

Aus dem
Institut für Pathologie
an der Heinrich-Heine-Universität zu Düsseldorf

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med H. E. Gabbert

**Molekulargenetische Untersuchung der RNS –Expressionsrate des
Apoptoseinhibitors Livin Alpha im kolorektalen Karzinom und dessen
prognostischen Wertes in Bezug zur Tumorprogression**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Viktoria Louise Schneitler

2014

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich Heine Universität Düsseldorf
gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf Dekan

Referent: Prof. Dr. Stephan Baldus
Koreferent: Prof. Dr. med. A. Erhardt

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	IV
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VII
TABELLENVERZEICHNIS	IX
1 EINLEITUNG	1
1.1 Kolorektales Karzinom	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Ätiologie/ Pathophysiologie	2
1.1.2.1 Adenom-Karzinom-Sequenz	3
1.1.2.2 Genetische Disposition/ Faktoren.....	5
1.1.2.3 Präkanzerosen und Risikofaktoren	6
1.1.3 Klassifikation und Prognose	9
1.2 Apoptose	13
1.2.1 Apoptosemechanismen	13
1.2.1.1 Der extrinsische Apoptoseweg	14
1.2.1.2 Der intrinsische Apoptoseweg.....	15
1.2.1.3 Der gemeinsame Effektorweg	16
1.2.2 Familie der „Inhibitor of Apoptosis Proteins“ (IAP).....	17
1.2.2.1 Molekulare Struktur der Apoptoseinhibitoren IAP bzw. BIRC.....	17
1.2.2.2 Wirkungs- und Regulationsweise der IAP Proteine	19
1.2.3 Tumorbiologische Relevanz der IAP für den Gastrointestinaltrakt	20
1.2.4 Livin	20
1.3 Fragestellung der Arbeit	23
2 MATERIALIEN.....	24
2.1 Gewebeproben und Patientengut	24
2.2 Chemikalien	27
2.2.1 Flüssigkeiten und Feststoffe	27
2.2.2 Medien, Puffer und Lösungen.....	27

2.3	Nukleinsäuren	28
2.3.1	DNS-Längenstandards	28
2.3.2	Oligonukleotide	28
2.4	Molekularbiologische Kits	29
2.5	Hilfsmittel	29
2.5.1	Verbrauchsmaterialien	29
2.5.2	Laborgerät	30
2.5.3	Software und Server	30
3	METHODEN	31
3.1	Gewebeaufbereitung und -verarbeitung	31
3.2	RNS-Extraktion	31
3.2.1	RNS-Isolierung aus kolorektalem Kryogewebe	31
3.2.2	Reinheits- und Konzentrationsbestimmung mit Nanodrop und Photometrie	32
3.2.3	DNS Verdau von RNS	33
3.2.4	Qualitätskontrolle der RNS	33
3.3	cDNS-Synthese durch reverse Transkription	34
3.4	Primerdesign	35
3.5	Semiquantitative real time RT-PCR	35
3.5.1	Methode	35
3.5.2	Relative Quantifizierung mittels externer Standards	38
3.5.3	Primereffizienz	39
3.5.4	Durchführung	40
3.6	Agarose-Gelelektrophorese	41
3.7	Aufreinigung der PCR-Amplifikate zur Gensequenzierung	42
3.8	Densitometrie	42
3.9	Statistische Auswertung	42
4	ERGEBNISSE	44
4.1	Patientencharakteristika	44
4.2	Relative mRNS-Livin-Expressionsrate im kolorektalen Karzinom	44

4.3	Statistische Auswertung der relativen mRNS-Expression von Livin in kolorektalem Gewebe.....	46
4.4	Korrelation der Expressionsrate von Livin und klinisch pathologischen Charakteristika.....	48
4.5	Kaplan-Meier-Überlebenskurve und prognostischer Einfluss der Livin-Expressionsrate	52
5	DISKUSSION	54
6	ZUSAMMENFASSUNG	60
7	DANKSAGUNG	61
	LITERATURVERZEICHNIS	62
	ANHANG	XI
	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	XIII

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AIF	apoptosis inducing factor
Apaf-1	apoptotic protease activating factor-1
APC	Adenomatous polyposis Coli
Bax	BCL2-associated X protein
Bak	BCL2-antagonist/killer-1
Bid	B-cell-lymphoma
BIR	Baculovirus IAP repeat
BIRC	BIR-containing proteins
BMFZ	Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum der Universität Düsseldorf
CAD	Caspase aktivierte DNase
CARD	caspase activation recruitment domain
Caspase	cysteine-aspartic proteases
cDNS	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CIN	chromosomale Instabilität
CP	crossing point
Ct	cycle threshold
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DCC	deleted in colon cancer
DD	death domain
DED	death effector domain
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIABLO	direct IAP binding protein with low pI
DISC	death inducing signaling complex
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
FADD	Fas-associating protein with death domain
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FLIP	Fllice inhibiting proteins

Abkürzungsverzeichnis

g	Erdbeschleunigung
HNPCC	Hereditary nonpolyposis colorectal cancer
HtrA2	high temperature requirement A 2
IAP	inhibitor of apoptosis protein
IBM	IAP-binding motif
Ig	Immunglobulin
ILP-2	IAP-linked protein 2
JNK1	Jun NH2 terminale Kinase 1
kDa	kilo Dalton
KRK	Kolorektales Karzinom
LOH	loss of heterozygosity
LRR	leucine-rich repeat
MIN	Mikrosatelliteninstabilität
ML-IAP	Melanoma-linked-IAP
MM	Master Mix
MMR	Mismatch-Repair
mRNS	messenger Ribonukleinsäure
NAIP	neuronal apoptosis inhibitor protein
NB	nucleotide-binding domain
NOD	nucleotide-binding oligomerization
NTC	Non Template Control
ph	potentia hydrogenii; negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
PJS	Peutz-Jeghers-Syndrom
QRT- PCR	quantitative real-time PCR
RER	replication errors
RIN	RNA-Integrity Number
RING	really interesting new gene
RT	reverse Transkriptase
SMAC	second mitochondrial activator of caspases
STK11	Serin-Threonin-Kinase-11
TAB1	TAK1-binding protein
TAK1	transforming growth factor beta activated kinase-1
Taq	Thermus aquatus

Abkürzungsverzeichnis

TNF	tumor necrosis factor
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit(s)
Ubc	ubiquitin conjugating
UICC	union for international cancer control
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Relative Krebshäufigkeit nach Geschlecht und Organbefall in Deutschland..	1
Abbildung 2: Anteil der Risikogruppen beim kolorektalen Karzinom	2
Abbildung 3: Adenom-Karzinom-Sequenz.....	3
Abbildung 4: Kumulative Inzidenz des KRK bei Verwandten ersten Grades von Patienten mit kolorektalem Karzinom	8
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Apoptosom-Bildung.....	16
Abbildung 6: Apoptoseinduktion über den extrinsischen und intrinsischen Signaltransduktionsweg	17
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Domänenverteilung der acht humanen IAP- Familienmitglieder:	18
Abbildung 8: Potenzielle Mechanismen der Interaktion von Livin in der Apoptose	21
Abbildung 9: Die zwei Livin Splicevarianten α und β mit der Auflistung der 18 Aminosäuren langen Region,.....	22
Abbildung 10: Untersuchtes kolorektales Probenkollektiv des pathologischen Institutes der Universität Düsseldorf als Flussdiagramm.....	25
Abbildung 11: Überblick über den Funktionsmechanismus von SYBR-Green (nach Fa. Roche, 2005) :	36
Abbildung 12: Schematische Darstellung einer Amplifikationsgraphik: Die gemessene Fluoreszenz (Ordinate) wird gegen die Zyklenzahl (Abszisse) aufgetragen (modifiziert nach Bente, 2003).....	37
Abbildung 13: PCR-Produktkontrolle für das Gen Livin (li. Peak) und GAP-DH (re. Peak) mit dem LightCycler® durch eine Schmelztemperaturanalyse.....	38
Abbildung 14: Konzept der Quantifikation anhand eines externen Standards (modifiziert nach Fa. Roche, 2005).....	39
Abbildung 15: Verwendete Standardkurve anhand GAP-DH in aufsteigender Verdünnung: 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%.	40
Abbildung 16: RNS-Untersuchung im Bioanalyzer mit Nanochip.....	45
Abbildung 17: Gelelektrophorese der QRT-PCR-Amplifikate	45
Abbildung 18: Amplifikationskurven von GAP-DH bei Ct 22 und Livin bei Ct 28 für Normal- und Tumorgewebe.....	46
Abbildung 19: Testung auf Normalverteilung nach Kolmogorov-Smirnov	47
Abbildung 20: Relative mRNS-Expressionsdaten von Livin im Normal- versus	

Tumorgewebe pT 1-4:	48
Abbildung 21: Relative mRNS-Livin-Expressionsrate im Bezug zum Grading (G)	49
Abbildung 22: Relative mRNS-Livin-Expressionsrate im Bezug zum N-Stadium.....	49
Abbildung 23: Relative mRNS-Livin-Expressionsrate im Bezug zur Lokalisation.....	50
Abbildung 24: Relative mRNS-Livin Expressionsrate in Bezug zum R-Status	50
Abbildung 25: Relative mRNS-Livin-Expressionsrate im Bezug zur Fernmetastasierung.	51
Abbildung 26: Relative mRNS-Livin-Expressionsrate im Bezug zum Geschlecht.....	51
Abbildung 27: Relative mRNS-Livin-Expressionsrate im Bezug zum Alter.....	52
Abbildung 28: Kaplan-Meier-Überlebenskurve für Livin- Expressionsraten	53

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Häufigkeiten der histologischen Zuordnung des kolorektalen Karzinoms, WHO Klassifikation 2000	9
Tabelle 2: TNM-Klassifikation, Klassifikation nach DUKES und UICC Stadien	10
Tabelle 3: Potenzielle molekulargenetische Prognosefaktoren	12
Tabelle 4: Überlebensrate in Abhängigkeit der Tumorstadien	12
Tabelle 5: Kolorektales Probenkollektiv des pathologischen Institutes der Universität Düsseldorf	26
Tabelle 6: Verwendete Oligonukleotide	29
Tabelle 7: PCR-Syntheseprogramm	41
Tabelle 8: Eigenschaften des untersuchten Kollektives	44
Tabelle 9: Ermittelte Regressionen	47
Tabelle 10: Relative Livin mRNS-Expressionsrate der untersuchten Patientenproben	XI

1 Einleitung

1.1 Kolorektales Karzinom

1.1.1 Epidemiologie

Inzidenz und Mortalität des kolorektalen Karzinoms weisen erhebliche geographische Unterschiede auf. Die Inzidenz in der Europäischen Union ist hoch und wird auf 1,2 Million pro Jahr geschätzt (Ferlay et al., 2007).

In Teilen von Afrika, Indien, Israel und Südamerika ist die Inzidenz außerordentlich gering und bis zu 60-fach geringer als z.B. in Japan, den USA, Europa bzw. den westlichen Industrieländern.

Karzinome des Kolons und des Rektums sind im gesamten Europa mittlerweile die häufigste, in den USA die vierthäufigste und in Deutschland die zweithäufigste Krebserkrankung nach dem Prostatakarzinom beim Mann bzw. Mammakarzinom der Frau mit einer Inzidenzrate von 70 pro 100.000 Einwohner pro Jahr. Nach dem Bronchialkarzinom steht das kolorektale Karzinom (KRK) in Europa an der zweiten Stelle der Mortalitätsskala mit 30 pro 100.000 Einwohner pro Jahr 2008 (RKI, 2010). Seit Mitte der 70er Jahre nimmt die Sterberate im Vergleich zur steigenden Inzidenz (Anstieg um das Doppelte in zwanzig Jahren) stetig ab mit einer Letalität von 50% durch die Einführung von Früherkennungsmaßnahmen und Vorsorgeuntersuchungen (Boyle & Langman, 2000).

Selten tritt das KRK vor dem 40. Lebensjahr auf, 90% der Fälle sind nach Erreichen des 50. Lebensjahres mit dem Häufigkeitsgipfel um das 65. Lebensjahr. Es ist damit ein Karzinom des höheren Lebensalters.

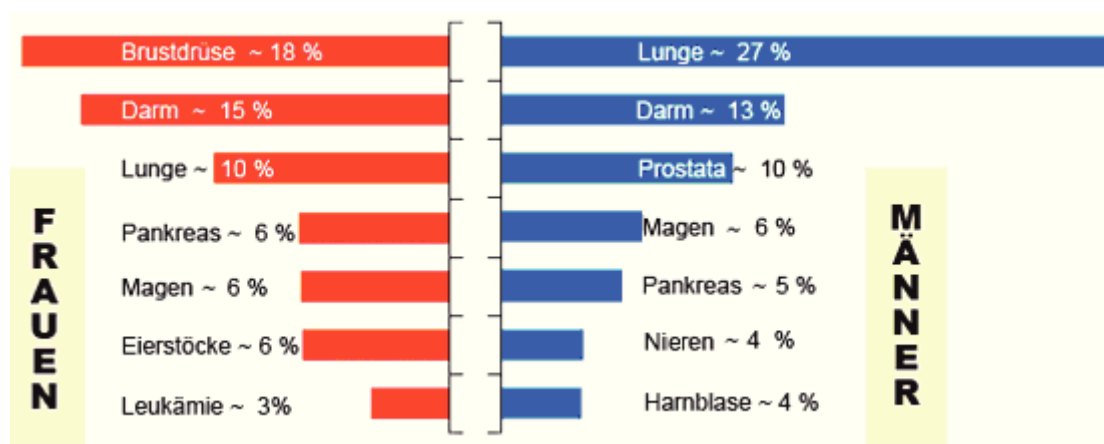


Abbildung 1: Relative Krebshäufigkeit nach Geschlecht und Organbefall in Deutschland

(Mit Genehmigung des RKI, 2010)

Die Geschlechterverteilung beim Kolonkarzinom ist gleich, beim Rektumkarzinom zeigt sich jedoch ein 1,5-fach höheres Risiko für Männer.

Das Lebenszeitrisiko für einen Deutschen, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken, beträgt ca. 6% und das Risiko daran zu versterben 2,5-3% (Schulmann & Schmiegel, 2002).

Die häufigste Lokalisation des KRK ist mit 80% das Rektum und das Sigma, das Colon ascens und Caecum ist in 10% d. F. betroffen, nur 10% entfallen auf das restliche Kolon.

1.1.2 Ätiologie/ Pathophysiologie

Das kolorektale Karzinom wird aus ätiologischer Sicht in sporadische und hereditäre KRK eingeteilt. 65-85% der neu aufgetretenen KRK treten sporadisch auf, d.h. meist über die Entwicklung aus adenomatösen Polypen von einer multifaktoriellen bzw. polygenen Genese ausgehend. Die hereditären KRK werden monogen vererbt. Dazu gehören v. a. die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) mit 1% der Fälle und das Lynch-Syndrom auch HNPCC genannt (hereditäres nicht polypöses kolorektales Karzinom) mit 5-10% der Fälle.

Bei der Genese des KRK werden exogene und endogene Faktoren als Auslöser unterschieden.

Die endogenen Faktoren beruhen auf genetischen Defekten z. B. Vererbung beim FAP.

Bei den exogenen Faktoren sind die Umwelteinflüsse wesentlich, v. a. bedeutsam bei sporadischen KRK (Scherneck & Kölbl, 1998). 10-30% treten familiär gehäuft auf, bei diesen sind auch genetische Einflüsse bedeutsam.

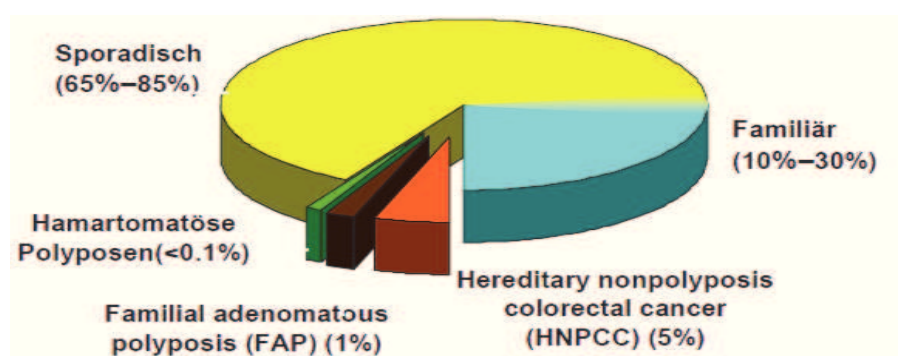


Abbildung 2: Anteil der Risikogruppen beim kolorektalen Karzinom

(Mit Genehmigung des Pflaum Verlages, modifiziert nach Winawer et al., 1996)

1.1.2.1.1 Adenom-Karzinom-Sequenz

Die sogenannte Dysplasie der kolorektalen Schleimhaut stellt die pathogenetische Grundlage für die Karzinomentwicklung dar. Diese ist als eindeutige Neoplasie ohne invasives Wachstum definiert mit zellulärer Atypie, abweichender Differenzierung und gestörter epithelialer Architektur.

Das von Vogelstein und Fearon entwickelte Tumorgenese-Modell des KRK, die „Adenom-Karzinom-Sequenz“ stellt den kontinuierlichen Übergang von der Dysplasie in ein Adenom über zunehmende Dysplasieschweregrade bis hin zum infiltrativen Karzinom dar.

In ca. 95% der Fälle sind Dysplasien in Adenomen nachweisbar, so entstehen die meisten KRK mit einer Latenz von ca. 10 Jahren aus polypösen Vorstufen (Hauser et al., 2010).

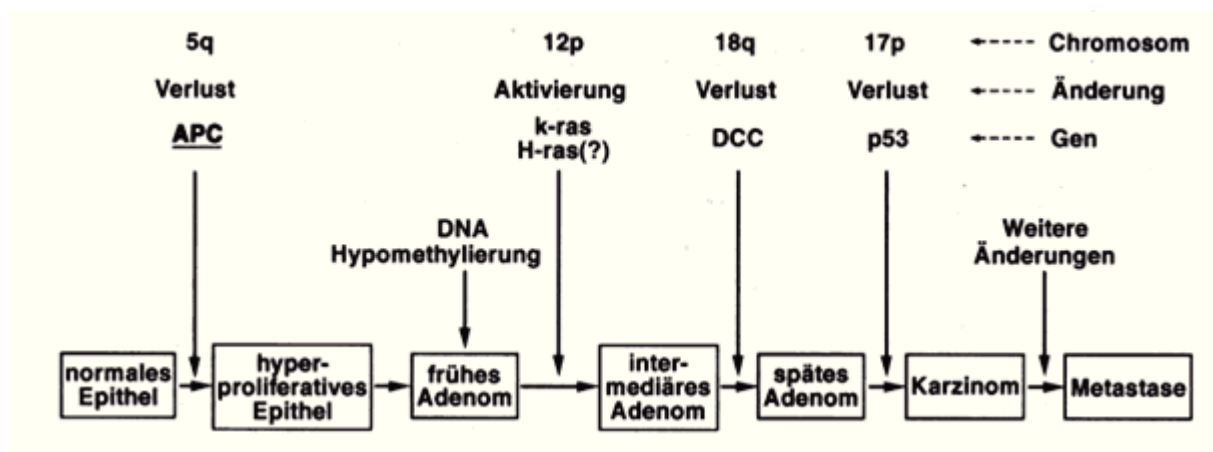


Abbildung 3: Adenom-Karzinom-Sequenz

(Mit Genehmigung des Elsevier Verlages, modifiziert nach Fearon und Vogelstein, 1990)

Die Neoplasie entsteht somit nicht aus einer einzelnen genetischen Veränderung, sondern resultiert aus der Akkumulation verschiedener Alterationen unterschiedlicher Tumorsuppressor bzw. Onkogene als Multistep-Karzinogenese (Dörfer et al., 2008).

Onkogene leiten sich i. d. R. von physiologisch in der Zelle vorhandenen Protoonkogenen ab, die eine Funktion in der Kontrolle des Zellwachstums haben durch Kodierung von Wachstumsfaktoren. Die Aktivierung bereits eines Allels ist ausreichend zur Aktivierung eines Onkogenes und damit unkontrollierter Überexpression.

Tumorsuppressorgene sind physiologische Negativregulatoren des Zellwachstums und der Zellteilung. Zu deren Inaktivierung müssen nach der Knudson'schen Hypothese beide Allele betroffen sein (Knudson et al., 1976). Die Inaktivierung wird durch Mutationen erzeugt oder/und durch den Verlust ganzer Chromosomenarme bzw. -teilstücke, *loss of heterozygosity* (LOH).

Im KRK finden sich am häufigsten Verluste eines Allels von 5q, 18q, 17p und 9p (Kern et al., 1989; Vogelstein et al., 1988; Ried et al., 1999).

Erste Phase: Mutationen im Tumorsuppressorgen APC (Chromosomen-Arm 5q) und WNT/ β -Catenin-Signalweg:

Das APC-Gen (Adenomatous polyposis coli) hat eine Schlüsselstellung in der Kolontumorinitiation inne (Kinzler & Vogelstein, 1996), so ist es bereits im Adenom in der gleichen Häufigkeit nachweisbar wie später im invasiven Karzinom. KRK weisen in 80% der Fälle somatische biallelische Mutationen des APC-Gens auf.

Die Folge ist eine ineffektive Degradation des Transkriptionsfaktors β -Catenin. Die unphysiologische Akkumulation von β -Catenin bewirkt eine vermehrte Transkription von Zellzyklusregulatoren und Zielgenen z. B. c-myc, Zyklin D und dadurch eine unkontrollierte Proliferation (Schulmann & Schmiegel, 2002).

Zweite Phase: K-ras-Onkogen (Chr. 12p), DCC (Chr. 12q) und p53 (Chr.17p):

Mutationen im K-ras Onkogen werden in einem fortgeschrittenen Stadium des KRK in 50% d. F. detektiert. Es kommt zu einer Aktivierung von K-ras, dies stellt einen prognostisch ungünstigen Faktor dar (Esteller et al., 2001).

Bei DCC (*deleted in colon cancer*) handelt es sich um ein Transmembranprotein der Ig-Superfamilie, dessen Verlust wahrscheinlich zu Veränderungen der Zelladhäsion in der gesunden Kolonmukosa führt (Wrba, 2001).

Das p53 Tumorsuppressorgen ist ein Transkriptionsgen mit zentraler Rolle in der Regulation des Zellzyklus, Induktion der Apoptose und Bewahrung der genomischen Stabilität durch Kontrolle der DNS-Reparatur. In 75% der Fälle lässt sich eine p53 Inaktivierung als LOH und 50-60% als somatische Mutation beim KRK im fortgeschrittenen Stadium nachweisen (Boland et al., 1995).

Das „Vogelstein“-Modell (s. Abb. 3) ist in den letzten Jahren um eine Reihe weiterer Auslöser erweitert worden. Die zugrunde liegenden genetischen Veränderungen beruhen einerseits auf erzeugten Instabilitäten (CIN) auf chromosomaler Ebene und Aneuploidie bei 85% der sporadischen KRK und andererseits auf epigenetischen durch Punktmutationen hervorgerufenen Defekten in DNS-Reparatur-Systemen, in 15% d. F. sogenannte Mikrosatelliteninstabilitäten (MIN) (Schulmann & Schmiegel, 2002).

Die MIN beruht auf einem Defekt des DNS-Mismatch Reparatursystems (MMR-System).

Mikrosatelliten sind kurze repetitive DNS-Sequenzen aus einer oder zwei Basen. Diese repetitiven Sequenzen sind besonders anfällig für Kopierfehler (sogenannte replication errors, RER), die dazu führen, dass es zu einer Inkongruenz (mismatch) zwischen der Ausgangs-DNS und ihrer Kopie kommt. Das MMR-System dient der Erkennung und der Korrektur von fehlgepaarten Basen. Diese Funktion wird gestört durch Insertion oder Deletion der MMR-Gene, dies führt zu einer frameshift-Verschiebung und zur Inaktivierung des Genes.

Bei sporadischen Tumoren wird dies häufig durch lokale Hypermethylierung von 5' CpG-Inseln verursacht, dies innerhalb von Promotoren krebsrelevanter Gene speziell des hMLH1 bei sporadischen KKR. Dies führt zu deren transkriptionaler Repression (Cunningham et al., 1998; Baylin et al., 1998). Es können auch andere Gene unabhängig von der MIN betroffen sein z. B. Apoptogene. In diesem Zusammenhang wird von dem CIM-Phänotyp gesprochen (Dörfer et al., 2008). Bedeutsamer als für die sporadischen KKR ist MIN mit 90% d. F. für das HNPCC (Lynch et al., 2009).

1.1.2.1.2 Genetische Disposition/ Faktoren:

Hereditäre KKR machen 5-10% aller KKR aus, sind monogen erblich und den autosomal dominant vererbten Syndromen zu zuordnen.

Familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) und extrakolische Manifestationen/ allelische Varianten:

Bei der FAP liegt eine Mutation eines Suppressorgens des APC-Gens vor (Grodin et al., 1991). Diese Inaktivierung führt zu einer erhöhten Initiationsrate in der Adenom-Karzinom-Sequenz. Das FAP stellt eine obligate Präkanzerose dar, für die Patienten besteht ein fast 100% Entartungsrisiko (Friedl, 2002). Deshalb ist therapeutisch bei Erstdiagnose eine prophylaktische Kolektomie angeraten. Klinisch imponiert die Erkrankung durch das Auftreten multipler Adenome insbesondere im distalen Dickdarmbereich durch eine Keimbahnmutation in einem der APC-Allele auf dem Chromosom 5q21 (Dörfer et al., 2008). Je höher die Polypendichte, umso früher manifestieren sich die Karzinome. Durchschnittlich treten Adenome im Rahmen der FAP meist nach der Pubertät auf, besonders um das dreißigste Lebensjahr. Die Entwicklung zum Karzinom erfolgt meist um das vierzigste Lebensjahr. Neben den kolorektalen Veränderungen kann die FAP auch mit extrakolischen Manifestationen kombiniert sein. Das zusätzliche Auftreten von multiplen Osteomen im Schädel- bzw. Mandibulabereich, das Auftreten multipler Epidermiszysten sowie von Hautlipomen und -fibromen kennzeichnet das Gardner-Syndrom. Das gleichzeitige Auftreten von Tumoren des Zentralnervensystems wird als Turcot-Syndrom bezeichnet.

Peutz-Jeghers-Syndrom (PJS):

Dem PJS liegt eine Mutation am Chromosom 19p13.3 auf dem STK11 (Serin-Threonin-Kinase) zugrunde. Typisch für diese Erkrankung sind multiple polypoide Hamartome im gesamten Magen-Darm-Trakt sowie charakteristische melanoide Flecken auf der Haut, Lippen und der Mundschleimhaut. Polypen entwickeln sich dabei bevorzugt im Dünndarmbereich, können aber auch im Kolon nachgewiesen werden. Ein erhöhtes Risiko besteht für Tumore des gastrointestinalen Traktes und extrakolisch lokalisierte Karzinome v. a. der Mamma, der Zervix und des Bronchialsystems (Hearle et al., 2006).

HNPCC:

Das HNPCC ist das häufigste hereditäre KRK und hat eine hohe Penetranz mit 80%, deshalb wurden spezielle Richtlinien für Früherkennungsuntersuchungen eingeführt. Typisch für diese Erkrankung ist das v. a. im rechtsseitigen Kolon auftretende Karzinom mit syn- bzw. metachron auftretenden Zweitmalignomen. In 30-40% der Fälle sind dies z. B. Endometrium-, Nierenbecken/ ableitende Harnwegs- und Dünndarmkarzinome. Als Ursache liegen bei HNPCC MIN speziell in den Fehlpaarungsreparaturgenen MSH2, MLH1, PMS1 oder PMS2 vor (Liu et al., 1996).

1.1.2.1.3 Präkanzerosen und Risikofaktoren

Ernährungs- und Umweltfaktoren:

Migrationsstudien haben gezeigt, dass bei Einwanderern innerhalb einer Generation das KRK-Risikoprofil des jeweiligen Gastlandes erreicht wird und sich die Inzidenz entsprechend anpasst z. B. bei Japanern oder Chinesen nach Übersiedlung in die USA (Kolonel et al., 2004), was ein Hinweis dafür ist, wie bedeutsam Umweltfaktoren in der Genese des KRK sind.

Auch Zwillingsstudien haben gezeigt, dass Umwelteinflüsse bei sporadischen KRK eine größere Bedeutung als genetischen Faktoren zukommt (Lichtenstein et al., 2000).

Eine Ernährung mit einem hohen Anteil an gesättigten Fettsäuren, rotem Fleisch und niedrigem Anteil an Ballaststoffen (<30 g/d) scheint das Erkrankungsrisiko zu erhöhen (Bingham et al., 2003). Speziell stellt eine geringe Zufuhr an Gemüse und Früchten einen Risikofaktor dar, da dadurch nicht die Bindung des Galaktose bindenden Lektins an ungesättigte Galaktose verhindert bzw. vermindert wird und so eine kolorektale epitheale Proliferation stimuliert wird (Evans et al., 2002). Eine vermehrte Zufuhr von Obst und Gemüse ist deshalb mit einer reduzierten Häufigkeit von Kolonadenomen und Karzinomen assoziiert, dies gilt insbesondere für das linksseitige Kolon, und in sehr geringem Maß für das Rektumkarzinom (Terry et al., 2001). Unklar ist in welchem Ausmaß, welche Bestandteile (Ballaststoffe, Flavonoide, Anthocyanine) einen protektiven Effekt haben und über welche Mechanismen, ob z. B. über eine Verkürzung der

intestinalen Transitzeiten und damit geringere Mukosaschädigung durch potentielle Karzinogene.

Das Karzinomrisiko korreliert zudem positiv mit der aufgenommenen Menge an Alkohol- und Nikotinkonsum (Poynter et al., 2009).

Es gibt wahrscheinlich keine Möglichkeit, durch eine Veränderung von Umweltfaktoren, Lebensstil oder Ernährung das Risiko einer Karzinomentwicklung gänzlich zu eliminieren. Allerdings sollten anhand epidemiologischer Studien gewonnene Erkenntnisse als Empfehlungen ausgesprochen werden, die zumindest einen protektiven Effekt haben sollen (Satia et al., 2004). So ist gesichert, dass körperliche Inaktivität und Adipositas einen wichtigen Einfluss auf die Entstehung von Tumorerkrankungen haben. Dieser Zusammenhang ist signifikant nachweisbar für das Kolonkarzinom mit einer relativen Risikoreduktion um bis zu 40%, jedoch nicht für das Rektumkarzinom (Giovannucci & Michaud, 2007). Diese Bedeutung wird erklärt mit einer Adipositas induzierten Insulinresistenz, die mit erhöhten Plasmaspiegeln an Insulin, Glukose und Fettsäuren einhergeht. Insulin scheint einen mitogenen Effekt auf die Kolonschleimhaut zu haben (Halle & Schoenenberg, 2009)

Familienanamnese:

Das Risiko einer Kolonkarzinomerkrankung ist zwei- bis dreifach erhöht, wenn ein Angehöriger ersten Grades (Eltern, Geschwister, Kinder) bereits an einem Kolonkarzinom erkrankt war/ ist und steigt weiter an (drei- bis vierfach), wenn diese Erkrankung vor dem 45. Lebensjahr aufgetreten ist und/oder mehr als ein Verwandter ersten Grades von einem kolorektalen Karzinom betroffen ist (Schmiegel et al., 2008).

Bei Kindern betroffener Eltern ist das Risiko im Vergleich zur allgemeinen Bevölkerung 2,3-fach, bei einem betroffenen Geschwisterkind 2,6-fach erhöht.

Erkrankt der betroffene Verwandte erst nach dem 60. Lebensjahr, ist das Risiko für erstgradige Verwandte für ein kolorektales Karzinom nur noch gering erhöht. Verwandte zweiten Grades von Patienten mit kolorektalem Karzinom haben ein leicht erhöhtes Karzinomrisiko (Risikofaktor 1,3), und Verwandte dritten Grades haben kein erhöhtes KRK-Risiko (Schmoll & Arnold, 2006, Schulmann & Schmiegel, 2002).

Erworbene präkanzeröse Faktoren:

Das Risiko, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken, steigt bei einem vorbestehenden Dünndarm-, Endometrium-, Mamma- oder Ovarialkarzinom um das 1,5-fache. Klinisch bekannte kolorektale Tumore, synchrone Zweitkarzinome und Adenome bilden ein zwei- bis dreifach

erhöhtes Risiko gegenüber der Normalbevölkerung für weitere metachrone Läsionen. Die Wahrscheinlichkeit an einem zweiten primären kolorektalen Karzinom zu erkranken, liegt bei ca. 2% nach 10 Jahren, nach 15 Jahren bei ca. 3,5% und nach 25 Jahren bei ca. 5% (Satia et al., 2004). Auch nach Anlage einer der seltenen Ureterosigmoideostomien wird nach Jahren ein um den Faktor 2 erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines KRK angegeben (Rösch, 1988).

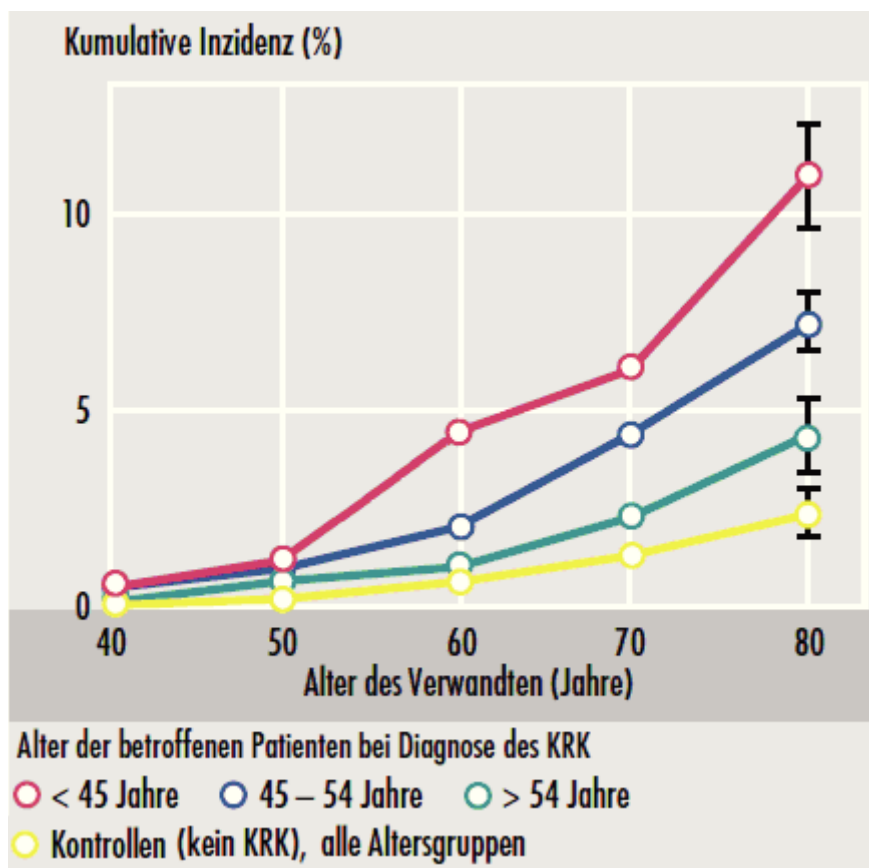


Abbildung 4: Kumulative Inzidenz des KRK bei Verwandten ersten Grades von Patienten mit kolorektalem Karzinom (Mit Genehmigung des Deutschen Ärzteblattes, Neuhaus, 1998)

Entzündliche Darmkrankheiten:

Entzündliche Darmerkrankungen stellen einen KRK-Risikofaktor dar, insbesondere die Colitis ulcerosa. Ein Colitis-assoziiertes Karzinom tritt bei 2–2,5% aller Colitis-ulcerosa-Patienten auf über eine Erkrankungsdauer von 10 Jahren. Im Vergleich zur Normalbevölkerung besteht damit ein zwei- bis achtfach erhöhtes Karzinomrisiko (Söderlund et al., 2009). Zur Abschätzung des Karzinomrisikos spielen drei Faktoren eine wichtige Rolle, die Erkrankungsdauer, ein früher Erkrankungsbeginn bereits im Jugendalter und ein ausgedehnter Befall des gesamten Kolons (Pankolitis).

Bei Morbus Crohn wird ebenfalls ein gering erhöhtes Karzinomrisiko im befallenen Darmsegment diskutiert. Dieses Risiko ist deutlich geringer als bei der Colitis ulcerosa und zumeist mit einem langjährigen schweren Crohn-Befall assoziiert (Triantafillidis et al., 2009).

1.1.3 Klassifikation und Prognose

Histologische Klassifikation:

Adenome stellen etwa 90% der präkanzerösen kolorektalen Läsionen dar und können sowohl solitär als auch multipel vorkommen. Es werden tubuläre, tubulovillöse und villöse Adenome unterschieden. Das Entartungsrisiko kolorektaler Adenome steigt direkt mit der Adenomgröße und ist abhängig vom histologischen Typ und dem Schweregrad der Dysplasie. Tubuläre Adenome mit Durchmessern unter 1 cm weisen eine Karzinomhäufigkeit von unter 1% auf, villöse Adenome gleicher Größe von 10% (Schmoll & Arnold, 2006)

Die Mehrheit der KRK sind Adenokarzinome, andere Karzinome sind selten. Differentialdiagnostisch kommen ferner z. B. Karzinoide, Lymphome und Kaposi-Sarkome in Frage.

Tabelle 1: Häufigkeit der histologischen Zuordnung des kolorektalen Karzinoms, WHO Klassifikation 2000

Histologische Verteilung der Karzinome	
Adenokarzinom	85-90%
Muzinöses Adenokarzinom	5-10%
Siegelringkarzinom	1%
Undifferenziertes Karzinom	<1%
Plattenepithelkarzinom	<0,5%
Adenosquamöses Karzinom	<0,5%
Kleinzelliges Karzinom	<0,5%

Stadieneinteilung:

Die Stadieneinteilung des Kolonkarzinoms erfolgt nach DUKES oder der TNM-Klassifikation („T“ für Tumorinfiltrationstiefe, „N“ für Lymphknotenbefall und „M“ für Metastasierung). Die Klassifikation nach DUKES wurde in den letzten Jahren durch die differenziertere Einteilung der UICC (union of international cancer control) abgelöst, die auf dem TNM-System beruht (s. Tab.2).

Die Fernmetastasen des kolorektalen Karzinoms haben eine Prädisposition für Leber und Lunge, seltener Skelett und Gehirn. Bei manchen Patienten finden sich über längere Zeit ausschließlich Lebermetastasen; bei dieser biologischen Variante liegt ein prognostisch etwas günstigerer Verlauf vor, im Vergleich zu Patienten mit zusätzlichen oder ausschließlich extrahepatischen Metastasen.

Tabelle 2: Klassifikation: TNM, DUKES und UICC

(Genehmigung nach der Creative Commons Public License, Wittekind et al., 2002)

TNM-Einteilung kolorektaler Karzinome [UICC 2002]			
T - Primärtumor			
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden		
T0	Kein Anhalt für Primärtumor		
Tis	Carcinoma in situ		
T1	Tumor infiltriert Submukosa		
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria		
T3	Tumor infiltriert durch die Muscularis propria in die Subserosa oder in nicht peritonealisiertes perikolisches oder perirektales Gewebe		
T4	Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen und/oder perforiert das viszerale Peritoneum		
N - Regionäre Lymphknoten			
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden		
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen		
N1	Metastasen in 1–3 regionären Lymphknoten		
N2	Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten.		
M - Fernmetastasen			
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden		
M0	Keine Fernmetastasen		
M1	Fernmetastasen		
TNM-Stadiengruppierung [UICC 2002]			
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1, T2	N0	M0
Stadium IIA	T3	N0	M0
Stadium IIB	T4	N0	M0
Stadium IIIA	T1, T2	N1	M0
Stadium IIIB	T3, T4	N1	M0
Stadium IIIC	Jedes T	N2	M0
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1

Grading:

Zur Definition des Differenzierungsgrades werden u. a. zytologische Kriterien (Kernatypen, Zellpolymorphien, Mitosezahl) im Vergleich zum Normalgewebe herangezogen. In dieser Arbeit wird die Einteilung der WHO verwendet von „G1“ gut differenziert bis „G4“ undifferenziert. Nach dem Grad der Differenzierung ist ein zweistufiges Grading mit den Kategorien low-grade (G1, G2) und high-grade (G3, G4) ausreichend.

Klinisch-pathologische Prognoseabschätzung:

Die Prognosefaktoren lassen sich in tumor-, patienten- und behandlungsassoziierte Variablen einteilen. Stärkster prognostischer Faktor für das KRK ist die tumorbezogene Variable des TNM-System (Baldus, 2003). Insbesondere die Anzahl der befallenen Lymphknoten ist ein

wichtiger Parameter zur Prognoseabschätzung. Diese kann nur durch eine ausreichende Anzahl untersuchter Lymphknoten gewährleistet werden, gefordert sind mindestens 12 tumorfreie Lymphknoten zur Festlegung eines Stadiums II. Unabhängig davon, ob es nodal positive oder nodal negative Stadien sind, ist die Prognose der Patienten mit einer Vielzahl untersuchter Lymphknoten besser (Le Voyer et al., 2003).

Weitere relevante Prognosefaktoren für Stadium II und III sind Perforation, Obstruktion, Infiltration benachbarter Organe (T4-Stadien), lymphovaskuläre und perineurale Infiltration und ein schlechter Differenzierungsgrad G3.

Die Residualtumorklassifikation der UICC bezeichnet das Fehlen oder Vorhandensein von nachweisbarem Residualtumor (Resttumor) nach erfolgter Behandlung und wird mit dem Symbol „R“ beschrieben. R-0 bedeutet, dass kein Residualtumor nachweisbar ist, während R-1 einen mikroskopisch und R-2 einen makroskopisch nachweisbaren Residualtumor bezeichnet. R-X bedeutet, dass die Residualtumorklassifikation nicht eindeutig möglich ist. Die Unterscheidung R-0 versus R-1, R-2 ist prognostisch höchst signifikant und therapeutisch wichtig in Hinsicht auf adjuvante Therapieverfahren wie Polychemotherapie und Radiatio.

Als wesentlicher behandlungsbezogener prognostischer Faktor hat sich die Expertise des Chirurgen dargestellt v. a. im fortgeschrittenen Tumorstadium (Baldus, 2003).

Neuerdings werden auch Molekularparameter untersucht als potenzielle Prognoseparameter. Es gibt nur sehr uneinheitliche Aussagen dazu, da sich diese noch im experimentellen Status befinden (Conlin et al., 2005)

Tabelle 3: Potenzielle molekulargenetische Prognosefaktoren

Onkogen	• Ras (Nachweis)
	• TGF α (niedrige Expression), TGF β -1 (Nachweis)
	• c-erbB2 (Über-und Unterexpression)
	• EGFR (höhere Expression)
	• c-myc (Nachweis)
Tumorsuppressor-Gen	• p53 (Überexpression)
	• DCC (Nachweis)
	• p27 (fehlender Nachweis)
	• Allelverlust (5q, 17p, 1p) (Nachweis)
Zellproliferation	• PCNA (niedrige Expression)
Angiogenese/ Metastasierung/ Invasion	• Thymidinphosphorylase (Nachweis)
	• Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (Nachweis)
	• Matrix Metalloproteinasen + Inhibitoren (Nachweis v. MMP-1)
	• Urokinase Plasminogen-Aktivator (höhere Expression)
	• CD44 (Nachweis)
intrazell. Zielstruktur der Chemotherapie	• Thymidylate synthase (TS) (höhere Expression)

(Mit Genehmigung des Elsevier Verlags, modifiziert nach Winder und Lenz, 2010)

In Kenntnis all dieser entscheidenden Faktoren wird die Überlebensrate jedoch v. a. vom TNM-Stadium als den Prognosefaktor bestimmt (s. Tab.4).

Tabelle 4: Überlebensrate in Abhängigkeit des Tumorstadiums

UICC-Stadium	TNM	5-Jahres-Überleben [%]
I	T1-2 N0	93
II A	T3 N0	85
II B	T4 N0	72
III A-B	T1-4 N1	83-64
III C	T1-4 N2	44
IV	M1	8

(Mit Genehmigung des Oxford University Press, modifiziert nach O'Connell et al., 2004)

1.2 Apoptose

Der Begriff Apoptose ist griechischen Ursprungs (apo „weg“, ptosis „fallen“) und bezeichnet sinngemäß das Fallen der Blätter im Herbst. Apoptose ist ein aktiver und koordinierter suizidaler Mechanismus eukaryotischer Zellen mit einer bedeutenden Rolle in der embryonalen Entwicklung und der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase im adulten Organismus. Der „programmierte Zelltod“ wurde in den 70iger Jahren erstmalig definiert und dient der Balance zwischen Zellproliferation und Zelltod (Kerr et al., 1972). Bedeutsame Schlüsselmoleküle der Apoptose wurden erstmals in dem Nematoden *caenorhabditis elegans* entdeckt (Horvitz et al., 1994).

Wichtig ist die Abgrenzung zur Nekrose, dem Zelltod mit unkontrollierter Entleerung des Zellinhaltes in die Zellumgebung bei der Zellyse, und dadurch hervorgerufenen Entzündungsreaktionen im Gegensatz zur Apoptose.

Dysregulationen des apoptotischen Programmes haben weitreichende Folgen und führen zum vorzeitigen Zelltod, Entstehung von Autoimmunerkrankungen, neurodegenerativen Erkrankungen oder malignen Tumoren. So können Inhibitoren der Apoptose u. a. das Tumorüberleben ermöglichen trotz zytotoxischer Therapie durch Escapemechanismen (Vuvic et al., 2002).

Der Ablauf der Apoptose lässt sich in drei Phasen unterteilen: der Initiationsphase (Apoptose auslösendes Signal), der Effektorphase (Induktion der Apoptosekaskade) und der finalen Degradationsphase (Phagozytose der Zellreste). Dieser Verlauf ist elektronenmikroskopisch durch eine charakteristische Morphologie der Zellen gekennzeichnet. Die betroffenen Zellen runden sich ab und schrumpfen, wodurch sie sich aus ihrem Zellverband lösen. Die Plasmamembran bildet kleine Vesikel, als „Membran-blebbing“ bezeichnet. Im weiteren Verlauf wird die DNS durch Endonucleasen fragmentiert und das Chromatin kondensiert im Nucleus. Es kommt zur Karyorrhexis und Karyopyknose. Die mitochondriale Membran depolarisiert. Die Zelle zerfällt in kleinere, membranumschlossene Fragmente, die man als „apoptotic bodies“ bezeichnet. Das sich an der Membranoberfläche befindene Phosphatidylserin wird bei Verlust der Membranintegrität externalisiert und dient den Makrophagen, über spezifische Rezeptoren zu erkennen, als Fresssignal. Die Zellüberreste werden phagozytiert bevor sie eine inflammatorische Reaktion hervorrufen können (Karp, 2005).

1.2.1 Apoptosemechanismen

Die Aktivierung des apoptotischen Programmes kann durch zwei prototypische Signaltransduktionswege induziert werden.

Der intrinsische Signaltransduktionsweg beschreibt, die durch strukturelle Veränderungen der Mitochondrien ausgelöste Apoptose, die durch Stressfaktoren, wie z. B. Wachstumsfaktorenentzug, Chemotherapeutika oder ultraviolette Strahlung getriggert wird.

Die Induktion der Apoptose über den extrinsischen Signaltransduktionsweg erfolgt durch Todesrezeptoren, Oberflächenrezeptoren und nach exogener Stimulation.

1.2.1.1.1 Der extrinsische Apoptoseweg

Das Signal des extrinsischen Apoptoseweges, auch als Todesrezeptor-Signalweg bezeichnet, wird mit Hilfe der mehr als 20 Proteine umfassenden Superfamilie der TNF-Rezeptoren (tumor necrosis factor) z. B. TNF-R1, CD95, TRAMP, TRAIL-R1, TRAIL-R2, DR6) in die Zelle übertragen. Charakterisiert sind die TNF-Rezeptoren durch mehrere verschiedene extrazelluläre Domänen, eine Transmembranregion und eine zytoplasmatische Todesdomäne (DD; death domain) aus ca. 80 Aminosäuren, welche eine entscheidende Rolle bei der Signalweiterleitung in die Zelle spielt. Der am besten untersuchte Rezeptor dieser Familie ist CD95 (Apo-1/ FAS) (Peter & Kramer, 2003).

Bei den extrazellulären Liganden der TNF-Familie (CD95L, TNF α , TRAIL, TWEAK und RANKL) handelt es sich um Zytokine, homotrimere Proteine. Nach Ligandenbindung kommt es zur Aktivierung des Rezeptors durch Auslösung einer Trimerisierung, wodurch sich die Todesdomänen aneinander lagern und so aktiviert werden. Es kommt zur Ausbildung des Todesrezeptorkomplexes DISC (death inducing signaling complex) unter Rekrutierung vieler zytosolischer Adapterproteine wie z. B. FADD beim Fas-Rezeptor (Fas-associating protein with death domain). Diese Adapterproteine besitzen ebenfalls eine DD zur Interaktion mit den TNF-Rezeptoren und eine Todeseffektordomäne/ DED (death effector domain) zur Interaktion mit der Pro-Caspase-8 und -7 oder -10. Nach der Aktivierung und der Freisetzung aus dem Todesrezeptorkomplex spaltet die Initiatorcaspase-8 ihre Substrate, v. a. die Effektorcaspasen durch limitierte Proteolyse (Debatin & Fulda, 2004). Durch die Caspase-8 vermittelte Spaltung des pro-apoptotischen Bcl-2-Proteins (B-cell-lymphoma) Bid und der Caspase-6 findet eine Verknüpfung zwischen extrinsischen und intrinsischen Signalweg statt. Somit kann der mitochondriale Apoptose-Signalweg zusätzlich als Verstärkungsmechanismus des extrinsischen Signalweges wirken.

Die Inhibition der Todesrezeptor vermittelten Apoptose geschieht durch direkte Blockade der Rekrutierung von Caspase-8 (= Flice) und FADD durch Bindung von FLIP (Flice inhibiting proteins) an die DED (Yeh et al., 2000).

1.2.1.1.2 Der intrinsische Apoptoseweg

Die Apoptose-Induktion über den intrinsischen Apoptose-Signalweg erfolgt aufgrund zellulären Stresses (s. 1.2.1) und führt zu p53-vermitteltem Zellzyklus-Arrest, DNS-Reparatur oder Apoptose.

Die p53 vermittelte Apoptose wird durch transkriptionelle Expression proapoptotischer Proteine gesteuert. Zu den Zielgenen von p53 gehören essentielle Regulatoren der Apoptose der Bcl-2-Familie. Die Einteilung der verschiedenen Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie basiert auf vier verschiedenen Bcl-2-Homologie-Domänen (BH1-4) (Youle & Strasser, 2008). Mitglieder, die alle vier BH-Domänen aufweisen, wirken anti-apoptotisch (Bcl-2, Bcl-w, Bcl-xL, A1, Mcl-1) und Mitglieder mit weniger Bcl-2-Homologie-Domänen pro-apoptotisch. Das Zusammenspiel der einzelnen Bcl-2-Mitglieder ist bedeutsam für die Induktion der Mitochondrienmembran-Permeabilisierung und damit Zerstörung des mitochondrialen Potenzials. Es kommt zur Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren, wie z. B. Cytochrom C und AIF (apoptosis inducing factor) aus dem Intermembranraum in das Zytoplasma. Cytochrom C übernimmt in vitalen Zellen während der Atmungskette die Elektronenübertragung von Komplex III auf Komplex IV, fungiert aber nach seiner Freisetzung ins Zytosol während der Apoptose als second messenger in der Apoptose. Es bindet in einem ATP-abhängigen Prozess an das Adapterprotein Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1), das u. a. die funktionale Rekrutierungsdomäne CARD (caspase-recruitment domain) besitzt.

Nach der Bindung von Cytochrom C an die geschlossene Apaf-1 Form über WD40-Repeats-Regionen (grün) und der Hydrolyse von dATP kommt es zur Konformationsänderung. Dadurch wird die CARD-Domäne (blau) freigelegt und sieben Apaf-1-Moleküle oligomerisieren zum hochmolekularen Apoptosom-Komplex (Cecconi et al., 1998). Das Apoptosom führt zur Aktivierung der Caspase-9 über eine CARD Interaktion.

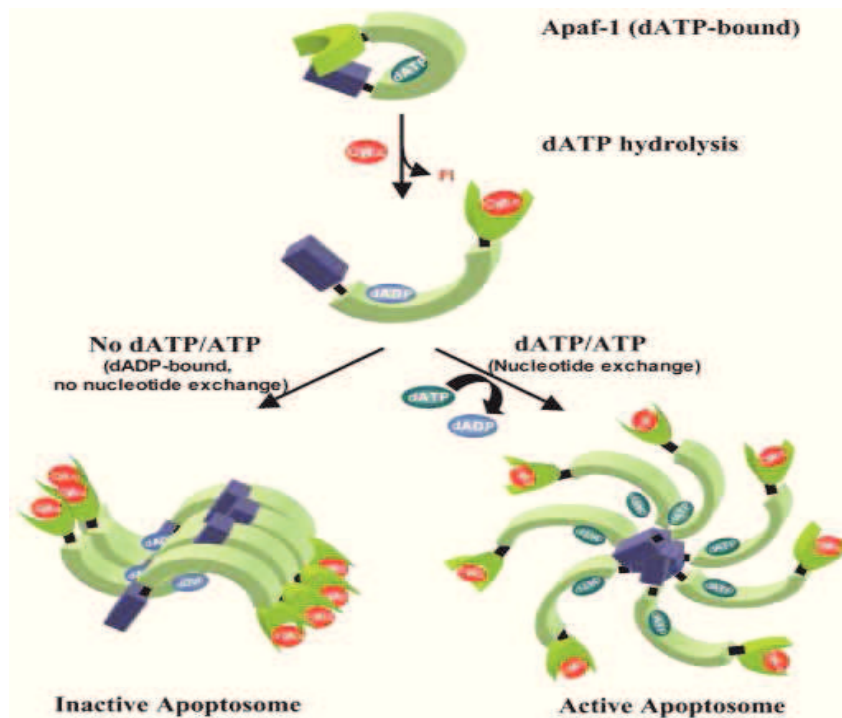


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Apoptosom-Bildung

(Mit Copyright Genehmigung 2014 der National Academy of Sciences USA, Kim et al., 2005)

1.2.1.1.3 Der gemeinsame Effektorweg

Beide Signalwege führen zur Aktivierung von Proteasen, den Caspasen (cysteine-aspartic proteases), die als inaktive Präkursoren/ Zymogene 30-55 kDa ubiquitär synthetisiert werden und v. a. im Zellkern und Zytosol lokalisiert sind. Caspasen sind eine hoch konservierte Familie von Cystein-Proteasen mit einer Spaltspezifität nach Aspartatresten. Bisher sind 11 verschiedene Mitglieder beim Menschen beschrieben. Sie sind analog dem Blutgerinnungssystem hierarchisch geordnet und sequenziell aktiviert (Degterev & Yuan, 2008). Sie werden durch selektive Proteolyse oder Autoprozessierung, also nach dem Modell der „induzierten Proximität“ aktiviert. Sie bestehen aus einer variablen Prodomäne und einer größeren und kleineren Untereinheit (10-20 kDa). Die Heterotetramerstruktur aktivierter Caspasen entsteht durch Abtrennung dieser Prodomäne und einer Komplexbildung zum Dimer zweier Caspasen mit Ausbildung eines gemeinsamen aktiven Zentrums. Es wird nach der Sequenz der Aktivierung unterschieden Initiator-Caspasen, zu denen Caspase-2, -8, -9, und -10 gehören und den Effektor-Caspasen wie z.B. Caspase-3, -6 und -7. Initiatorcaspasen werden über bestimmte Adaptermoleküle autokatalytisch aktiviert und aktivieren dann die Effektor-Caspasen, die daraufhin über eine Reihe von Zielproteinen die Apoptose einleiten z. B. die Aktivierung der CAD (Caspase aktivierte DNase) durch Caspase-3 (Salvesen & Dixit, 1999).

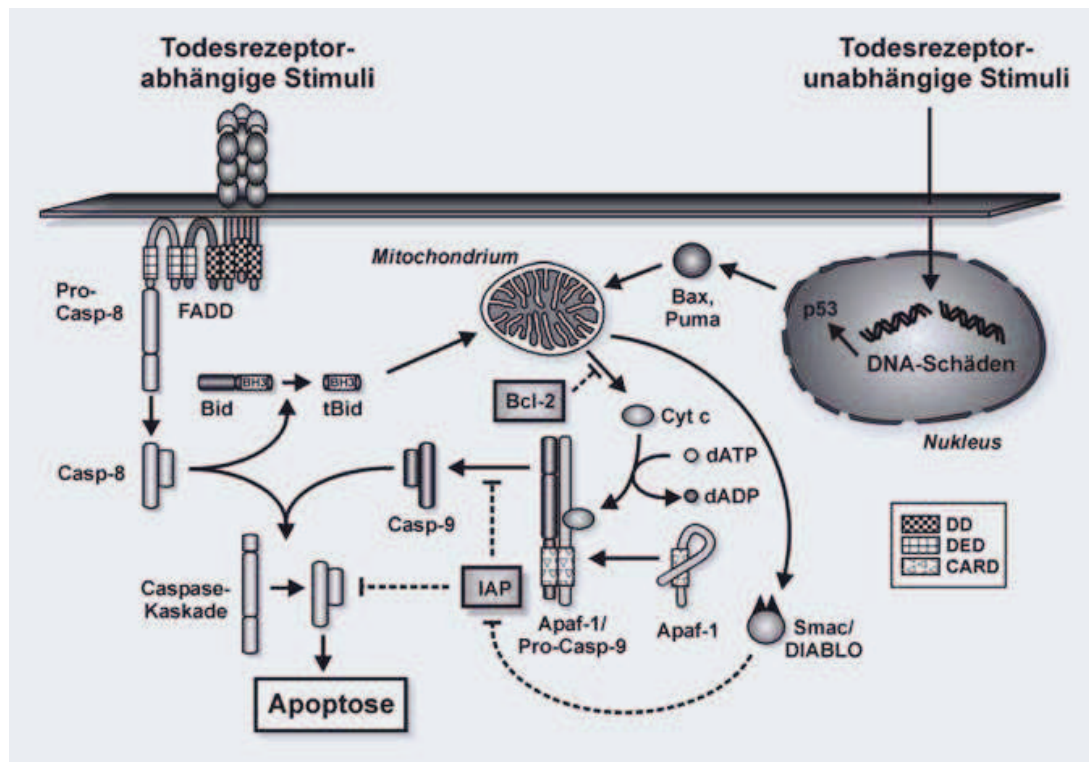


Abbildung 6: Apoptoseinduktion über den extrinsischen und intrinsischen Signaltransduktionsweg
(Mit freundlicher Genehmigung der Springer Science + Business Media, Lauber et al., 2004)

1.2.2 Familie der „Inhibitor of Apoptosis Proteins“ (IAP)

Proteine der „Inhibitor of Apoptosis“-Familie sind Moleküle, die auf unterschiedliche Weise in die Regulation der Apoptose eingreifen. Erstmals wurden IAP-kodierende Sequenzen im Genom von Baculoviren entdeckt und es konnte gezeigt werden, dass IAP an der Unterdrückung des Zelltodes von Baculovirus-infizierten Wirtszellen beteiligt sind (Crook et al., 1993). Seit kurzem ist bekannt, dass IAP auch nichtapoptotische Funktionen haben wie z. B. im Kupfer-Haushalt, der intrazellulären Signalweiterleitung (MAP-kinase, NF- κ B), der Zellmigration und -teilung. Diese nichtapoptotischen Signalwege und deren Interaktion durch IAP sind bisher nur in Ansätzen verstanden und Gegenstand weiterer Untersuchungen (Srinivasula & Ashwell, 2008).

1.2.2.1.1 Molekulare Struktur der Apoptoseinhibitoren IAP bzw. BIRC

Beim Menschen sind aus der Familie der IAP-Proteine bisher acht Mitglieder bekannt (s. Abb. 7):

- 1.) X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP; alternativ BIRC4)
- 2.) cellular IAP1 (c-IAP1 alternativ BIRC2)

- 3.) c-IAP2 (alternativ BIRC3)
- 4.) Neuronal apoptosis inhibitor protein (NAIP alternativ BIRC1)
- 5.) Survivin (alternativ BIRC5)
- 6.) Apollon (alternativ BIRC6 oder BRUCE)
- 7.) Melanoma IAP (ML-IAP alternativ BIRC7 oder Livin)
- 8.) IAP-linked protein 2 (ILP2 alternativ BIRC8)

Definierend für die IAP-Familie ist das Vorhandensein von mindestens einer bis max. drei BIR (= Baculovirus IAP repeat)-Domänen. Neben dieser Domäne gibt es weitere variable Domänen, die RING, Ubc, LRR, NOD und CARD-Domäne, die jeweils nur in einzelnen IAP Mitgliedern enthalten sind.

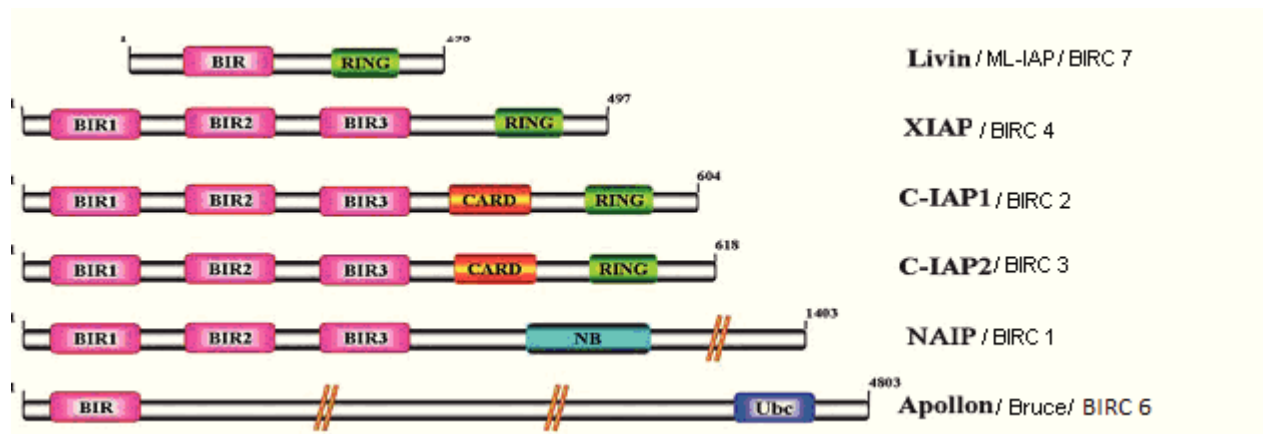


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Domänenverteilung der acht humanen IAP-Familienmitglieder: BIR, RING, CARD, Ubc und NB

(Mit Genehmigung der American Association for Cancer Research, modifiziert Wang et al., 2008)

Bei der BIR-Domäne handelt es sich um hochkonservierte Regionen von etwa 70-80 Aminosäuren am NH₂-terminalen Ende, die essentiell für die antiapoptotische Funktion der IAP sind (Takahashi et al., 1998). Mit der BIRC (BIR-containing protein) einer alternativen Terminologie wird versucht, eine neue Nomenklatur dieser Proteinfamilie einzuführen, die sich mehr an deren Struktur als an deren Aufgaben orientiert, wobei nicht alle BIRC antiapoptotisch wirksam sein müssen.

XIAP, c-IAP1, c-IAP2, NAIP und Livin (s. 1.2.4.) besitzen neben der BIR-Domäne auch eine RING (Really interesting new gene)-Domäne am COOH terminalen Ende, einem Zinkfinger Motiv, bestehend aus 6-7 Cystein und 1-2 Histidin Aminosäuren mit zwei Zinkionen verbunden. Diese RING-Domäne enthaltenen IAP besitzen eine E3 Ubiquitin-Ligase Aktivität, durch die ein Substrat spezifisch gebunden werden kann und nach Mono- oder Polyubiquitinierung im Proteasom proteolytisch abgebaut wird. Durch Homo- oder Heterodimerisierung mit den RING-

Domänen können IAP auch autodegradieren. Die Notwendigkeit der RING-Domäne für die antiapoptotische Funktion scheint abhängig zu sein vom zellulären Kontext (Vaux & Silke, 2005; Srinivasula & Ashwell, 2008).

Die Ubc-Domäne (ubiquitin conjugating domain) ist nur in BRUCE enthalten (Hauser et al., 1998). Die Funktion von Ubc ist ähnlich der RING-Domäne eine unterstützende Verbindung zwischen Apoptose und dem Ubiquitin Proteasom Signalweg (Deveraux & Reed, 1999).

Die c-IAP1 und c-IAP2 haben zusätzlich eine CARD Domäne, zwischen den BIR-Domänen und der RING-Domäne gelegen, deren Funktion und Struktur noch unbekannt ist, aber möglicherweise nicht unbedingt erforderlich ist für die antiapoptotische Fähigkeit. Die CARD-Domäne dient wahrscheinlich der Protein-Protein-Interaktion mit anderen CARD-Domänen, v. a. von Caspasen (Park et al., 2007).

NAIP besitzt neben den drei BIR-Domänen eine NOD-Domäne (nucleotide-binding oligomerization domain) und eine C-terminale LRR-Domäne (leucine-rich repeat). Diese Domänen regulieren die NAIP BIR Interaktion mit Caspase-9 (Davoodi et al., 2004).

1.2.2.1.2 Wirkungs- und Regulationsweise der IAP Proteine

Die zerstörerische proteolytische Aktivität von Caspasen erfordert eine strikte Kontrolle ihrer Aktivierung und Effektorfunktion, diese wird ausgeübt durch die IAP-Familie (Deveraux & Reed, 1999). IAP schützt vor Apoptose, die induziert wird durch TNF Alpha, Fas-Ligand, Adaptermoleküle der TNF-Superfamilie wie z. B. RIP, FADD, proapoptotischen Mitgliedern der Bcl-Familie (BIK, BAK), Cytochrom C, Chemotherapeutika (Etoposid, Cisplatin, Taxol), UV-Strahlung, Ischämien und zahlreichen viralen Infektionen (LaCasse et al., 1998). Über ihre BIR-Domäne können IAP-Proteine an Caspasen binden und inaktivieren (Deveraux & Reed, 1999). Obwohl die verschiedenen BIR-Domänen strukturell ähnlich sind, zeigen sie Unterschiede in ihrer Caspase-Spezifität. Bei IAP-Proteinen mit drei BIR-Domänen (XIAP, c-IAP1, c-IAP2) vermittelt die dritte BIR-Domäne die Bindung an die prozessierte Form von Caspase-9. Diese Interaktion verhindert die Homodimerisierung und Aktivierung der Caspase-9. Mittels der BIR2-Domäne und einer N-terminal benachbarten Region wird die Bindung der IAP an die aktiven Caspasen-3 und -7 vermittelt. Diese Bindung verhindert die Caspase-Interaktion mit zellulären Substraten. ILP-2 kann mit seiner einzelnen BIR-Domäne nur an Caspase-9 binden. Survivin bindet mit seiner einzelnen BIR-Domäne an Caspase-3 und -7 und Livin an Caspase-3, -7 und -9 (Shiozaki et al., 2003, Liston et al., 2003).

Die IAP Aktivität wird physiologisch auch gegenreguliert. Die Mechanismen sind noch nicht in Gänze aufgeklärt, es bestehen aktuell drei Erklärungsansätze: Kontrolle durch transkriptionelle/

posttranskriptionelle Prozesse, Regulation über die Stabilität und Kontrolle über regulierende Proteine (Salvesen & Duckett, 2002).

Transkriptionelle und posttranskriptionelle Kontrolle geschieht einerseits über die E3 Ubiquitin Ligase Aktivität der RING-Domäne (s. o.) und andererseits über Induktion der IAP z. B. für XIAP und c-IAP2 durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B.

Direkte Antagonisten der IAP sind die regulierenden, mitochondrial lokalisierten Proteine SMAC (second mitochondrial activator of caspases) im Mensch bzw. DIABLO (direct IAP binding protein with low pI) bei der Maus und Omni/ HtrA2 (high temperature requirement A 2) gebunden an Cytochrom C. Bei Apoptosestimuli lösen sich diese Proteine aus dem mitochondrialen Verband, werden dadurch aktiviert und binden mittels ihrer IBM (IAP-binding motif) an die BIR-Domäne von XIAP, c-IAP1, c-IAP2, Survivin und Livin und wahrscheinlich auch anderer IAP (Verhagen et al., 2007, Hedge et al., 2002). Durch die Bindung an die BIR- Domäne der IAP können diese nicht mehr mit den Caspasen interagieren.

1.2.3 Tumorbiologische Relevanz der IAP für den Gastrointestinaltrakt

Die Unterdrückung der Apoptose ist häufig ein bedeutsamer Faktor der Karzinogenese. Zahlreiche Untersuchungen konnten zeigen, dass die IAP Expressionsrate z. B. von Survivin deutlich erhöht war in Tumorgewebe im Vergleich zu Normalgewebe (z. B. Mamma, KRK, Lymphom, Neuroblastom) und dass dies mit einer schlechteren Prognose für die Patienten einherging (Duffy et al., 2007). Wahrscheinlich tragen die IAP zur Chemoresistenz bestimmter Tumore bei. Dies ist auch ein therapeutischer Ansatzpunkt in der Target-Therapie, durch Aktivierung von Apoptosesignalwegen und anschließender sensitivierter Chemotherapie oder Radiatio.

1.2.4 Livin

Livin, auch ML-IAP/ BIRC7 oder KIAP (kidney IAP) genannt, besitzt eine einzelne BIR-Domäne am NH₂-terminalen Ende und eine carboxyterminale RING-Domäne (Lin et al., 2000; Vucic et al., 2000). Der genomische Locus liegt auf Chromosom 20q13, bestehend aus sechs Introns und Exons, einer Region die häufiger bei Karzinomen amplifiziert ist, v. a. bei Melanomen, KRK und Bronchialkarzinomen (Pitti et al., 1998).

Livin antagonisiert den intrinsischen mitochondrialen Apoptosesignalweg durch Inhibition der Initiatorcaspase-9, der Effektorcaspasen-3 und -7 oder indirekt durch Sequestrierung und Degradierung des IAP-Antagonisten SMAC (Kasof & Gomes, 2001). Das Ausmaß der Caspase-Inhibierung durch Livin ist jedoch deutlich geringer ausgeprägt als durch XIAP. Livin wirkt

auch antiapoptotisch durch Inhibition des extrinsischen Apoptosesignalweges insbesondere über Fas, TNFR1, DR4 und DR65 Rezeptoren (Duckett, 2005; Vucic et al., 2005).

Alternativer Mechanismus der Apoptoseinhibition durch Livin ist die selektive Aktivierung der Jun NH2-terminalen Kinase 1 (JNK1) über die Aktivierung des TAK1 (transforming growth factor beta activated kinase-1)/ TAB1 (TAK1-binding protein)-Signalweges. Im kleinzelligen Brochialkarzinom war ein Anstieg der Livinpromoter-Aktivität durch Beta-Catenin Aktivierung zu beobachten, der Mechanismus ist jedoch noch unklar (s. Abb. 8).

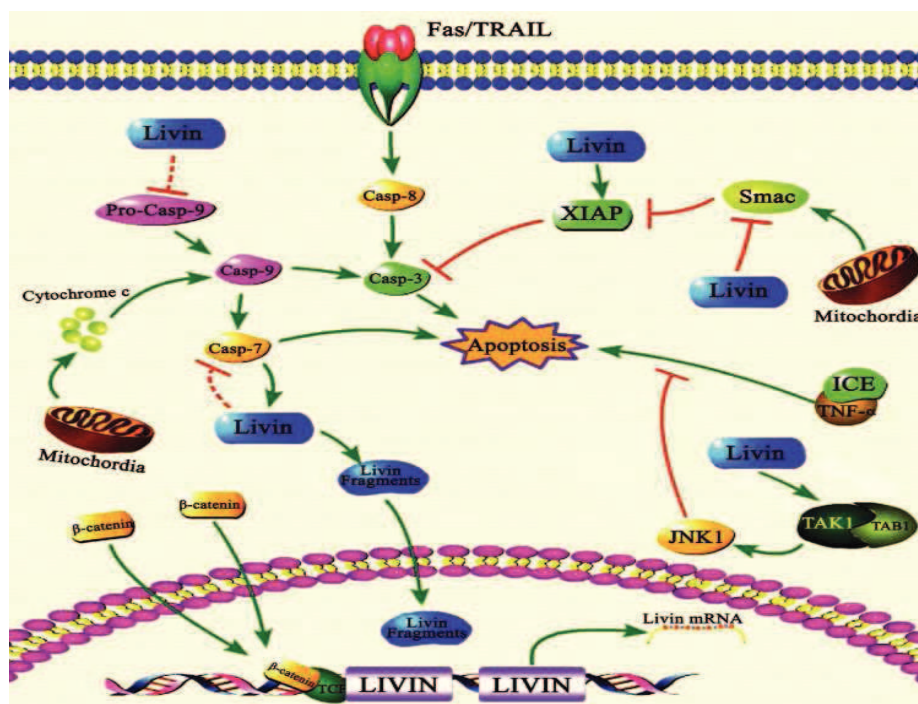


Abbildung 8: Potenzielle Mechanismen der Interaktion von Livin in der Apoptose

(Mit Genehmigung der American Association for Cancer Research, modifiziert Wang et al., 2008)

Durch alternatives Splicing des Livins entstehen zwei Isoformen unterschiedlicher Größe, Isoform α mit 298 Aminosäuren und Isoform β mit 280 Aminosäuren (Ashhab et al., 2001).

Die beiden Proteine unterscheiden sich in einer 18 Aminosäure langen Region zwischen der BIR- und der RING-Domäne, die nur in der Alpha-Isoform vorhanden ist (Abb. 9).

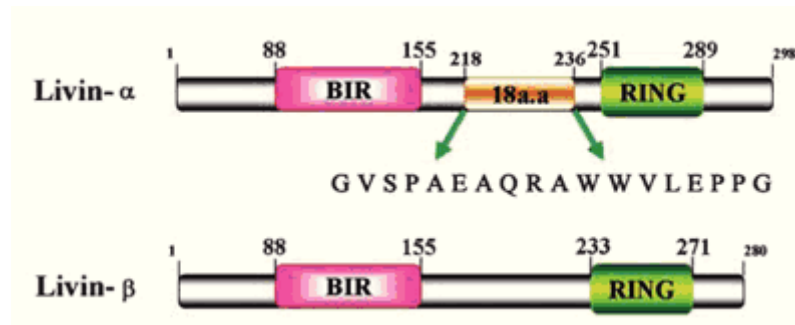


Abbildung 9: Die zwei Livin Splicevarianten α und β mit der Auflistung der 18 Aminosäuren langen Region, die in Livin β fehlt

(Mit Genehmigung der American Association for Cancer Research, modifiziert Wang et al., 2008)

Initial konnten keine funktionellen Unterschiede zwischen den Isoformen festgestellt werden (Vucic et al., 2000). Spätere Untersuchungen beobachteten verschiedene apoptotische Eigenschaften, die in Abhängigkeit vom Zelltyp und apoptotischem Stimulus variierten (Ashhab et al., 2001). Für Livin β konnte neben der antiapoptotischen Funktion auch eine proapoptotische Funktion nachgewiesen werden.

Zunächst wurde Livin als Melanom-assoziiert beschrieben, da es in Melanomen entdeckt wurde "Melanoma-linked-IAP" (ML-IAP) (Vucic et al., 2000). Dabei wurde in Melanomzellen eine direkte Korrelation zwischen der Resistenz gegenüber Apoptose und dem Expressionsspiegel von Livin beobachtet (Nachmias et al., 2003). Inzwischen konnte die Expression von Livin in einer Vielzahl weiterer Tumorarten u. a. Blasenkrebs (Gazzaniga et al., 2003), Lungenkrebs (Crnkovic-Mertens et al., 2006), Pankreastumoren (Lopes et al., 2007), Leukämien (Choi et al., 2007), Nierenzellkarzinomen (Crnkovic-Mertens et al., 2007), Mesotheliomen (Gordon et al., 2007), Astrozytomen (Liu et al., 2006), Neuroblastomen (Kim et al., 2005) und Nasopharynxkarzinomen (Xiang et al., 2006) nachgewiesen werden.

Livin konnte in Tumorzellen, fetalen Geweben und in einigen adulten Normalgeweben detektiert werden, wie Plazenta, Hoden, Thymus, Lymphknoten, Herz, Milz, Eierstöcken, Niere, Skelettmuskel, Gehirn, peripheren Blutlymphozyten und Lunge (Lin et al., 2000; Vucic et al., 2000; Ashhab et al., 2001; Kasof & Gomes, 2001; Gordon et al., 2007). Dabei waren die Livin-Konzentrationen im Normalgewebe jedoch deutlich geringer als in Tumoren (Ashhab et al., 2001). Die präferentielle Expression von Livin in Tumoren sowie seine dokumentierten antiapoptotischen Aktivitäten in Tumorzellen könnten Livin zu einem interessanten therapeutischen Zielmolekül machen (Chang & Schimmer, 2007; Liu et al., 2007).

1.3 Fragestellung der Arbeit

Wie vorbestehend dargestellt erfolgt die Regulation von Zellproliferation und Zelltod durch eng miteinander verknüpfte Signalwege.

In normalem adulten Gewebe besteht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Zellproliferation durch mitotische Teilung und Zelluntergang durch regulierten Zelltod.

Im Rahmen der malignen Genese und Progression ist häufig eine weitere Inaktivierung von Zelltodsignalwegen festzustellen.

Apoptosedefekte in Tumoren korrelieren daher häufig mit einem ungünstigem Verlauf der Erkrankung und sind deshalb prognostische Faktoren, die für die Risikoabschätzung genutzt werden können. Die Apoptosedefekte in Tumorzellen begünstigen zudem die Metastasierung der Tumorzellen in anderen Regionen des Körpers.

So konnte bei vielen verschiedenen Tumoren gezeigt werden, dass Livin im Rahmen der Karzinogenese überexprimiert wurde. Bisher wurde aber noch nicht molekulargenetisch die Expression von Livin mRNA in Abhängigkeit der Tumorprogression und klinischer Faktoren im kolorektalen Karzinom auf die Wertigkeit als unabhängiger prognostischer Faktor untersucht.

Da sich zum Diagnosezeitpunkt 30% der KRK in einem nicht mehr kurativ resektablen Stadium befinden und ca. 50% der Patienten ein Lokalrezidiv oder Metastasen entwickeln, wäre die Detektion eines prognostischen Faktors v. a. für die weitere Therapie von großer Bedeutung.

In dieser Arbeit sollten dazu folgende Fragen geklärt werden:

1. Liegt eine Überexpression von mRNA-Livin Alpha im kolorektalen Karzinom vor?
2. Ist eine Korrelation zwischen mRNA-Livin Alpha Expression und TNM Kategorie bzw. Grading nachweisbar?
3. Besteht ein Zusammenhang zwischen dem Expressionsgrad von mRNA-Livin Alpha und der Tumorlokalisation?
4. Hat die Expression von mRNA-Livin Alpha prognostische Relevanz für das Langzeitüberleben?
5. Stellt Livin einen unabhängigen Tumormarker für das kolorektale Karzinom dar?

2 Materialien

2.1 Gewebeproben und Patientengut

Das verwendete Tumormaterial mit assoziiertem Normalgewebe aus Operationspräparaten wurde von Pathologen der Universitätsklinik Düsseldorf von 1997 bis 2002 asserviert (Ethikantrag Nr. 3821).

Das entnommene Gewebe wurde nach der Gewinnung zeitnah, d. h. innerhalb von 20 Minuten nach der Tumorresektion in der Allgemein- und Viszeralchirurgie der Universitätsklinik Düsseldorf, in sterilen 2 ml Eppendorf Tubes konserviert und bei -80°Grad eingefroren. Die Tumorproben wurden durchnummeriert und mit den verfügbaren klinischen Daten in die Tumordatenbank aufgenommen. Die histologische Charakterisierung und Reklassifizierung des Patientenmaterials nach der gültigen WHO-Klassifikation des Jahres 2002 (s. 1.1.3) erfolgte durch Prof. Dr. med S. E. Baldus, Oberarzt des Institutes für Pathologie der Heinrich Heine Universität anhand der eigenständig gefertigten HE-Schnitte. Das Tumorgewebe wurde ab einem Anteil von 80% maligner Zellen für die aktuelle Untersuchung verwendet.

Insgesamt wurden 139 Patienten mit jeweiligen Tumor- und assoziierten Normalgewebe für diese Arbeit untersucht. Ausgeschlossen werden mussten 49 der Probenpaare bei Nachweis einer hereditären Genese, unzureichender Präparatgröße oder fehlender Probe. Nach histologischer Durchsicht wurde das Material von 3 Patienten wegen eines Tumoranteils geringer als 80% des Gesamtpräparates oder Adenom-Nachweis für weitergehende Analysen nicht verwandt. Bei 87 Patienten (insgesamt 174 Proben) wurde die RNS-Extraktion und anschließender Qualitätsüberprüfung mittels Bioanalyzer durchgeführt. 40 der Proben konnten für die weitergehenden Untersuchung nicht verwendet werden wegen RNS-Defragmentierung bzw. unzureichender RNS-Konzentration. Der Basisdatensatz dieser Arbeit für die Livin-Expressions-Analysen begründete 47 Probenpaare.

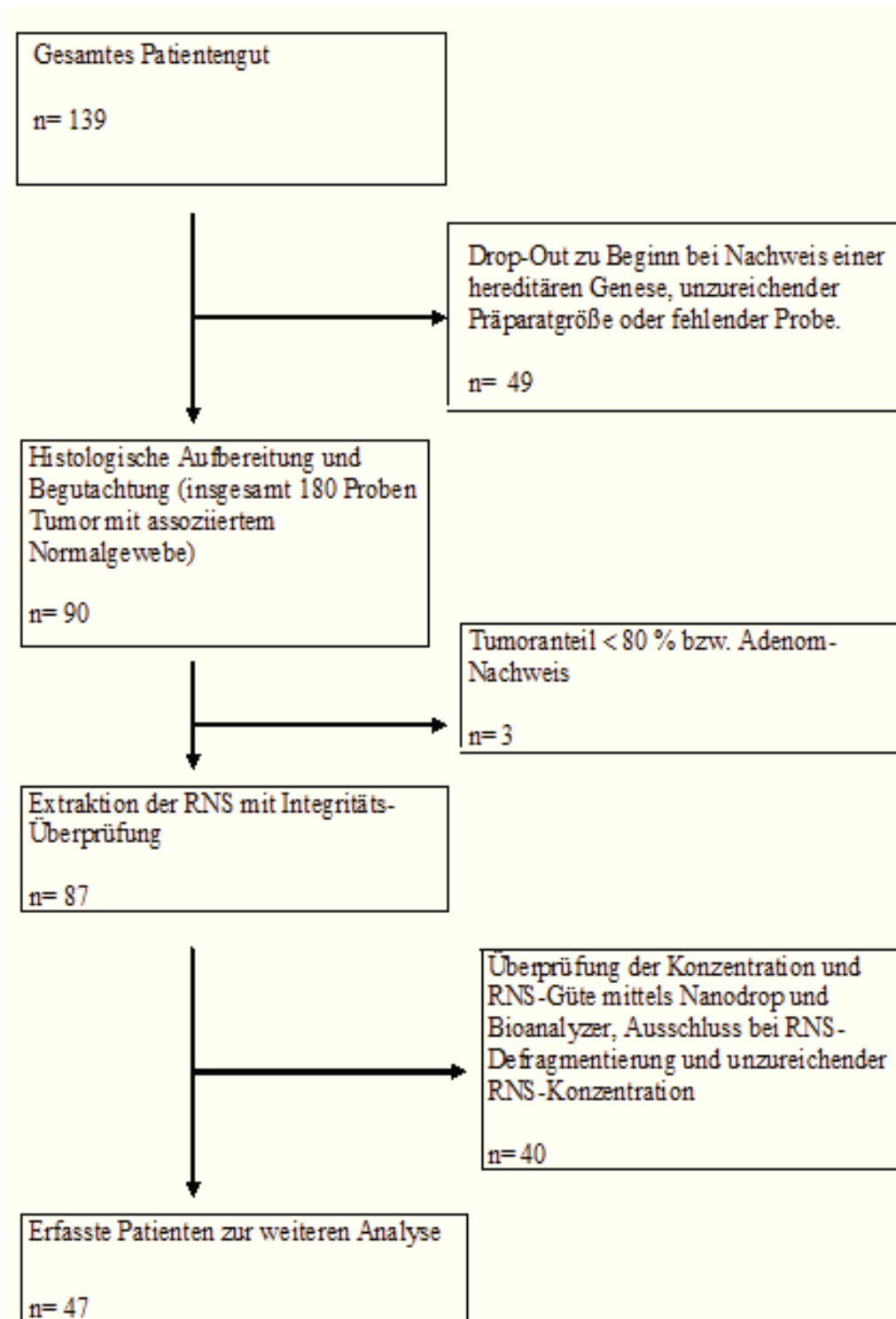


Abbildung 10: Untersuchtes kolorektales Probenkollektiv des pathologischen Institutes der Universität Düsseldorf als Flussdiagramm

Tabelle 5: Kolorektales Probenkollektiv des pathologischen Institutes der Universität Düsseldorf

FALLNR.	GESCHLECHT	PT	N	M	R	G	STUDIENBEGINN
2	w	1	0	0	0	2	1997
4	m	3	3	0	0	2	1997
10	w	3	0	0	0	3	1997
13	w	3	1	0	0	3	1997
16	w	3	3	0	0	3	1997
17	w	3	0	0	0	3	1997
18	w	3	3	0	0	2	1997
19	w	3	2	0	0	2	1997
21	m	3	1	0	0	3	1997
22	w	3	1	0	0	3	1997
24	m	4	2	1	1	3	1997
29	w	4	0	0	0	2	1997
30	m	2	0	0	0	2	1997
35	m	4	0	0	0	2	1998
38	m	2	0	0	0	2	1998
42	m	2	0	0	0	0	1998
43	m	3	2	0	0	3	1998
45	m	3	2	0	0	3	1998
60	m	4	2	0	0	3	1998
61	m	2	0	0	0	2	1998
65	w	3	2	0	0	2	1998
66	m	3	1	0	0	3	1998
70	w	4	2	0	0	3	1998
71	w	3	2	1	1	2	1998
74	w	1	0	0	0	2	1998
75	m	3	1	0	0	2	1998
81	m	2	0	0	0	2	1998
96	w	2	0	0	0	2	1999
97	m	4	2	1	1	3	1999
98	w	4	2	0	0	4	1999
105	w	3	2	0	0	2	1999
107	m	3	1	0	0	2	1999
109	m	2	2	0	0	2	1999
111	m	3	0	0	0	2	1999
112	w	3	0	0	0	2	1999
114	m	3	1	0	0	2	1999
115	m	3	0	0	0	2	1999
116	w	3	2	0	0	2	1999
121	m	3	0	0	1	3	1999
126	w	3	1	0	0	2	1999
127	w	3	0	0	0	2	1999
129	m	3	0	0	0	2	1999
212	m	3	1	0	0	2	2001
213	w	3	0	0	0	1	2001
214	w	4	1	0	0	3	2001
215	w	3	0	0	0	2	2001
216	m	2	0	0	0	2	2001

2.2 Chemikalien

2.2.1 Flüssigkeiten und Feststoffe

Substanz:	Hersteller / Lieferant:
Agarose, Peq Gold universal	Peq Lab, Erlangen
Aqua dest.	Braun, Sembach, Schweiz
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
DEPC	Sigma-Aldrich, Steinheim
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Eosin	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromidlösung 10 mg/ml	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Merck, Darmstadt
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
Methanol pro analysis	Merck, Darmstadt
Orange G	Fermentas, St. Leon-Rot, Schweiz
2-Propanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Stickstoff	Universitätsklinikum, Düsseldorf
Tris	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tri-Reagent® (Trizol)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Xylencyanol	Merck, Darmstadt
Xylol	Merck, Darmstadt

2.2.2 Medien, Puffer und Lösungen

TBE- Puffer 10x fach auf 1 Liter:

108 g	Tris
55 g	Borsäure
40 ml	0,5 M EDTA ph 8,0
ad 1 Liter dest. H ₂ O	

EDTA 0,5 M ph 8,0

18,6 EDTA-Dinatriumsalz
+ 80 ml Aqua dest.

DEPC-behandeltes Wasser

2 ml Diethyl-Pyrocarbonat
auf 1 Liter Aqua dest.

über Nacht unter dem Abzug rühren lassen, am nächsten Tag 40 min bei 121°C autoklavieren, anschließend 1 ml Aliquots bilden und bei -20°C einfrieren.

Gel Ladepuffer für DNS 10 ml Ansatz

25 mg Bromphenolblau
25 mg Xylencyanol
3,45 ml Glycerol
ad Aqua dest. auf 10 ml Gesamtvolumen

2.3 Nukleinsäuren

2.3.1 DNS–Längenstandards

DNS Leiter 50 bp	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
DNS Leiter 20 bp	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen

2.3.2 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma biomers aus Ulm bezogen als gereinigte Lyophilisate. Für die RT-PCR im Light-Cycler® wurden 38 µM Lösungen hergestellt.

Tabelle 6: Verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')	Produktgröße
GAP-DH sense	acg gat ttg gtc gta ttg ggc g	211 bp
GAP-DH antisense	ctc ctg gaa gat ggt gat gg	
Livin Alpha revers	cac tca gca cag acc agg t	179 bp
Livin Alpha forward	gcc agg agg ggt cag tcc a	

2.4 Molekularbiologische Kits

RNeasy Mini Kit®	Qiagen, Hilden
Reverse Transkription System (AMV)®	Promega, Mannheim
MMLV-RT RNase H Minus®	Promega, Mannheim
QuantiTect SYBR Green PCR Kit®	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit®	Qiagen, Hilden

2.5 Hilfsmittel

2.5.1 Verbrauchsmaterialien

Objekt:	Hersteller/Lieferant:
Deckglas	Menzel Gläser, Hamburg
Reaktionsgefäß (0,5-2 ml)	Eppendorf, Hamburg
EuKit	Kindler, Freiburg
Falcon Tube	Greiner, Frickenhausen
Halbmikroküvette UVette	Eppendorf, Hamburg
Korkscheibe (20 nm)	Slee, Mainz
Light-Cycler-Kapillare	Roche, Mannheim
Mehrzweckgefäß für Gewebe	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Objektträger (76x26mm)	Engelbrecht, Edermünde
Parafilm	American National Can TM, Chicago, USA
Pipettenspitze, gestopft	Biozym, Hess. Oldendorf
Pipettenspitze, ungestopft	StarLab, Ahrensburg
Reaktionsgefäß Safe lock 1,5 ml	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
(Gel) Tissue-Tek	Sakura Fintek B.V., Zoeterwoude, NL

Trockeneis

Universitätsklinik, Düsseldorf

2.5.2 Laborgerät

Gerät:

Hersteller / Lieferant:

Agagel Standard G45/1

Biometra, Göttingen

Analysenwaage

Sartorius AG, Göttingen

Autoklav

Systec, Wetttenberg

Biophotometer RS 232C

Eppendorf, Hamburg

Bioanalyzer 2100®

Agilent, Santa Clara Technologies, USA

Kühlschrank

Liebherr AG, Bulle, Schweiz

Kryostat HM 550®

Microm, Walldorf

Light-Cycler®

Roche, Mannheim

Magnetrührer MR3001

Heidolph, Schwabach

Mikrowelle

Micromat, AEG, Nürnberg

Mikroskop

Leica/ Leitz, Wetzlar

pH-Meter

Beckman, Krefeld

Pipette

Eppendorf, Hamburg

NanoDrop ND-1000®

NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, USA

NanoDrop-ND 1000 Spektrophotometer®

Eppendorf, Hamburg

Thermomixer compact

Eppendorf, Hamburg

Tiefkühltruhe -80°C

Hettich, Tuttlingen

UV-Transilluminator 312 nm

Biometra, Göttingen

Vortexer MSR Minishaker

IKA Works, Wilmington, USA

Zentrifugen:

Mikro 22 R

Hettich, Tuttlingen

Micro D

Denver Instrument, Denver, USA

2.5.3 Software und Server

Verwendete Software-Programme

Roche Light-Cycler Software; Version 3,5

Biometra BioDocAnalyze rev. 1.1.5.3.

IBM SPSS; Version 18

Microsoft Office Excel; Version 2003

Verwendete Server

BLAST <http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

PubMed <http://ncbi.nlm.nih.gov>

Primer3 Input, Version 3.0 <http://frodo.wi.mit.edu>

3 Methoden

3.1 Gewebeaufbereitung und -verarbeitung

Die bei -80°C aufbewahrten Proben wurden mit Trockeneis transportiert und für die Schnittaufbereitung in einem inerten Gel fixiert und direkt mit Stickstoff schockgefroren, um die Kühlkette nicht zu unterbrechen.

Anschließend wurden die Proben in einem gesäuberten und mit RNS freien Alufolien ausgeklebten Kryomikrotom bei -20°C getrimmt. Pro Probe wurde dann durchschnittlich 30 bis 40 $10\text{ }\mu\text{m}$ dicke Schnitte gefertigt, die in ein mit 1 ml Trizol gefülltes 1,5 ml Eppendorf Tube überführt wurden. Um sich des Normal- bzw. Tumorgewebsanteil der verwendeten Proben zu versichern, wurde vor Materialentnahme und danach ein $7\mu\text{m}$ Schnitt gefertigt.

Dieser wurde HE gefärbt, in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol fixiert, in Eukitt gebettet zur Konservierung und durch Oberarzt Prof. Dr. med S. E. Baldus untersucht.

3.2 RNS-Extraktion

3.2.1 RNS-Isolierung aus kolorektalem Kryogewebe

Zur Isolierung der tRNS aus humanem kolorektalen Kryogewebe wurde Tri-Reagent® (Trizol) der Firma Sigma verwendet. Dies ist eine Lösung aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat, die sowohl DNS als auch RNS isoliert und eine Modifizierung des klassischen „single step method“ Phenol-Chloroform Verfahrens zur RNS Extraktion nach Chomczynski und Sacchi darstellt.

Es wurde dazu wie folgt vorgegangen: Die in Trizol enthaltenen Gewebsschnitte (s. 3.1) wurden durchmischt bis sich das Gewebe homogen lysierte. Dann wurden 200 μl Chloroform hinzugegeben zur Phasentrennung und für 10 sec erneut durchmischt bis sich eine milchige Suspension ausbildete. Das Gemisch wurde dann für 15 min bei 12000 g und 4°C zentrifugiert. Die Lösung konnte so in eine wässrige und organische Phase getrennt werden. Das RNS Extrakt befand sich in der oberen wässrigen Phase, die DNS in der mittleren und Proteine in der unteren, organi-

schen, oder in der mittleren Phase. Die obrige wässrige Phase wurde mit einer Pipette vorsichtig abgehoben, dabei wurde darauf geachtet nichts von den unteren Schichten mit zu überführen um keine Verunreinigung zu verursachen. Die gelöste RNS wurde mit 500 µl gekühltem Isopropanol versetzt. Über Nacht bei -20°C wurde dann die Fällung abgewartet. Anschließend wurde die Lösung für 10 min bei 12000 g und 4°C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das RNS Pellet wurde zweimal mit je 500 µl gekühltem 70% Ethanol gewaschen, für 5 min bei 7500 g und 4°C abzentrifugiert und der Überstand erneut verworfen und z. T. mit der Pipette abgenommen.

Um das Pellet vollständig zu trocknen wurde das Reaktionsgefäß für 10-20 min bei geöffnetem Deckel unter den Abzug gestellt.

Das gereinigte und getrocknete RNS-Pellet wurde dann in 20 µl RNS freiem DEPC-Wasser eluiert und sofort in ein Eisbad gestellt. Zur Verhinderung der Ausbildung von Sekundärstrukturen wurde die RNS für 10 min bei 70°C im Heizblock inkubiert.

Die Lagerung der isolierten RNS erfolgte bei -80°C.

3.2.2 Reinheits- und Konzentrationsbestimmung mit Nanodrop und Photometrie

Die Konzentration der RNS Proben wurde mittels des NanoDrop-ND 1000 Spektrophotometer® im Doppelversuch bestimmt.

Die Richtigkeit und Zuverlässigkeit der RNS-Messungen durch den NanoDrop® wurden mit dem konventionellen UV-Spektrophotometer durch Vergleichsmessungen überprüft.

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration wurde spektrophotometrisch durchgeführt anhand der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge. Die Messung erfolgte in einer 1:50 Verdünnung mit DEPC-H₂O, das auch zum Leerwertabgleich diente im UV-Spektrophotometer und unverdünnt 1µl RNS Eluat im NanoDrop®. Zur Berechnung der Konzentration und der Reinheit der Nukleinsäuren kam folgende Formel zur Anwendung:

$$K(RNS) = OD_{260 \text{ nm}} \times \text{Verdünnung} \times 40 \text{ [in } \mu\text{l/ml]}.$$

Der Reinheitsgrad der RNS errechnet sich als Quotient der OD 260 nm/ OD 280 nm, der größer 1,8 sein sollte. Ein geringerer Wert und damit eine Absorption bei 280 nm Wellenlänge spricht für eine Kontamination mit Proteinen und aromatischen Substanzen wie z. B. Phenol. Die aromatischen Ringe der Basen der RNS haben typischerweise bei einer Wellenlänge von 260 nm ihr Absorptionsmaximum.

3.2.3 DNS Verdau von RNS

Es wurden probatorisch 1 µg RNS mit 1 µl DNase I, 1 µl RNasin Inhibitor und 1 µl 10x PCR Puffer (Invitrogen) versetzt und mit Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Dieses Gemisch wurde vorsichtig mit der Pipette vermengt, da die DNase sauerstoffempfindlich ist, anschließend erfolgte für 30 min bei 37°C eine Inkubation. Danach wurde der Ansatz des DNS-Verdaus mit 2 µl EDTA (25 mM) und zweiminütigem Erhitzen auf 80°C abgestoppt.

Ansatz:

RNS	1 µg
10x Reaktion Puffer mit MgCl ₂	1 µl
DEPC-H ₂ O	ad auf 18 µl
DNase I (RNase frei)	1 U/µl
Recombinant RNasin-Inhibitor 25 U/µl	25 U/µl

Anschließend wurde die DNS verdaute RNS-Probe von Reaktionsprodukten gereinigt, um die Störung nachfolgender Untersuchungen zu verhindern. Die Reinigung erfolgte mittels des RNeasy Mini Kits® von Qiagen nach Herstellerprotokoll.

Die folgende RNS Konzentrations- und Integritätsbestimmung ergab zu geringe Konzentrationen der RNS, so dass davon abgesehen wurde einen DNS-Verdau durchzuführen bei nachgewiesener Negativkontrolle für genomische DNS (s. 2.5).

3.2.4 Qualitätskontrolle der RNS

Die Überprüfung der RNS-Integrität erfolgte durch den Bioanalyzer 2100® (Agilent Technologies) im BMFZ der Universität Düsseldorf. Die Funktionsweise des Agilent RNS 6000 Nano Assay® beruhte auf der gelelektrophoretischen Auftrennung von RNS in einem RNS Nano Assay Chip. Die negativ geladenen Nukleinsäuren wandern dabei in einem elektrischen Feld in Richtung des positiven Pols. Die Wanderungsgeschwindigkeit wurde durch die Größe und räumliche Struktur der Nukleinsäuren und die Porengröße des Gels bestimmt. Anders als in konventionellen Agarosegelen wurde ein mit Gel gefülltes Mikrokanalsystem als Trägersystem verwendet. Die Gesamt-RNS weist im denaturierenden Gel distinkte ribosomale Banden der 18 und 28 S rRNS auf. Das Intensitätsverhältnis 28:18 S rRNS liegt nahe an 2:1. Anhand der sogenannten RIN-Werte, der RNA-Integrity Number, wurden die verwendeten RNS-Extrakte zur

weiteren Untersuchung ausgewählt. Die RIN-Werte teilen die Güte der RNS auf einer Skala von 1 vollständig degradiert bis 10 intakte RNS ein. Für diese Arbeit wurden Proben mit RIN-Werten ab 5 verwendet.

3.3 cDNS-Synthese durch reverse Transkription

Die mRNA wurde mittels der reversen Transkriptase (RT) aus dem Avian mycoblastosis virus RT (AMV-RT), einer DNS-Polymerase, die RNS- oder DNS abhängig synthetisiert, in cDNS umgeschrieben. Der verwendete Master Mix enthielt ein dNTP Mix mit je 10 mM Konzentration aller vier Basen, 10x Reaktionspuffer zur Optimierung der Reaktionsbedingungen und MgCl₂ als Cofaktor für die AMV. Als Primer wurden Oligo dT-Primer aus 16-20 Thymidinen verwendet, die an den Poly-A⁺ Schwanz von der mRNA binden. Das RNasin diente dem Schutz vor einem Abbau der RNS durch RNasen.

Die Proben wurden für 60 min mit dem Master Mix (MM) versetzt und bei 42°C als Temperaturoptimum für die AMV-RT inkubiert. Anschließend erfolgte zur Inaktivierung der RT und Verhinderung der weiteren Bindung an die neu gebildete cDNS eine Erhitzung über 5 min bei 95°C. Die cDNS Proben wurden zum Schluss für 5 min bei 0-5°C gekühlt.

Zur Überprüfung einer ggf. Ausbeutesteigerung der cDNS, wurde vergleichend auch eine reverse Transkription aus der Moloney murine leukaemia virus-RT (M-MLV) und AMV-RT primerspezifisch durchgeführt. Beide zeigten keine besseren Ergebnisse.

Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Reverse Transkription Master Mix:

Umschreibung von 1 µg RNS

MgCl ₂ , 25 mM	4 µl
Reverse Transkription	
10x Puffer	2 µl
dNTP Mixture, 10 mM	2 µl
Recombinant RNasin-Inhibitor	0,5 µl
Oligo Primer dT 15	1 µl
AMV Reverse Transkriptase	15 U
Auffüllen auf 20 µl mit Nuclease freiem Wasser	

3.4 Primerdesign

Die Primer wurden mit dem Programm „Primer3“ nach den Parametern Größe (19-25 bp), Schmelzpunkt (59-61°C), Guanidin-Cytosin-Gehalt (40-60%) und Selbstkomplementarität ausgesucht. Außerdem wurden sie auf Haarnadel-, Homodimer- und Heterodimerbildung überprüft mittels Python-Server. Die Spezifität und Komplementarität für das gewünschte Gen wurde mittels NCBI-Blast untersucht.

3.5 Semiquantitative real time RT-PCR

3.5.1 Methode

Die real-time PCR (auch qPCR-quantitative PCR bzw. RTQ-PCR genannt) stellt eine Weiterentwicklung der konventionellen PCR dar, eine Methode zur Amplifikation von DNS-Fragmenten einer bestimmten Größe und Lokalisation.

Der wichtigste Unterschied zur herkömmlichen PCR besteht in der Möglichkeit, die amplifizierte DNS-Rate noch während der Reaktion, also in Echtzeit/real-time zu detektieren.

Die DNS-Polymerase, ausgehend von sogenannten Primern (synthetische DNS-Oligonukleotide) synthetisiert einen neuen DNS-Strang an einer einzelsträngigen Nukleinsäure-Matritze, der Template-DNS, in zyklischen Wiederholungen, durchschnittlich zwischen 25-45 Zyklen.

Die drei grundlegenden Reaktionsschritte sind die Denaturierung, die Annelierung und die Elongation.

Bei der RTQ-PCR erfolgt der Nachweis der PCR-Produkte direkt durch Interkalierung des DNS bindenden Fluoreszenzfarbstoffes häufig z. B. SYBR-Green I sequenzunabhängig (Vandesompele et al., 2002). Die Besonderheit dieses Farbstoffes liegt in der Fähigkeit, unter UV-Licht, interkaliert in doppelsträngiger DNS sichtbares Licht zu emittieren bei einer Anregungswelle von 497 nm und Emissionswelle von 520 nm.

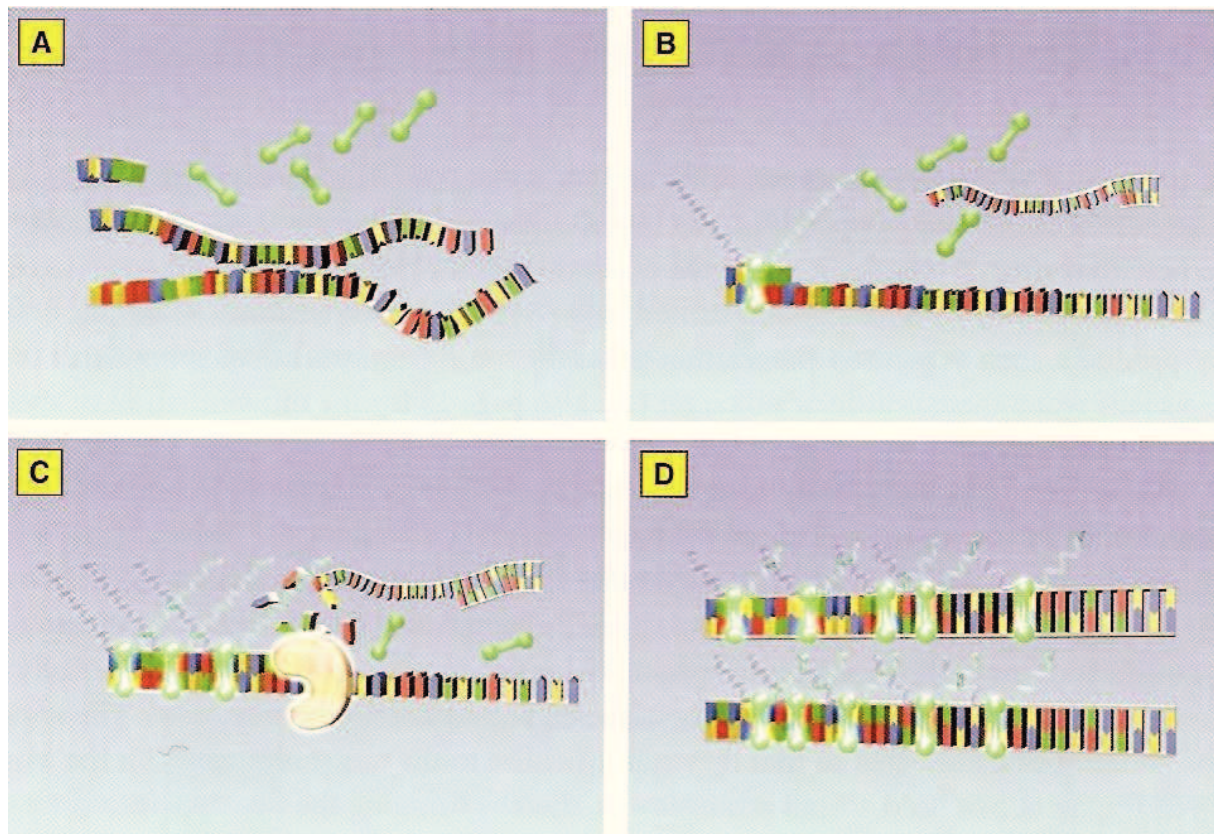


Abbildung 11: Überblick über den Funktionsmechanismus von SYBR-Green

(Mit Referenz der Fa. Roche, LightCycler Application Note 2005) :

- A) Denaturierungsphase der doppelsträngigen DNS: keine Bindung von SYBR-Green
- B) Annelierungsphase: geringe SYBR-Green Bindung infolgedessen geringes Fluoreszenzsignal
- C) und D) Elongationsphase: max. Fluoreszenz bei Bindung des SYBR-Green an' doppelsträngige DNS

Dies ermöglicht eine genauere kinetische Quantifizierung im Gegensatz zu konventionellen PCR-Verfahren mit einer Endpunktanalyse in der nur zwischen zwei Log-Stufen unterschieden werden kann.

In den ersten Zyklen ändern sich die Fluoreszenzwerte nur unwesentlich, hier wird die Basislinie (Baseline) definiert. Nach einer bestimmten Anzahl von Zyklen (abhängig von der Zahl der eingesetzten cDNS Ausgangskopien) wird die Fluoreszenz schließlich messbar. Dieses Signal ist direkt proportional zur Menge der gebildeten DNS und steigt wie auch die Menge an DNS exponentiell bis zum Erreichen eines Maximums an. Aus der Standardabweichung der Fluoreszenz zwischen Zyklus 3 und 15 multipliziert mit dem Faktor zehn, wird ein Fluoreszenzwert errechnet, der zur Grundfluoreszenz der Proben addiert wird. So wird der Schwellenwert (Threshold) bestimmt. Der Schnittpunkt zwischen Amplifikationsgraph und Schwellenwert wird als Cycleth-

reshold (Ct) oder auch Crossing point (Cp) bezeichnet. Er markiert einen Anstieg der Fluoreszenz über den Schwellenwert.

Wird der logarithmische Anstieg mit dem entsprechenden Zyklus korreliert und ein Standard zugrunde gelegt, so wird eine direkte quantitative Aussage erreicht (s. 3.5.2). Dafür wird der Ct-Wert als Bezugsgröße genutzt, da er sich umgekehrt proportional zum Logarithmus der Ausgangsmenge an Nukleinsäure verhält (Higuchi et al., 1993). Die Quantifizierung kann relativ oder absolut erfolgen.

R_n^+ , R_n^- bezeichnen die normalisierte Fluoreszenz einer positiven, bzw. negativen Probe und das (ΔR_n), die baselinekorrigierte, normalisierte Fluoreszenz.

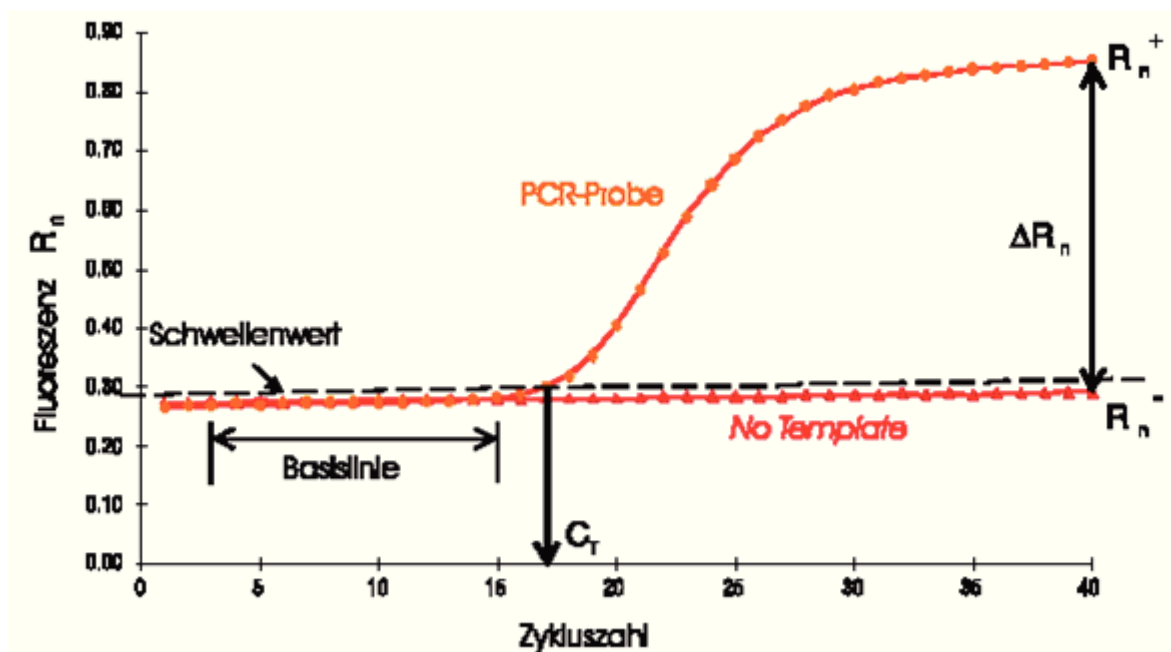


Abbildung 12: Schematische Darstellung einer Amplifikationsgraphik: Die gemessene Fluoreszenz (Ordinate) wird gegen die Zykluszahl (Abszisse) aufgetragen (Mit Genehmigung von Herrn Bente, 2003).

Zu beachten ist, dass die Quantifikation in der frühen exponentiellen Phase erfolgt, da nur in dieser eine konstante Amplifikationseffizienz vorherrscht und nicht in der Plateauphase. In der exponentiellen Phase besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Zahl der eingesetzten Zielmoleküle und der Zahl der entstandenen Moleküle, da alle Reaktionssubstanzen noch im Überschuss vorhanden sind und u. a. auch die DNS-Polymerase noch hoch aktiv ist. Die ermittelten Daten sind nur unter dieser Bedingung exakt.

Da u. a. auch unspezifische PCR-Produkte ein positives Signal emittieren können, wird zum Ende einer RTQ-PCR zusätzlich eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt. Dabei wird der Reaktionsansatz in 1°C Schritten von ca. 55°C auf ca. 96°C erhitzt und kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen. Der Zeitpunkt, an dem doppelsträngige DNS denaturiert, ist durch einen Abfall der

Fluoreszenz des interkalierenden Farbstoffes gekennzeichnet. Die Temperatur mit der höchsten Änderung der Fluoreszenz pro Zeitintervall ($dF/dt_{\max}$) stellt den spezifischen T_m -Wert da.

So kann für jedes PCR-Produkt ein Schmelzpunkt bestimmt werden. Durch Vergleich der Schmelzpunkte des Templates und einer Positivkontrolle kann das PCR-Produkt einwandfrei identifiziert werden. Bindet ein Primer unspezifisch an das Template, ist die Bindung weniger fest, als die spezifische und der Primer löst sich bei einer niedrigeren Temperatur vom Template und kann so ebenfalls detektiert werden.

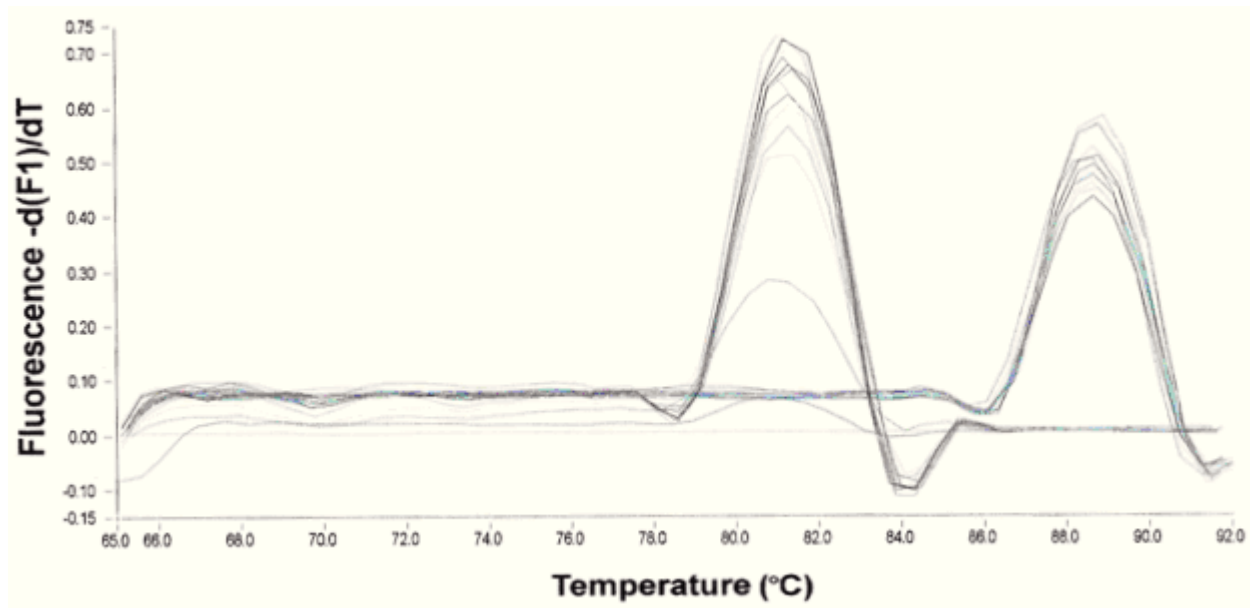


Abbildung 13: PCR-Produktkontrolle für das Gen Livin (li. Peak) und GAP-DH (re. Peak) mit dem LightCycler® durch eine Schmelztemperaturanalyse

3.5.2 Relative Quantifizierung mittels externen Standards

Bei der relativen Quantifizierung erfolgt eine Bestimmung der zu detektierenden DNS relativ zu einem Housekeeping-Gen, das in allen Geweben homogen und ubiquitär exprimiert wird. Mit Hilfe dieses externen Standards wird die absolute Menge von Ziel- und Referenz-Gen aus dem gleichen Probenmaterial berechnet. Der Quotient beider Expressionsraten ergibt dann die einheitslose Expressionsrate des Zielgens, deshalb ist dies eine relative semiquantitative Bestimmung.

In der vorgelegten Arbeit fungierte als externer Standard das Housekeeping-Gen GAP-DH.

Es wurde ein cDNS-Pool aus dem verwendeten Kollektiv gebildet und dieser in fünf Log-Schritten verdünnt mit DEPC-H₂O von 100% bis 6,25%. In Doppelbestimmung wurde mit einer Negativkontrolle aus den Expressionswerten dieser Verdünnungsreihe die Standardkurve (s. 3.5.3) erstellt.

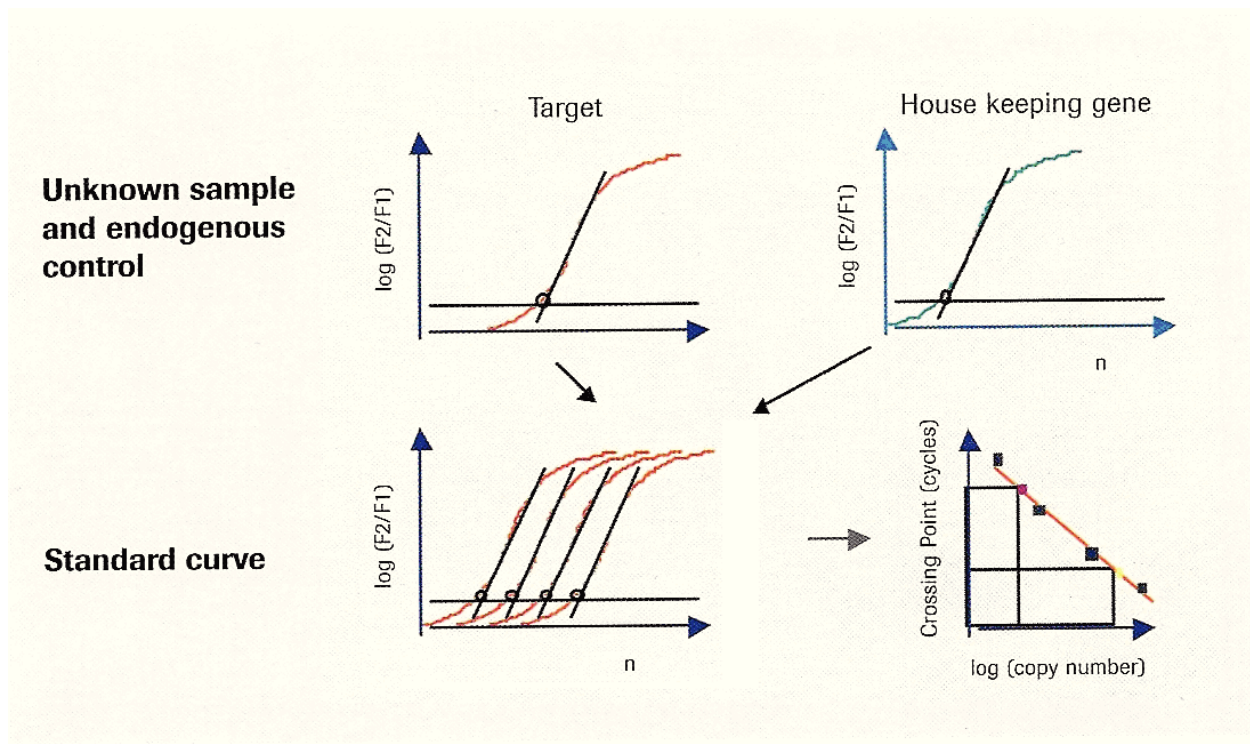


Abbildung 14: Konzept der Quantifikation anhand eines externen Standards

(Referenz der Fa. Roche, LightCycler Application Note 2005)

3.5.3 Primereffizienz

Zur möglichst genauen PCR-Produktquantifizierung ist die PCR-Effizienz bedeutsam, da sich nur in der Theorie das PCR-Produkt pro Zyklus verdoppelt, das würde einer Effizienz von 2 entsprechen. Die tatsächliche Effizienz muss ermittelt werden, um schwere Detektionsfehler zu vermeiden. So wird anhand einer cDNS-Verdünnungsreihe (s. 3.5.2) eine Standardkurve durch lineare Regression ermittelt, mit der Formel:

$$N = N_0 \times E^n$$

N = Anzahl der Moleküle im PCR-Produkt

N_0 = Ausgangsmenge an DNS Template

E = PCR-Effizienz

n = Zahl der PCR-Zyklen

Die Steigung dieser Kurve auch Slope genannt enthält die PCR-Effizienz E :

$$\text{Steigung} = -1 / \log E \Rightarrow E = 10^{-1/\text{Steigung}}$$

Die Effizienz sollte zwischen 1,8 und 2,2 liegen bei einer Fehlerrate von kleiner 0,1 und eines r-Wertes größer 0,97. Für diese Arbeit ist die berechnete Primereffizienz 2,075, bei einem Slope von -3,154, Error von 0,1, und r von 0,98 (s. Abb. 15).

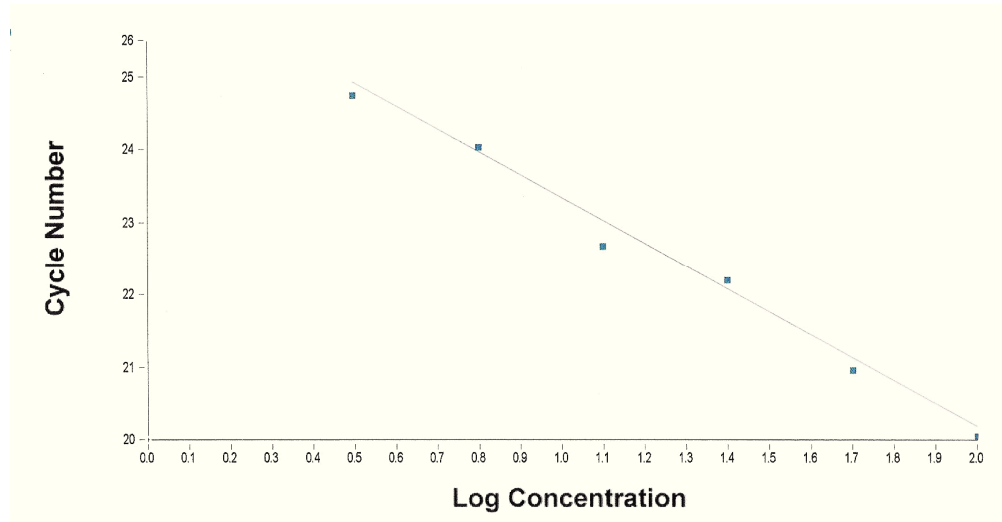


Abbildung 15: Verwendete Standardkurve anhand GAP-DH in aufsteigender Verdünnung: 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%.

3.5.4 Durchführung

Die RTQ-PCR-Versuche wurden mittels des 2x QuantiTect SYBR-Green PCR-Master Mixes® von Qiagen am Light-Cycler® von Roche durchgeführt.

Der Master Mix enthält eine hitzestabile Taq DNS Polymerase, einen PCR-Puffer, einen dNTP Mix aus dATP, dCTP, dGTP, dTTP/dUTP in gleicher Konzentration, SYBR-Green I, ROX als passiver Fluoreszenzreferenz und 5 mM MgCl₂.

PCR-Master-Mix:

<u>Komponenten</u>	<u>Endkonzentration</u>	<u>Volumen</u>
9,5µl Syber Green QuantiTect®	12,5 µl	12,5 µl
Forward Primer	38 µM	0,25 µl
Reverse Primer	38 µM	0,25 µl
cDNS Template	10 pg-µg	9 µl

Der MM wurde jeweils für eine Doppelbestimmung aller zu messenden Proben, der Non Template Control (NTC) als Negativkontrolle unter Zufügung von 2 µl DEPC-H₂O anstelle des cDNS Template und mindestens einer der fünf Standardproben angesetzt. Dieser Ansatz mit 13 µl

wurde auf vorgekühlte Light-Cycler-Kapillaren verteilt und 9 µl cDNS Template hinzugefügt bzw. NTC. Die Kapillaren wurden verschlossen und für 5 sec bei 1200 rpm abzentrifugiert und in das Light-Cycler-Karussell eingesetzt.

Bis zur gelelektrophoretischen Auftrennung wurden die Amplifikate bei 4°C gelagert.

Tabelle 7: PCR-Syntheseprogramm

Programm	Schritt	Temperatur	Zeitdauer	Slope (°C/sec)
Initialisierung	1. Denaturierung	95°C	15 min	20
PCR-Zyklen 45	2. Denaturierung	94°C	15 sec	20
	3. Annealing (Primerbindung)	55°C	25 sec	20
	4. Elongation (Primerverlängerung)	72°C	20 sec	20
Schmelzkurve	5. Denaturierung	95°C	0 sec	20
	6. Annealing	65°C	0 sec	20
	7. Aufschmelzung der DNS-Stränge und Fluoreszenzmessung	95°C	0 sec	0,1
Abkühlung	8. Re-Annealing	40°C	30 sec	20

3.6 Agarose-Gelelektrophorese

Zur zusätzlichen Kontrolle der RTQ-PCR Produkte wurden alle Amplifikate gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Bei der DNS-Gelelektrophorese wandert die negativ geladene DNS durch den Einfluss eines elektrischen Feldes durch das Agarosegel, wodurch größere DNS-Fragmente langsamer wandern als kleinere. Die Fragmentlänge wurde mit Hilfe eines zeitgleich mitlaufenden Längenstandards von 50 bp bestimmt.

Die Auftrennung erfolgte durch 2% TBE-Agarosegele. Zur Herstellung des Gels wurde in einem Erlenmeyerkolben in der Mikrowelle für 1 ½ Minuten 1,6 g Agarose in 80 ml TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlen auf 50°C wurde die Lösung mit 5 µl Ethidiumbromid versetzt und in einen mit Kämmen bestückten Gelschlitten gefüllt. Nach Aushärtung und Entfernung der Kämmen nach ca. 1 h wurde das Gel in eine mit TBE-gefüllte Elektrophoresekammer gelegt.

Die Taschen wurden mit je 5 µl Template und 1,5 µl Ladepuffer versetzt, u. a. mit Bromphenolblau um die Wanderung der Fragmente im Gel schon während des Laufes darzustellen.

Die Laufzeit betrug 45 min bei einer Spannung von 85 V.

Danach wurden die PCR Amplifikate unter UV-Licht indirekt dargestellt durch das an die DNS interkalierte Ethidiumbromid.

3.7 Aufreinigung der PCR-Amplifikate zur Gensequenzierung

Die PCR-Produkte wurden mittels des PCR Purification Kit® von Qiagen nach Herstellerempfehlung von Polymerasen, Salzen, Primern und nicht verbrauchten Nukleotiden gereinigt. Bei der Reinigung wurde die DNS an eine anionische Silica-Gel-Membran unter definierten niedrigen Salz- und pH-Bedingungen gebunden und nach zusätzlichen Waschschritten und Elution wieder gelöst.

Um die PCR-Produkte aus den Kapillaren in Reaktionsgefäße zu überführen, wurden die Light-Cycler-Kapillaren mit der Öffnung voran in diese gestellt und kurz bei 1000 rpm abzentrifugiert. Das PCR-Amplifikat wurde mit 10 Volumeneinheiten äquivalentem Bindepuffer (PBI-Puffer) versetzt, mit der Pipette gemischt, auf die Säule übertragen und für eine Minute bei 8000 g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen, 750 µl PE-Puffer auf die Säule gegeben und erneut bei 8000 g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde ebenfalls verworfen und die Säule bei 13000 g für eine Minute trocken zentrifugiert. Anschließend wurden 20 µl DEPC-H₂O dazu pipettiert, die Säule in ein 1,5 ml Eppendorf Tube überführt und bei 10000 g für eine Minute zentrifugiert.

Die eluierte DNS wurde bei -20°C aufbewahrt bis zur Gensequenzierung durch das BMFZ der Universität Düsseldorf.

3.8 Densitometrie

Zur Analyse der Mengenverhältnisse von aufgetrennten PCR-Amplifikaten wurde die Absorption der einzelnen, gefärbten Banden im Gel mit Hilfe von BioDocAnalyze® Densitometern bestimmt.

Dies diente der zusätzlichen Überprüfung der RTQ-PCR Ergebnisse.

3.9 Statistische Auswertung

Die Daten wurden in Excel-Tabellen gespeichert. Statistische Berechnungen wurden mit Hilfe des Programmes „SPSS“ (Vers. 18) ausgeführt.

Die Prüfung auf Normalverteilung erfolgte durch den Kolmogorow-Smirnow-Test.

Neben der explorativen Datenanalyse und den Korrelationsberechnungen nach Spearman wurde der nicht parametrische Test nach Wilcoxon für verbundene Stichproben für die Expressionsraten durchgeführt.

Die graphische Darstellung erfolgte über die Erstellung von Boxplots. Ein Boxplot gibt die Spannweite aller Werte einer Gruppe unter separater Darstellung von Ausreißern an. Das Rechteck, die sog. „Box“ beinhaltet 50% aller Werte der dargestellten Gruppe. Der eingezeichnete

Median, der auch als 50%-Quantil bezeichnet wird, gibt den mittleren Wert einer Stichprobe wieder.

Die Signifikanz wird anhand des Quantils p der zu überprüfenden Nichtwahrscheinlichkeit bestimmt. Dieses „ p “ wurde mit dem Wert von $p = 0,05$ festgelegt, was einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% entspricht. Alle Werte unter $p = 0,05$ gelten als signifikant, alle Werte unter $p = 0,01$ als hoch signifikant. Alle Werte über $p = 0,05$ bestätigen die Nullhypothese, die besagt, dass es keinen Unterschied zwischen den beiden Kollektiven gibt.

Für die Expressionsuntersuchungen in der RTQ-PCR, die in Doppelbestimmung erfolgten, wurden die Standardfehler der Mittelwerte (SEM) ermittelt, die sich nicht mehr als 0,5 unterscheiden durften, um als gewertete Probe verwendet zu werden.

Die Überlebenszeitanalyse erfolgte nach dem Kaplan-Meier Verfahren (Kaplan & Meier, 1958). Alle Patienten, die bis zum Stichtag 31.01.2009 überlebten, 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 erreichen. Die Methode nach Kaplan-Meier berücksichtigt die Informationen aller Patienten solange, wie diese beobachtet werden konnten. 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 und Log-Rank 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 Spät ereignisse am Ende der Überlebenskurve, wenn nur noch wenige Patienten am Leben sind, dies im Gegensatz zum Log-Rank.

4 Ergebnisse

Der extrinsische und intrinsische Apoptose-Signalweg führt zu dem gemeinsamen Effektorweg in die kaskadenartige Aktivierung der Caspasen und damit Initiierung der Apoptose. Die IAP greifen in diesen Signalweg inhibierend ein. Um mögliche Zusammenhänge zwischen der Expression des IAP Livin und dem Tumorstadium bzw. dem Differenzierungsgrad zu analysieren wurde dies in vivo mittels real-time PCR im kolorektalen Gewebe vergleichend im Tumor- und Normalgewebe untersucht. Auch wurde erforscht, ob Veränderungen des Livin einen Einfluss auf das Überleben und die Rückfallrate von Patienten hatte.

4.1 Patientencharakteristika

Die in der Arbeit untersuchten Gewebeproben stammen aus kryoasservierten Tumorgewebeproben eines Patientenkollektivs des Institutes für Pathologie der Universität Düsseldorf und wurden bzgl. der Tumorstadien und Differenzierungsgrade zufällig ausgewählt. Es wurden 47 Patienten weitergehend untersucht, darunter waren 23 Frauen und 24 Männer. Der Altersdurchschnitt des Kollektivs betrug 76 Jahre. Ausgenommen aus der Untersuchung wurden hereditäre Karzinome und Adenome. Des Weiteren wurden Patienten-Proben ausgeschlossen im Rahmen der Untersuchung nach den schon oben genannten Kriterien (s. Flussdiagramm Kap. 2.1).

Tabelle 8: Eigenschaften des untersuchten Kollektivs

Kolorektales Karzinom	Anzahl n	Männlich	Weiblich
pT1	2	0	2
pT2	8	7	1
pT3	29	13	16
pT4	8	4	4

4.2 Relative mRNS-Livin-Expressionsrate im kolorektalen Karzinom

Die Gewinnung der RNS aus dem kolorektalem Kryogewebe, Überprüfung der RNS-Integrität u. a. durch den Bioanalyser, reverse Transkription in cDNS und Durchführung der RTQ-PCR wurden in Kapitel 3 schon ausführlich beschrieben (s. Abb. 15).

Exemplarisch ist in Abbildung 18 eine Amplifikationskurve der real-time PCR abgebildet.

Der Nachweis des spezifischen PCR-Produktes erfolgte durch die Schmelzkurvenanalyse (s. 3.5), durch die Kontrolle der PCR-Produktgrößen der Gelelektrophorese (s. Abb. 17) und durch Sequenzierung von Stichproben.

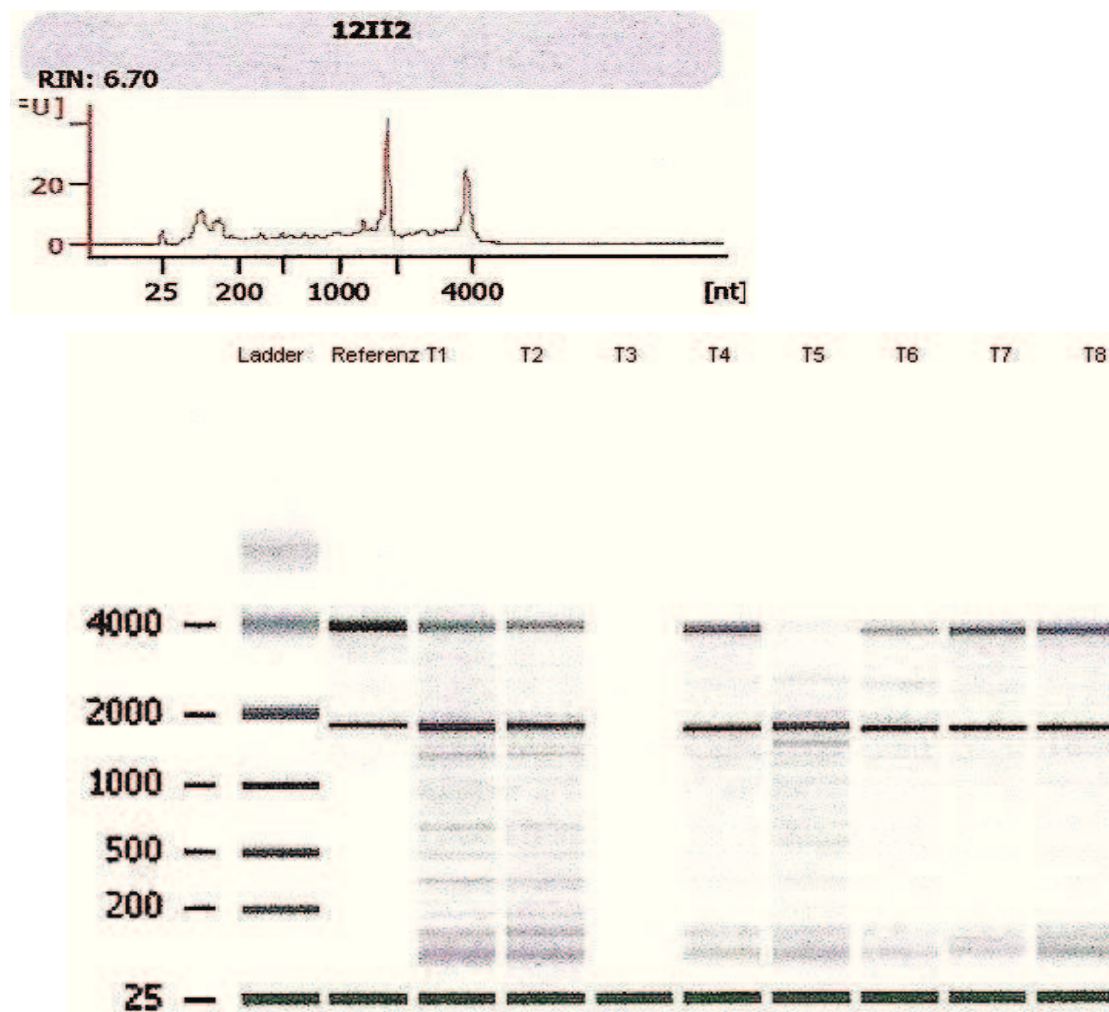


Abbildung 16: RNS-Untersuchung im Bioanalyzer mit Nanochip

Aufgetragen sind Ladder, Referenz und Tumorproben der Nummerierung T1 bis T8; T3 ist degradiert, Peak bzw. Bande sind typischerweise bei 18 und 28 S.

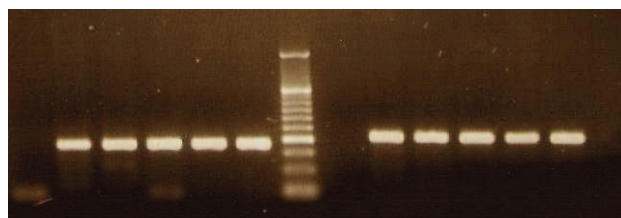


Abbildung 17: Gelelektrophorese der QRT-PCR-Amplifikate

Livin (li.) mit der Amplifikatgröße von 179 bp und GAP-DH (re.) mit der Amplifikatgröße von 211 bp.

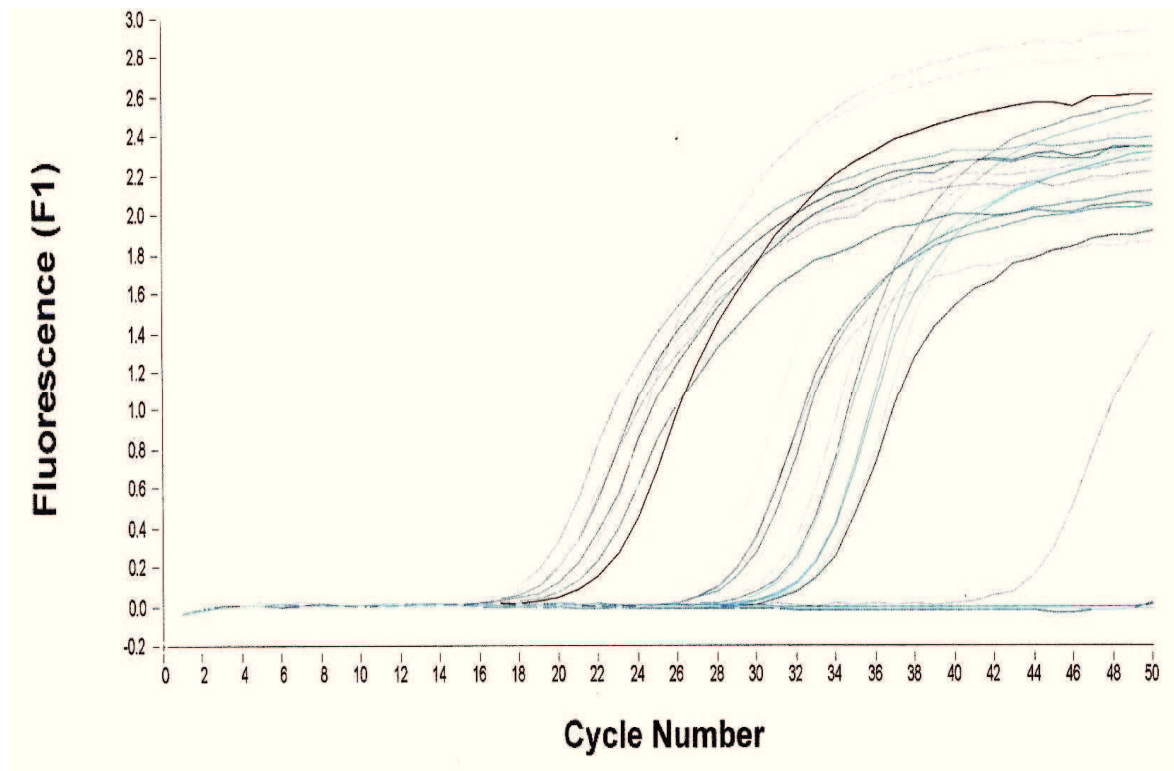


Abbildung 18: Amplifikationskurven von GAP-DH bei Ct 22 und Livin bei Ct 28 für Normal- und Tumorgewebe.

Die Quantifikation der Livin mRNA-Expressionsrate erfolgte anhand des externen Standards (s. 3.5). Jede Gewebeprobe wurde in Doppelbestimmung durchgeführt. Von den so gewonnenen relativen mRNA-Expressionsdaten wurden die Mittelwerte für alle Faktoren bestimmt und gegen GAP-DH normalisiert. Anhand der Quotienten aus dem relativen mRNA-Expressionswert von Livin und GAP-DH wurden die jeweiligen Konzentrationen für Normal- und Tumorgewebe berechnet.

Die ermittelten Quotienten wurden mit Hilfe des Analyseprogramms SPSS statistisch ausgewertet und in Boxplots dargestellt. Die Auswertung erfolgte durch Gegenüberstellung der Proben nach den klinischen und histopathologischen Parametern. Die Überprüfung aller Ergebnisse erfolgte mit den nichtparametrischen Tests nach Mann-Whitney, Wilcoxon und Kruskal-Wallis unter Beachtung der Bonferoni-Korrektur. Die semiquantitativen Livin mRNA-Expressionsraten der untersuchten Patienten ist in der Tabelle 10 im Anhang aufgelistet.

4.3 Statistische Auswertung der relativen mRNA-Expression von Livin im kolorektalem Gewebe

Die erhobenen Daten sind nicht normalverteilt nach Kolmogorov-Smirnov, deshalb wurden nichtparametrische Tests erforderlich (s. Abb. 19).

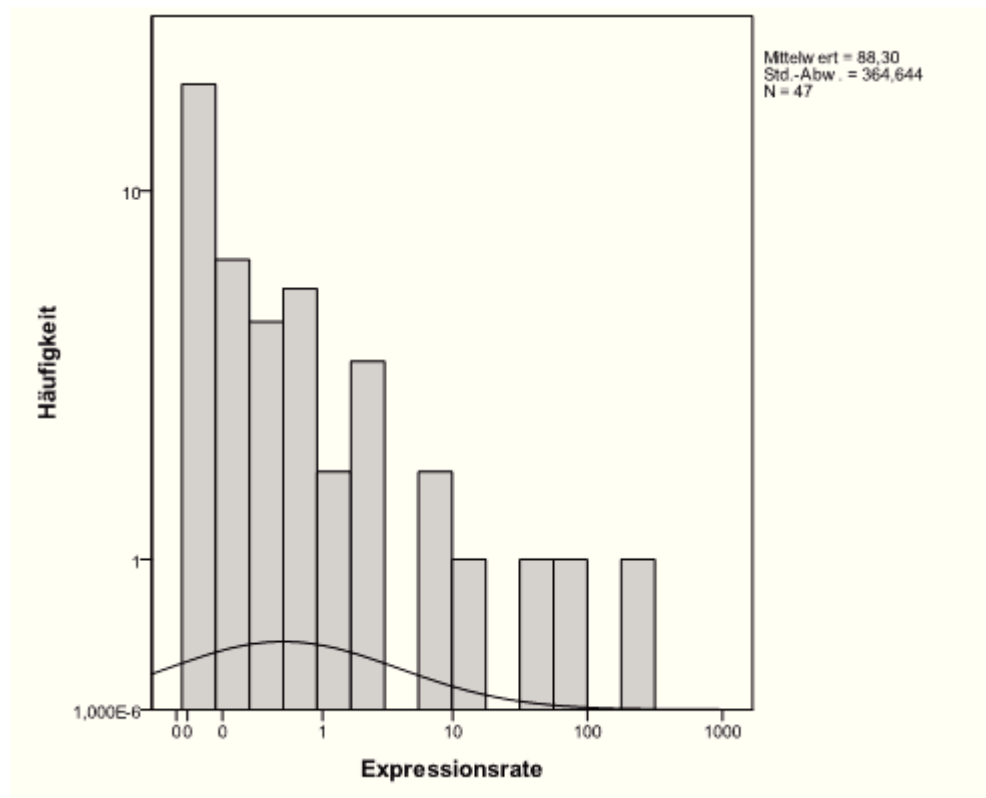


Abbildung 19: Testung auf Normalverteilung nach Kolmogorov-Smirnov:

Darstellung der Expressionsrate als Histogramm mit Normalverteilungskurve.

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen den einzelnen Variablen zu ermitteln, wurde auch eine nichtparametrische Korrelation nach Spearman getestet. Mit einem Korrelationskoeffizient von -0,033 besteht eine sehr geringe Korrelation zwischen den Variablen.

Für die Auswertung wurden die Proben in kolorektales Normalgewebe und Tumorgewebe pT1-4 eingeteilt und diese Gruppen mit dem Mann-Whitney und dem Wilcoxon Test auf signifikante Unterschiede in der Expression überprüft. Die einzelnen pT-Stadien wurden auch noch untereinander auf eine möglicherweise bestehende Signifikanz getestet. Die Einheit auf der Y-Achse der Boxplots ist die relative gegen GAP-DH normalisierte mRNS-Expression mit logarithmierter Skala.

Eine Regression des Tumorgewebes pT1 zu pT4 besteht nicht mit einem linearen Regressionskoeffizienten von 0,139 (s. Tab. 9).

Modellzusammenfassung ^b				
Modell	R	R-Quadrat	Korrigiertes R-Quadrat	Standardfehler des Schätzers
1	,139 ^a	,019	-,003	54,437503857 494490

a. Einflußvariablen : (Konstante), pT

b. Abhängige Variable: T_konz

Tabelle 9: Ermittelte Regressionen

4.4 Korrelation der Expressionsrate von Livin und klinisch pathologischen Charakteristika

Zwischen dem nicht-neoplastischen kolorektalen Gewebe und den Tumorgeweben mit den Stadien pT1-4 zeigte sich kein signifikanter Anstieg der relativen mRNS-Expression ($p = 0,244$), wohingegen sich ein deutlicher Trend des Expressionsanstieg ($p = 0,069$) zwischen pT3 und pT4 Stadien feststellen ließ.

Hinsichtlich der Invasionstiefe (pT-Kategorie) der Tumore zu der Livin-Expressionsrate zeigen sich Hinweise, dass Tumore mit höherer Infiltrationstiefe auch eine höhere Livin-Expressionsrate aufwiesen, dies jedoch ohne Erreichen einer statistische Signifikanz ($p = 0,244$). Die in der Graphik sichtbaren Unterschiede der Daten zu den einzelnen pT-Stadien zeigen eine Zunahme der Rate bei jedoch insgesamt großen interindividuellen Unterschieden und einer hohen Standardabweichung bei geringer Fallzahl (s. Abb. 20)

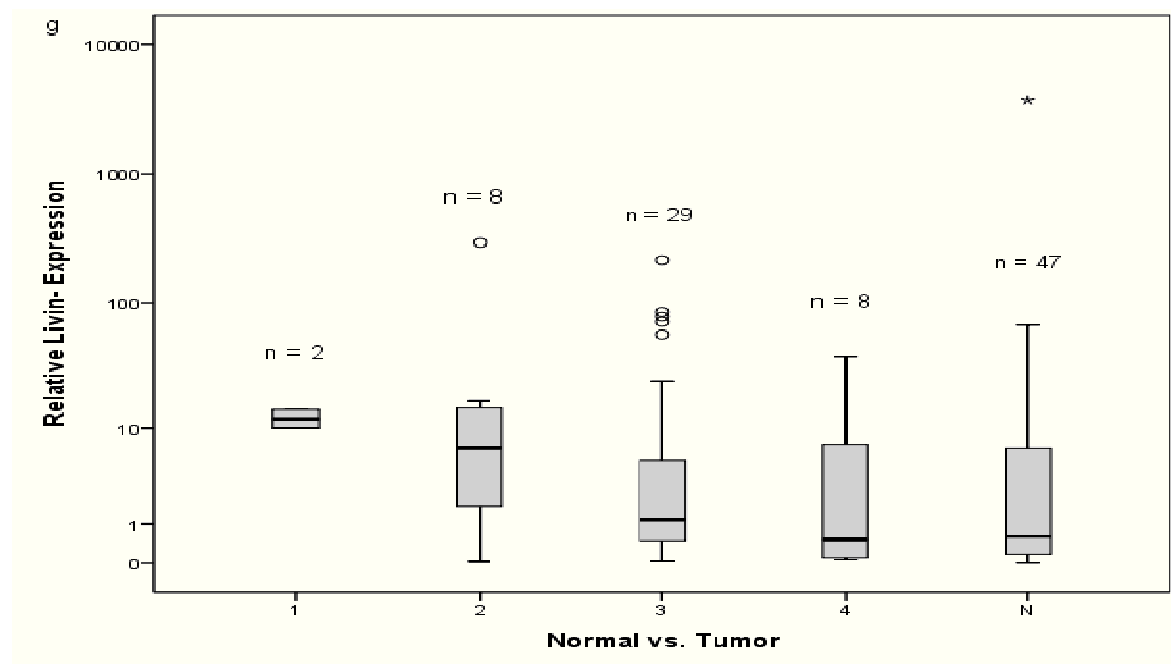


Abbildung 20: Relative mRNS-Expressionsdaten von Livin im Normal- versus Tumorgewebe pT 1-4:

Extremwerte als Kreise dargestellt, Ausreißer als Rauten, N= Normalgewebe, 1-4= pT-Stadium 1-4.

pT zu N $p > 0,244$, pT1 zu T2 $p > 0,715$, pT2 zu T3 $p > 0,889$, pT3 zu T4 $p > 0,069$,
T4 zu T2 $p > 0,674$, T3 zu T1 $p > 0,465$, T4 zu T1 $p > 0,144$

Hinsichtlich der untersuchten histopathologischen Parameter fand sich für den Differenzierungsgrad (Grading) der Tumore keine statistisch signifikante Korrelation zur Livin-Expressionsrate ($p < 0,642$) (s. Abb. 21). Dies galt auch dann, wenn das KRK in zwei Gruppen mit G1/G2 und G3/G4 Differenzierung zusammengefasst wurde und die Tumore gemäß des Medianwertes der

Expressionsrate in Tumore mit hoher und mit niedriger Expressionsrate unterteilt wurden.

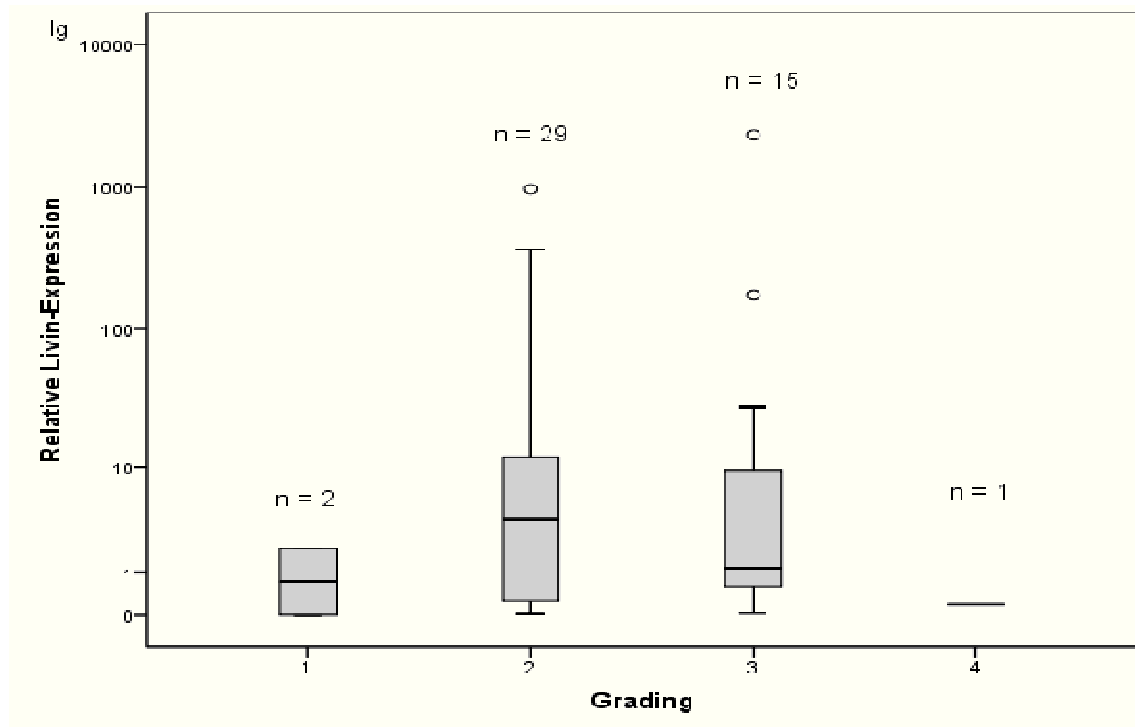


Abbildung 21: Relative mRNS-Livin-Expressionsrate im Bezug zum Grading (G) $p=0,642$

Extremwerte als Kreise dargestellt, Ausreißer als Rauten, G= Grading

Auch hinsichtlich des Lymphknotenbefalls (pN-Kategorie) fand sich keine Korrelation mit der Livin-Expressionsrate $p > 0,899$ (s. Abb. 22). Auch bei Dichotomisierung der Expressionsrate mittels des Medianwertes bestand ebenfalls keine statistische Signifikanz.

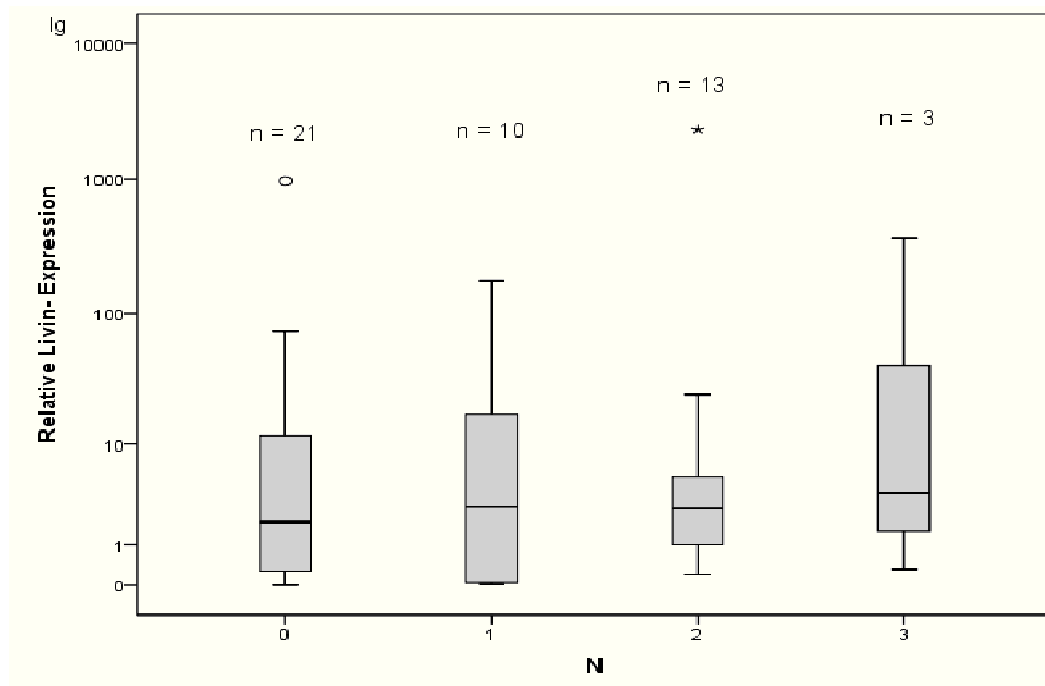


Abbildung 22: Relative mRNS-Livin-Expressionsrate im Bezug zum N-Stadium $p=0,899$

Extremwerte als Kreise dargestellt, Ausreißer als Rauten, N= Lymphknoten
Metastasen

Auch die Lokalisation zeigte keine signifikante Korrelation zur Livin-Expressionsrate $p > 0,349$ (s. Abb. 23), obgleich sich eine Tendenz darstellte. Kolorektale Karzinome im Bereich des Colon descendens, Sigma und Rektum hatten bis zu 100-fach höhere Livin-Expressionsraten im Vergleich zur Lokalisation im Colon ascendens und transversum.

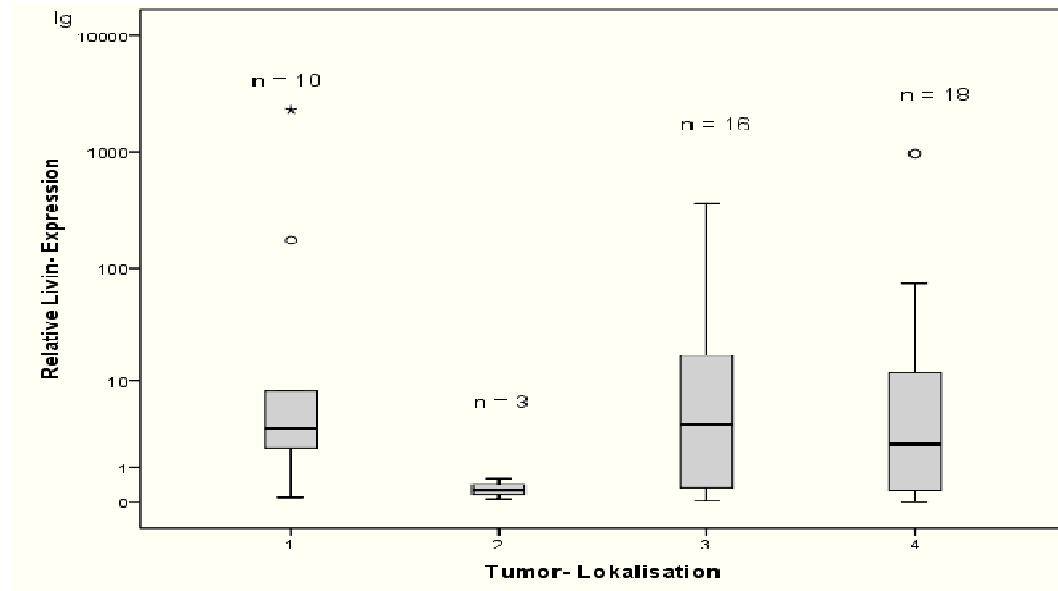


Abbildung 23: Relative mRNS-Livin-Expressionsrate im Bezug zur Lokalisation $p = 0,349$

1= Coecum/Colon ascendens, 2= re. Flexur/ Colon transversum, 3= Colon descendens/ Sigma, 4= Rektosigma/ Rektum.

Bezüglich des R-Status fand sich keine signifikante Korrelation zur Livin-Expressionsrate $p > 0,465$ (s. Abb. 24).

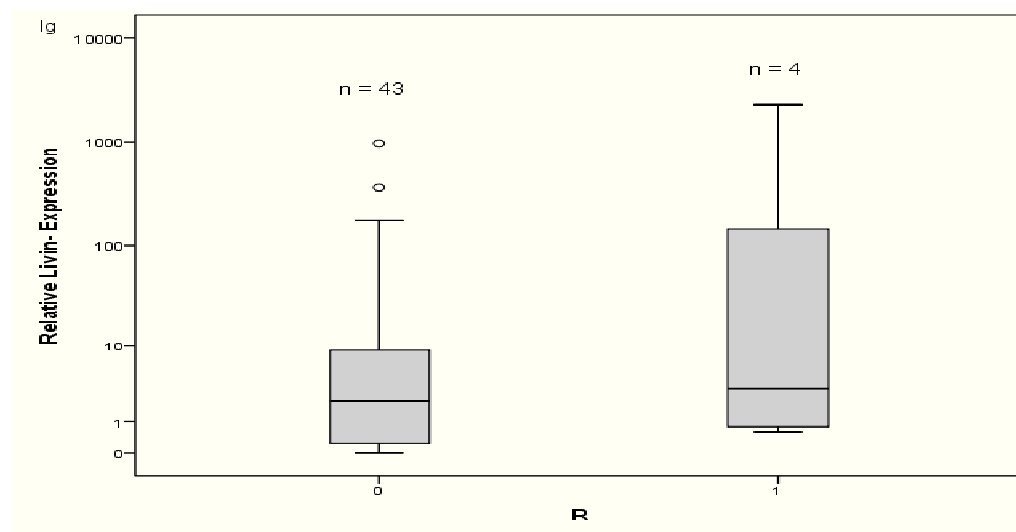


Abbildung 24: Relative mRNS-Livin Expressionsrate in Bezug zum R-Status $p = 0,456$

Extremwerte als Kreise dargestellt, Ausreißer als Rauten, R= Resektions-Grad.

In Bezugsetzung der Fernmetastasierung (pM-Stadium) zu Livin-Expressionsraten ergab sich keine Signifikanz bei einem $p > 0,593$, obgleich sich höhere Livin-Expressionsraten in M1-Tumoren nachweisen liessen. Dies ist graphisch dargestellt in Abbildung 25.

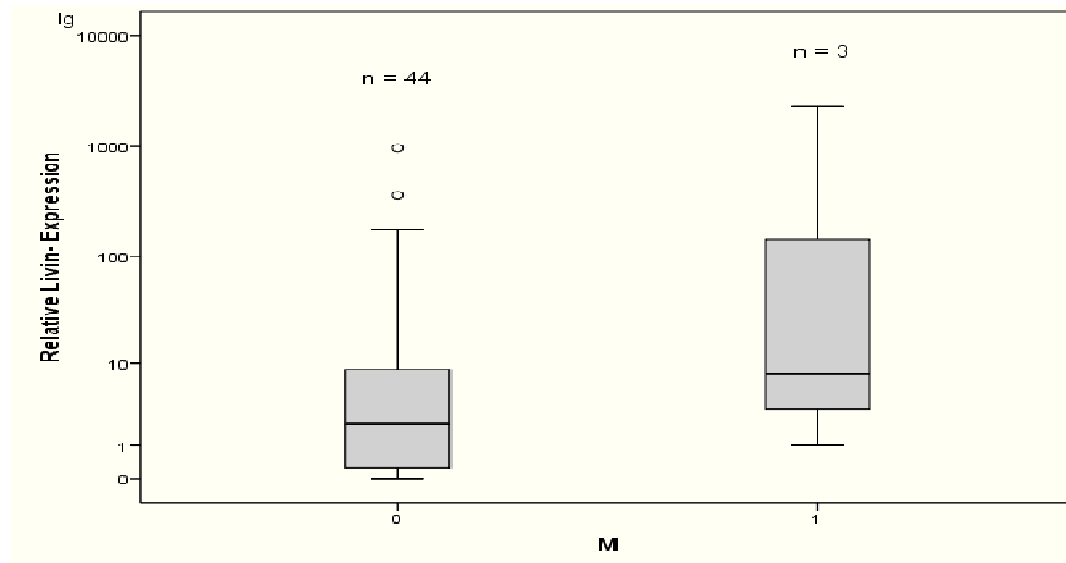


Abbildung 25: Relative mRNS-Livin-Expressionsrate im Bezug zur Fernmetastasierung $p=0,593$

Extremwerte als Kreise dargestellt, Ausreißer als Rauten, M= Fernmetastasierung.

Die Untersuchung der Expressionsrate hinsichtlich Geschlecht und Alter ergab keinen Anhalt für eine signifikante Korrelation (s. Abb. 26 u. 27).

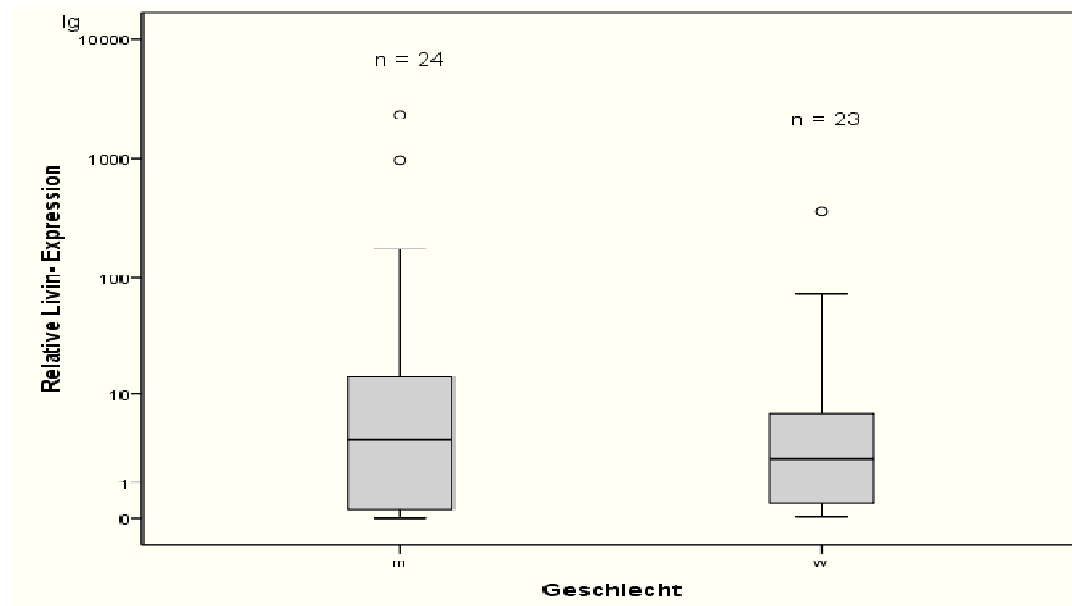


Abbildung 26: Relative mRNS-Livin-Expressionsrate im Bezug zum Geschlecht $p=0,915$.

Extremwerte als Kreise dargestellt, Ausreißer als Rauten.

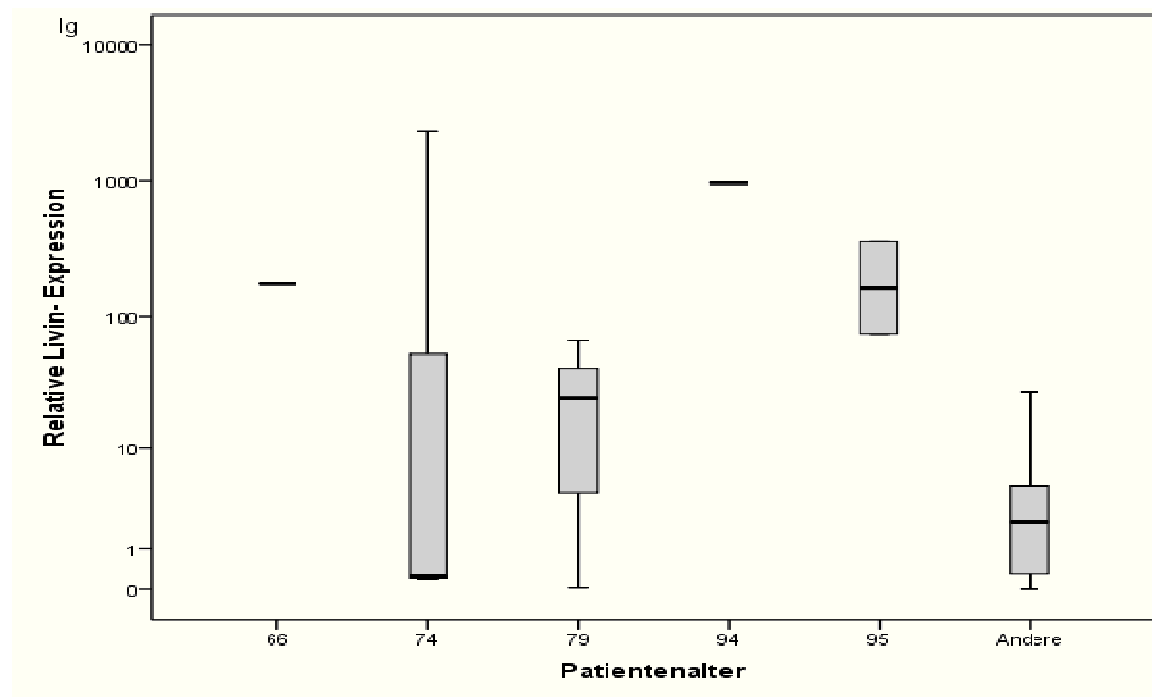


Abbildung 27: Relative mRNS-Livin-Expressionsrate im Bezug zum Alter, in Kategorien zusammengefasst.

(Kategorien wurden zusammengefasst und summiert wenn < 1% um eine bessere Übersicht herzustellen)

Die Patienten wurden in Alterskategorien zusammengefasst und bei einem Anteil kleiner 1 % zur Kategorien „Andere“ summiert, um eine bessere graphische Darstellung zu ermöglichen. Deutlich erkennbar ist, dass kein Zusammenhang zwischen Patientenalter und relativer Livinexpressionsrate besteht.

4.5 Kaplan-Meier-Überlebenskurve und prognostischer Einfluss der Livin-Expressionsrate

Bezüglich der postoperativen Überlebenszeit bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen Tumoren mit einer hohen Livin-Expressionsrate ($>$ Median) und Tumoren mit einer niedrigen Expressionsrate ($<$ Median).

Die univariate Analyse nach Log-Rank ergab für die Livin-Expression keinen prognostischen Einfluss auf das gesamte postoperative Überleben im Vergleich der verschiedenen pT-Stadien (Abb. 28) ($p < 0,942$). Nach Breslow zeigt sich ebenfalls keine Signifikanz ($p = 0,950$).

Gesamtvergleiche			
	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	,005	1	,942
Breslow (Generalized Wilcoxon)	,004	1	,950

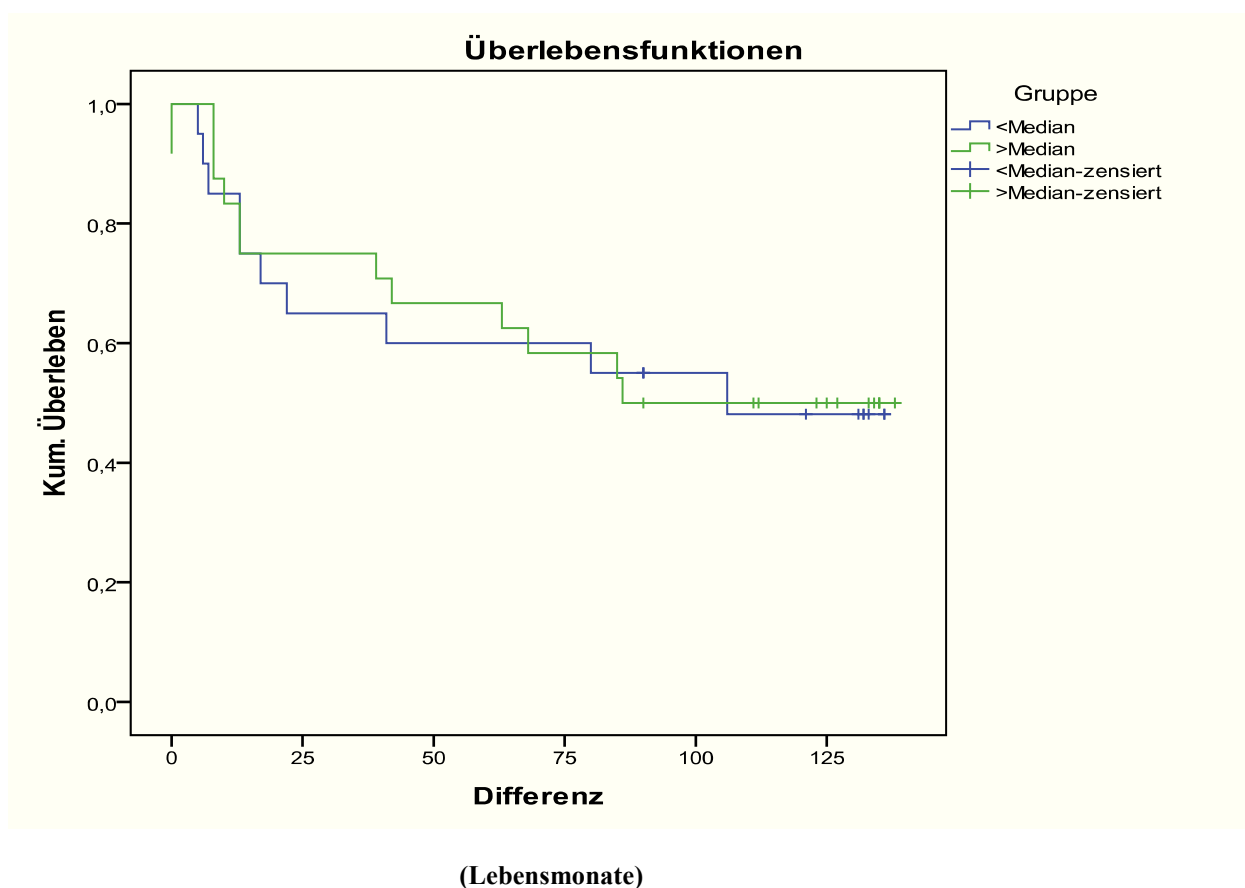


Abbildung 28: Kaplan-Meier-Überlebenskurve für Livin- Expressionsraten:

Die Gruppeneinteilung erfolgte nach dem errechnetem Median 215 der Livin-Expression.

5 Diskussion

Zur physiologischen Existenz des multizellulären Organismus gehört der programmierte Zelltod, die Apoptose. Diese unterliegt vielen Regelmechanismen und äußeren Einflüssen. Wie vorstehend schon dargestellt, spielt die Unterdrückung der Apoptose in der Karzinogenese einen bedeutsamen Faktor. Es wird malignen Zellen ermöglicht zu überleben unter Bedingungen, unter denen gesunde Zellen nicht bestehen könnten. In der Steuerung der Apoptose kommt der Familie der IAP eine fundamentale Rolle zu, eines der IAP ist Livin. Die IAP sind Teil eines komplexen Systemes regulatorischer Kontrollen und stellen so einen der Schlüssel dar in der Ordnung des multizellulären Organismus. Dies ließ sich für viele klinisch pathologische Prozesse nachweisen. Für ein weiteres Mitglied der IAP-Familie, dem Survivin wurden deutlich erhöhte Expressionsraten im Tumorgewebe im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe nachgewiesen (z. B. Mamma, KHK, Lymphom, Neuroblastom). Die erhöhte Expressionsrate ging einher mit einer ungünstigeren Patienten-Prognose (Chen et al., 2004).

Auch für Livin wurde dies in unterschiedlichen Geweben untersucht, jedoch mit kontroversen Ergebnissen. Zur weiteren Klärung dieser Fragestellung wurde deshalb in dieser Arbeit die Livin-Expressionsrate vergleichend in Normal- zu kolorektalem Tumorgewebe analysiert. Es wurde dabei speziell die Isoform Livin Alpha untersucht. Diese entsteht durch alternatives Spleining des Livins neben der zweiten Isoform Livin Beta. Die beiden Proteine unterscheiden sich nur in einer 18 Aminosäure langen Region zwischen der BIR- und der RING-Domäne.

Zur Beurteilung der postoperativen Überlebens-Wahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von den Livin-Expressionsraten wurden die Überlebensraten der Patienten ermittelt.

Das Ziel der Untersuchungen war festzustellen, ob anhand der Expressionsrate des Apoptoseinhibitors Livin Alpha eine prognostische Aussage bezüglich des kolorektalen Karzinoms möglich ist und sich dieser damit als unabhängiger Tumormarker eignet.

A) Untersuchung auf bestehende Unterschiede in der relativen Expressionsrate von Livin Alpha im Normal- zum Tumorgewebe

Insgesamt zeigte sich für alle Invasionstiefen der Tumoren (pT-Kategorie) in der Korrelation zu der Livin-Expressionsrate der Trend, dass Tumoren mit höherer Infiltrationstiefe auch eine höhere Livin-Expressionsrate aufwiesen, jedoch ohne Erreichen einer statistischen Gesamt-Signifikanz ($p = 0,244$).

Im Vergleich der pT-Stadien waren insgesamt große interindividuelle Unterschiede in der Livin-Expressionsrate feststellbar, die bei der relativ geringen Patientenfallzahl mit konsekutiv hoher Standardabweichung die Auswertung stark beeinflussten.

Diese Ergebnisse decken sich mit der Studie von Li et al., 2007, in der die veränderte Expression von Survivin und Livin in Dukes B Tumoren immunhistochemisch bei 81 Patienten untersucht wurde. In dieser Veröffentlichung korrelierte die Livin Überexpression mit den Tumorstadien, der Rezidivrate und/ oder Metastasierung, jedoch ohne Nachweis einer Beziehung zum Grading, Geschlecht und Alter.

Abd-Elrahman et al. 2009 konnten am Tiermodell mit immundefizienten Mäusen nach Injektion von tumorösen Zellen ebenfalls zeigen, welche Auswirkungen die alleinige Expression von Livin Alpha versus Beta und die Koexpression beider in vivo hat. Bei einer Überexpression von Livin Alpha war stets ein deutlicher Tumorprogress feststellbar, wohingegen bei der Überexpression von Livin Beta erstmalig auch ein tumorinhibierender Effekt detektiert wurde (s. u.).

B) Untersuchung auf eine bestehende Korrelation der klinisch-pathologischen Merkmale und der Livin Alpha Expressionsrate

Eine Korrelation zwischen klinisch pathologischen Merkmalen des KRK und der Livin-Expression konnte in der vorgelegten Arbeit nicht nachgewiesen werden. Dies wäre ein möglicher Hinweis dafür gewesen, dass Livin früh in die Karzinom-Entwicklung eingreift. Weder für das Geschlecht noch für das Alter war eine Einflussnahme auf die Livin-Expressionsrate nachweisbar. Es konnte jedoch eine Tendenz aufgezeigt werden, dass sowohl für die Lokalisation der KRK als auch bei der Fernmetastasierung eine Bedeutung zukommt. Bei distal gelegenen kolorektalen Karzinomen (Colon descendens, Sigma) war ein bis zu 100-fach erhöhter Livin-Expressionslevel im Vergleich zu distal lokalisierten Tumoren messbar.

Vergleichbare Daten wurden in einer Studie von Birkenkamp et al. 2005 ebenfalls beschrieben. Es zeigte sich eine Signifikanz hinsichtlich der Expressionsrate für 58 Gene im Vergleich rechtseitiges versus linksseitiges KRK. Die getesteten Gene zeigten eine deutlich höhere Expressionsrate im linksseitigen Kolon. Zum Teil war dies auch prognostisch relevant, da damit auch ein unterschiedliches Ansprechen auf die Chemotherapie einherging.

Nachmias et al. konnten in Zellkulturen 2003 für das maligne Melanom eine negative Korrelation für die Überlebens-Wahrscheinlichkeit der Patienten bei einer Livin-Überexpression nachweisen, dies ging in vitro mit einer Chemotherapie-Resistenz einher.

C) Livin Alpha Expression und prognostische Relevanz für das Langzeitüberleben

Mit der Kaplan-Meier-Methode wurde ermittelt, dass die Expressionsrate von Livin Alpha keine Auswirkung auf das Langzeitüberleben hat.

Die univariate Analyse nach Log-Rank ergab für die Livin-Expression ebenfalls keinen prognostischen Einfluss auf das postoperative Gesamtüberleben im Vergleich der pT-Stadien ($p < 0,942$). Die verwandten postoperativen Behandlungsformen wurden in der Auswertung nicht gesondert berücksichtigt.

In der Vergangenheit konnte schon in anderen Studien gezeigt werden, dass die klinische Relevanz von Livin stark abhängig ist vom Tumortyp, so z. B. als unabhängiger negativer Faktor im Melanom (Nachmias et al., 2003) oder Neuroblastom (Kim et al., 2005).

Im nasopharyngealen Karzinom war keine Korrelation nachweisbar (Xiang et al., 2005).

Interessant ist die Studie von Choi et al., 2007, in der bei Kindern mit akuter lymphoblastischer Leukämie Livin als unabhängiger positiver prognostischer Faktor identifiziert wurde. Dies steht im genauen Gegensatz zu Gazzaniga et al. 2003, die für das Blasenkarzinom Livin als negativen prognostischen Faktor nachwiesen. Bei beiden Publikationen wurde für das IAP Livin eine signifikante Einwirkung auf die Überlebens-Wahrscheinlichkeit der Patienten ermittelt, wohingegen aber bei Gazzaniga et al. 2003 die Überlebenswahrscheinlichkeit bei Überexpression deutlich verkürzt war. Zu diskutieren ist das Alter der Patienten als relevanter divergierender Faktor der beiden Studien.

Kempkensteffen et al. 2007 konnten für Livin im Nierenzellkarzinom keine Korrelation mit dem Expressionsgrad, dem Tumorprogress und der Überlebensrate aufzeigen. Obgleich in frühen Tumorstadien und hoch-differenzierten Nierenzellkarzinomen eine vermehrte Livin-Expression detektiert wurde.

Dai et al. 2010 untersuchten die Livin- und Survivin-Expression im kleinzelligen Bronchialkarzinom und bewiesen für ihr Patientenkollektiv, dass Livin keine Bedeutung als prognostischer Parameter zukam.

Als eine mögliche Erklärung für die Unterschiede in den genannten Studien wird einerseits die Abhängigkeit der Livin-Expression von der Tumorentität und andererseits die Anwendung verschiedener Nachweismethoden durch die Autoren diskutiert.

Für das kolorektale Karzinom wurde in einer kürzlich erschienenen Arbeit von Xi et al. 2011 eine inverse Korrelation zwischen erhöhter Livin- und Survivin-Expression und dem Gesamtüberleben der Patienten ermittelt. Das dabei untersuchte Kollektiv umfasste sechzig Patienten. Die Expressionsrate wurde immunhistochemisch detektiert. Eine Differenzierung der Livin-Isoformen erfolgte nicht.

Die divergenten Resultate der vorgelegten Arbeit bezüglich der Überlebens-Wahrscheinlichkeit im Vergleich zu den vorgenannten Publikationen könnte die hohen interindividuellen Livin-Expressionslevel bei insgesamt kleinem untersuchten Patientenkollektiv zugrunde liegen. Andererseits könnten mögliche posttranskriptionelle Veränderungen für die unterschiedlichen Ergebnisse relevant sein, die bisher nicht weitergehend abgeklärt wurden (s. u.).

D) Livin als möglicher zukünftiger unabhängiger Tumormarker im KRK und immuntherapeutischer Therapie-Ansatz

Ein Tumormarker ist definiert als eine Substanz (dabei häufig ein Protein oder Glykoprotein), die aus Körperflüssigkeiten oder Gewebeproben bestimmt werden kann und anhand deren Vorliegens und/ oder derer Dynamik im Verlauf der Erkrankung eine prognostische Aussage hinsichtlich einer Tumorerkrankung gewonnen werden kann. Die Bestimmung sollte routinemäßig und reproduzierbar durchführbar sein und es sollte vor allem keine Abhängigkeit von anderen Faktoren bestehen, z. B. Alter und Geschlecht.

Der aktuelle Stellenwert von Livin als prognostischer Parameter und damit Tumormarker ist noch ungewiss bei größtenteils noch unklarer v. a. zellulärer Wirkungsweise auf der posttranskriptionalen Ebene (s. u.) (Chang et al., 2006).

So konnten neue Studien zeigen, dass die Funktionen der Livin Splicevarianten Alpha und Beta offenbar verschieden sind. Livin Beta kommt demnach sowohl eine anti- als auch proapoptotische Wirkung zu (Wang et al., 2008).

Die duale Eigenschaft in der Tumorgenese von Livin konnte auch bereits für das maligne Melanom im Tierversuch gezeigt werden (Abd-Elrahman et al., 2009). In einigen weiterführenden Untersuchungen Abd-Elrahmans konnte dargestellt werden, dass das Protein Livin in der trunkierten Form einen proapoptotischen Effekt hat, dies sowohl für Livin Alpha als auch Beta. Dabei überwiegt bei der Koexpression der dominante proapoptotische Effekt des Livin Beta vor Alpha. Die Steuerung und De-/Aktivierung zum gespaltenen trunkierten Livin ist jedoch noch unklar. Hinsichtlich der zitierten Studie ist auffällig, dass eine Häufung von Tumoren im Tiermodell beschrieben wird, jedoch ohne spezielle Auflistung der ermittelten Tumorentitäten. Zudem wurden weitergehende Untersuchungen ausschließlich an Melanozyten durchgeführt. Die Übertragbarkeit auf andere Tumore u. a. das kolorektale Karzinom ist deshalb noch zu klären.

Ein gänzlich neuer Ansatz wurde durch Haferkamp et al., 2008 erbracht. Es konnte dargelegt werden, dass die Unterscheidung der Livin-Expressionsrate im Nukleus zum Zytoplasma, bedeutsam für das Patienten-Überleben ist. Dabei ist der nukleäre Livin-Anteil ein relevanter

prognostischer Marker im Gegensatz zum cytoplasmatischen Anteil. Die dafür verantwortlichen zellulären Pathways sind komplex und aktuell nur zum Teil verstanden und müssen deshalb Gegenstand zukünftiger Experimente sein. Weiterhin unklar ist, wie die anti- und proapoptotische Eigenschaft von Livin Alpha und Beta und deren Koexpression gesteuert wird. Dies könnte in der Weiterführung der Arbeit einen möglichen Ansatzpunkt für eine gezielte Tumorthherapie darstellen.

E) Kritische Wertung und weiterführende Ausblicke

Die bedeutsame Rolle des Livin in der Karzinogenese wurde schon für viele Tumore dargestellt. Livin kommt als Vertreter der IAP eine besondere Stellung zu, da bisher keine wesentliche Expression beim Erwachsenen im korrespondierenden Normalgewebe nachgewiesen werden konnte. Deshalb ist für die Zukunft eine therapeutische Anwendung als Target-Therapie gut vorstellbar.

In den vergangenen Jahren konnte in weiterführenden Untersuchungen wie Tier- und Zellkultur-Versuchen die duale Wirkungsweise der Isoformen Livin Alpha und Beta auf die Karzinogenese dargestellt werden (Wang et al., 2008; Abd-Elrahman et al., 2009). Die pro- bzw. antiapoptotische Funktion ist einerseits von der posttranslationellen Veränderung des Proteins Livin abhängig, als auch der daraus resultierenden unterschiedlichen Lokalisation im Zellkompartiment (Nachmias et al., 2007). So ist es ggf. erklärbar, dass bei nachweislicher Livin-Gen-Überexpression bei verschiedenen Tumorentitäten sowohl positive als auch negative Korrelationen im Vergleich zur Überlebens-Wahrscheinlichkeit der Patienten beobachtbar waren, da keine weitergehende Differenzierung vorgenommen wurde (Gazzaniga et al., 2003; Choi et al., 2007). In der vorgelegten Arbeit konnte auch nachgewiesen werden, dass es einen Trend zwischen der Livin-Expressionsrate in Korrelation zu höheren Tumorstadien gibt, jedoch ohne Ausprägung eines Signifikanz-Niveau und den statistischen Nachweis einer Relevanz für das Patienten-Überleben. Kritisch zu erwähnen ist aber, dass die ermittelten Daten auf einem kleinen Patientenkollektiv beruhen. Zudem fanden die im Einzelnen verwandten adjuvanten Behandlungsformen keine Berücksichtigung in der Auswertung, da diese nicht bekannt waren. Eine weitergehende Analyse der Isoformen Livin und ggf. durchlaufende posttranslationelle Veränderungen wurden ebenfalls nicht untersucht.

Generell ist in den vorangegangenen Studien insbesondere der immunhistochemischen Untersuchungen zu beachten, dass der Nachweis von Zellzyklusproteinen wie Livin nichts über die

Funktionsfähigkeit aussagen kann, da dies eine statische Momentaufnahme des Zellzyklus darstellt.

Die vorgelegte Arbeit und die meisten Studien in der Literatur deuten daraufhin, dass Livin ein hohes Potenzial als unabhängiger negativer prädiktiver Tumormarker hat.

Für eine abschließende Bewertung müssen jedoch in vivo die z. T. divergente Wirkung der Isoformen Livin Alpha und Beta geklärt werden, u. a. mittels Lokalisationsuntersuchungen der Subkompartimente z. B. durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie.

Des Weiteren ist zu untersuchen, ob Interaktionen durch die anderen Vertreter der “Inhibitor of Apoptosis“-Familie im kolorektalen Karzinom zum Livin-Expressionslevel vorliegen, ob/ wie diese sich gegenseitig beeinflussen und welche endogenen bzw. exogenen Stimuli zur De-/Aktivierung der Livin-Trunkierung führen.

Vor dem genannten Hintergrund ist die Wichtigkeit der Bemühungen um immuntherapeutische Strategien erkennbar, dafür sind aber v. a. zur Erkennung systemischer potenzieller Toxizität durch Livin-Inhibitoren, die Wirkungsweise des Livin auf zellulärer Ebene zu bestimmen, u. a. durch Knock-Out-Versuche.

Für den Gewinn weiterer Erkenntnisse ist die Generierung eines größeren Patientenkollektives erforderlich mit Feststellung der klinisch-pathologischen Parameter während der Tumornachsorge/ adjuvanten Therapie. Während der Nachbeobachtungszeit sollte auch eine Etablierung der Livin-Bestimmung im peripheren Blut erfolgen bei gleichzeitiger detaillierter Dokumentation der gewählten Therapie. In dieser prospektiven Studie könnte so ermittelt werden, ob mit einem Tumorrezidiv ein Livinspiegel-Anstieg einhergeht.

6 Zusammenfassung

Molekulargenetische Untersuchung der RNS-Expressionsrate des Apoptoseinhibitors Livin Alpha im kolorektalen Karzinom und dessen prognostischen Wertes in Bezug zur Tumorprogression

Die Inhibierung der Apoptose ist ein bedeutsamer Faktor der Karzinogenese. In zahlreichen Untersuchungen konnte die fundamentale Rolle zur Steuerung der Apoptose durch die Gruppe der „Inhibitoren of Apoptosis“ (IAP) nachgewiesen werden.

Die Bedeutsamkeit und Übertragbarkeit auf klinisch pathologische Prozesse wurde deshalb für Livin, einem Vertreter der IAP, in der vorgelegten Arbeit anhand des kolorektalen Karzinoms (KRK) untersucht.

In Gewebe-Kryoasservaten eines Kollektives von 47 Patienten wurde die Livin-Expressionsrate der Isoform Alpha mittels real-time PCR (Polymerase-Kettenreaktion) quantifiziert, dies vergleichend im Normal- zum Tumorgewebe. Zur Beurteilung einer ggf. bestehenden Korrelation der Livin-Expressionsrate zur postoperativen Patienten-Überlebensrate wurde diese in Bezug gesetzt und mittels Kaplan-Meier-Methode ausgewertet.

Ziel der vorgelegten Arbeit war zu beurteilen, ob Livin ein möglicher unabhängiger Tumormarker für das kolorektale Karzinom ist und bei positiver Feststellung mit welcher prognostischen Aussage eine Überexpression einhergeht.

Da heute noch zum Diagnosezeitpunkt 30% der KRK in einem nicht mehr kurativ resektablen Stadium sind und trotz Nachsorge ca. 50% der Patienten ein Lokalrezidiv oder Metastasen entwickeln, ist die Detektion eines prognostischen Faktors für die weitere Therapie von großer Relevanz.

In den erhobenen Daten zeigten die Livin-Expressionsraten in höheren Tumorstadien pT3 und 4 eine positive Korrelation ohne Erreichen einer Signifikanz, ein Bezug zum Alter und Geschlecht war nicht nachweisbar. Bezüglich des Patienten-Überleben konnte insgesamt kein Unterschied in der Überlebenszeit festgestellt werden. Dies sollte prospektiv mit größerer Patienten-Fallzahl hinsichtlich der prädiktiven prognostischen Signifikanz hinsichtlich der Wahrscheinlichkeit eines Tumorrezidivs weiter abgeklärt werden.

Weitergehende Analysen der Wirkungsweise Livin auf zellulärer posttranslationeller Ebene und Tierversuche mit Knock-Out Mäusen erscheinen sinnvoll, um die Livin-Funktion und der Isoformen beurteilen zu können.

7 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Helmut Erich Gabbert, Direktor des Institut für Pathologie danke ich für die Möglichkeit die Dissertation am Institut für Pathologie der Universität Düsseldorf erstellen zu können.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Stephan Ernst Baldus, Oberarzt des Institut für Pathologie der Universitätsklinik Düsseldorf für die Überlassung des Themas und seine Hilfsbereitschaft bei der Bearbeitung. Seine stetige und geduldige Unterstützung war eine grundlegende Hilfe bei der Erarbeitung des Themas.

Herrn PD Dr. rer. nat. Karl Ludwig Schäfer und Herrn PD Dr. rer. nat. Csaba Mahotka, Institut für Pathologie, danke ich für Ihre Betreuung bei der Laborarbeit.

Im Besonderen bedanke ich mich bei Frau Julia Lange und Frau Niermann-Kaiser, die mich in die Laborarbeit eingeführt haben und stets unterstützt haben bei Messungen und Fragen zur Labortechnik.

Abschließend danke ich meinen Eltern und meinen drei Geschwistern für ihre Hilfen auf meinem Lebensweg, ihre Zuneigung und Liebe.

Literaturverzeichnis

- Abd-Elrahman I., Hershko K., Neuman T., Nachmias B., Perlman R. und Ben-Yehuda D. (2009): The inhibitor of apoptosis protein Livin (ML-IAP) plays a dual role in tumorigenicity. *Cancer Res*; 69 (13): 5475-80.
- Ambrosini G., Adida C. und Altieri D. C. (1997): A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med*; 3 (8): 917-21.
- Ashhab Y., Alian A., Polliack A., Panet A. und Yehuda D. B. (2001): Two splicing variants of a new inhibitor of apoptosis gene with different biological properties and tissue distribution pattern. *FEBS Lett*; 495 (1-2): 56-60.
- Baldus S. E. (2003): Klinisch-pathologische und molekulare Prognosefaktoren kolorektaler Karzinome. *Pathologe*; 24 (1): 49-60.
- Baylin S. B., Herman J. G., Graff J. R., Vertino P. M. und Issa J. P. (1997): Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res*; 72: 141-96.
- Bente D. A. (2003): Evaluierung konventioneller und real-time RT-PCR-Protokolle für die spezifische Diagnose des Virus der klassischen Schweinepest. Dissertation, Institut für Virologie, Tierärztliche Hochschule Hannover.
- Bingham S. A., Day N. E., Luben R., Ferrari P., Slimani N., Norat T., Clavel-Chapelon F., Kesse E., Nieters A., Boeing H., Tjønneland A., Overvad K., Martinez C., Dorronsoro M., Gonzalez C. A., Key T. J., Trichopoulou A., Naska A., Vineis P., Tumino R., Krogh V., Bueno-de-Mesquita H. B., Peeters P. H., Berglund G., Hallmans G., Lund E., Skeie G., Kaaks R. und Riboli E. (2003): Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet*; 361 (9368): 1496-501.
- Birkenkamp-Demtroder K., Olesen S. H., Sørensen F. B., Laurberg S., Laiho P., Aaltonen L. A. und Orntoft T. F. (2005): Differential gene expression in colon cancer of the caecum versus the sigmoid and rectosigmoid. *Gut*; 54(3): 374-84.
- Boland C. R., Sato J., Appelman H. D., Bresalier R. S. und Feinberg A. P. (1995): Microallelotyping defines the sequence and tempo of allelic losses at tumour suppressor gene loci during colorectal cancer progression. *Nat Med*; 1 (9): 902-9.
- Boyle P. & Langman J. S. (2000): ABC of colorectal cancer: Epidemiology. *BMJ*; 321 (7264): 805- 8.
- Cecconi F., Alvarez-Bolado G., Meyer B. I., Roth K. A. und Gruss P. (1998): Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development. *Cell*; 94 (6): 727-37.
- Chang H. & Schimmer A. D. (2007): Livin/melanoma inhibitor of apoptosis protein as a potential therapeutic target for the treatment of malignancy. *Mol Cancer Ther*; 6 (1): 24-30.
- Chen W. C., Liu Q., Fu J. X. und Kang S. Y. (2004): Expression of survivin and its significance in colorectal cancer. *World J Gastroenterol*; 10 (19): 2886-9.

- Choi J., Hwang Y. K., Sung K. W., Lee S. H., Yoo K., Jung H., Koo H. H., Kim H. J., Kang H. J., Shin H. Y. und Ahn H. S. (2007): Expression of Livin, an antiapoptotic protein, is an independent favorable prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*; 109 (2): 471-7.
- Chomczynski P. & Sacchi N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*; 162 (1): 156-9.
- Conlin A., Smith G., Carey F. A., Wolf C. R. und Steele R. J. C. (2005): The prognostic significance of K-ras, p53, and APC mutations in colorectal carcinoma. *Gut*; 54 (9): 1283-6.
- Crnković-Mertens I., Muley T., Meister M., Hartenstein B., Semzow J., Butz K. und Hoppe-Seyler F. (2006): The anti-apoptotic livin gene is an important determinant for the apoptotic resistance of non-small cell lung cancer cells. *Lung Cancer*; 54 (2): 135-42.
- Crnković-Mertens I., Wagener N., Semzow J., Grone E. F., Haferkamp A., Hohenfellner M., Butz K. und Hoppe-Seyler F. (2007): Targeted inhibition of Livin resensitizes renal cancer cells towards apoptosis. *Cell Mol Life Sci*; 64 (9): 1137-44.
- Crook N. E., Clem R. J. und Miller L. K. (1993): An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol*, 67 (4): 2168-74.
- Cunningham J. M., Christensen E. R., Tester D. J., Kim C. Y., Roche P. C., Burgart L. J. und Thibodeau S. N. (1998): Hypermethylation of the hMLH1 promotor in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res*; 58 (15): 3455-60.
- Davoodi J., Lin L., Kelly J., Liston P. und MacKenzie A. E. (2004): Neuronal apoptosis- inhibitory protein does not interact with Smac and requires ATP to bind caspase-9. *J Biol Chem*; 279 (39): 40622-8.
- Dai C. H., Li J., Shi S. B., Yu L. C., Ge L. P. und Cheng P. (2010): Survivin and Smac gene expressions but not livin are predictors of prognosis in non-small cell lung cancer patients treated with adjuvant chemotherapy following surgery. *Jpn J Clin Oncol*; 40 (4): 327-35.
- Debatin K. M. und Fulda S. (2004): Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets*; 4 (7): 569-76.
- Degterev A. und Yuan J. (2008): Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 9 (5): 378-90.
- Deveraux Q. L. und Reed J. C. (1999): IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev*, 13 (3): 239-252.
- Dörfer J., Hohenberger W., Schmiegell W., Schulmann K. und Andre N. (2008): Kolorektales Karzinom. In: Kiemann, J. F. et al. (Hrsg.): *Gastroenterologie*. Georg Thieme Verlag: Stuttgart; 4. Auflage; 1 (6): 846-8.
- Duckett C. S. (2005): IAP proteins: sticking it to Smac. *Biochem J*; 385 (Pt 1): e1-2.
- Duffy M. J., O'Donovan N., Brennan D. J., Gallagher W. M. und Ryan B. M. (2007): Survivin: a promising tumor biomarker. *Cancer Lett*; 249 (1): 49-60.

- Esteller M., González S., Risques R. A., Marcuello E., Mangues R., Germà J. R., Herman J. G., Capellà G. und Peinado M. A. (2001): K-ras and p16 aberrations confer poor prognosis in human colorectal cancer. *J Clin Oncol*; 19 (2): 299-304.
- Evans R. C., Fear S., Ashby D., Hackett A., Williams E., Van der Vliet M., Dunstan F. D. J. und Rhodes J. M. (2002): Diet and colorectal cancer: an investigation of the lectin/galactose hypothesis. *Gastroenterology*; 122 (7): 1784-92.
- Fearon E. R. und Vogelstein B. (1990): A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*; 61 (5): 759-67.
- Ferlay J., Autier P., Boniol M., Heanue M., Colombet M. und Boyle P. (2007): Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol*; 18 (3): 581-92.
- Friedl W. (2002): Sporadische Darmtumoren. *Medgen*; 14: 145-151.
- Gazzaniga P., Gradilone A., Giuliani L., Gandini O., Silvestri I., Nofroni I., Saccani G., Frati L. und Agliano A. M. (2003): Expression and prognostic significance of Livin, Survivin and other apoptosis-related genes in the progression of superficial bladder cancer. *Ann Oncol*; 14 (1): 85-90.
- Giovannucci E. und Michaud D. (2007): The role of obesity and related metabolic disturbances in cancers of the colon, prostate, and pancreas. *Gastroenterology*; 132 (6): 2208-25.
- Gordon, G. J., Mani M., Mukhopadhyay L., Dong L., Edenfield H. R., Glickman J. N., Yeap B. Y., Sugarbaker D. J. und Bueno R. (2007): Expression patterns of inhibitor of apoptosis proteins in malignant pleural mesothelioma. *J Pathol*; 211 (4): 447-54.
- Groden J., Thliveris A., Samowitz W., Carlson M., Gelbert L., Albertsen H., Joslyn G., Stevens J., Spirio L., Robertson M., Sargeant L., Krapcho K., Wolff E., Burt R., Hughes J. P., Warrington J., McPherson J., Wasmuth J., Le Paslier D., Abderrahim H., Cohen D., Leppert M. und White R. (1991): Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell*; 66 (3): 589-600.
- Haferkamp A., Bedke J., Vetter C., Pritsch M., Wagener N., Buse S., Crnkovic-Mertens I., Hoppe-Seyler K., Macher-Goeppinger S., Hoppe-Seyler F., Autschbach F. und Hohenfellner M. (2008): High nuclear Livin expression is a favourable prognostic indicator in renal cell carcinoma. *BJU Int*; 102 (11): 1700-6.
- Hearle N., Schumacher V., Menko F. H., Olschwang S., Boardman L. A., Gille J. J., Keller J. J., Westerman A. M., Scott R. J., Lim W., Trimbath J. D., Giardiello F. M., Gruber S. B., Offerhaus G. J., de Rooij F.W., Wilson J. H., Hansmann A., Möslin G., Royer-Pokora B., Vogel T., Phillips R. K., Spigelman A. D. und Houlston R. S. (2006): Frequency and spectrum of cancers in the Peutz-Jeghers syndrome. *Clin Cancer Res*; 12 (10): 3209-3215.
- Hauser H., Zitt M., Berger A., Herbst F., Heuberger A., Klimpfinger M., Lechner P., Pfeifer H., Karner-Hanusch J., Mischinger H. J., Teleky B., Tschemelitsch J. und Tuchmann A. (2010): Kolorektales Karzinom. *J Gastroenterol Hepatol Erkr*; 8 (2): 42- 59.

- Halle M. und Schoenberg M. H. (2009): Körperliche Aktivität in der Prävention und Therapie des kolorektalen Karzinoms. *Dtsch Ärztebl Int*; 106 (44): 722-7.
- Hegde R., Srinivasula S. M., Zhang Z., Wassell R., Mukattash R., Cilenti L., DuBois G., Lazebnik Y., Zervos A. S., Fernandes-Alnemri T. und Alnemri E. S. (2002): Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem*; 277 (1): 432-8.
- Higuchi R., Fockler C., Dollinger G. und Watson R. (1993): Kinetic PCR: Real time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (NY)*; 11 (9): 1026-1030.
- Horvitz, H. R., Shaham, S. und Hengartner, M. O. (1994): The genetics of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*; 59: 377-85.
- Kasof G. M. und Gomes B. C. (2001): Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. *J Biol Chem*; 276 (5): 3238-46.
- Karp, G. (Hrsg.) (2005): Zelluläre Signale und Signalübertragung: Kommunikation zwischen Zellen. In: *Molekulare Zellbiologie*. Springer Verlag: Berlin, Heidelberg, New York; 816-820.
- Kempkensteffen C., Hinz S., Christoph F., Krause H., Koellermann J., Magheli A., Schrader M., Schostak M., Miller K. und Weikert S. (2007): Expression of the apoptosis inhibitor livin in renal cell carcinomas: correlations with pathology and outcome. *Tumour Biol*; 28 (3):132-8.
- Kern S. E., Fearon E. R., Tersmette K. W., Enterline J. P., Leppert M., Nakamura Y., White R., Vogelstein B. und Hamilton S. R. (1989): Clinical and pathological associations with allelic loss in colorectal carcinoma. *JAMA*; 261 (21): 3099-103.
- Kerr J. F., Wyllie A. H. und Currie A. R. (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*; 26 (4): 239-57.
- Kim, D. K., Alvarado C. S., Abramowsky C. R., Gu L., Zhou M., Soe M. M., Sullivan K., George B., Schemankewitz E. und Findley H. W. (2005): Expression of inhibitor-of-apoptosis protein (IAP) livin by neuroblastoma cells: correlation with prognostic factors and outcome. *Pediatr Dev Pathol*; 8 (6): 621-9.
- Kim H. E., Du F., Fang M. und Wang X. (2005): Formation of apoptosome is initiated by cytochrome c-induced dATP hydrolysis and subsequent nucleotide exchange on Apaf-1. *Proc Natl Acad Sci USA*; 102 (49): 17545-50.
- Knudson A. G. Jr., Meadows A. T., Nichols W. W. und Hill R. (1976): Chromosomal deletion and retinoblastoma. *N Engl J Med*; 295 (20): 1120-3.
- Kolonel L. N., Altshuler D. und Henderson B. E. (2004): The multiethnic cohort study: exploring genes, lifestyle and cancer risk. *Nat Rev Cancer*; 4 (7): 519-27.
- LaCasse E. C., Baird S., Korneluk R. G. und MacKenzie A. E. (1998): The inhibitors of apoptosis (IAP) and their emerging role in cancer. *Oncogene*; 17 (25): 3247-59.
- Lauber K., Engels I. H. und Wesselborg S. (2004): Apoptose-Prinzipien der Apoptosesignaltransduktion. *Onkologe*; 10 (S1): 58-61.

Le Voyer T. E., Sigurdson E. R., Hanlon A. L., Mayer R. J., Macdonald J. S., Catalano P. J. und 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 (15): 2912-9.

Li J. H., He W. J. und He Y. J. (2007): Expression and clinical significance of Survivin and Livin in DukesB colorectal cancer. *Ai Zheng*; 26 (5): 547-51.

Lichtenstein P., Holm N. V., Verkasalo P. K., Iliadou A., Kaprio J., Koskenvuo M., Pukkala E., Skytthe A. und Hemminki K. (2000): Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med*; 343 (2): 78-85.

Lin J. H., Deng G., Huang Q. und Morser J. (2000): KIAP, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family. *Biochem Biophys Res Commun*; 279 (3): 820-31.

Liston P., Fong W. G. und Korneluk R. G. (2003): The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2. *Oncogene*; 22 (53): 8568-80.

Liu B., Parsons R., Papadopoulos N., Nicolaides N. C., Lynch H. T., Watson P., Jass J. R., Dunlop M., Wyllie A., Peltomaki P., de la Chapelle A., Hamilton S. R., Vogelstein B. und Kinzler K. W. (1996): Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nat Med*; 2 (2): 169-74.

Liu, B., Han M., Wen J. K. und Wang L. (2007): Livin/ML-IAP as a new target for cancer treatment. *Cancer Lett*; 250 (2): 168-76.

Lopes, R. B., Gangeswaran R., McNeish I. A., Wang Y. und Lemoine N. R. (2007): Expression of the IAP protein family is dysregulated in pancreatic cancer cells and is important for resistance to chemotherapy. *Int J Cancer*; 120 (11): 2344-52.

Lynch H. T., Lynch P. M., Lanspa S. J., Synder C. L., Lynch J. F. und Boland C. R. (2009): Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clin Genet*; 76 (1): 1-18.

Nachmias B., Ashhab Y., Bucholtz V., Drize O., Kadouri L., Lotem M., Peretz T., Mandelboim O. und Ben-Yehuda D. (2003): Caspase-mediated cleavage converts Livin from an antiapoptotic to a proapoptotic factor: implications for drug-resistant melanoma. *Cancer Res*; 63 (19): 6340-9.

Nachmias B., Lazar I., Elmalech M., Abed-El-Rahaman I., Asshab Y., Mandelboim O., Perlman R. und Ben-Yehuda D. (2007): Subcellular localization determines the delicate balance between the anti- and pro-apoptotic activity of Livin. *Apoptosis*; 12 (7):1129-42.

Neuhaus H. (1998): Vorsorge zur Prävention: oder Früherkennung des kolorektalen Karzinoms. *Dtsch Ärztebl*; 95 (10): A-530-7.

O'Connell J. B., Maggard M. A. und Ko C. Y. (2004): Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *J Natl Cancer Inst*; 96 (19): 1420-5.

Park H. H., Lo Y. C., Lin S. C., Wang L., Yang J. K. und Wu H. (2007): The death domain superfamily in intracellular signaling of apoptosis and inflammation. *Annu Rev Immunol*; 25: 561-86.

Peter M. E. und Krammer P. H. (2003): The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ*; 10 (1): 26-35.

Pitti R. M., Marsters S. A., Lawrence D. A., Roy M., Kischkel F. C., Dowd P., Huang A., Donahue C. J., Sherwood S. W., Baldwin D. T., Godowski P. J., Wood W. I., Gurney A. L., Hillan K. J., Cohen R. L., Goddard A. D., Botstein D. und Ashkenazi A. (1998): Genomics amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature*; 396 (6712): 699-703.

Poynter J. N., Haile R. W., Siegmund K. D., Campbell P. T., Figueiredo J. C., Limburg P., Young J., Le Marchand L., Potter J. D., Cotterchio M., Casey G., Hopper J. L., Jenkins M. A., Thibodeau S. N., Newcomb P. A., Baron J. A. und Colon Cancer Family Registry (2009): Associations between smoking, alcohol consumption, and colorectal cancer, overall and by tumor microsatellite instability status. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 18 (10): 2745-50.

Ried T., Heselmeyer-Haddad K., Blegen H., Schrock E. und Auer G. (1999): Genomics changes defining the genesis, progression, and malignancy potential in solid human tumors: a phenotype/genotype correlation. *Genes Chromosomes Cancer*; 25 (3):195-204.

RKI (Hrsg.) (2010): Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland: Entwicklung der Prävention zwischen 1990 und 2010. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes; 37-44.

Roche Applied Science (Hrsg.) (2005): Technical Notes. LC 16 update.

Rösch W. (1988): Risikoerkrankungen des kolorektalen Karzinoms. *Wien Med Wochenschr*; 138 (11-12): 278-81.

Satia J. A., Campbell M. K., Galanko J. A., James A., Carr C. und Sandler R. S. (2004): Longitudinal changes in lifestyle behaviors and health status in colon cancer survivors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 13 (6): 1022-31.

Salvesen G. S. und Dixit V. M. (1999): Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci USA*; 96 (20): 10964-7.

Salvesen G. S. und Duckett C. S. (2002): IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 3 (6):401-10.

Scherneck S. und Kölbl K. (1998): Mechanismen der Entstehung genetisch bedingter Krebsformen. In: Ganten, D., Ruckpaul K. (Hrsg.): Tumorerkrankungen, Handbuch der Molekularen Medizin. Springer Verlag, 2. Band: Berlin, Heidelberg, New York, 3-26.

Schmiegel W., Pox C., Reinacher-Schick A., Adler G., Arnold D., Fleig W., Fölsch U. R., Frühmorgen P., Graeven U., Heinemann V., Hohenberger W., Holstege A., Junginger T., Kopp I., Kühlbacher T., Porschen R., Propping P., Riemann J. F., Rödel C., Sauer R., Sauerbruch T., Schmitt W., Schmoll H. J., Seufferlein T., Zeitz M. und Selbmann H. K. (2008): S3-Leitlinie „Kolorektales Karzinom“ Ergebnisse evidenzbasierter Konsensuskonferenzen am 6./ 7. Februar 2004 und am 8./ 9. Juni 2007 (für die Themenkomplexe IV, VI and VII). *Z Gastroenterol*; 46 (1):

1-73.

Shiozaki E. N., Chai J., Rigotti D. J., Riedl S. J., Li P., Srinivasula S. M., Alnemri E. S., Fairman R. und Shi Y. (2003): Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Mol Cell*; 11 (2): 519-27.

Schulmann K. und Schmiegel W. (2002): Kolorektales Karzinom. In: Ganten D., Ruckpaul K., Hahn S. A., Schmiegel W. (Hrsg.): *Molekularmedizinische Grundlagen von nicht-hereditären Tumorerkrankungen*. Springer Verlag: Berlin, Heidelberg, New York; 231-256.

Söderlund S., Brandt L., Lapidus A., Karlén P., Broström O., Löfberg R., Ekbom A., Askling J. (2009): Decreasing time-trends of colorectal cancer in a large cohort of patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*; 136 (5): 1561-7.

Schmoll H.- J. und Arnold D. (2006): Kolorektales Karzinom. In: Schmoll H. J., Höffken K. und Possinger K. (Hrsg.): *Kompendium Internistische Onkologie*. Springer Verlag: Berlin, Heidelberg, New York, 4. Auflage; 3787-934.

Srinivasula S. M. und Ashwell J. D. (2008): IAP: what's in a name? *Mol Cell*; 30 (2): 123-35.

Takahashi R., Deveraux Q., Tamm I., Welsh K., Assa-Munt N., Salvesen G. S. und Reed J. C. (1998): A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J Biol Chem*; 273 (14): 7787-90.

Terry P., Giovannucci E., Michels K. B., Bergkvist L., Hansen H., Holmberg L. und Wolk A. (2001): Fruit, vegetables, dietary fiber, and risk of colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst*; 93 (7): 525-33.

Triantafillidis J. K., Nasioulas G. und Kosmidis P. A. (2009): Colorectal cancer and inflammatory bowel disease: epidemiology, risk factors, mechanisms of carcinogenesis and prevention strategies. *Anticancer Res*; 29 (7): 2727-37.

Wang L., Zhang Q., Liu B., Han M. und Shan B. (2008): Challenge and promise: roles for Livin in progression and therapy of cancer. *Mol Cancer Ther*; 7 (12): 3661-9. DOI: 10.1158/1535.7163.MCT-08-0480.

WHO. (2000): *World Health Organization Classification of Tumours, Pathology and Genetics of Tumours of the digestive System*. Lyon: IARC Press. URL: <http://apps.who.int/bookorders/anglais/detart1.jsp?sesslan=1&codlan=1&codcol=70&codcch=2>.

Winawer S. J., St John D. J., Bond J. H., Rozen P., Burt R. W., Waye J. D., Kronborg O., O'Brien M. J., Bishop D. T., Kurtz R. C., Shike M., Swaroop S. V., Levin B., Frümorgen P. und Lynch H. T. (1996): Prevention of colorectal carcinoma. Current WHO guidelines for early detection of colorectal carcinoma. *World Health Organization Collaborating Center for the Prevention of Colorectal Cancer. Leber Magen Darm*; 26 (3):139-40, 143.

Winder T. und Lenz H.-J. (2010): Molecular predictive and prognostic markers in colon cancer. *Cancer Treat Rev*; 36 (7): 550- 6.

Wing L., Zhang Q., Liu B., Han M. und Shan B. (2008): Challenge and promise: roles for Livin in progression and therapy of cancer. *Mol Cancer Ther*; 7 (12): 3661-9.

Wittekind C. H., Meyer H. J. und Bootz F. (Hrsg.) (2002): TNM-Klassifikation maligner Tumoren (UICC). Springer: Berlin, Heidelberg, New York; 6. Auflage.

Wrba F. (Hrsg.) (2001): Suppressorgene und Onkogene: Grundlagen der Tumorgenese. In: Facultas: Wien, 2. Auflage, 80-2.

Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A. und Speleman F. (2002): Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*; 3 (7): RESEARCH0034.

Vaux D. L. und Silke J. (2005): IAP, RINGs and ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 6 (4): 287-97.

Verhagen A. M., Kratina T. K., Hawkins C. J., Silke J., Ekert P. G. und Vaux D. L. (2007): Identification of mammalian mitochondrial proteins that interact with IAP via N-terminal IAP binding motifs. *Cell Death Differ*; 14(2): 348-57.

Vogelstein B., Fearon E. R., Hamilton S. R., Kern S. E., Preisinger A. C., Leppert M., Nakamura Y., White R., Smits A. M. und Bos J. L. (1988): Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*; 319 (9): 525-32.

Vucic D., Stennicke H. R., Pisabarro M. T., Salvesen G. S. und Dixit V. M. (2000): ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas. *Curr Biol*; 10 (21): 1359-66.

Vucic D., Franklin M. C., Wallweber H. J., Das K., Eckelman B. P., Shin H., Elliott L. O., Kadkhodayan S., Deshayes K., Salvesen G. S. und Fairbrother W. J. (2005): Engineering ML-IAP to produce an extraordinarily potent caspase 9 inhibitor: implications for Smac-dependent anti-apoptotic activity of ML-IAP. *Biochem J*; 385 (Pt 1): 11-20.

Xi R. C., Biao W. S., und Gang Z. Z. (2011): Significant elevation of survivin and livin expression in human colorectal cancer: inverse correlation between expression and overall survival. *Onkologie*; 34 (8-9): 428-32.

Xiang Y., Yao H., Wang S., Hong M., He J., Cao S., Min H., Song E. und Guo X. (2006): Prognostic value of Survivin and Livin in nasopharyngeal carcinoma. *Laryngoscope*; 116 (1): 126-30.

Yagihashi A., Asanuma K., Tsuji N., Torigoe T., Sato N., Hirata K. und Watanabe N. (2003): Detection of anti-livin antibody in gastrointestinal cancer patients. *Clin Chem*; 49 (7): 1206-8.

Yeh W.-C., Itie A., Elia A. J., Ng M., Shu H.-B., Wakeham A., Mirtsos C., Suzuki N., Bonnard M., Goeddel D. V. und Mak T. W. (2000): Requirement for Casper (c-FLIP) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development. *Immunity*; 12 (6): 633-42.

Youle R. J. und Strasser A. (2008): The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 9 (1): 47-59.

Anhang

Tabelle 10: Relative Livin mRNA-Expressionsrate der untersuchten Patientenproben:

Fallnr.= Patientennr.; T= Tumor; N= Normalgewebe; konz.= Expressionsrate im Tumor- bzw. Normalgewebe für Livin.

Fallnr.	T_GAP-DH	T_Livin	T_konz.	N_GAP-DH	N_Livin	N_Konz.
2	2,396	34,03	14,20	19,12	23,14	1,21
4	5,786	140	24,19	7,369	46,61	6,32
10	162	67,51	0,41	16,38	66,46	4,05
13	131,3	59,08	0,44	3,555	51,19	14,39
16	19,57	87,91	4,49	12,07	182,1	15,08
17	2,241	174,7	77,95	19,81	56,05	2,82
18	1,923	413,6	215,08	177,7	105,4	0,59
19	38,41	88,73	2,31	160,1	15,05	0,09
21	1,318	93,46	70,91	6,793	27,75	4,08
22	20,93	109,7	5,24	15,03	113,8	7,57
24	100,9	8,734	0,08	432,4	37,58	0,08
29	22,78	276,3	12,12	22,9	681,9	29,77
30	4,969	1456	293,01	165,4	716,5	4,33
35	793,8	501,4	0,63	24,63	226,8	9,20
38	88,77	137,4	1,54	7,66	120,4	15,71
42	11,29	111,5	9,87	0,0033	12,45	3686,70
43	73,86	71	0,96	102,6	20,96	0,20
45	84,04	70,92	0,84	61,94	46,6	0,75
60	423,9	50,64	0,11	66,98	13,56	0,20
61	516,6	2233	4,32	99,63	36,47	0,36
65	16,67	309,3	18,55	17,69	121,9	6,89
66	38,08	2161	56,74	885,8	288,1	0,32
70	166,7	671,2	4,02	40,61	77,36	1,90
71	386,2	346,4	0,89	185,5	21,04	0,11
74	27,18	272,7	10,03	59,55	330,1	5,54
75	122,7	326,8	2,66	6,034	345,4	57,24
81	15,75	30,89	1,96	10,27	77,21	7,51
96	18,22	303,9	16,67	9,29	624,2	67,19
97	27,96	1060	37,91	250,8	4,104	0,01
98	104,6	6,338	0,06	6,664	2,086	0,31
105	127,5	11,52	0,09	48,85	19,55	0,40
107	53,98	26,04	0,48	114,3	8,558	0,07
109	51,33	660,9	12,87	1,915	5,22	2,72

111	177,5	16,42	0,09	165,2	4,697	0,02
112	88,12	161,8	1,83	425,5	10,58	0,02
114	613	101,6	0,16	478	3,253	0,006
115	0,8361	70,78	84,65	427,3	37,3	0,08
116	478	207,6	0,43	91,92	7,556	0,08
121	16,54	35,76	2,16	3,081	11,12	3,60
126	1019	575,6	0,56	132	20,38	0,15
127	122,3	58,89	0,48	59,7	13,6	0,22
129	17,4	29,57	1,69	66,64	20,73	0,31
212	1,118	0,9268	0,82	0,1688	6,689	39,62
213	283,5	10,01	0,03	1115	20,53	0,01
214	59,03	23,7	0,40	68,2	12,69	0,18
215	84,14	96,93	1,152	29,11	10,2	0,35
216	1268	35,64	0,02	267,9	134	0,50

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

21.03.2014, Viktoria Louise Schneitler

Unterschrift