, 811-813
- Milano, G., Etienne, M.C., Pierrefite, V., Barberi-Heyob, M., Deporte-Fety, R., Renee, N. (1999)  
Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and fluorouracil-related toxicity  
*Br J Cancer*, 79, 627-630

- Miyazono, K., Okabe, T., Urabe, A., Takaku, F., Heldin, C.H. (1987)  
Purification and properties of an endothelial cell growth factor from human platelets  
*J Biol Chem*, 262, 4098-4103
- Moertel, C.G., Fleming, T.R., Macdonald, J.S., Haller, D.G., Laurie, J.A., Goodman, P.J., Ungerleider, J.S., Emerson, W.A., Tormey, D.C., Glick, J.H. et al. (1990)  
Levamisole and fluorouracil for adjuvant therapy of resected colon carcinoma  
*N Engl J Med*, 322, 352-358
- Moghaddam, A., Bicknell, R. (1992)  
Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor in *Escherichia coli* and confirmation of its thymidine phosphorylase activity  
*Biochemistry*, 31, 12141-12146
- Morrison, G.B., Bastian, A., Dela Rosa, T., Diasio, R.B., Takimoto, C.H. (1997)  
Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency: a pharmacogenetic defect causing severe adverse reactions to 5-fluorouracil-based chemotherapy  
*Oncol Nurs Forum*, 24, 83-88
- Nanni, O., Volpi, A., Frassinetti, G.L., De Paola, F., Granato, A.M., Dubini, A., Zoli, W., Scarpi, E., Turci, D., Oliverio, G., Gambi, A., Amadori, D. (2002)  
Role of biological markers in the clinical outcome of colon cancer  
*Br J Cancer*, 87, 868-875
- Nishimura, G., Terada, I., Kobayashi, T., Ninomiya, I., Kitagawa, H., Fushida, S., Fujimura, T., Kayahara, M., Shimizu, K., Ohta, T., Miwa, K. (2002)  
Thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase levels in primary colorectal cancer show a relationship to clinical effects of 5'-deoxy-5-fluorouridine as adjuvant chemotherapy  
*Oncol Rep*, 9, 479-482
- O'Connell, M.J., Mailliard, J.A., Kahn, M.J., Macdonald, J.S., Haller, D.G., Mayer, R.J., Wieand, H.S. (1997)  
Controlled trial of fluorouracil and low-dose leucovorin given for 6 months as postoperative adjuvant therapy for colon cancer  
*J Clin Oncol*, 15, 246-250
- O'Connell, M.J., Laurie, J.A., Kahn, M., Fitzgibbons, R.J.Jr., Erlichman, C., Shepherd, L., Moertel, C.G., Kocha, W.I., Pazdur, R., Wieand, H.S., Rubin, J., Vukov, A.M., Donohue, J.H., Krook, J.E., Figueredo, A. (1998)  
Prospectively randomized trial of postoperative adjuvant chemotherapy in patients with high-risk colon cancer  
*J Clin Oncol*, 16, 295-300

- Oi, K., Makino, M., Ozaki, M., Takemoto, H., Yamane, N., Nakamura, S., Ikeguchi, M., Kaibara, N. (2004)  
Immunohistochemical dihydropyrimidine dehydrogenase expression is a good prognostic indicator for patients with Dukes' C colorectal cancer  
*Anticancer Res*, 24, 273-279
- Paradiso, A., Simone, G., Petroni, S., Leone, B., Vallejo, C., Lacava, J., Romero, A., Machiavelli, M., De Lena, M., Allegra, C.J., Johnston, P.G. (2000)  
Thymidilate synthase and p53 primary tumour expression as predictive factors for advanced colorectal cancer patients  
*Br J Cancer*, 82, 560-567
- Peters, G.J., Laurensse, E., Leyva, A., Pinedo, H.M. (1987)  
Purine nucleosides as cell-specific modulators of 5-fluorouracil metabolism and cytotoxicity  
*Eur J Cancer Clin Oncol*, 23, 1869-1881
- Peto R., Pike, M.C. (1973)  
Conservatism of the approximation sigma (O-E)2-E in the logrank test for survival data or tumor incidence data  
*Biometrics*, 29, 579-584
- Pinedo, H.M., Peters, G.F. (1988)  
Fluorouracil: biochemistry and pharmacology  
*J Clin Oncol*, 6, 1653-1664
- Porschen, R., Bermann, A., Loffler, T., Haack, G., Rettig, K., Anger, Y., Strohmeyer, G.; Arbeitsgemeinschaft Gastrointestinale Onkologie (2001)  
Fluorouracil plus leucovorin as effective adjuvant chemotherapy in curatively resected stage III colon cancer: results of the trial adjCCA-01  
*J Clin Oncol*, 19, 1787-1794
- Pritchard, D.M., Watson, A.J., Potten, C.S., Jackman, A.L., Hickman, J.A. (1997)  
Inhibition by uridine but not thymidine of p53-dependent intestinal apoptosis initiated by 5-fluorouracil: evidence for the involvement of RNA perturbation  
*Proc Natl Acad Sci U S A.*, 94, 1795-1799
- Ragnhammar, P., Hafstrom, L., Nygren, P., Glimelius, B.; SBU-group Swedish Council of Technology Assessment in Health Care (2001)  
A systematic overview of chemotherapy effects in colorectal cancer  
*Acta Oncol*, 40, 282-308

Riethmüller, G., Holz, E., Schlimok, G., Schmiegel, W., Raab, R., Hoffken, K., Gruber, R., Funke, I., Pichlmaier, H., Hirche, H., Buggisch, P., Witte, J., Pichlmayr, R. (1998)

Monoclonal antibody therapy for resected Dukes' C colorectal cancer: seven-year outcome of a multicenter randomized trial  
J Clin Oncol, 16, 1788-1794

Robert-Koch Institut, 2000  
<http://www.rki.de>

Rougier, P., Van Cutsem, E., Bajetta, E., Niederle, N., Possinger, K., Labianca, R., Navarro, M., Morant, R., Bleiberg, H., Wils, J., Awad, L., Herait, P., Jacques, C. (1998)

Randomised trial of irinotecan versus fluorouracil by continuous infusion after fluorouracil failure in patients with metastatic colorectal cancer  
Lancet, 352, 1407-1412

Saito, S., Tsuno, N., Nagawa, H., Sunami, E., Zhengxi, J., Osada, T., Kitayama, J., Shibata, Y., Tsuruo, T., Muto, T. (2000)

Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor correlates with good prognosis in patients with colorectal carcinoma  
Cancer, 88, 42-49

Sakamoto, J., Hamashima, H., Suzuki, H., Ito, K., Mai, M., Saji, S., Fukushima, M., Matsushita, Y., Nakazato, H. (2003)

Thymidylate synthase expression as a predictor of the prognosis of curatively resected colon carcinoma in patients registered in an adjuvant immunochemotherapy clinical trial  
Oncol Rep, 10, 1081-1090

Salonga, D., Danenberg, K.D., Johnson, M., Metzger, R., Groshen, S., Tsao-Wei, D.D., Lenz, H.J., Leichman, C.G., Leichman, L., Diasio, R.B., Danenberg, P.V.

Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphorylase  
Clin Cancer Res, 6, 1322-1327

Schwartz, E.L., Baptiste, N., Wadler, S., Makower, D. (1995)

Thymidine phosphorylase mediates the sensitivity of human colon carcinoma cells to 5-fluorouracil  
J Biol Chem, 270, 19073-19077

Seidensticker, P., Schmiegel, W. (1998)

Kolorektales Karzinom  
Internist (Berl), 39, 509-518

Shirota, Y., Stoecklacher, J., Brabender, J., Xiong, Y.P., Uetake, H., Danenberg, K.D., Groshen, S., Tsao-Wie, D.D., Danenberg, P.V., Lenz, H.J. ERCC1 and thymidylate synthase mRNA levels predict survival for colorectal cancer patients receiving combination oxaliplatin and fluorouracil chemotherapy

J Clin Oncol, 19, 4298-4304

Statistischen Bundesamt Wiesbaden, 2000

<http://www.destatis.de>

Strachan, T., Read, A.P.

Molekulare Humangenetik

Spektrum, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1996

Sugiyama, Y., Kato, T., Nakazato, H., Ito, K., Mizuno, I., Kanemitsu, T., Matsumoto, K., Yamaguchi, A., Nakai, K., Inada, K., Tatematsu, M. (2002) Retrospective study on thymidylate synthase as a predictor of outcome and sensitivity to adjuvant chemotherapy in patients with curatively resected colorectal cancer

Anticancer Drugs, 13, 931-938

Sumizawa, T., Furukawa, T., Haraguchi, M., Yoshimura, A., Takeyasu, A., Ishizawa, M., Yamada, Y., Akiyama, S. (1993)

Thymidine phosphorylase activity associated with platelet-derived endothelial cell growth factor

J Biochem (Tokyo), 114, 9-14

Takahashi, Y., Bucana, C.D., Liu, W., Yoneda, J., Kitadai, Y., Cleary, K.R., Ellis, L.M. (1996)

Platelet-derived endothelial cell growth factor in human colon cancer angiogenesis: role of infiltrating cells

J Natl Cancer Inst, 88, 1146-1151

Takebayashi, Y., Akiyama, S., Akiba, S., Yamada, K., Miyadera, K., Sumizawa, T., Yamada, Y., Murata, F., Aikou, T. (1996)

Clinicopathologic and prognostic significance of an angiogenic factor, thymidine phosphorylase, in human colorectal carcinoma

J Natl Cancer Inst, 88, 1110-1117

Takenoue, T., Nagawa, H., Matsuda, K., Fujii, S., Nita, M.E., Hatano, K., Kitayama, J., Tsuruo, T., Muto, T. (2000)

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, 193-198

Tokunaga, Y., Hosogi, H., Hoppou, T., Nakagami, M., Tokuka, A., Ohsumi, K. (2002)

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, 541-547

Tokunaga, Y., Nakagami, M., Tokuka, A., Ohsumi, K. (2003)

Prognostic effects of dihydropyrimidine dehydrogenase in advanced colorectal cancer after surgery: immunohistochemistry using a new monoclonal antibody  
Anticancer Res, 23, 1763-1768

Tsuji, T., Sawai, T., Takeshita, H., Nakagoe, T., Hidaka, S., Atsushi, Nanashima, Yamaguchi, H., Yasutake, T., Nagayasu, T., Tagawa, Y. (2004)  
Tumor dihydropyrimidine dehydrogenase in stage II and III colorectal cancer: low level expression is a beneficial marker in oral-adjuvant chemotherapy, but is also a predictor for poor prognosis in patients treated with curative surgery alone

Cancer Lett, 204, 97-104

Twelves, C., Wong, A., Nowacki, M.P., Abt, M., Burris, H. 3<sup>rd</sup>., Carrato, A., Cassidy, J., Cervantes, A., Fagerberg, J., Georgoulas, V., Hussein, F., Jodrell, D., Koralewski, P., Kroning, H., Maroun, J., Marschner, N., McKendrick, J., Pawlicki, M., Rosso, R., Schuller, J., Seitz, J.F., Stabuc, B., Tujakowski, J., Van Hazel, G., Zaluski, J., Scheithauer, W. (2005)  
Capecitabine as adjuvant treatment for stage III colon cancer  
N Engl J Med, 352, 2696-2704

Usuki, K., Saras, J., Waltenberger, J., Miyazono, K., Pierce, G., Thomason, A., Heldin, C.H. (1992)

Platelet-derived endothelial cell growth factor has thymidine phosphorylase activity  
Biochem Biophys Res Commun, 184, 1311-1316

van Triest, B., Pinedo, H.M., Blaauwgeers, J.L., van Diest, P.J., Schoenmakers, P.S., Voorn, D.A., Smid, K., Hoekman, K., Hoitsma, H.F., Peters, G.J. (2000)

Prognostic role of thymidylate synthase, thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor, and proliferation markers in colorectal cancer

Clin Cancer Res, 6, 1063-1072

Van Triest, B., Pinedo, H.M., Giaccone, G., Peters, G.J. (2000)

Downstream molecular determinants of response to 5-fluorouracil and antifolate thymidylate synthase inhibitors

Ann Oncol, 11, 385-391

- Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Kern, S.E., Preisinger, A.C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A.M., Bos, J.L. (1988)  
Genetic alterations during colorectal-tumor development  
N Engl J Med, 319, 525-532
- Wittekind, C., Meyer, H.J., Bootz, F.  
TNM-Klassifikation maligner Tumoren, 6. Auflage  
Springer, Berlin, Heidelberg, 2002
- Wong, N.A., Brett, L., Stewart, M., Leitch, A., Longley, D.B., Dunlop, M.G., Johnston, P.G., Lessells, A.M., Jodrell, D.I. (2001)  
Nuclear thymidylate synthase expression, p53 expression and 5FU response in colorectal carcinoma  
Br J Cancer, 85, 1937-1943
- Yamachika, T., Nakanishi, H., Inada, K., Tsukamoto, T., Kato, T., Fukushima, M., Inoue, M., Tatematsu, M. (1998)  
A new prognostic factor for colorectal carcinoma, thymidylate synthase, and its therapeutic significance  
Cancer, 82, 70-77
- Yamaue, H., Tanimura, H., Kono, N., Aoki, Y., Tabuse, K., Uchiyama, K., Takifuji, K., Iwahashi, M., Tani, M. (2003)  
Clinical efficacy of doxifluridine and correlation to in vitro sensitivity of anticancer drugs in patients with colorectal cancer  
Anticancer Res, 23, 2559-2564

## 5. Danksagung

Mein Dank gilt all denen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn PD Dr. med. Bodo Klump und Herrn PD Dr. med. Jörg Thomas Hartmann danke ich für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas. Herrn PD Dr. med. Bodo Klump gilt mein Dank für seine Diskussionsbereitschaft und die stets vorbildliche Betreuung meiner Arbeit.

Herrn Dr. med. Oliver Nehls danke ich für die geduldige und hilfsbereite Betreuung meiner Arbeit. Nicht nur seine Informationen zum klinischen Hintergrund, auch sein immerwährender Optimismus bei Problemen trugen zum Gelingen maßgeblich bei. Dankbar bin ich auch für seine ausdauernde Unterstützung bei der Durchführung der statistischen Analysen.

Frau Vera Gaco bin ich für die geduldige Hilfestellung bei der Erlernung der immunhistochemischen Arbeitsmethoden sehr verbunden. Ihr Fachwissen zur Optimierung der immunhistochemischen Färbungen und ihre freundschaftliche Anteilnahme an Problemen meiner Arbeit waren mir eine wertvolle Unterstützung.

Frau Elke Malenke verdanke ich die qualifizierte Einführung sowohl in die molekularbiologischen Untersuchungsmethoden, als auch in die relative Quantifizierung.

Herrn Dr. rer. nat. Chiesh-Jen Hsieh und allen Mitarbeitern der Labore der Medizinischen Klinik I und II, danke ich für das freundliche Arbeitsklima.

Herrn Christoph Meisner danke ich für die kompetente Beratung zu den statistischen Berechnungen.

Herrn PD Dr. med. Dr. rer. nat. Klaus Hamprecht danke ich für die freundliche Erlaubnis zur Nutzung des LightCycler Gerätes.

Frau Friederike Wunsch danke ich für die kooperative und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Frau Claudia Semmler gilt mein Dank für kritische Kommentare und Anregungen zum Manuskript der Arbeit.

Meinem Bruder Daniel und besonders meinem Bruder Stephan danke ich herzlich für ihre geduldige Hilfe bei der Bewältigung von Anwendungsproblemen der verwendeten Software.

Meinen Eltern bin ich für ihre immer liebevolle und aufmunternde Unterstützung während des Studiums und bei der Erstellung der Doktorarbeit sehr dankbar.

## 6. Lebenslauf

**Persönliche** Susanne Margarete Knauß

**Daten** geb. am 12.11.1979 in Böblingen

Familienstand: ledig, keine Kinder

### **Ausbildung** **Schule**

9/86 – 7/90 Schlehengäuschule Gechingen

9/90 – 6/99 Hermann Hesse – Gymnasium Calw

Allgemeine Hochschulreife

### **Studium**

seit 10/99 Humanmedizin an der Eberhard-Karls-  
Universität Tübingen

### **Examen**

9/01 Ärztliche Vorprüfung

9/02 1. Staatsexamen

4/05 2. Staatsexamen

09/05/06 3. Staatsexamen

### **Praktika** **Famulaturen**

3/02 Innere Medizin, Kreiskrankenhaus Calw

8/03 Gynäkologie und Geburtshilfe,  
Klinikum Kaufbeuren-Ostallgäu

9/03 Praxisfamulatur bei Dr. med. H. Haug,  
Facharzt für Hals-Nasen- Ohrenheilkunde,  
Calw

3/04 Neurologie, Universitätsklinikum Tübingen

### **Praktisches Jahr**

4/05 - 8/05 Anästhesiologie, Marienhospital Stuttgart

8/05 - 12/05 Chirurgie, GZO Spital Wetzikon, Schweiz

12/05 - 3/06 Innere Medizin, Marienhospital Stuttgart