

Aus der  
Klinik für Chirurgie  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. med. Hans-Peter Bruch

---

**Untersuchung zur Bildung von pKi-67  
Autoantikörpern beim kolorektalen Karzinom**

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

vorgelegt von  
Christian Hagen Ziems  
aus Radebeul

Lübeck 2006

1. Berichtstatter: Priv. - Doz. Dr. med. Dr. h. c. Peter Sterk

2. Berichtstatter: Priv. – Doz. Dr. med. Christopher Altgaßen

Tag der mündlichen Prüfung: 20.04.2007

Zum Druck genehmigt: Lübeck, den

## **bisherige Veröffentlichungen dieser Arbeit**

Duchrow M, Ziems C, Broll R, Habermann JK, Roblick UJ, Bruch HP (2006)  
Ki-67 Auto-Antibodies of Colorectal Cancer Patients  
27. Deutscher Krebskongress, Berlin, 22.-26.3.2006  
Scientific Proceedings of the 27th German Cancer Congress  
Im Internet veröffentlicht unter:  
<http://www.egms.de//en/meetings/dkk2006/06dkk313.shtml>

Duchrow M, Ziems C, Roblick UJ, Habermann JK, Broll R, Bruch HP (2006)  
Investigation of pKi-67 Auto-Antibodies in Colorectal Cancer Patients  
XXXXIth Congress of the European Society for Surgical Research (ESSR),  
Rostock/Germany, 17.-20. May 2006  
Eur. Surg. Res. 38 (Suppl. 1), 2006: 36  
Im Internet veröffentlicht unter:  
<http://www.essr2006.de/view.php?abstract=269&cat=0>

Duchrow M, Ziems C, Habermann J, Bruch HP (2006)  
Autoantikörper beim kolorektalen Karzinom  
177. Tagung der Vereinigung Nordwestdeutscher Chirurgen, Rostock/Germany, 8.-  
10. Juni 2006  
Zbl Chir 131, 2006: 262-263

Duchrow M, Ziems C, Broll R, Habermann JK, Roblick UJ, Bruch HP (2006)  
Ki-67 Auto-Antibodies in Colorectal Cancer Patients  
Congress "Molecular Staging of Cancer", Heidelberg/Germany, June 22-26, 2006  
Eur J Cancer Supplements 4 (No. 6), 2006, 52

# Inhaltsverzeichnis

	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	S. 6
<b>1)</b>	<b>Einleitung</b>	S. 8
	1.1) Der Zellzyklus	S. 9
	1.2) Expression von pKi-67 im Zellzyklus	S. 10
	1.3) Lokalisation von pKi-67 im Zellzyklus	S. 13
	1.4) Molekularbiologische Struktur von pKi-67	S. 14
	1.5) Funktion von pKi-67	S. 15
	1.6) Das kolorektale Karzinom	S. 17
	1.6.1) Allgemeines	S. 17
	1.6.2) Prognose	S. 19
	1.7) Tumorsuppressorgen p53	S. 20
	1.8) Ziele der Arbeit	S. 22
<b>2)</b>	<b>Patienten, Material und Methoden</b>	S. 24
	2.1) Patienten	S. 24
	2.2) Materialien	S. 25
	2.3) Methoden	S. 25
	2.3.1) Zellanzucht	S. 25
	2.3.2) Proteinisolierung	S. 25
	2.3.3) SDS-PAGE nach Lämmli	S. 26
	2.3.4) Blotten von Proteinen	S. 27
	2.3.5) Immunchemische Proteindetektion	S. 28
	2.4) Statistik und Darstellung	S. 29
<b>3)</b>	<b>Ergebnisse</b>	S. 30
	3.1) Charakterisierung des Patientenkollektivs	S. 30
	3.2) Westernblot-Analysen	S. 30
	3.3) Statistische Auswertung für pKi-67	S. 33

3.4)	Ergebnisse der Kontrollgruppe	S. 37
3.5)	Statistische Auswertung für p53	S. 38
3.6)	Vergleich der Daten gegen pKi-67 und p53 Autoantikörper getesteter Seren	S. 41
<b>4)</b>	<b>Diskussion</b>	S. 43
4.1)	Autoantikörperbildung gegen pKi-67 und p53	S. 44
4.2)	Vergleich der Studienergebnisse mit bekannten Daten	S. 45
4.3)	Schlussfolgerung	S. 47
<b>5)</b>	<b>Zusammenfassung</b>	S. 50
<b>6)</b>	<b>Literatur</b>	S. 52
<b>7)</b>	<b>Anhang</b>	S. 65
7.1)	Klassifizierung und Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms	S. 65
7.2)	Angaben über Stadienhäufigkeiten des kolorektalen Karzinoms für das Bundesland Schleswig-Holstein im Zeitraum von 1998 – 2005	S. 68
7.3)	Chemikalien und Antikörper	S. 69
7.4)	Puffer und Lösungen	S. 71
7.5)	Fragebogen und Patientenaufklärung	S. 74
<b>8)</b>	<b>Danksagung</b>	S. 81
<b>9)</b>	<b>Curriculum vitae</b>	S. 83
<b>10)</b>	<b>Eigenständigkeitserklärung</b>	S. 84

## Abkürzungsverzeichnis

0,1 M HCL	- 0,1 molare Salzsäure
APC-Gen	- Gen auf Chromosom 5, APC im Namen kommt von „adenomatöse polyposis coli“
AP conjugated	- „Alkaline phosphatase conjugated“
APS-Lsg	- Ammoniumpersulfat-Lösung
Bp	- Basenpaare, „base pairs“
c.i.s.	- „carcinoma <i>in situ</i> “
DCC - Gen	- „deleted in colon cancer“ gen
DMEM	- Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	- Desoxyribonukleinsäure, „desoxyribonucleic acid“
EGFR	- „epidermal growth factor receptor“
HCC	- Hepatocelluläres Karzinom
Hela S3 Zellen	- Zelllinie eines humanen Cervixkarzinomes
KD	- Kilodalton
k-ras – Gen	- Oncogen, „kirsten rat sarcoma“
MRL/MpJ	- gentechnisch veränderte Mäusestammlinie
mRNA	- messenger-Ribonukleinsäure, „messenger ribonucleic acid“
NBT/BCIP-Lösung	- Nitroblautetrazoliumchlorid/ 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat-Lösung
PBS	- „Phosphat buffered saline“
PET	- Positronenemissionstomographie
PVDF	- Polyvinylidenfluorid
RNA	- Ribonukleinsäure, „ribonucleic acid“
RPMI	- Roswell Park Memorial Institute
rRNA	- ribosomale Ribonukleinsäure
SDS-PAGE	- Natriumlaurylsulfat „sodium dodecyl (lauryl) sulphate“ – polyacrylamide gel electrophoresis
SGK RK	- Studiengruppe kolorektales Karzinom
SPSS	- „statistical package for social science“

Stamm BALB/c	- 1912 erstmals gezüchteter Stamm transgener Mäuse
SV40	- Simian Virus 40
SW 480	- Zelllinie eines humanen Kolonkarzinomes (Adenocarcinom)
TBS	- „Tris-buffered saline“
TBST	- „Tris-buffered saline Tween“
TEMED	- Tetramethylethylenediamine
TNM-System	- „tumor/nodus/metastase system“
UICC-Stadien	- „Union International contre le cancer“
VEGF	- „vascular endothelial growth factor“

## 1) Einleitung

1983 erfolgte die wissenschaftliche Erstbeschreibung des monoklonalen Antikörpers Ki-67, der ein Antigen erkennt, welches ausschließlich in proliferierenden Zellen nachweisbar ist. Für diese Arbeit wurden Mäuse (Stamm BALB/c) gegen die Zellkerne von Hodgkin- und Sternberg-Reed Zellen (L428 Zellen) immunisiert (Gerdes et al., 1983). Mittels der so genannten Hybridoma Technik wurden so Zellklone gewonnen, welche einen kernspezifischen Antikörper produzierten. Das von dem Antikörper erkannte Peptid wurde dementsprechend „Ki-67 Antigen“, bzw. nach der gängigen Nomenklatur für Proteine „pKi-67“ genannt: nach dem Ort seiner Entdeckung, Kiel, und nach der Nummer des Klones.

### 1.1) Der Zellzyklus

Die Zellteilung (Cytokinese) als Bestandteil des Zellzyklus ist Grundlage des Lebens. Der Prozess dient ein- und mehrzelligen Lebewesen zur Vermehrung und letzteren auch zum Wachstum. Vielzellige Organismen entstehen durch die aufeinander abgestimmte Abfolge von Zellteilung und programmierten Zelltod (Apoptose). Um den Status quo eines Erwachsenenstadiums zu erhalten, müssen im menschlichen Körper jede Sekunde Millionen von Zellen erneuert werden. Daraus erklärt sich die enorme Bedeutung der Regulation dieser Vorgänge. Entartete Zellen und somit Krebs entstehen im Prinzip dort im Körper, wo die geregelte Zellteilung außer Kontrolle geraten ist. Möglichkeiten hierzu sind entweder der Verlust, die Zellvermehrung zu stoppen oder die Anregung von ruhenden Zellen, erneut in den Zellzyklus einzutreten.

Nach der wissenschaftlichen Erstbeschreibung durch Flemming 1882 wurde der Begriff der Mitose für die Kernteilung von Eukaryonten eingeführt. Die so genannte M-Phase (Mitosephase) beschreibt als häufigste Form der Kernteilung eine exakte erbgleiche Weitergabe der Information infolge der Chromosomenverteilung. Das heute gültige Konzept des Zellzyklus beinhaltet insgesamt vier Phasen (Howard & Pelc 1951, 1953). Die sich mit der Mitose abwechselnde Interphase unterscheidet drei weitere Abschnitte. Maßgebend hierfür ist, dass die Replikation der DNA nur während der so genannten S-Phase (Synthesephase) stattfindet. Vor und nach dieser sind die G<sub>1</sub>-Phase und G<sub>2</sub>-Phase definiert (G von gap = Lücke). Die G<sub>1</sub>-Phase wird auch als Wachstumsphase der Zelle

bezeichnet. Zellen höherer Organismen, die zu speziellen Aufgaben differenziert sind, befinden sich in der postmitotischen  $G_0$ -Phase. Diese wird sowohl als Ruhephase (Pardee, 1989) oder auch Arbeitsphase bezeichnet. Vielen Zellen ist es jedoch möglich, auf bestimmte Signale hin wieder in die  $G_1$ -Phase zurückzukehren. Die nachfolgende Übersicht gibt einen schematischen Überblick des Zellzyklus nach dem aktuellen Stand der Forschung.

### **Mitose Phase** (siehe Abbildung 3)

- **Prophase:** Auflösung des Nucleolus, maximale Kondensierung des Chromatins zu Chromosomen, Sichtbarwerden der Chromatiden
- **Prometaphase:** Zusammenbruch der Kernmembran, Ausbildung der Spindelfasern
- **Metaphase:** Orientierung der Chromosomen durch Spindelfasern in Äquatorialebene
- **Anaphase:** Verschiebung der Chromatiden zu den Zellpolen
- **Telophase:** Dekondensation des Chromatins, Bildung neuer Kernmembran, Beginn der rRNA-Synthese
- **Cytokinese:** Bildung zweier Tochterzellen aus einer Mutterzelle unter Verteilung der Organellen

### **G1 Phase**

- Wachstumsphase nach der Mitose, ohne DNA Synthese

### **G0 Phase**

- Zellen scheren hier aus dem Zyklus aus, z.B. Zellen in "Dauergewebe," teilen sich im Normalfall nicht mehr

### **S Phase**

- Synthesephase, DNA wird durch Replikation / Chromatidenergänzung gebildet

### **G2 Phase**

- Wachstumsphase, Vorbereitung auf die Mitose Phase

Systematische Darstellung der Phasen des Zellzyklus (Quelle: Hirsch Kauffmann „Biologie für Mediziner“ Georg Thieme Verlag Stuttgart New York 3. Auflage 1996)

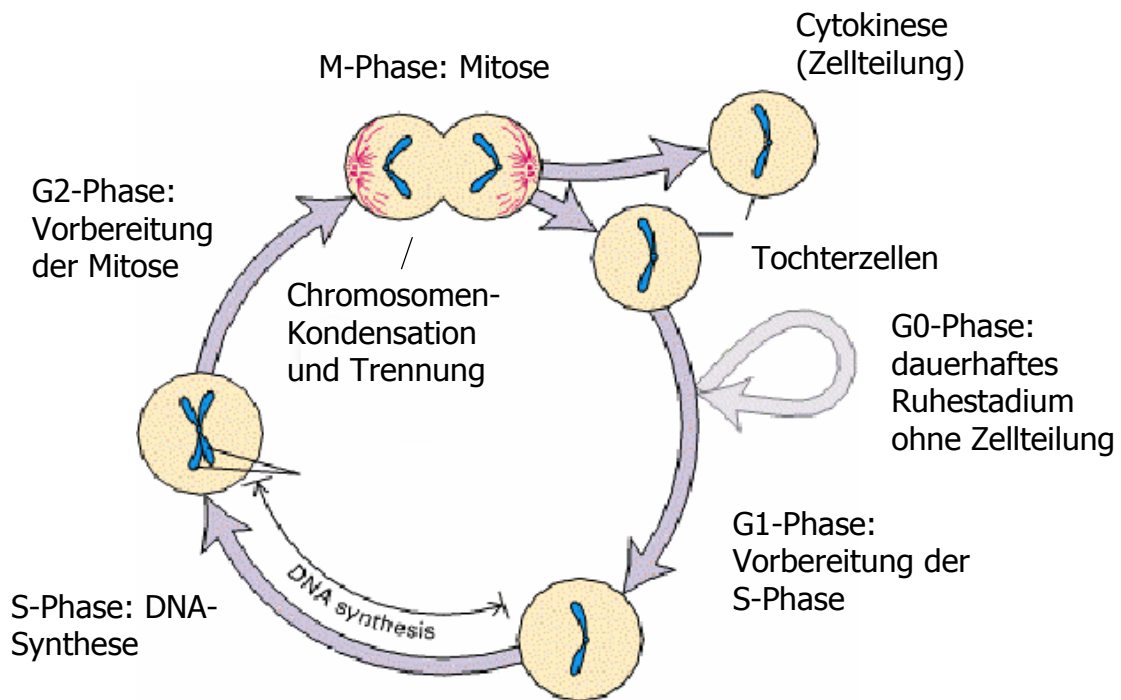
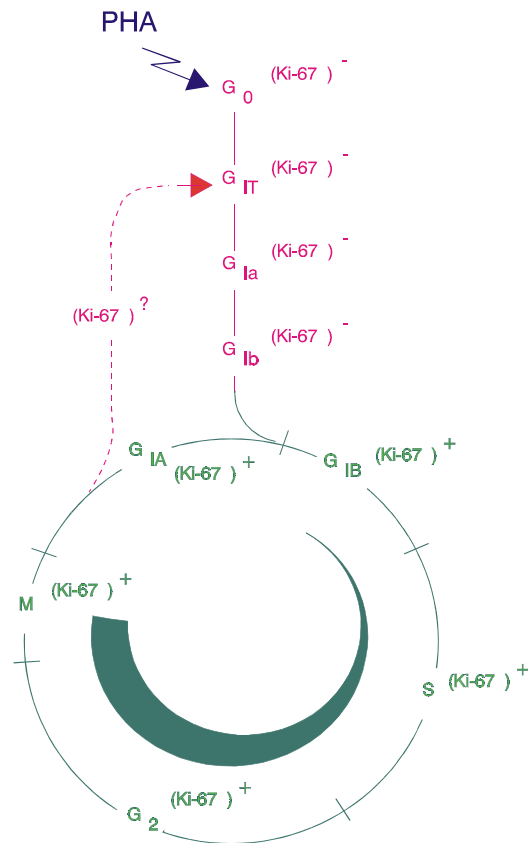


Abbildung 1: Der Zellzyklus (Quelle: [www.boku.ac.at](http://www.boku.ac.at))

Die Dauer des gesamten Zellzyklus ist für verschiedene Zellen unterschiedlich. Am variabelsten ist hierbei die Dauer der G1-Phase (Grundmann, 1971). Mittlerweile sind eine Vielzahl von Genen und deren Genprodukte isoliert, welche eine Funktion in der komplizierten Steuerung des Zellzyklus innehaben. Genauere Zusammenhänge sind immer noch Bestandteil der aktuellen Forschung. Auch pKi-67 scheint an der Regulation des Zyklus beteiligt zu sein. Schmidt et al. äußerten 2003 die Vermutung, daß pKi-67 am Übergang von der G<sub>2</sub>- zur M-Phase eine massive Phosphorylierung der Proteine im Nukleolus induziert, woraufhin sich dieser auflöst und die Chromosomen-Kondensation einsetzt.

## 1.2) Expression von pKi-67 im Zellzyklus

Weitere Untersuchungen von Gerdes et al. 1984 zeigten, daß pKi-67 während des gesamten Zellzyklus (G<sub>1</sub>-, S-, G<sub>2</sub>- und M-Phase) nachgewiesen werden kann. Die Abbildung 2 ergänzt das Schema des Zellzyklus um die mögliche Nachweisbarkeit des Proteins in T-Lymphozyten. In der ruhenden Zelle (G<sub>0</sub>-Phase) ist das Protein jedoch nicht nachzuweisen.



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung des Zellzyklus in Korrelation zur pKi-67 Expression in durch das Lektin Phythämagglutinin (PHA) zur Proliferation stimulierten T-Lymphozyten (Duchrow et al., 1994).

Abweichend hiervon kann bei Zellen, die aus der G<sub>0</sub>-Phase aktiviert werden (keine vorangegangene Mitose), in der frühen G<sub>1</sub>-Phase kein pKi-67 nachgewiesen werden. 1989 erzielten Verheijen et al. mit demselben Modell der PHA (Phytohaemagglutinin) getriggerten peripheren Blutlymphozyten das gleiche Ergebnis. 1989 bestätigten van Dierendonck et al. eine konstitutive Nachweisbarkeit des Ki-67 Antigens in einem Alternativmodell mit sich permanent teilenden, humanen MR65 Tumorzellen. Diese Befunde waren auch für dermale Fibroblasten reproduzierbar (Kill et al., 1994). Weiterhin wurde nachgewiesen, dass proliferierende Zellen bei Nahrungsmangel pKi-67 negativ werden (Baisch & Gerdes 1987, Verheijen et al., 1989). Als Ursache nannten sie die unzureichende de novo Synthese des Proteins bei Nahrungsmangel. Entgegen früherer Annahmen, dass die Konzentration des Proteins während des gesamten Zellzyklus konstant bleibe, behaupteten Sasaki et al., dass die Konzentration während des Zyklus zunehme und in der G<sub>2</sub>/M-Phase ihr Maximum erreiche. Dabei nehme die Nachweisbarkeit von pKi-67 während der S-Phase zu. Dieses Ergebnis wurde später sowohl von van Dierendonck et al. als auch von Hitchcock und Shawney et al. bestätigt. 1999 zeigten Tan et al., dass die pKi-67 mRNA ein besserer Proliferationsmarker als das

Protein selbst ist. Deren Transkription verläuft parallel zum Einbau von Bromdesoxyuridin in die neu synthetisierte DNA. All diese Untersuchungen führten zur heutigen Vorstellung über das Vorkommen von pKi-67. Danach steigt die Nachweisbarkeit des Proteins mit Fortschreiten des Zellzyklus immer weiter an, um während der Mitose ihr Maximum zu erreichen. In der Metaphase wird die höchste Nachweisrate erreicht, in der Ana- und Telophase fällt diese bis zu ihrem Minimum in G<sub>1</sub> ab. Dieses Modell führt zu einer geschätzten postmitotischen Halbwertszeit des Proteins von 20 bis 90 Minuten (Ross et al., 1995, Scholzen & Gerdes 2000). Wird die Proteinsynthese mittels Cycloheximid inhibiert, so wird pKi-67 unabhängig von der Phase des Zellzyklus mit einer Halbwertszeit von etwa einer Stunde abgebaut (Bruno & Darzynkiewicz, 1992). Daraus ergibt sich die Annahme, dass in allen Phasen des Zellzyklus eine permanente de novo Synthese des Proteins erforderlich ist (Duchrow et al., 1994). Es ist insgesamt noch unklar, was mit pKi-67 während der G<sub>1</sub>-Phase passiert. Dem umfassendsten Modell zur zellzyklusabhängigen Expression von pKi-67 zufolge (du Manoir et al., 1991, von Ross et al. 1995 und Scholzen & Gerdes 2000 übernommen) kann eine Zelle zwischen den drei folgenden Pfaden wählen:

- Der abnehmende pKi-67 Pfad: Die Zelle verlässt den Zellzyklus in Richtung Differenzierung und degradiert dabei das Ki-67 Antigen, welches nicht in ruhenden Zellen vorkommt.
- Der zunehmende pKi-67 Pfad: Eine Zelle, die sich auf dem abnehmenden Pfad befindet, kann restimuliert werden, tritt wieder in den Zellzyklus ein und produziert erneut pKi-67.
- Der stabile pKi-67 Pfad: Die Konzentration von pKi-67 bleibt stabil, z.B. in sich permanent teilenden Zellen.

Eine mögliche Erklärung für die von Autor zu Autor divergierende Beschreibung der Verteilung des Proteins in der Zelle lieferten Scholzen & Gerdes. Sie formulierten die Annahme, dass unterschiedliche Zelllinien und Fixierungsmethoden verwendet wurden. Außerdem ist die Nachweisbarkeit des Proteins mit Ki-67 oder isospezifischen Antikörpern wie MIB-1 von der Ionenstärke des Puffers und der DNA-Bindung desselben abhängig (Bruno & Darzynkiewicz, Lopez & Boisseau). Weiterhin wird durch die Anwesenheit von Ca<sup>2+</sup> die Anfärbbarkeit mit MIB-1, dem paraffingängigen Homolog zu Ki-67, reduziert (Shi et al., 1999).

### 1.3) Lokalisation von pKi-67 im Zellzyklus

Außer der Expressionsstärke von pKi-67 variiert auch die Lokalisation des Proteins während des Zellzyklus. Schon 1989 beobachtete Bading et al., daß pKi-67 in der Interphase das Nukleoplasma, aber nicht das Zytoplasma anfärbt und dort prominente Flecken bildet. Während der Mitose werden hingegen die Chromosomen gefärbt. Spätere Untersuchungen ergaben folgendes Modell der zellzyklusabhängigen Verteilung von pKi-67 (Kill et al., 1996):

In der frühen G<sub>1</sub>-Phase kommt das Protein in einer großen Anzahl diskreter Foki im Nukleoplasma vor, die in der Nähe der Kernlamina zu finden sind. Später bis zur Mitte der G<sub>1</sub>-Phase verbindet sich pKi-67 an genau determinierten Stellen mit den sich neu bildenden Nukleoli. Dort bleibt das Protein auch in der S-Phase und der sich anschließenden G<sub>2</sub>-Phase nachweisbar. Mit dem Einsetzen der Mitose ändert sich die Verteilung von pKi-67 grundlegend. Während der Interphasekern durch Phosphorylierung vieler Proteine (z.B. Histone) zusammenbricht, kondensiert das Chromatin. Ein Teil der Kernproteine verteilt sich auf die Chromosomen, einige diffundieren ins Zytoplasma, andere wiederum verbleiben in den NOR's (Nukleolären Organisations Regionen), wo postmitotisch die neuen Nukleoli entstehen (Gautier et al., 1992). Präzise Untersuchungen über die Verteilung von pKi-67 stammen von Verheijen et al. und van Dierendonck et al. aus dem Jahr 1989.

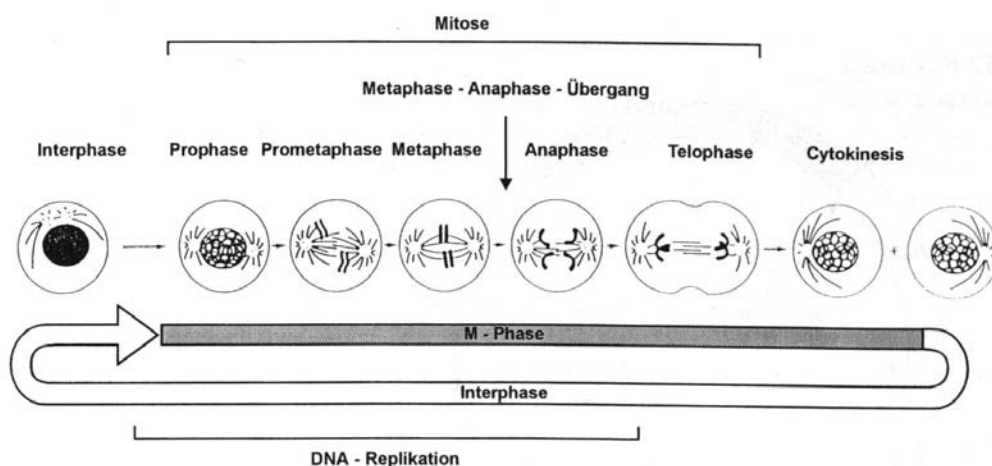


Abbildung 3: Phasen der Zellteilung (Krauss 1997)

In der Prophase ist pKi-67 netzartig über den Kern verteilt. Dieses „Netz“ ist mit dem sich kondensierenden Chromatin assoziiert. In der Metaphase bildet es ein wirkliches Netz mit interdigitierenden Fibrillen um die Chromosomen. In der Ana- und Telophase erscheint

das Netz mehr granulär (van Dierendonck et al., 1989, Verheijen et al., 1989). In der späten Telophase bildet pKi-67 dann wieder die schon erwähnten Foki, die aggregieren und mit den sich neu bildenden Nukleoli der Tochterzellen assoziieren (Kill et al., 1996). Die Beobachtungen von Verheijen wurden von van Dierendonck dahingehend ergänzt, dass pKi-67 während der Meta- und Anaphase hauptsächlich in den kortikalen Regionen der Chromosomen vorkommt, wo später die pränukeolären Körperchen und damit die Nukleoli entstehen.

#### **1.4) Molekularbiologische Struktur von pKi-67**

Erste Untersuchungen zu diesem Thema führten 1991 Gerdes et al. durch. Neben der Empfindlichkeit gegenüber Proteasen bemerkte die Arbeitsgruppe, dass pKi-67 nicht durch 0,1 M HCL aus acetonfixierten L428 Zellen isoliert werden kann. Daraus schloss man, dass es nicht zu der Gruppe der Histone zählt. Das Protein kommt in mehreren Isoformen vor. Meist werden eine 395 KD (9768 bp) und eine 345 KD (8688 bp) schwere Form beschrieben (Schlüter et al. 1993), erkennbar an der charakteristischen Doppelbande im Western Blot. Es werden von verschiedenen Autoren weitere Isoformen beschrieben, deren Bedeutung jedoch noch nicht geklärt werden konnte (Schmidt et al. 2003, Schlüter et al. 1993). Die verschiedenen Isoformen entstehen durch alternatives Spleißen der mRNA, wobei die kürzere Form die durch Exon 7 codierte Sequenz einbüßt.

Das pKi-67 Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 10 (10q25-ter) lokalisiert (Fonatsch et al., 1991). Es besteht aus insgesamt 15 Exons und 14 Introns. Unterhalb des Polyadenylierungssignales gibt es drei weitere, weshalb noch mehr Isoformen der mRNA (siehe Abbildung 5, 1.4) postuliert werden (Schlüter et al. 1993). 1999 beschrieben MacCallum et al. die Phosphorylierung als eine wichtige Bedingung für die Funktion des Proteins. Sie zeigten, dass der Translokation von pKi-67 von nukleolär zu perichromosomal eine starke Phosphorylierung vorangeht: der so genannte „Phosphorylierungsshift“. Erwähnenswert ist außerdem die Tatsache, dass pKi-67 offensichtlich ubiquitär in allen Säugetieren vorkommt. Der Antikörper MIB-1 färbt zum Beispiel proliferierende Zellen in Rind, Hund, Pferd und Schaf.

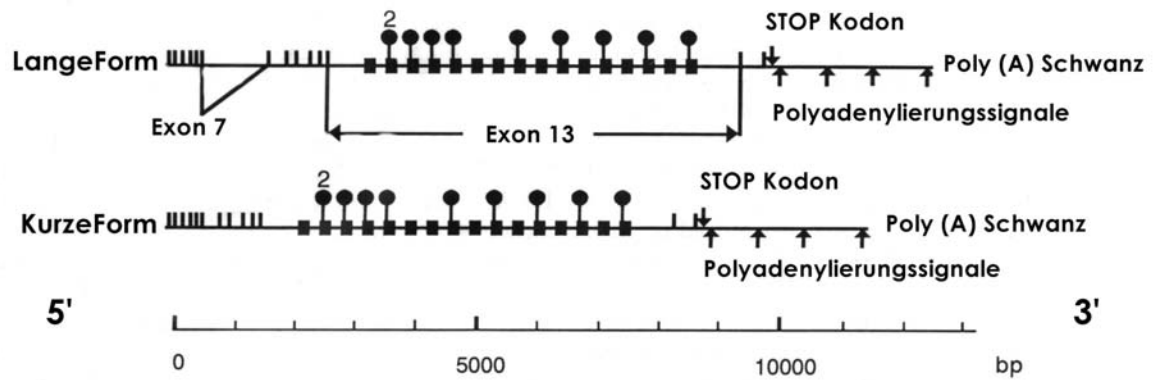
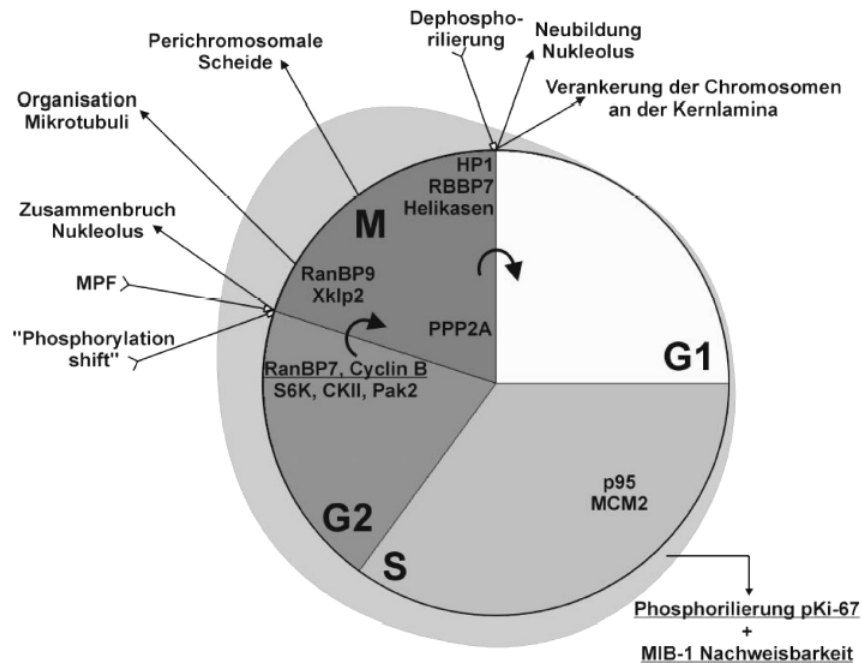


Abbildung 4: Die pKi-67 mRNA (Duchrow et al., 1994)

### 1.5) Funktion von pKi-67

Im Gegensatz zu den zahlreichen Arbeiten über Lokalisation, Struktur und Regulation von pKi-67 liegen über die eigentliche Funktion des Proteins nur einige gesicherte Erkenntnisse vor. Eine gewichtige Rolle für die Zellproliferation wird als gesichert angesehen, weil die Antisense-Inhibition zur Akkumulation von Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase und zur Abnahme des <sup>3</sup>H-Thymidin- bzw. Bromdesoxyuridineinbaus führt (Schlüter et al., 1993, Duchrow et al., 2001). Deswegen wird für pKi-67 eine Rolle bei der Regulation des Übergangs von der G<sub>1</sub>- zur S-Phase und eventuell der Beendigung der S-Phase postuliert (Duchow et al., 2001). In den bisher unerwähnten repetitiven Elementen [Exon 13 besitzt 16 repetitive Elemente, sogenannte Ki-67 Repetitionen, in denen die Bindungsstelle für Ki-67, MIB-1 und MIB-5 kodiert wird (Kubbutat et al., 1994) siehe Abbildung 5, 1.4] wird aufgrund ihrer Vielzahl von möglichen Interaktionen mit anderen Proteinen eine Schlüsselrolle gesehen. Mögliche Interaktionspartner sind ribosomale Proteine, DNA-Helikasen, Zellzyklusproteine, und Signaltransduktionsproteine. Bridger et al. vermuteten 1998 aufgrund der extra-nukleolären Lokalisation während der G<sub>1</sub>-Phase eine Rolle von pKi-67 bei der Organisation von DNA. Durch die Beschreibung der Lokalisation von pKi-67 in den dichten fibrillären Komponenten der Nukleolen durch Kill et al. 1996 wird eine Beteiligung von pKi-67 an der Synthese der Ribosomen während der Zellteilung vermutet. Diese These könnte durch Plaat et al. 1999 bekräftigt werden, der einen Zusammenhang zwischen Proteinsynthese und pKi-67 mittels PET nachweisen konnte. Aufgrund der Fähigkeit an DNA, RNA und sich selbst zu binden (Schmidt et al., 2003) wird auch eine strukturelle Rolle des Proteins innerhalb des Zellkerns vermutet.

Trotz bisher intensiver Bemühungen ist über die Funktion von pKi-67 viel, aber noch nicht alles bekannt. Die folgende Abbildung (5) gibt einen schematischen Überblick über den aktuellen Stand.



**Abbildung 5** : Funktionsdiagramm von pKi-67 innerhalb des Zellzyklus. Das Diagramm zeigt mögliche Funktionen von pKi-67. Weiße Pfeile zeigen Einflüsse auf das Protein, schwarze Pfeile zeigen durch das Protein verursachte Einflüsse auf die Zelle (Schmidt et al., 2003)

## **1.6) Das kolorektale Karzinom**

### **1.6.1) Allgemeines**

In Westeuropa und den USA ist das kolorektale Karzinom neben dem Bronchialkarzinom und dem Prostatakarzinom bzw. Mammakarzinom der am häufigsten auftretende maligne Tumor. Karzinome des Kolons und des Rektums stehen in Deutschland an zweiter Stelle der malignombezogenen Todesfälle. Die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen wird für Männer auf über 32000 (Altersdurchschnitt 68 Jahre) und für Frauen auf 34000 (Altersdurchschnitt 73 Jahre) geschätzt (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2004). Die altersstandardisierte Inzidenzraten in Deutschland betragen demnach 71 für Männer und 50 für Frauen (im Zeitraum von 1998-2000 Erkrankungen pro 100000 Einwohner). Die mir vom Institut für Krebs-epidemiologie e.V. Schleswig-Holstein zur Verfügung gestellten Angaben über die Erkrankung im Bundesland Schleswig-Holstein weisen steigende Inzidenzen der Krankheit aus. So stieg die altersstandardisierte Inzidenzrate vom Diagnosejahr 1999 bis 2002 für Frauen von 38,2 auf 41,9 und für Männer von 52,4 auf 61,9. Insgesamt starben im Jahre 2002 in Schleswig-Holstein 991 Frauen (1,43 Millionen weibliche Einwohner insgesamt) und 1078 Männer (1,37 Millionen Einwohner insgesamt) an kolorektalen Tumoren. Im Jahr 2004 sind in der EU insgesamt 279000 Menschen an diesem Leiden erkrankt und mehr als 139000 Menschen an dieser Erkrankung gestorben (Boyle & Ferlay, 2005). Deutschland liegt im europäischen Vergleich der Inzidenzraten an der Spitze.

Hinsichtlich der Mortalität ist eine Abnahme aufgrund von intensivierten Maßnahmen zur Früherkennung (Darmspiegelung und Hämoccult®-Test) zu beobachten. Bei der Häufigkeitsverteilung der primär betroffenen Darmabschnitte ergibt sich ein 50%iger Befall des Rektums, gefolgt vom Sigma mit 30% sowie dem Colon ascendens und dem restlichen Kolon mit jeweils 10%. Risikofaktoren für maligne kolorektale Erkrankungen sind in der Ernährung zu finden. Ballaststoffarme Ernährung, Alkoholkonsum, generell erhöhter Kalorienzufuhr, erhöhter Aufnahme von N-Nitrosaminen und dem häufigen Konsum von „rotem“ Fleisch (Rind, Schwein, Lamm) sowie tierischen Fetten im Allgemeinen werden eine Rolle zugeschrieben. Hingegen wird ballaststoffreicher Nahrung, nicht-steroidalen Antiphlogistika (Cox II-Hemmer), Folsäure, Selen, Calcium und den Vitaminen A, C, E, ein protektiver Effekt zugesprochen.

Die überwiegende Anzahl der Karzinome (90%) entstehen durch Genmutationen im Rahmen der Adenom-Karzinom Sequenz (Dysplasie-Karzinom-Sequenz, Böcker et al. 1997). Zu weiteren prädisponierenden Faktoren die das Tumorrisiko erhöhen zählen u.a. entzündliche Darmerkrankungen, andere Karzinome in der Anamnese oder eine genetische Disposition wie z.B. familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), familiäre juvenile Polyposis, Peutz-Jeghers-, Gardner- und Tourkots-Syndrom, hereditäres nichtpolypöses kolorektales Krebsyndrom (HNPCC-Syndrom). Methode der Wahl bei der Behandlung kolorektaler Karzinome ist die operative Resektion, wobei sich trotzdem bei 40% aller kurativ operierten Patienten im Verlauf ein lokales, regionales bzw. fernes Tumorrezidiv entwickelt (Buglioni et al., 1999).

Stufe	Patho-Morphologie	zusätzliche genetische Veränderung
1	Normales Epithel	Keine
2	Hyperproliferatives Epithel	Verlust des APC-Genes (Chromosom 5q)
3	Frühes Adenom	DNA-Hypomethylierung
4	Intermediäres Adenom	Aktivierung von k-ras (Chromosom 12p)
5	Spätes Adenom	Verlust von DCC (Chromosom 18q)
6	Karzinom	Verlust von p53 (Chromosom 17p)
7	Metastase	Unbekannt

**Tabelle 1:** Jede pathomorphologisch weiter fortgeschrittene Stufe enthält eine zusätzliche genetische Veränderung (modifiziert nach Vogelstein et al. 1993)

## 1.6.2) Prognose

Das zum Zeitpunkt der Diagnosestellung vorherrschende Tumorstadium (zur Klassifizierung und Stadieneinteilung siehe Anhang 7.1) bestimmt im Wesentlichen die 5-Jahres-Überlebensrate der Erkrankung. Im Mittel beträgt sie 50- 60%. In der Literatur werden jedoch unterschiedliche Angaben gemacht (siehe Anhang 7.1, Klassifizierung und Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms).

UICC-Stadium	T-Stadium	N-Stadium	M-Stadium	Dukes/Turnbill
0	Tis	N0	M0	A
I	T1,T2	N0	M0	A
IIA	T3	N0	M0	B
IIB	T4	N0	M0	B
IIIA	T1,T2	N1	M0	C
IIIB	T3,T4	N1	M0	C
IIIC	jedes T	N2	M0	C
IV	jedes T	jedes N	M1	D

**Tabelle 2:** Gegenüberstellung der Stadien des kolorektalen Karzinoms nach UICC-, TNM- und Dukes-Kriterien . (Quelle: modifiziert nach Berchtold „Chirurgie“ Urban&Fischer München Jena 4. Auflage 2001)

Die Überlebensrate ist somit von Infiltrationsgrad und Metastasierung des Tumors abhängig. Patienten mit kolorektalem Karzinom im Frühstadium haben häufig gute Aussicht auf Heilung, während die Überlebenszeit bei fortgeschrittenen Tumorstadien häufig limitiert ist. Infolge verstärkter Anstrengung zur Früherkennung konnte aus chirurgischer Sicht der Anteil der kurativen Operationen erhöht werden. Durch radikale Operationstechniken ist ferner ein Rückgang der Lokalrezidive zu verzeichnen. Dennoch ist der Anteil an Patienten, die im weiteren Verlauf ihrer Erkrankung Fernmetastasen entwickeln, nahezu unverändert. Neue chemotherapeutische Therapiekonzepte beim Kolonkarzinom (Scheithauer et al., 2003, Andre et al., 2004) bzw. kombinierte chemo- und radiotherapeutische Maßnahmen bei Neoplasien des Rektums haben zu Verbesserung der 5-Jahres-Überlebensrate geführt. Jüngst haben Antikörper gegen VEGF (Bevacizumab [Avastin®], Hurwitz et al., 2004) und EGFR (Cetuximab [Erbix®], Cunningham et al., 2004) die Zulassung zur kombinierten Chemotherapie zur Behandlung der Erkrankung bekommen. Trotz allem kommt einer frühzeitigen Diagnosestellung

durch regelmäßige Darmspiegelungen, rektal-digitaler Untersuchung (insbesondere Rektumkarzinom) sowie Testung des Stuhles auf okkultes Blut die größte Bedeutung zur Verbesserung der Überlebensrate zu.

## **1.7) Tumorsuppressorgen p53**

Zur Kontrolle der Sensitivität der in dieser Arbeit verwendeten Methode wurde das humane p53-Gen verwendet, das auf dem kurzen Arm von Chromosomen 17 lokalisiert ist. Es kodiert die Information für ein phosphoryliertes Protein mit 53000 Dalton Molekulargewicht, was entscheidend für die Namensgebung war (Levine et al., 1991, Miller et al., 1986). Ursprünglich entdeckte man das Protein in Komplexen mit einem viralen Tumorantigen des Affenvirus SV40 (Chang et al., 1979, Linzer et al., 1997). Zentrale Funktion des Proteins ist die Regulation der Expression zahlreicher Gene, welche über die Fähigkeit an DNA zu binden realisiert wird. Diese Genprodukte sind entscheidend an Prozessen der Signaltransduktion, Wachstumsregulation, DNA-Replikation und DNA-Reparatur beteiligt (Montenarh, 1998). Mutationen des p53-Genes gehören zu den häufigsten genetischen Veränderungen, welche mit einer Krebserkrankung einhergehen. Diese Veränderungen des Erbgutes erhöhen die Rate an mutantern p53, welches sich in Konformation und Funktion wesentlich vom Wildtyp unterscheidet. Auffälligster Unterschied ist, dass die mutierte Variation als Oncogen agieren kann, währenddessen die Funktion des Wildtypes als die eines Tumorsuppressorgens beschrieben wird (siehe auch Tabelle 1).

Mutiertes p53-Protein besitzt eine viel längere Halbwertszeit als der Wildtyp und akkumuliert dadurch in den Tumorzellen in Relation zu dem Wildtypellevel in normalen Zellen (Hinds et al., 1990, Finlay et al., 1989, Benchimol et al., 1982). Für die in dieser Arbeit wichtigen p53- Autoantikörper scheint zu gelten, dass deren Bildung nicht mit dem absoluten p53- Spiegel in den Zellen zusammenhängt, da sowohl bei Patienten ohne p53- Überexpression als auch bei Patienten mit p53- Überexpression Autoantikörper gegen das Protein auftreten können (Galle et al., 1994). Die folgende Tabelle (4) gibt einen Überblick über einige Arbeiten, die sich mit der Bildung von Autoantikörpern gegen p53 bei verschiedenen Krebserkrankungen befassten (Weigmann, 1998). Weitere Arbeiten werden im Diskussionsteil ausführlicher behandelt. Zusammenfassend zur klinischen Bedeutung kann man sagen, dass p53 Autoantikörper einen zuverlässigen Indikator für Tumorerkrankungen darstellen. Nahezu alle Patienten bei denen p53

Autoantikörper festgestellt wurden, waren an bösartigen Tumoren erkrankt. Jedoch ist es nicht möglich eine bestimmte Tumorerkrankung anhand der Autoantikörperbildung gegen p53 zu diagnostizieren. Dafür sind weitere Faktoren zu untersuchen (Montenarh, 2000). Auch wird der prognostische Wert der Feststellung von p53 Antikörpern in Seren von an Krebs erkrankten Menschen noch kontrovers diskutiert. Auch hierzu finden sich im Diskussionsteil, speziell für das kolorektale Karzinom, genauere Angaben über die verschiedenen Studien.

Tumor	Autor	Jahr	Häufigkeit
Mammakarzinom	Crawford et al.	1984	11,5%
Mammakarzinom	Green et al.	1994	25,6%
Mammakarzinom	Mudenda et al.	1994	26%
Mammakarzinom	Davidoff et al.	1992	23%
Mammakarzinom	Wilsher et al.	1996	48%
Bronchialkarzinom	Winter et al.	1992	10%
Bronchialkarzinom	Guinee et al.	1995	8,4%
Bronchialkarzinom	Wild et al.	1995	15,2%
HCC	Ryder et al.	1996	37%
HCC	Volkman et al.	1993	25%
HCC	Trivers et al.	1995	33%
Pankreaskarzinom	Marxen et al.	1994	6,4%
Pankreaskarzinom	Laurent-Puig et al.	1995	28%
colorectales Karzinom	Crawford et al.	1984	12,5%
colorectales Karzinom	Hammel et al.	1997	26%
Ösophaguskarzinom	Breveren et al.	1996	25%
Ovarialkarzinom	Green et al.	1995	29%

**Tabelle 3:** p53-Autoantikörper in Abhängigkeit von der Tumorentität (Weigmann, 1998)

## 1.8) Ziele der Arbeit

Über die Anwendungsmöglichkeiten von pKi-67 als Proliferationsmarker wurden schon zahlreiche Arbeiten veröffentlicht. Besonders die eingangs erwähnte Eigenschaft, dass die Expression des Ki-67 Antigens 24 bis 36 Stunden nach der Aktivierung der Zelle und während des gesamten Zellzyklus nachweisbar ist (siehe Abbildung 3), macht es zu einem idealen immunhistochemischen Proliferationsmarker. In einem „Tumor Xenograft Model“ konnte gezeigt werden, dass der Ki-67 Index (Verhältnis von positiv gefärbten Zellen zur Gesamtzellzahl) mit der Wachstumsfraktion korreliert (McCormick et al., 1990). Nachfolgende Tabelle (4) zeigt die relativ unterschiedlichen Ergebnisse von Studien über die prognostische Aussagefähigkeit von pKi-67 gegenüber unterschiedlichen malignen Erkrankungen.

TUMORENTITÄT	ANZAHL DER STUDIEN MIT PROGNOSTISCHEM WERT*	ANZAHL DER STUDIEN OHNE PROGNOSTISCHEN WERT*
I (>75 % der Studien mit prognostisch positivem Wert von pKi-67)		
Mammakarzinom	23	1
Weichteiltumore	11	3
Bronchialkarzinom	10	2
Astrozytom	6	0
II (25 %-75 % der Studien mit prognostisch positivem Wert von pKi-67)		
Cervixkarzinom	5	6
Prostatakarzinom	15	7
III (< 25 % der Studien mit prognostisch positivem Wert von pKi-67)		
Kolorektale Karzinome	2	10

\*Der prognostische Wert basiert auf statistisch signifikanten Korrelationen zwischen pKi-67 Expression und den erhobenen klinischen Parametern

**Tabelle 4:** Relevanz des Ki-67 bzw. MiB-1 Markierungsindex in Bezug auf die Prognose verschiedener Tumorentitäten (modifiziert nach Brown & Gatter, 2002 )

Ziel dieser Arbeit ist es, festzustellen, ob mit der Erkrankung des kolorektalen Karzinoms eine vermehrte Bildung an Autoantikörpern gegen den pKi-67 einhergeht. Im Gegensatz zu den zahlreichen Arbeiten über den Nutzen des Proteins als Proliferationsmarker mittels immunhistochemischer Darstellung wurden über eine etwaige Autoantikörperproduktion erst wenige Publikationen veröffentlicht. So fanden 1995 Bloch et al. Autoantikörper

gegen pKi-67 in Seren von MRL/MpJ(-)/+ und MRL/MpJ-lpr/lpr Mäusen, aber nicht in Seren von Kontrolltieren oder Mäusen mit anderen Autoimmunkrankheiten. Weiterhin wurde eine Arbeit über Autoantikörper gegen das Ki-67-Antigen bei Patienten mit systemischen rheumatischen Erkrankungen veröffentlicht (Muro et al., 1997). Dabei wurde bei 2 von 76 Patienten mit systemischen Lupus Erythemathodes und bei 1 von 90 Patienten mit Sklerodermie Autoantikörper im Serum gefunden.

Vorraussetzung für die Bildung von Autoantikörpern ist eine spezifische humorale Immunreaktion. Dazu sind möglicherweise der Verlust der Immuntoleranz gegenüber pKi-67 und insbesondere eine Präsentation des Ki-67-Antigens notwendig. Dies könnte einfach über eine Freisetzung des Proteins durch Tumorzellnekrose geschehen. Spezielle Mechanismen der Antigenpräsentation auf der Tumorzelle sind dagegen sehr unwahrscheinlich, da pKi-67 als sehr fragil gilt, besonders wenn es sich nicht in seiner natürlichen Umgebung, dem Zellkern befindet (Gerdes et al., 1991).

Um die Sensitivität der in dieser Arbeit verwendeten Methode sicherzustellen, wurde an einem Teil der Patienten die Untersuchung auf Autoantikörper gegen p53 ausgeweitet. Deren Existenz wurde bereits mehrfach beschrieben (Crawford et al., 1984, Hammel et al., 1997, 2000 weitere Arbeiten über dieses Thema werden im Diskussionsteil ausführlicher vorgestellt). Weiterhin wurde das Patientengut in präoperativ und postoperativ abgenommene Seren unterteilt. Wenn der Nachweis von Autoantikörpern gegeben sein sollte, könnte man hinsichtlich der Aussagefähigkeit über den Verlauf der Erkrankung und die Prognose der Patienten genauere Aussagen treffen.

Da keine „matched pair“ Kontrollgruppe zur Verfügung stand, wurde dem Patientenkollektiv eine Kontrollgruppe aus freiwilligen Studenten gegenübergestellt.

## **2) Patienten, Material und Methoden**

### **2.1) Patienten**

Für diese Studie wurden Patienten mit einem kolorektalen Karzinom ausgewählt, die in dem Tumornachsorgeregister der Klinik für Chirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck erfasst waren. Aus diesem Kollektiv standen 101 prä- bzw. postoperative Serum-Proben von Patienten zur Verfügung, die zwischen 1998 und 2004 aufgrund eines kolorektalen Karzinoms in der Klinik für Chirurgie operiert wurden. Unter dem Aktenzeichen 37-95 143 vom 6.4.1995 hatte die Ethik-Kommission der Universität Lübeck keine Bedenken gegen die Durchführung einer Studie des Chirurgischen Forschungslabors zum Nachweis von Autoantikörpern im Serum von Patienten mit gastrointestinalen Tumoren. Das Serum wurde nach dem Einfrieren bei – 50°C gelagert und stand der Studie retrospektiv zur Verfügung.

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

Sowohl im Rahmen der onkologischen Nachsorge in der Klinik als auch durch Befragung der jeweiligen Hausärzte wurden klinische Verlaufsangaben anhand eines Fragebogens (siehe Anhang 7.5) erhoben, so dass eine Nachbeobachtung der Patienten möglich ist. Die Erhebungen wurden unter Berücksichtigung der Datenschutzrichtlinien anonymisiert in einer Computerdatenbank gespeichert.

## **2.2) Materialien**

Alle Chemikalien, Antikörper und Verbrauchsmaterialien sind in Anhang (7.3) aufgelistet. Verwendete Puffer und Lösungen sind ebenfalls im Anhang (7.4) aufgeführt.

## **2.3) Methoden**

### **2.3.1) Zellanzucht**

Die zur Proteinisolierung notwendigen Zelllinien (HeLa S3, SW 480) wurden bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) bezogen und bei ca. -180°C in flüssigen Stickstoff gelagert. Nach vorsichtigem Auftauen werden die Zellen in ein für sie spezifisches Medium (bei Zimmertemperatur) in Zellkulturflaschen überführt. Verwendet wird für die HeLa S3 Zellen DMEM mit L-Glutamin und für die SW 480 Zellen RPMI – 1640. Optimales Zellwachstum wird im CO<sub>2</sub>-begasteten, feuchten Brutschrank bei 37°C (5% CO<sub>2</sub>) erreicht. Alle zwei bis drei Tage muss das Medium gewechselt oder die adhären nachwachsenden Zellen bei Erreichen von Konfluenz, nach Ablösung vom Boden mit Hilfe von Trypsin (1%), abgelöst und in neue Zellkulturflaschen überführt und aufgeteilt werden (Passagieren von Zellen).

### **2.3.2) Proteinisolierung**

Zur Isolierung von pKi-67 aus HeLa S3 Zellen (humanes Cervixkarzinom) und pKi-67 plus p53 aus SW480 Zellen (Kolonkarzinom) wird eine modifizierte Methode nach MacCallum et al (1999) verwendet. Wichtig ist, dass die Zellen zum Zeitpunkt der Proteingewinnung sich noch gut im Wachstum befinden, da sonst kein oder zu wenig proliferationassoziiertes pKi-67 zu isolieren ist. Die Mengenangaben sind für Petrischalen (Ø 10 cm) etabliert. Die Anzucht der Zellen erfolgt wie unter 2.3.1 beschrieben, bis ausreichend viele Zellen vorkonfluent sind. Dann werden die Zellen zunächst zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und dann aus den Petrischalen herausgeschabt. Das nach fünfminütiger Zentrifugation mit 300 g bei 4°C entstehende Pellet wird zur Entfernung der zytoplasmatischen Fraktion fünf Minuten in kalten Extraktionspuffer I auf Eis inkubiert. Die Zellkerne werden durch fünfminütige Zentrifugation mit 22.000 g bei 4°C

sedimentiert. Der Überstand wird entfernt, das Sediment in 200 µl kalten Extraktionspuffer II aufgenommen. Nach zehnmütiger Inkubation auf Eis werden die Zelltrümmer durch zehnmütige Zentrifugation mit maximaler Geschwindigkeit (22000 g) bei 4°C sedimentiert. Der Überstand mit den nukleären Proteinen kann mit Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert werden oder wird direkt zur Elektrophorese eingesetzt. Bei allen einzelnen Schritten sind die Proben auf Eis zu lagern.

### 2.3.3) SDS-PAGE nach Lämmli

SDS-Polyacrylamidgele (60 x 90 x 1 mm<sup>3</sup>) werden mit dem Gießstand der Mini-Protean<sup>®</sup> 3 Zelle von BIO-RAD (München, Deutschland) gegossen. Nachfolgende Tabelle (5) gibt ein Pippettierschema für verschiedene Acrylamid Gele wieder. Das Trenngel wird 5 cm hoch und 0,75 cm dick gegossen und dann mit einem 1 cm hohen Sammelgel überschichtet. Verwendet werden ein 3% Sammelgel sowie ein geschichtetes Trenngel (7% und 5%) um der stark differenten Größe von pKi-67 und p53 Rechnung zu tragen. Abweichend vom Protokoll nach Lämmli (Lämmli, 1970) wird der Trenngel-Puffer mit Glycerin versetzt, wodurch Trenn- und Sammelgel gleichzeitig gegossen werden können, sich aber kaum mischen. Das Acrylamid polymerisiert etwa eine Stunde lang aus. Danach wird das Gel mit Laufpuffer gespült und eingespannt. Nach 10 Minuten Vorlauf bei

Lösung	Sammelgel 3 %	Sammelgel 5 %	Trenngel 5 %	Trenngel 7 %	Trenngel 12 %	Trenngel 16 %
AA	0,75 ml	1,25 ml	1 ml	1.5 ml	4,8 ml	6,405 ml
T-Puffer			1,5 ml	1,5 ml	3 ml	3 ml
S-Puffer	1,875 ml	1,875 ml				
Glycerin			0,75 ml	0.75 ml	1,5 ml	1,5 ml
H <sub>2</sub> O	4,643 ml	4,143 ml	2,6 ml	2,1 ml	2,385 ml	5,175 ml
SDS-Lsg.	150 µl	150 µl	120 µl	200 µl	240 µl	240 µl
APS-Lsg.	75 µl	75 µl	37 µl	70 µl	75 µl	75 µl
TEMED	7,5 µl	7,5 µl	3,8 µl	7 µl	7,5 µl	7,5 µl
<b>Volumen</b>	7,5 ml	7,5 ml	5,9 ml	5,9 ml	12 ml	12 ml

Tabelle 5: Pippettierschema für verschiedene Polyacrylamidgele nach Lämmli

konstantem Strom von 20 mA können die Proben pipettiert werden. Bevor diese jedoch zur Elektrophorese einsetzbar sind, müssen sie erst 1:2 mit Probenpuffer nach Lämmli versetzt und für 5 Minuten bei 95°C erhitzt werden. Nach dem Auftragen in die Taschen des Gels wird für ca. 50 Minuten ein Strom von konstant 40 mA angelegt. Da die Proteine aufgrund der Bindung an SDS strikt nach Größe getrennt werden, ist darauf zu achten, dass das wesentlich kleinere p53 bei zu langer Laufzeit nicht aus dem Gel herausläuft. Das Molekulargewicht der getrennten Proteine wird durch den ebenfalls aufgetragenen Perfect Protein Marker der Firma Novagen (Heidelberg, Deutschland) abgeschätzt. Die Proteine werden dann geblottet.

#### 2.3.4) Blotten von Proteinen

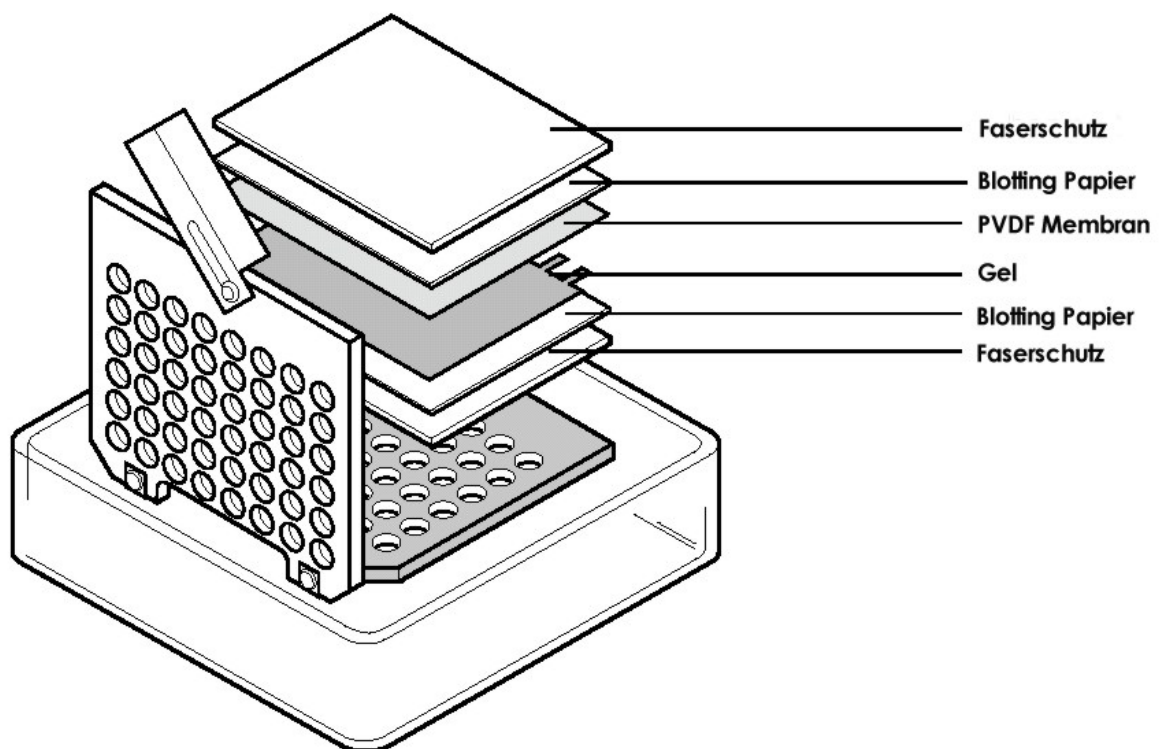


Abbildung 6: Das Blotting-Sandwich (Quelle: BIO-RAD)

Zum Blotten wird die Mini Trans-Blot<sup>®</sup> Electrophoretic Transfer Cell von BIO-RAD (München, Deutschland) verwendet. Nach der SDS-PAGE werden die Acrylamidgele eine halbe Stunde lang in Blottingpuffer äquilibriert. Die PVDF Blottingmembran (Polyvinylidenfluoridmembran Roti<sup>®</sup>-PVDF, Firma Roth, Karlsruhe), die als feste Matrix

dient, wird in 6 x 10 cm große Stücke geschnitten, 2 bis 3 Sekunden lang in Methanol aktiviert, kurz in destilliertes Wasser getaucht und dann in Blottingpuffer äquilibriert. Dann werden die „Blotting Sandwiches“ entsprechend der Abbildung 6 zusammengesetzt. Diese werden in die Blotting-Kammer überführt, wobei darauf zu achten ist, dass die Membran immer näher an der Anode (Plus-Elektrode) liegt, da die Proteine aufgrund ihrer Beladung mit SDS von Minus nach Plus wandern.

Für kleinere Proteine bis 100 kD läuft ein Blot eine Stunde lang bei 100 Volt, wobei mit Eis gegengekühlt wird. Eine Ausnahme bilden die pKi-67 Blots, die mindestens 15 Stunden lang bei 50 Volt unter Eiskühlung laufen müssen, da das Protein sehr groß ist.



**Abbildung 7:** Mini Trans-Blot<sup>®</sup> Electrophoretic Transfer Cell (Quelle BIO-RAD)

### **2.3.5) Immunchemische Proteindetektion**

Nach dem Blotten wird die Membran dreimal 5 Minuten mit TBST 0,1% gewaschen und dann mindestens 3 Stunden in Blockierlösung (für Antikörper nicht erkennbares Protein) geschüttelt. Danach wird die Membran mit einer Schere in Streifen entsprechend der mit Protein beladenen Geltaschen zerteilt. Der Bereich mit dem Standardproteinmarker wird getrocknet. Vom linken und rechten Rand wird jeweils ein Streifen zur Kontrolle mit MIB-1 und p53-AK als Primärantikörper gefärbt. Dazu erfolgt eine einstündige Inkubation mit dem Primärantikörper, der in der Blockierlösung verdünnt wird (1:2000). Die Membran wird viermal fünf Minuten lang mit TBST 0,1% gewaschen und dann eine Stunde lang mit der Sekundärantikörper-Lösung inkubiert (IgG goat anti mouse - AP conjugated, Verdünnung 1:5000 mit TBST 0,1%). Danach wird zweimal 5 Minuten mit TBST 0,1%, dreimal 10 Minuten mit TBS und einmal mit dem alkalischen Phosphatase-

Puffer fünf Minuten lang gewaschen. Die Färbung erfolgt lichtgeschützt 10-30 Minuten mit einer frisch angesetzten NBT/BCIP Lösung. Sobald die Banden intensiv genug sind, wird die Reaktion durch Waschen mit bidestilliertem Wasser gestoppt. Zur Untersuchung der Patientenseren wird die Membran entsprechend der Proteinbeladung vor der Elektrophorese in einzelne Streifen geschnitten. Diese werden mit jeweils 0,5 ml Serum als Primärantikörper und 1 ml TBST 0,5% über Nacht inkubiert. Das Serum wurde seit der Blutentnahme bei -20°C im Kühlschrank gelagert. Die weiteren Schritte zur Proteindetektion werden analog zur MIB-1 Färbung übernommen (Sekundärantikörper IgG rabbit anti-human- AP conjugated, Verdünnung 1:5000 mit TBST 0,1%, siehe Anhang 7.3). Die erhaltenen Blots werden lichtgeschützt gelagert und aufgrund besserer Möglichkeiten zur Auswertung und Dokumentation für diese Studie digital fotografiert.

## **2.4) Statistik und Darstellung**

Die Statistiken zu dieser Studie wurden mit Hilfe des Programms SPSS für Windows Version 11.5.1 (Fa. SPSS Inc., Chicago, USA) erstellt. Tabellen und Graphiken der Arbeit wurden mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Excel (aus Microsoft Office Edition 2003) der Firma Microsoft (USA) erstellt. Mit dem Chi-Quadrat-Test wurde die Verteilungseigenschaft einer statistischen Grundgesamtheit untersucht. Ein p-Wert  $\leq 0.05$  gilt dabei als statistisch signifikant (statistische Auswertung für pKi-67 siehe 3.3, Tabelle 8, Lokalisation der Tumoren, deren zugehörige Patientenseren positiv auf pKi-67 Autoantikörper getestet wurden). Zum Gruppenvergleich kam der zweiseitige U-Test nach Mann und Whitney für unabhängige Stichproben zur Anwendung. Als statistisch signifikant wurde auch hier ein p-Wert  $\leq 0,05$  festgelegt (Statistische Auswertung für pKi-67 siehe 3.3, Tabelle 10, Durchschnittsalter des Patientenkollektivs). Auf Untersuchungen zur Überlebenszeit der Patienten wurde verzichtet, da im Patientenkollektiv zum Zeitpunkt der Datenerhebung erst ein Todesfall bekannt war.

### **3) Ergebnisse**

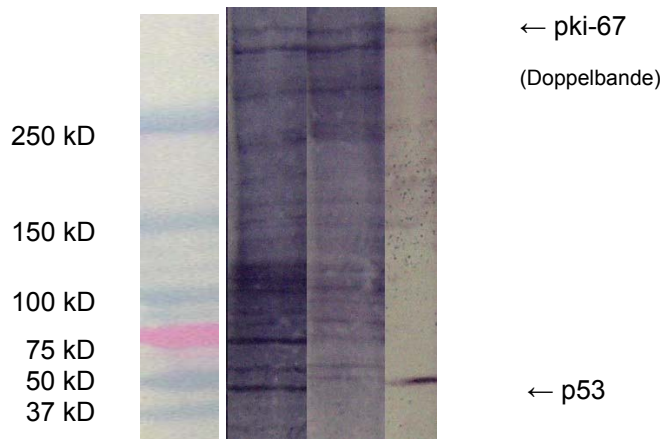
#### **3.1) Charakterisierung des Patientenkollektivs**

In diese Untersuchung wurden 101 Seren von Patienten eingeschlossen, die wegen eines kolorektalen Karzinoms zwischen 1998 und 2004 an der Klinik für Chirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, behandelt wurden. 91 dieser Patienten wurden nach einem kurativen Therapieansatz behandelt und einer eigenen Auswertung unterzogen. Die 61 Männer und 40 Frauen waren im Alter von 40 bis 80 Jahren, das durchschnittliche Alter betrug 64 und das mediane Alter 64,35 Jahre. Im Anhang befindet sich eine vom Krebsregister Schleswig-Holstein erstellte Anlage über das kolorektale Karzinom im Zeitraum von 1998 bis 2005 in diesem Bundesland (7.2). Anhand dieser Daten ist es möglich das Patientenkollektiv genauer zu bewerten. Bei dem Patientenkollektiv, welches in dieser Studie verwendet wurde, findet sich ein 60:40 Verhältnis zwischen Männern (61) und Frauen (40). Die Tumoren waren zwischen Rektum und Kolon gleich verteilt (Kolon: 49,5 %, Rektum: 47,5%, beide 3%). Der Großteil der Patienten wurde in den Jahren 2002 und 2003 behandelt. Zur genaueren Klassifizierung des kolorektalen Karzinoms werden der histologische Tumorgrad und das TNM-System sowie die UICC-Stadien verwendet (siehe Anhang 7.1). 94% der Karzinome waren auf den mittleren Differenzierungsgrad 2 (60%) und 3 (34%) verteilt (G<sub>1</sub>: 4%, G<sub>0</sub> 0%). In der TNM-Klassifizierung dominierten die T<sub>2</sub>- und T<sub>3</sub> Kategorien (T<sub>1</sub>: 8,9%, T<sub>2</sub>: 25,7%, T<sub>3</sub>: 53,5% und T<sub>4</sub>: 9,9%), sowie das Nichtvorhandensein von befallenen Lymphknoten N<sub>0</sub> (60,4%) und von Fernmetastasen M<sub>0</sub> (85,1%). Für die Einteilung nach den UICC-Kriterien ergab sich eine relative Gleichverteilung aller Stadien (Stadium 1: 29,77%, Stadium 2: 26,37%, Stadium 3: 25,7%, Stadium 4: 14,9%, wobei Stadium 0 (Karzinoma *in situ*) mit nur 2% vertreten war.

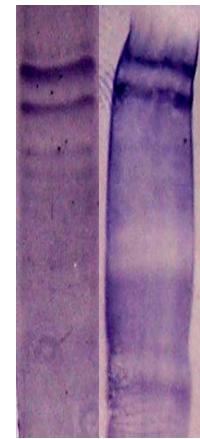
#### **3.2) Westernblot-Analysen**

Mit der Westernblottechnik zu Erfassung der Autoantikörper des Ki-67 Antigens wurde eine Methode etabliert, welche schon mehrfach Anwendung gefunden hat (Gerlach et al., 1998, Schmidt et al., 2003). Da die zur Verfügung gestandene Menge der Seren nicht für eine Doppeluntersuchung ausreichte, konnten alle Proben nur einmal getestet werden. Um

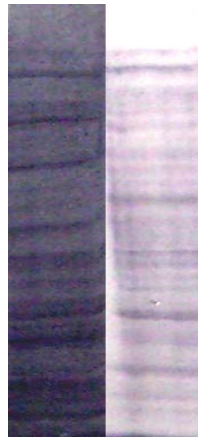
jedoch die Ergebnisse einer methodischen Prüfung unterziehen zu können, beschlossen wir, einen Teil der Seren simultan auch auf p53 Autoantikörper zu untersuchen. Dafür standen aber nicht mehr alle 101 Seren zur Verfügung, da die Untersuchung auf pKi-67 Autoantikörper bereits angelaufen war. Die Antikörper gegen p53 und pKi-67 konnten in einem Lauf untersucht werden. Da im SDS-Page durch die Überlagerung der „intrinsic charge“ der Proteine durch das SDS die Moleküle strikt nach Größe und nicht nach Ladung getrennt werden, ist eine Verwechslung der Banden auf den Blot mit Benutzung des Precision Plus Protein™ Standard nahezu ausgeschlossen. Aufgrund der sehr unterschiedlichen Molekulargewichte von 53000 Dalton (p53) und 395000 bzw. 345000 Dalton für die beiden pKi-67 Banden sind diese auf einem Blot eines normalen Page-Geles wegen der unterschiedlichen Laufzeiten schwer nur zusammen darstellbar. Deswegen verwendeten wir ein geschichtetes Sammelgel, welches so gegossen wurde, dass es in seiner Dichte zunehmend war (siehe Material und Methoden Kapitel 2.3.3). Die zwei Banden des pKi-67, die auf unterschiedlich gespleisste mRNA's (siehe Einleitung 1.4) zurückzuführen sind, verleihen dem positiven Ergebnis zusätzlich ein charakteristisches Aussehen. Außer den eigentlichen Proben liefen neben dem schon erwähnten Größenstandard immer noch zwei Reihen mit kommerziell erwerbbaeren Antikörpern gegen die beiden Proteine p53 und pKi-67 mit, um ein fehlerhaftes Isolieren der Antigene aus den Zelllinien auszuschließen. Im Folgenden sind einige Beispiele von positiven Befunden von Seren mit Autoantikörpern gegen pKi-67 unter Abbildung 8a, 8b, 8c, 8d) dargestellt (Proben 1266, 1358, 1359, 1375, 1370). Ausgewertet wurden diese Blotstreifen visuell über ein Vergleichen mit den oben beschriebenen Standards. Der jeweilige rechte Streifen ist die Kontrolle mit den erworbenen Antikörpern gegen pKi-67 bzw. p53 (MIB-1 und p53 monoklonal). Wichtig ist in dem Fall auch, dass der Abstand der pKi-67 Doppelbande untereinander in Probe und Kontrolle gleich ist, da es sich sonst möglicherweise nur um ein falsch positives Ergebnis oder um verschiedene Bruchstücke eines Antigens handelt, nicht aber das in der Kontrolle nachgewiesene pKi-67 Antigen. Vergleichend dazu sind positiv auf p53 Autoantikörper getestete Seren unter Abbildung 8e, 8f, 8g) dargestellt. Zu beachten ist die von der pKi-67 Doppelbande differente Lage der p53-Bande am unteren Ende des Blots wegen des viel geringeren Molekulargewichtes (Proben 1358, 1192, 1363). Am Beispiel der unter 8b) untersuchten Seren ist exemplarisch ein Precision Plus Protein™ Standard mit dargestellt und die jeweiligen Banden mit dem entsprechenden Molekulargewicht gekennzeichnet.



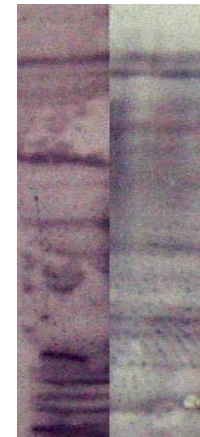
**8b)** Precision Plus Protein™ Standard, 1358, 1359, MIB-1



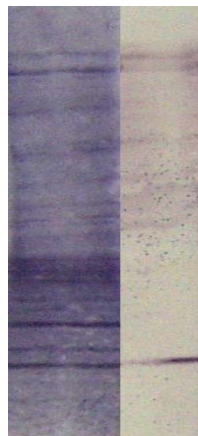
**8a)** 1266 , MIB-1



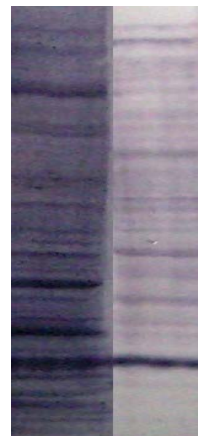
**8c)** 1375 , MIB-1



**8d)** 1370 , MIB-1



**8e)** 1358 , p53



**8f)** 1192 , p53



**8g)** 1363 , p53

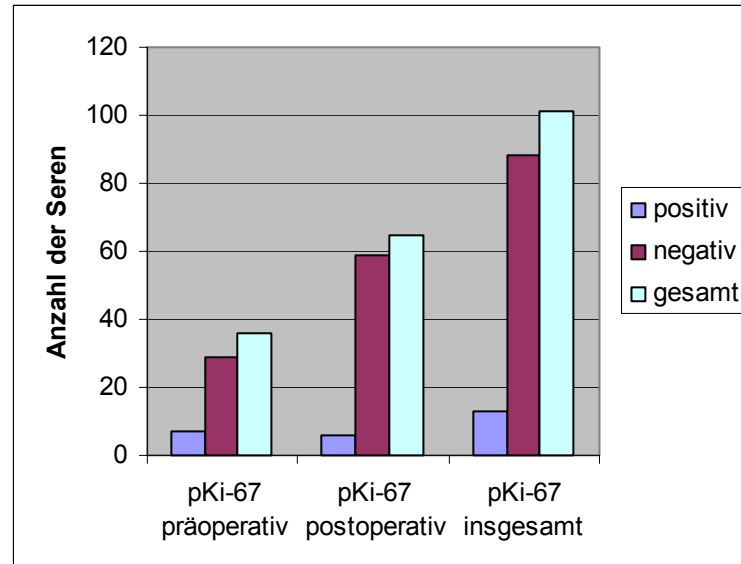
**Abbildung 8a, 8b, 8c, 8d, 8e, 8f, 8g:** exemplarische Abbildung positiv auf Autoantikörper getesteter Seren. Im linken Blot sind jeweils die nummerierten Seren und im rechten Blot die kommerziellen Primäantikörper dargestellt. Bei 8b) Darstellung des Molekulargewichtsmarkers Precision Plus™ Protein Standard, sowie Markierung der Proteine im Blot der kommerziellen Antikörper durch Pfeile

### 3.3) Statistische Auswertung für pKi-67

Von den 101 getesteten Seren waren 13 für pKi-67 eindeutig positiv. Durch die Unterteilung in post- und präoperativ abgenommene Proben ist zu erkennen, dass verhältnismäßig zur Anzahl aller Seren die Anzahl positiver Seren postoperativ abnimmt (siehe Tabelle 6 und Abbildung 9, für pKi-67 19,4% präoperativ zu 9,2% postoperativ). Es standen aber für diese Studie keine prä- und postoperativen Seren von den jeweils gleichen Patienten zur Verfügung.

	pKi-67 präoperativ	pKi-67 postoperativ	pKi-67 insgesamt
<b>positiv</b>	7 (19,4%)	6 (9,2%)	13 (12,9%)
<b>negativ</b>	29 (80,4%)	59 (90,8%)	88 (87,1%)
<b>gesamt</b>	36 (100,0%)	65 (100,0%)	101 (100,0%)

**Tabelle 6:** positiv getestete Seren im Verhältnis zu allen Seren



**Abbildung 9:** vergleichende Darstellung aller auf pKi-67 Autoantikörper getesteter Seren

Betrachtet man die Verteilung der positiven Proben hinsichtlich der Geschlechter, so fällt auf, dass verhältnismäßig eine höhere Anzahl positiver Seren zu weiblichen Patienten gehören (Tabelle 7, prä - und postoperativ). Insgesamt sind 11,5% (7 von 61 Seren) aller Männer und 15% aller Frauen (6 von 40 Seren) positiv auf pKi-67 Autoantikörper getestet

worden. Allerdings sind die in der Studie enthaltenen Fallzahlen gering, es gibt keine signifikante Häufung.

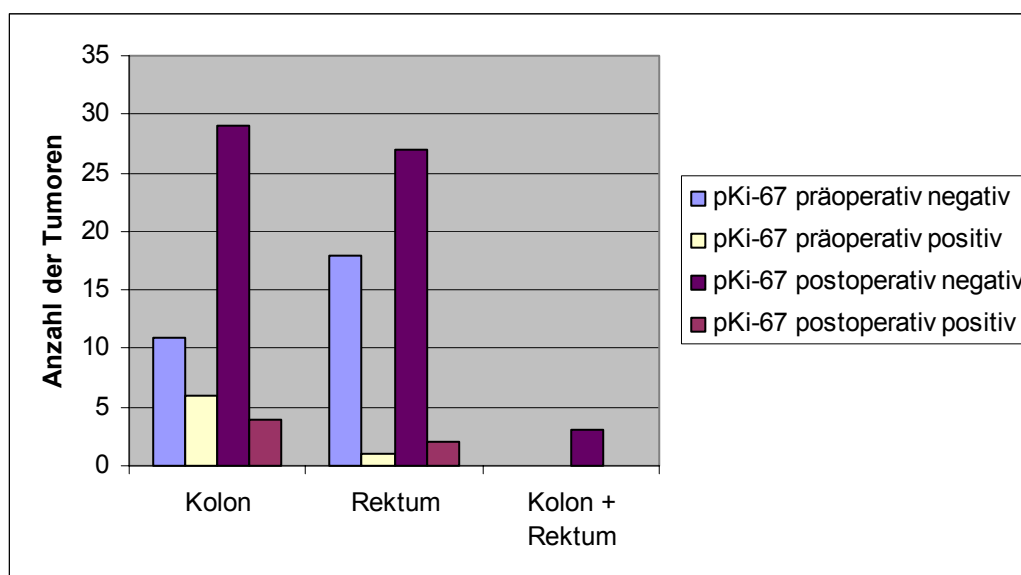
	pKi-67 präoperativ			pKi-67 postoperativ		
	<i>negativ</i>	<i>positiv</i>	<i>insgesamt</i>	<i>negativ</i>	<i>positiv</i>	<i>insgesamt</i>
<b>männlich</b>	19 (82,6%)	4 (17,4%)	23 (100,0%)	35 (92,1%)	3 (7,9%)	38 (100,0%)
<b>weiblich</b>	10 (76,9%)	3 (23,1%)	13 (100,0%)	24 (88,9%)	3 (11,1%)	27 (100,0%)

**Tabelle 7:** Geschlechtsverteilung der auf pKi-67 Autoantikörper getesteten Seren

Auffällig ist, dass die Mehrzahl der Proben mit Autoantikörpern gegen pKi-67 zu Patienten gehören, deren Tumoren im Kolon lokalisiert waren; insgesamt 10 der 13 Seren (ca. 77%,  $p=0,023$  nach Chi-Quadrat-Test, Tabelle 8).

	pKi-67 präoperativ			pKi-67 postoperativ		
	<i>negativ</i>	<i>positiv</i>	<i>gesamt</i>	<i>negativ</i>	<i>positiv</i>	<i>gesamt</i>
<b>Lokalisation</b>						
<b>Kolon</b>	11 (64,7%)	6 (35,3%)	17 (100,0%)	29 (87,9%)	4 (12,1%)	33 (100,0%)
<b>Rektum</b>	18 (94,7%)	1 (5,3%)	19 (100,0%)	27 (93,1%)	2 (6,9%)	29 (100,0%)
<b>Kolon + Rektum</b>	0	0	0	3 (100,0%)	0	3 (100,0%)

**Tabelle 8:** Lokalisation der Tumoren, welche auf Autoantikörper gegen pKi-67 getestet wurden



**Abbildung 10:** Lokalisation der auf pKi-67 Autoantikörper untersuchten Tumoren

Von den 101 getesteten Patienten hatten 91 einen kurativen und 10 einen palliativen Therapieansatz. Letztere 10 Seren unterteilten sich wiederum in 6 präoperativ und 4 postoperativ abgenommene. 50% (3 von 6) der präoperativ abgenommenen Seren wurden positiv, aber alle postoperativ abgenommenen negativ auf Autoantikörper gegen pKi-67 getestet. Natürlich schränkt die geringe Anzahl der palliativ behandelten Patienten die Aussagefähigkeit ein.

Nachfolgende Tabelle 9 zeigt eine Aufschlüsselung der Ergebnisse nach TNM-Kategorie, dem Differenzierungsgrad und dem UICC Tumorstadium. Eine signifikant gehäufte Verteilung der auf pKi-67 Autoantikörper positiv getesteten Seren anhand der gewählten Kriterien ist nicht erkennbar, jedoch eine Abnahme der auf Antikörper positiv getesteten Seren bei präoperativer Blutabnahme bei steigendem Tumorgrad. Bei den postoperativen positiven Seren ist eine Häufung in entgegengesetzter Richtung zu erkennen. Betrachtet man die Verteilung der positiven (prä- und postoperativ abgenommen) Seren entsprechend des Lymphknotenstatus (N-Kategorie), fällt eine nicht signifikante Häufung im N<sub>2</sub>-Stadium (4 und mehr Lymphknoten befallen) auf. Im Anhang (7.2) befindet sich zum Vergleich eine Tabelle für die TNM-Angaben des Bundeslandes Schleswig-Holstein.

Kategorie	pKi-67 präoperativ		pKi-67 postoperativ		gesamt pKi-67 positiv
	<i>negativ</i>	<i>positiv</i>	<i>negativ</i>	<i>positiv</i>	
<b>Differenzierungsgrad</b>					
1	0	0	4 (100,0%)	0	0
2	15 (78,9%)	4 (21,1%)	39 (95,1%)	2 (4,9%)	6 (10,0%)
3	13 (86,7%)	2 (13,3%)	15 (78,9%)	4 (21,1%)	6 (17,6%)
4	0	0	0	0	0
x = keine Angaben	0	0	0	0	0
<b>T Kategorie</b>					
1	3 (75,0%)	1 (25,0%)	5 (100,0%)	0	1 (11,1,0%)
2	4 (80,0%)	1 (20,0%)	18 (85,7%)	3 (14,3%)	4 (15,4%)
3	19 (82,6%)	4 (17,4%)	28 (90,3%)	3 (9,7%)	7 (12,96%)
4	3 (75,0%)	1 (25,0%)	6 (100,0%)	0	1 (10,0%)
Is	0	0	2 (100,0%)	0	0
x = keine Angaben	0	0	0	0	0
<b>N Kategorie</b>					
0	16 (84,2%)	3 (15,8%)	39 (92,9%)	3 (7,1%)	6 (9,8%)
1	7 (100,0%)	0	15 (88,2%)	2 (11,2%)	2 (8,3%)
2	6 (66,7%)	3 (33,3%)	4 (80,0%)	1 (20,0%)	4 (28,6%)
x = keine Angaben	0	1 (100,0%)	1 (100,0%)	0	1 (50,0%)

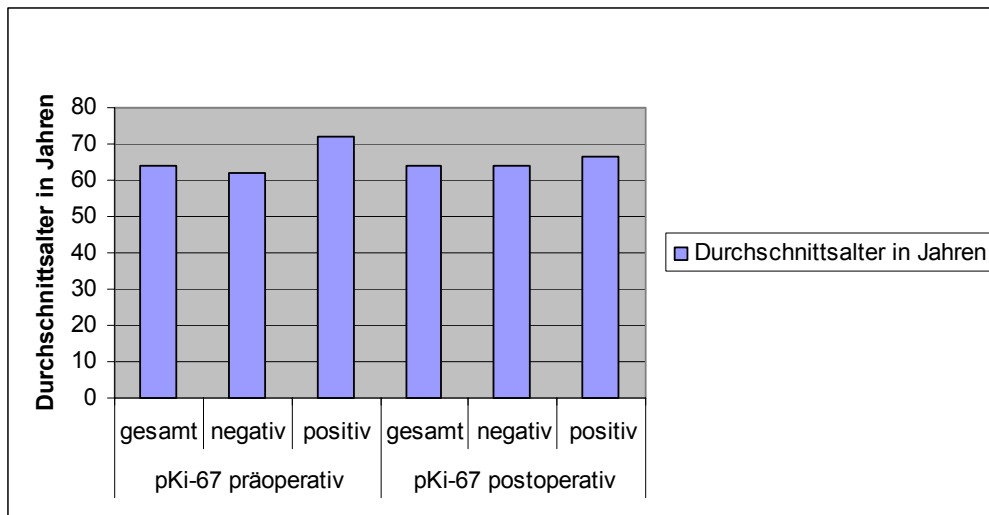
Kategorie	pKi-67 präoperativ		pKi-67 postoperativ		gesamt pKi-67 positiv
	<i>negativ</i>	<i>positiv</i>	<i>negativ</i>	<i>positiv</i>	
<b>M Kategorie</b>					
<b>0</b>	22 (81,5%)	5 (18,5%)	53 (89,8%)	6 (10,2%)	11 (12,8%)
<b>1</b>	7 (77,8%)	2 (22,2%)	6 (100,0%)	0	2 (13,3%)
<b>x = keine Angaben</b>	0	0	0	0	0
<b>UICC Stadium</b>					
<b>0</b>	0	0	2 (100,0%)	0	0
<b>1</b>	7 (77,8%)	2 (22,2%)	19 (90,5%)	2 (9,5%)	4 (13,3%)
<b>2</b>	9 (100,0%)	0	17 (94,4%)	1 (5,6%)	1 (3,7%)
<b>3</b>	6 (66,7%)	3 (33,3%)	14 (82,4%)	3 (17,6%)	6 (23%)
<b>4</b>	7 (77,8%)	2 (22,2)	6 (100,0%)	0	2 (13,3%)
<b>x = k. Angaben</b>	0	0	1 (100,0%)	0	0

**Tabelle 9:** Stadienverteilung sortiert nach pKi-67 prä- und postoperativ sowie positiv und negativ auf Autoantikörper getestet

Wie eingangs schon erwähnt, lag das Durchschnittsalter der gesamten Patientengruppe bei 64 Jahren. An der folgenden Tabelle (Tabelle 10) wird ersichtlich, dass es schwierig ist, aus der geringen Anzahl positiver Seren eine Aussage zu treffen. Beachtlich ist jedoch der Anstieg des Durchschnittsalters bei der Gruppe der auf pKi-67 Autoantikörper positiv getesteten Seren, welche präoperativ abgenommen wurden, von 63,82 auf 71,9 Jahre. Bei den vergleichbaren Seren, die postoperativ abgenommen wurden, ist der Anstieg weit geringer. Die statistische Bearbeitung ergab für die pKi-67 präoperativen Seren eine Signifikanz von  $p=0,016$  im Vergleich der Altersstrukturen von auf Autoantikörpern gegen pKi-67 positiven und negativen Seren nach dem Mann-Whitney-U-Test. Eine Bestimmung der 5-Jahre-Überlebenszeit konnte nicht durchgeführt werden, da in dem gesamten Patientenkollektiv dieser Studie erst ein Todesfall bekannt ist.

	pKi-67 präoperativ			pKi-67 postoperativ		
	<i>gesamt</i>	<i>negativ</i>	<i>positiv</i>	<i>gesamt</i>	<i>negativ</i>	<i>positiv</i>
<i>Anzahl</i>	36	29	7	65	59	6
<i>Durchschnittsalter in Jahren</i>	63,8	61,8	71,9	64,1	63,9	66,7

**Tabelle 10:** Durchschnittsalter des Patientenkollektivs sortiert nach Untersuchungsergebnis



**Abbildung 11:** Durchschnittsalter des Patientenkollektivs, sortiert nach Untersuchungsergebnis

### 3.4) Ergebnisse der Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe umfasste 20 freiwillige Medizinstudenten (10 Frauen/Durchschnittsalter 24,3 Jahre, 10 Männer/Durchschnittsalter 26,9 Jahre) der Universität Schleswig-Holstein, Campus Lübeck. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme gab es keinerlei Anhaltspunkte für eine ernste körperliche Erkrankung dieser Probanden. Des Weiteren konnten in den Seren der Kontrollgruppe keine Antikörper gegen pKi-67 oder p53 nachgewiesen werden. Nachfolgend ein exemplarisches Beispiel eines negativen Blots eines Serums der Kontrollgruppe mit gegenübergestellten Blot mit kommerziellen Antikörpern gegen beide Antigene (Abbildung 12).



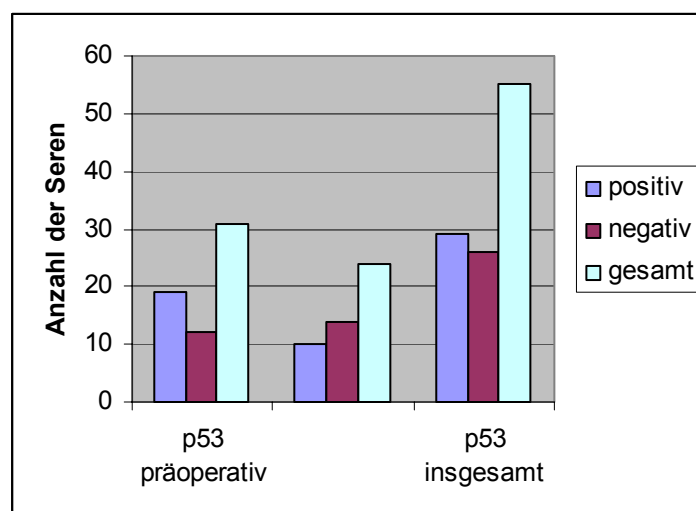
**Abbildung 12:** MIB-1/p53, Kontrollgruppenserum

### 3.5) Statistische Auswertung für p53

Im Folgenden wird die Auswertung der auf p53 Autoantikörper getesteten Proben dargestellt. Die zusätzliche Untersuchung auf p53 Autoantikörper diente als Kontrolle der Westernblot-Methode, weil der p53 Autoantikörperstatus beim kolorektalen Karzinom schon mehrmals beschrieben wurde (siehe 3.2 und 4). Es wurden insgesamt 55 Seren (31 präoperativ und 24 postoperativ abgenommene Seren) untersucht, da die Methode erst später um die zusätzliche Suche nach p53 Autoantikörper erweitert wurde. Die Reihenfolge der Kriterien entspricht der in dem statistischen Teil (3.3) für die pKi-67 Autoantikörper getesteten Seren. Es wurden insgesamt 52,7% der Seren positiv getestet. Auch hier ist die Rate positiver Seren präoperativ mit 61,3% größer als postoperativ mit 41,7% (Tabelle 11). Dabei waren 55,6% (20 von 36) aller Seren männlicher Probanden und 47,4% (9 von 19) aller weiblichen Probanden positiv (Tabelle 12).

	p53 präoperativ	p53 postoperativ	p53 insgesamt
<b>positiv</b>	19 (61,3%)	10 (41,7%)	29 (52,7%)
<b>negativ</b>	12 (38,7%)	14 (58,3%)	26 (47,3%)
<b>gesamt</b>	31 (100,0%)	24 (100,0%)	55 (100,0%)

**Tabelle 11:** Ergebnis der nach p53 Autoantikörpern untersuchten Seren



**Abbildung 13:** Darstellung positiv und negativ auf p53 Autoantikörper getesteter Seren

	p53 präoperativ			p53 postoperativ		
	Negativ	positiv	gesamt	negativ	positiv	gesamt
<b>männlich</b>	7 (35,0%)	13 (65,0%)	20 (100,0%)	9 (56,3%)	7 (43,7%)	16 (100,0%)
<b>weiblich</b>	5 (45,5%)	6 (54,5%)	11 (100,0%)	5 (62,5%)	3 (37,5%)	8 (100,0%)

**Tabelle 12:** Geschlechtsverteilung der auf p53 Autoantikörper getesteten Seren

Betrachtet man die Verteilung der Tumoren mit positiv auf p53 Autoantikörpern getesteten Seren so stellt man eine homogene Verteilung mit leichter Häufung im Rektum fest. So waren insgesamt (prä- und postoperativ) 15 von 25 Seren von Rektumtumoren (60%) und 14 von 30 Seren von Kolontumoren (46,7%) positiv.

	p53 präoperativ			p53 postoperativ		
	negativ	positiv	gesamt	negativ	positiv	gesamt
<b>Lokalisation</b>						
<b>Kolon</b>	7 (43,8%)	9 (56,3%)	16 (100%)	9 (64,3%)	5 (35,7%)	14 (100%)
<b>Rektum</b>	5 (33,3%)	10 (66,7%)	15 (100%)	5 (50%)	5 (50%)	10 (100%)

**Tabelle 12:** Lokalisation der Tumoren welche auf Autoantikörper gegen p53 getestet wurden

Die Rate an positiv auf p53 Antikörper getesteter Seren palliativ behandelter Patienten beträgt 75% (6 von 8 getesteten Seren). Hier waren von 6 präoperativen Seren 4 positiv auf die Antikörper und von 2 postoperativen Seren 2. Jedoch gilt auch hier, dass die Fallzahl von palliativen Patienten für verwertbare Aussagen zu gering ist. Die nächste Tabelle (Tabelle 13) sortiert die Ergebnisse nach dem TNM-System, dem Differenzierungsgrad und den UICC-Tumorstadien.

Kategorie	p53 präoperativ		p53 postoperativ		gesamt p53
	negativ	positiv	negativ	positiv	positiv
<b>Differenzierungsgrad</b>					
<b>1</b>	0	0	1 (50%)	1 (50%)	1 (50%)
<b>2</b>	7 (38,9%)	11 (61,1%)	10 (62,5%)	6 (37,54%)	17 (50%)
<b>3</b>	4 (36,7%)	7 (63,6%)	3 (50%)	3 (50%)	10 (58,82%)
<b>T Kategorie</b>					
<b>1</b>	1 (25%)	3 (75%)	1 (33,3%)	2 (66,7%)	5 (71,42%)
<b>2</b>	2 (66,7%)	1 (33,3%)	6 (66,7%)	3 (33,3)	4 (33,33)
<b>3</b>	7 (35%)	13 (65%)	6 (54,5%)	5 (45,5%)	18 (58%)
<b>4</b>	2 (50%)	2 (50%)	1 (100%)	0	2 (40%)

Kategorie	p53 präoperativ		p53 postoperativ		gesamt p53
	negativ	positiv	negativ	positiv	positiv
<b>N Kategorie</b>					
<b>0</b>	5 (35,7%)	9 (64,3)	9 (60%)	6 (40%)	15 (51,7%)
<b>1</b>	4 (57,1%)	3 (42,9%)	3 (50%)	3 (50%)	6 (46,1%)
<b>2</b>	3 (33,3%)	6 (66,7%)	2 (66,7%)	1 (33,3%)	1 (100%)
<b>9</b>	0	1 (100%)			
<b>M Kategorie</b>					
<b>0</b>	10 (45,5%)	12 (54,5%)	12 (60%)	8 (40%)	20 (47%)
<b>1</b>	2 (22,2%)	7 (77,8%)	2 (50%)	2 (50%)	9 (69%)
<b>UICC Stadium</b>					
<b>1</b>	3 (42,9%)	4 (57,1%)	6 (54,5%)	5 (45,5%)	9 (50%)
<b>2</b>	2 (33,3%)	4 (66,7%)	2 (66,7%)	1 (33,3%)	5 (55%)
<b>3</b>	5 (55,6%)	4 (44,4%)	4 (66,7%)	2 (33,3%)	6 (40%)
<b>4</b>	2 (22,2%)	7 (77,8%)	2 (50%)	2 (50%)	9 (69%)

**Tabelle 13:** Stadienverteilung der auf p53 Autoantikörper getesteten Seren

Es sind keine signifikanten Beziehungen zwischen den genannten Kriterien und auf Autoantikörper gegen p53 positiv getesteten Proben ersichtlich. Bei den präoperativ abgenommenen Seren ist eine Häufung der Positiven im M1-Stadium und UICC-Stadium 4 festzustellen, allerdings ist das M1-Stadium definitionsgemäß in dem UICC-Stadium 4 beinhaltet (siehe Anhang 7.1).

Hinsichtlich des Alters ergab sich bei der Kontrolle auf die p53 Antikörper ebenfalls keine statistische Auffälligkeit einer Differenz zwischen den verschiedenen Gruppen (Tabelle 14).

	p53 präoperativ			p53 postoperativ		
	gesamt	negativ	positiv	gesamt	negativ	positiv
<i>Anzahl</i>	31	12	19	24	14	10
<i>Durchschnittsalter in Jahren</i>	64,9	64,99	64,85	66,3	64,55	68,83

**Tabelle 14:** Durchschnittsalter für p53 prä- und postoperativ

### 3.6) Vergleich der Daten gegen pKi-67 und p53 Autoantikörper getesteter Seren

Vergleicht man die absolute Anzahl positiv getesteter Seren so fällt auf, dass die Rate an Seren, die p53 Autoantikörper enthalten, sehr viel höher ist (13 % positiv auf pKi-67 Autoantikörper, 53% positiv auf p53 Autoantikörper). Bei beiden ist eine Abnahme an positiv getesteten Seren zu erkennen, wenn diese postoperativ abgenommen wurden (Abbildung 14).

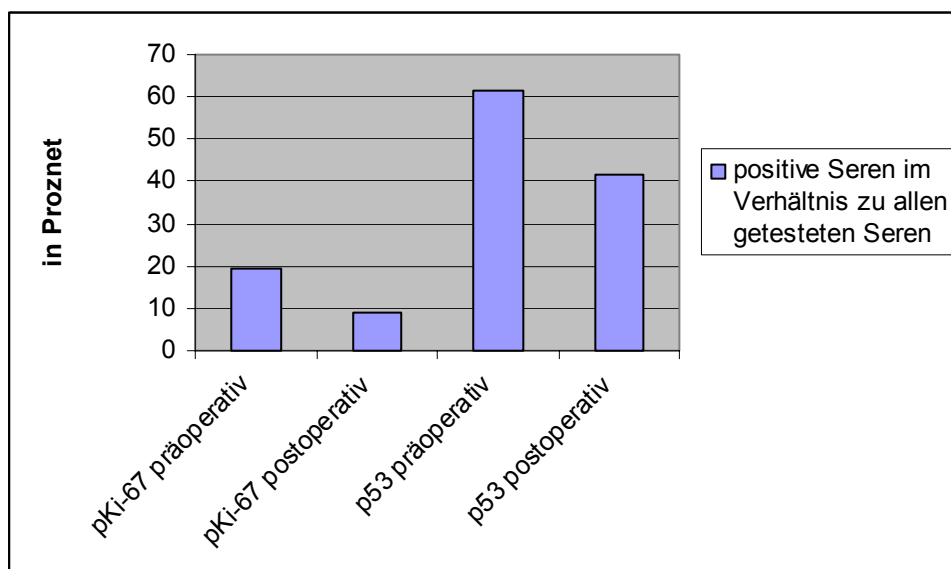
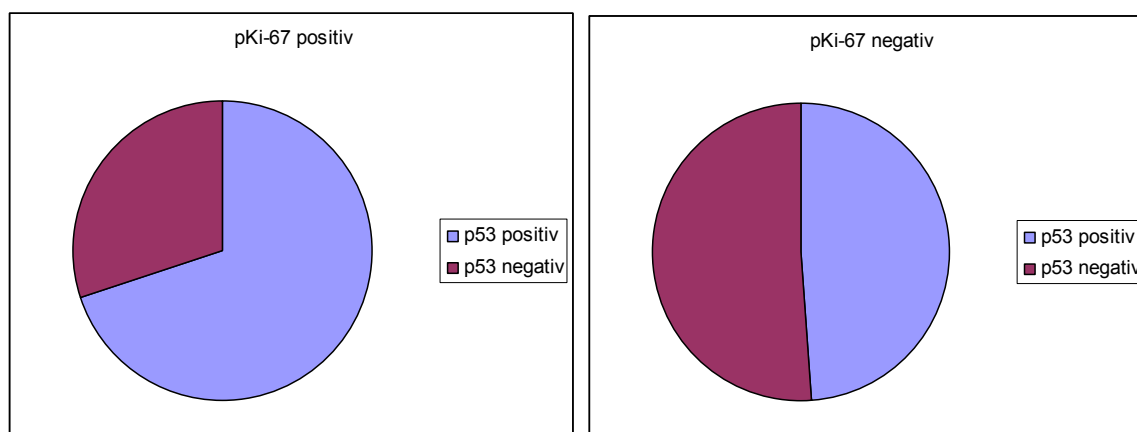


Abbildung 14: Vergleich positiv getesteter Seren pKi-67 / p53

Hinsichtlich der Geschlechterverteilung der positiv getesteten Seren fand sich bei beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied. Tendenziell wurden mehr Frauen positiv auf pKi-67 Autoantikörper (15% aller Frauen und 11,5% aller Männer) und mehr Männer positiv auf p53 Autoantikörper (55,6% aller Männer und 47,7% aller Frauen) getestet. Hinsichtlich der Verteilung der Tumoren ergab sich bei auf pKi-67 Autoantikörpern getesteten Seren eine signifikante Häufung im Kolon (10 von 13 positiv getesteten Seren, insgesamt 50 Kolontumore und 48 Rektumtumore sowie 3 Rektum und Kolontumore). Bei den positiv auf p53 getesteten Seren ergab sich keine signifikante Häufung (14 von 29 insgesamt positiv getestete Seren stammten von Kolontumoren, 15 von 29 insgesamt positiv getestete Seren stammten von Rektumtumoren) bei insgesamt 30 getesteten Seren von Kolontumoren und 25 getesteten Seren von Rektumtumoren.

Betrachtet man nur die Seren von palliativ behandelten Patienten, so kann man trotz der geringen Anzahl von nur 10 Patienten feststellen, dass präoperativ eine höhere Rate an positiv auf Antikörpern getesteten Seren feststellbar ist (pKi-67: kurativ 19,4% palliativ 50%, p53: kurativ 61,3% palliativ 67%; keine Signifikanz). Bei der Betrachtung der Kriterien von TNM-Klassifizierung und den UICC-Stadien lässt sich bei beiden hier verglichenen Gruppen kein signifikantes Ergebnis feststellen. Konnte man bei der Altersbetrachtung für pKi-67 positive präoperative Seren einen signifikanten Altersunterschied der Patienten zu den Patienten mit pKi-67 negativen präoperativen Seren feststellen, ergab sich für pKi-67 postoperative Seren oder p53 getestete Seren kein signifikanter Altersunterschied. Interessanterweise gibt es Überschneidungen in der Menge der positiv getesteten Seren. So sind 7 von 10 auf pKi-67 Autoantikörper positiv getestete Seren auch positiv auf p53 Autoantikörper (3 pKi-67 Autoantikörper positive Seren sind nicht auf p53 Antikörper getestet worden).



**Abbildungen 15 und 16:** Verteilung p53 positiver und negativer Seren auf pKi-67 positive und negative Seren

Für die pKi-67 negativen Seren lässt sich keine solche eindeutige Verteilung erkennen. Durch die geringe Fallzahl von 10 positiv auf pKi-67 Autoantikörper getesteten Seren ist das Ergebnis jedoch relativ zu sehen, außerdem wird keine statistische Signifikanz erreicht.

	pKi-67 positiv	pKi-67 negativ
p53 positiv	7	22
p53 negativ	3	23

**Tabelle 15:** Mengenüberschneidung der auf Autoantikörper getesteten Seren

#### 4) Diskussion

Die häufigsten Arbeiten über die Zusammenhänge zwischen dem kolorektalen Karzinom und Proliferationsmarkern beschäftigen sich mit p53, mit der Bildung von Autoantikörpern gegen p53, deren Korrelation zur Prognose oder mit dem Ki-67 Index und dessen Aussagen über die Prognose (Brown & Gatter et al., 1990, Angelopoulou et al., 1994, Houbiers et al., 1995, Hammel et al., 1997, Palmqvist et al. 1999). Wie aus einer bereits in der Einleitung (1.8, Ziele der Arbeit) wiedergegebenen Tabelle ersichtlich wird, konnte jedoch für den Ki-67-Index und das kolorektale Karzinom kein eindeutiger Zusammenhang und keine prognostische Aussagefähigkeit festgestellt werden, bzw. wird der Zusammenhang zwischen pKi-67 und postoperativer Diagnose bzw. Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms kontrovers diskutiert (Nanashima et al., 1998, Brown & Gatter, 2002, Palmquist et al., 1999). Nachfolgende Tabelle (Tabelle 16) gibt einen Überblick über verschiedene Studien die sich mit der Thematik des Ki-67 Index und der prognostischen Relevanz beschäftigen.

Patienten-anzahl	Ki-67 Index	Methode	Prognostische Relevanz	Autoren
61	38,70%	IHC	ja	Porschen et al., 1989
62	37,30%	IHC	nein	Hemming et al., 1992
100	34,60%	IHC	nein	Kubota et al., 1992
44	28,00%	IHC	nein	Baretton et al., 1996
106	31,90%	IHC	nein	Öfner et al., 1996
255	<50% -38,00% >50% -62,00%	IHC	nein	Jansson und Sun, 1997
30	58,97%	IHC	nein	Kyzer und Gordon, 1997
171	25,00%	IHC	nein	Buglioni et al., 1999
33	<33% -48,40% 33-66% -22,60% >66% -29,00%	IHC	nein	De Jong et al., 1998
51	59,00%/42,00%	IHC/ISH	ja	Duchrow et al., 1998
73	21,80%	IHC	nein	Handa et al., 1999
42	<10% -24,00% 10-50% -50,00% >50% -14,00%	IHC	nein	Mairinger et al., 1999
27	44,00%	IHC	nein	Nanashima et al., 1999
56	43,70%/36,80%	IHC	ja	Palmqvist et al., 1999
110	50,60%	IHC	ja	Kimura et al., 2000
25	60%	IHC/mRNA	ja	Duchrow et al., 2001
706	<20% -11,40% 21-40% -34,50% 41-60% -41,60% 61-80% -9% >81% -0,50%	IHC	ja	Allegra et al., 2003
81		IHC	ja	Dziegel et al., 2003

**Tabelle 16:** Übersicht über klinische Untersuchungen zu Ki-67 und prognostischer Relevanz bei kolorektalen Karzinomen in der Literatur (IHC - Immunhistochemie, ISH - *In situ*-Hybridisierung, mRNA – mRNA Bestimmung) aus Ihmann et al. 2004

Ein Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte darin liegen, dass die kolorektalen Karzinome ein heterogenes Krankheitsbild darstellen und eine verschiedene Expression von pKi-67 in einem Tumor aufweisen können (Brown & Gatter 1990, Palmquist et al., 1999). Demnach ist es möglich, in ein und demselben Tumor verschiedene Ki-67 Indices nachzuweisen. Diese Arbeit beschäftigt sich mit einer weiteren von dieser Problematik unabhängigen Möglichkeit, aus dem Wissen um den Nachweis von Autoantikörpern neue Erkenntnisse über die Prognose des kolorektalen Karzinoms zu erhalten.

#### **4.1) Autoantikörperbildung gegen pKi-67 und p53**

Erst wenige Studien berichten über das Thema der Autoantikörperbildung gegen pKi-67. Nachdem Bloch et al. 1995 die Bildung entsprechender Antikörper in Mäusen mit autoimmunen Krankheiten (in 12 von 12 weiblichen MRL/MpJ-+/+ Mäusen, 5 von 12 männlichen und 3 von 12 weiblichen MRL/MpJ-lpr / lpr Mäusen) nachweisen konnten, untersuchten Muro et al. 1997 das Blut von 252 Patienten mit Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises. Es gelang ihnen nur bei 2 von 76 Patienten mit systemischen Lupus Erythemathodes und bei 1 von 90 Patienten mit systemischer Sklerose Autoantikörper gegen pKi-67 im Blut nachzuweisen. Gerlach et al. 1998 wiesen bei 6 von 18 Patienten mit systemischen Lupus Erythemathodes Antikörper nach. All diesen Studien ist gemein, dass im Gegensatz zum kolorektalen Karzinom die untersuchte Krankheit generell mit der Bildung von Autoantikörpern einhergeht. Für dieses Karzinom in der Literatur jedoch viele Studien, die über die Bildung von Autoantikörpern, speziell gegen p53, berichten. Also ist die Bildung von Autoantikörpern als Ausdruck einer stattgehabten immunologischen Reaktion auf eigentlich zelluläre Proliferationsmarker [p53 - Akkumulation der mutanten Form durch Halbwertszeitverlängerung (siehe 1.7 Tumorsuppressoren p53); pKi-67 – direkte Beteiligung am Zellzyklus, gesteigerter Umsatz bei quantitativer Erhöhung des Zellzyklus) prinzipiell möglich. Doch sind zu dem Thema p53 Autoantikörper und deren Bezug zum kolorektalen Karzinom widersprüchliche Ergebnisse veröffentlicht worden. So behaupten zum Beispiel Hammel et al. 1997, dass das Vorhandensein von Antikörpern in keinem signifikanten Zusammenhang mit Tumorgröße, Geschlecht der Patienten oder Lokalisation des Tumors stehe. Jedoch waren alle Patienten dieser Studie mit Antikörpern gegen p53 erheblich jünger. In unserer Studie konnte das für die Kontrollproben mit p53 nicht bestätigt werden. Allerdings beschrieben auch Tang et al. 2001, dass das Alter

weder in signifikanten Zusammenhang mit p53 Autoantikörpern steht, noch einen Einfluss auf die Prognose von p53 Autoantikörpern positiven, an kolorektalen Krebs erkrankten, Menschen hat. 1995 beschrieben Houbiers et al. eine Assoziation zwischen Autoantikörpern gegen p53 und einer schlechten Prognose der Erkrankung, speziell für die Dukes Stadien A und B1. Um die unterschiedlichen Standpunkte der einzelnen Forschungsgruppen zu verdeutlichen, sei noch auf Broll et al. 2001, die keine unterschiedlichen Prognosen für p53 Antikörper positive oder negative Patientengruppen feststellen konnten, und Hammel et al. im Jahr 2000 verwiesen, die wiederum keine Korrelation zwischen Tumorstadium und Antikörperproduktion feststellen konnten. Auch Chang et al. 2005 schrieben der Autoantikörperproduktion gegen p53 im Gegensatz zur mutanten genetischen Veränderung von p53 keinerlei prognostischen Wert für das kolorektale Karzinom zu.

#### **4.2) Vergleich der Studienergebnisse mit bekannten Daten**

Die Testung auf p53 Autoantikörper dient dieser Arbeit zur Kontrolle der Methode, da diese die erste Studie ist, welche Antikörper gegen pKi-67 bei Patienten mit kolorektalem Karzinom sucht. Demzufolge ist es nicht möglich, die Ergebnisse mit anderen Studien zu vergleichen. Auch wenn die Methode des Westernblots schon genutzt wurde (siehe 3.2, Ergebnisse/ Versuche), ist es nötig, durch den Vergleich mit früheren Ergebnissen von p53-Studien die Resultate dieser Studie zu überprüfen.

Der größte Teil der Studien über die Suche nach Autoantikörpern bei verschiedenen Tumorentitäten benutzen den Elisatest. Ein mögliches Ziel dieser Arbeit, nämlich nach einem Screening mit der Westernblottechnik einen Elisatest zu konstruieren, konnte aufgrund des Mangels an notwendigen Seren und wegen technischen Schwierigkeiten bei der Realisierung leider nicht verfolgt werden.

Insgesamt waren 13% aller getesteten Seren positiv auf pKi-67 Antikörper. Das heißt, dass eine nicht unerhebliche Immunreaktion mit dem eigentlich nukleären Antigen stattgefunden haben muss. Wie der Kontakt zwischen Immunsystem und Antigen erfolgt, ist unklar (über diese Arbeit 1.8, Einleitung). In der Kontrolle mit p53 Autoantikörpern sind insgesamt 53% positiv. Diese Zahl ist höher als in vielen bisherigen Studien (Saleh et al., 2000 5,5%, Crawford et al., 1984 12,5%, Hammel et al., 1997 26%, Angelopoulou et al., 1994 16%, Houbiers et al., 1995 25,5%, Takeda et al., 2001 63%). In diesen Studien wurden neben immunhistochemischen Methoden meistens Elisatests eingesetzt, sodass

die Verwendung einer anderen Technik, in dieser Studie der Western Blot, die unterschiedlichen Zahlen erklären könnte (siehe 4.3 Schlussfolgerung). Andere Überlegungen gehen auch dahin, dass verschiedene Antigene zum Nachweis der Antikörper benutzt wurden (Saleh et al. 2000). Houbiers errechnete einen p53-titre Index (Houbiers et al., 1995), dessen Höhe in Korrelation zum Antikörpergehalt steht. Immerhin 70% der Seren erreichten einen höheren Wert als die Kontrolle, jedoch wurden nur 25% für sicher positiv erklärt. Eine weitere Möglichkeit, die Streubreite der Nachweisraten zu erklären, ist die als sicher anzunehmende unterschiedliche Zusammensetzung der einzelnen Patientenkollektive. Bei anderen Tumorentitäten sind auch höhere Streubreiten für die Studien bekannt (siehe Tabelle 3, p53, Einleitung 1.7). So beschrieben Willsher et al. 1996 48 % auf p53 Antikörper positive Seren bei Brustkrebs, nach Tabelle 3 (siehe Einleitung, 1.7 p53) waren bis dahin nur ähnlich geringe Zahlen wie beim kolorektalem Karzinom bekannt waren. Interessant ist die jeweilige Abnahme der Rate positiver Seren bei dem Vergleich präoperativ zu postoperativ. Takeda et al. beschrieben 2001, dass bei 27 von 28 Patienten mit kolorektalen Karzinom und präoperativ nachgewiesenen Antikörpern gegen p53 nach der Tumorsektion keine Antikörper mehr nachweisbar waren. Auch in einer weiteren Studie beschrieb diese Arbeitsgruppe eine Konversion nach Tumorsektion (Takeda et al., 2001b). Da in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht einzelne Patienten präoperativ und postoperativ, sondern nur präoperativ oder postoperativ untersucht worden sind, ist nur die Vermutung möglich, dass postoperativ nach Entfernung des Tumors ein geringerer immunologischer Reiz zur Antikörperbildung vorliegt (Abnahme der Rate positiver Seren von prä- zu postoperativ auch in dieser Studie, siehe 3.3). Jedoch ist die Zeitspanne für die einzelnen Seren zwischen Operation und Blutabnahme nicht bekannt, so dass keine genaueren Rückschlüsse auf eventuell stattfindende Konversion oder bestehende Antikörperproduktion möglich sind.

Diese Arbeit über pKi-67 Autoantikörper beschreibt zwei signifikante Zusammenhänge zum Krankheitsbild des kolorektalen Karzinoms. Einerseits ist das Durchschnittsalter des positiven präoperativen Patientenkollektives erhöht, andererseits ist die Mehrzahl der positiven Fälle ein reiner Kolontumor. Vergleichend zu anderen Studien über p53 Antikörper als Marker lässt sich feststellen, dass dort wie eingangs erwähnt das Alter bis auf in einer Studie (Hammel et al. 1997) keine signifikante Rolle einnimmt und die Lokalisation des Tumors selbst nicht beschrieben wurde. Nur in der Arbeit von Tang et al. 2001 wird eine höhere Frequenz von high p53 antibody levels bei Tumoren im linken Kolon beschrieben. Angesichts der vielen unterschiedlichen Ergebnisse der Studien über

p53 Autoantikörper und deren Korrelation zu verschiedenen Charakteristika eines an kolorektalen Karzinomen erkrankten Patientenkollektivs empfiehlt sich eine weitere Studie mit größeren Fallzahlen. Im Bezug auf die Korrelation des Auftretens von pKi-67 Autoantikörpern zu gängigen Kriterien für die Prognose des kolorektalen Karzinoms fanden sich in dieser Studie keine signifikanten Zusammenhänge. Vergleicht man die im Anhang (7.2) wiedergegebenen Daten des Bundeslandes Schleswig-Holstein von 1998-2005 (Differenzierungsgrad, TNM-System, UICC-Stadien) mit den Daten dieser Studie, können folgende Aussagen formuliert werden:

- es scheint für die Ausbildung von Autoantikörpern gegen pKi-67 nicht relevant zu sein, welche Tumorgroße vorliegt (T Kategorie)
- auch scheint die Ausbildung von Organmetastasen kein Einfluss zu haben (M Kategorie)
- es sind sowohl Patienten mit negativen als auch positiven Lymphknotenstatus von der Antikörperbildung betroffen (N Kategorie), jedoch findet sich eine Häufung in N<sub>2</sub>-Status (28% zu 9,8% in N<sub>0</sub> und 8,3% in N<sub>1</sub>)
- es sind die Differenzierungsgradstufen 2 und 3 betroffen
- es sind in allen UICC-Stadien Seren mit Autoantikörpern vorhanden.

### **4.3) Schlussfolgerung**

Wie schon erwähnt, ist die Aussagefähigkeit durch die kleine Fallzahl eingeschränkt. Vergleicht man die Ergebnisse dieser Studie über p53 Autoantikörper mit schon veröffentlichten Ergebnissen zu diesem Thema, werden die Studien unterstützt, die den p53 Autoantikörpern keinen signifikanten Zusammenhang mit den üblichen prognostischen Faktoren des kolorektalen Karzinoms zuschreiben (Hammel et al., 2000, Broll et al., 2001, Chang et al., 2005). Einzig die Aussage von Shiota et al. 2000, dass im Stadium IV bzw. Dukes D die p53 Autoantikörper häufiger nachgewiesen werden können, kann, wenn auch nicht signifikant, unterstützt werden (siehe 3.5 statistische Auswertung für p53, Tabelle 13).

Nachdem bereits für den Ki-67-Index verschiedene Ergebnisse über die prognostische Aussage veröffentlicht wurden, erbrachte diese Studie keinen Nachweis, dass mit der Suche nach Antikörpern gegen pKi-67 ein besseres prognostisches Profil für Patienten mit kolorektalen Karzinom erstellt werden kann. Sie erbrachte jedoch den Nachweis, dass

Antikörper in wesentlichen Mengen gebildet werden und dass Lokalisation des Tumors und Alter des Patienten eine entscheidende Rolle dafür spielen. Insgesamt stellt sich die Frage, ob durch die höhere Auftretenswahrscheinlichkeit und die, immer noch diskutierte und weiterhin zu erforschende, Korrelation zu Prognosefaktoren des kolorektalen Karzinoms p53 Autoantikörper nicht ein geeigneteres Mittel zur besseren Erstellung einer individuellen Prognose für den Patienten sind. Ziel einer weiteren Studie zu pKi-67 Autoantikörper bei kolorektalem Karzinom könnte der Nachweis einer möglichen Korrelation zwischen Antikörperbildung und chemotherapeutischer Behandlung sein, wie sie für p53 von Takeda et al. 2000 nachgewiesen wurde. Diese Arbeitsgruppe beschrieben signifikante Unterschiede im Ansprechen auf Fluorouracil und Cisplatin bei kolorektalen Karzinomen, die von dem Vorhandensein von p53 Autoantikörpern abhängig waren.

Des Weiteren müsste zur Bearbeitung einer größeren Patientenzahl ein Elisatest zum Screening der Seren nach Antikörpern entwickelt werden. Hauptvorteil dieser Methode gegenüber dem Westernblot liegt im geringeren finanziellen und zeitlichen Aufwand. Wissenschaftliche Arbeiten die beide Methoden vergleichen kommen zu unterschiedlichen Ergebnissen. So berichten Beck et al. 2005 in einer Arbeit zur serologischen Diagnosestellung der humanen Tuberkulose über eine 100%ige Spezifität des Westernblotes und eine 91%ige Spezifität des verwendeten Elisatestes. Wang et al. schrieben 2004 in einer Arbeit über die Detektion von Antikörpern gegen SARS-CoV im Serum an SARS erkrankten Patienten, dass bei Elisa-negativen SARS Fällen sowie Elisa-positiven non-SARS Fällen eine Überprüfung mit der Methode des Westernblotes hilfreich ist. Genauso wird bis heute ein Elisa-positiver HIV-Fall durch eine Immunfluoreszenz oder ein Westernblot bestätigt. Hier wird das Hauptproblem des Westernblotes ersichtlich: werden nicht gereinigte Proteine verwendet, sind die Blots mit vielen Banden beschrieben, die das eigentliche Ergebnis verdecken können. In dieser Arbeit ist das Problem aufgrund der charakteristischen Doppelbande von pKi-67 weniger stark ausgeprägt (Benutzung von Molekulargewichtsmarker und Kontrollbande mit kommerziellen Antikörpern bei jedem Durchlauf).

Eine 2005 von Diehl et al. veröffentlichte Arbeit beschreibt einen anderen viel versprechenden Weg, über Plasmauntersuchungen von Patienten Marker für das kolorektale Karzinom zu finden. So wurde bei Patienten im Frühstadium der Erkrankung, also kurablen Tumorbefall, bis zu 60% mutierte APC-DNA gefunden. Bereits 2002 beschrieben Traverso et al. eine ähnliche Suche nach APC-DNA, allerdings in Stuhlproben von Patienten. Sie beschrieben eine 57% Quote von mutierter DNA bei

Patienten die an einem kolorektalen Tumor erkrankt waren. Allerdings wurde bei beiden Arbeiten keine Aussage über die Korrelation zu weiteren Tumoreigenschaften oder der Prognose der Patienten geliefert.

Zur genaueren Aussage über die Prognosefähigkeit von pKi-67 Autoantikörpern gegenüber dem kolorektalem Karzinom müsste diese Studie noch zeitlich gestreckt werden, da noch keine Aussage über die Korrelation zur Überlebenszeit getroffen werden konnte. Bei einem anderen Patientenkollektiv wäre es möglich den individuellen Status der Antikörper (prä- und postoperativ sowie Verlauf) eines Patienten zu bestimmen.

Weiterhin konnte man nach dem prinzipiellen Nachweis von Autoantikörpern gegen das Protein die Suche auf andere Tumorentitäten ausweiten.

## 5) Zusammenfassung

Diese Arbeit untersucht die Bildung von Autoantikörpern gegen pKi-67 bei dem speziellen Krankheitsbild des kolorektalen Karzinoms. Für dieses inzwischen als immunhistochemischer Proliferationsmarker weltweit genutztes Protein wurde ein direkter Bezug von Expression und Lokalisation mit dem Zellzyklus nachgewiesen. In G<sub>0</sub>-Phasen arretierten Zellen, also ruhenden Zellen, konnte pKi-67 nicht nachgewiesen werden. Dafür nimmt die Konzentration von der G<sub>1</sub>-phase bis zur M-Phase zu. Gleichzeitig kann das Protein in der Mitose netzartig an das Chromatin assoziiert, in der G<sub>1</sub>-, S-, G<sub>2</sub>-Phase jedoch in diskreten Foki im Nukleoplasma dargestellt werden. Diese Tatsachen sowie der experimentelle Nachweis einer erheblichen Interaktion mit anderen Proteinen bilden die Grundlage der Hypothese dass pKi-67 eine Schlüsselrolle in der Steuerung des Zellzyklus spielt.

In einigen Arbeiten wurde eine immunologische Reaktion des Körpers auf pKi-67 nachgewiesen. Die hier vorgelegte Studie brachte den Beweis, dass auch bei proliferierenden Erkrankungen, hier speziell das kolorektale Karzinom (eine der häufigsten Krebserkrankung überhaupt), eine Antikörperproduktion gegen pKi-67 stattfindet. Bisherige Studien haben sich hauptsächlich mit der Antikörperproduktion gegen p53 beschäftigt.

Interessanterweise treten Autoantikörper gegen pKi-67 in diesem Patientenkollektiv signifikant häufiger bei Kolontumoren sowie bei älteren Patienten auf.

Diese Studie benutzte eine bereits in mehreren Arbeiten etablierte Methode. Mithilfe der Westernblots der Seren lies sich eine Antikörperproduktion in 13% der Fälle (13 von 101 Seren) nachweisen. Jedoch ergab sich kein signifikanter Zusammenhang zu den bekannten Prognosefaktoren des kolorektalen Karzinoms. Somit muss die Frage, ob eine immunologische Reaktion auf das Antigen eventuell als Prognosefaktor oder gar als Screening verwendet werden kann, offen bleiben bis der endgültige Prognoseverlauf des Patientenkollektivs ermittelt werden kann. Allerdings ergaben auch Studien über immunhistochemische Färbungen gegen pKi-67 beim kolorektalen Karzinom widersprüchliche Ergebnisse, sodass man zur endgültigen Beantwortung der Frage auf Studien mit größeren Fallzahlen zurückgreifen sollte.

Durch den Nachweis einer Antikörperproduktion gegen pKi-67 ergeben sich weitere Möglichkeiten. So könnte man Nachforschungen über das Verhalten anderer Tumorentitäten anstellen. Durch den signifikanten Zusammenhang zwischen

Autoantikörpern gegen pKi-67 und Alter sowie Tumorlokalisation sind auch Fragen nach anderen Kriterien wie das Ansprechen auf Chemotherapeutika, postoperative Entwicklung des Antikörperstatus oder Betrachtung des Patientenkollektivs über einen längeren Zeitraum zwecks Korrelation zur Überlebensrate entstanden.

Als Fazit stellt sich die Bestätigung der Autoantikörperbildung bei kolorektalen Karzinomen in die Mitte. Es empfiehlt sich, der Frage Autoantikörper gegen pKi-67 und Korrelation mit Tumoreigenschaften weiter nachzugehen, denn eine eventuell nicht vorhandene Korrelation lässt sich nicht mit einer Studie dieser Größe bestätigen.

## 6) Literatur

**1. Andre T., Boni C., Mounedji-Boudiaf L., Navarro M., Tabanero J., Hickish T., Topham C., Zaninelli M., Clingan P., Bridgewater J., Tabah-Fish I. & de Gramont A. (2004):** Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer.

N Engl J Med, 2004 Jun 3, 350(23), 2343-2351

**2. Angelopoulou K., Diamandis E.P., Sutherland D.J.A., Kellen J.A. & Bunting P.S. (1994):** Prevalence of serum antibodies against the p53 tumor suppressor gene protein in various cancers.

Int J Cancer, 58, 480-487

**3. Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland:** Krebs in Deutschland – Häufigkeiten und Trends, 4. Auflage, Saarbrücken, 2004

[www.rki.de](http://www.rki.de)

**4. Bading H., Rauterberg E.W. & Moelling K. (1989):** Distribution of c-myc, c-myb and ki67 antigens in interphase and mitotic human cells evidenced by immunofluorescence staining technique.

Exp Cell Res, 185, 50-59

**5. Baisch H. & Gerdes J. (1987):** Simultaneous staining of exponentially growing versus plateau phase cells with the proliferation-associated antibody Ki-67 and propidium iodide: analysis by flow cytometry.

Cell Tissue Kinet, 20, 387-391.

**6. Beck S.T., Leite O.M., Arruda R.S. & Ferreira A.W. (2005):** Combined use of Western blot/ELISA to improve the serological diagnosis of human tuberculosis.

Braz J Infect Dis. 2005 Feb; 9(1):35-43. Epub 2005 Jun 6

**7. Berchtold R. (2001):** Chirurgie - herausgegeben von Bruch H.P. & Trentz O., Kolon, Rektum und Anus von Woltmann A., Schiedeck T. & Bruch H.P.

4. Auflage Urban & Fischer, München + Jena

- 8. Biologie für Mediziner (1996):** herausgegeben von M. Hirsch-Kauffmann und M. Schweiger  
3. Auflage Georg Thieme Verlag Stuttgart + New York
- 9. Bloch D.B., Rabkina D. & Bloch K.D. (1995):** The cell proliferation-associated protein Ki-67 is a target of autoantibodies in the serum of MRL mice.  
Lab Inv, 73, 366-371
- 10. Böcker W., Höfler H., Denk H. & Heitz P.U. (1997):** Allgemeine Tumorpathologie.  
In: Böcker W., Denk H., Heitz P.U. : Pathologie.  
1. Auflage, 161-200, Urban & Schwarzenberg, München
- 11. Boyle P. & Ferlay J. (2005):** Cancer incidence and mortality in Europe, 2004.  
Ann Oncol. 2005 Mar, 16(3), 481-488
- 12. Bridger J.M., Kill I.R. & Lichter P. (1998):** Association of pKi-67 with satellite DNA of the human genome in early G<sub>1</sub> cells.  
Chromosome Res, 6, 13-24
- 13. Broll R., Duchrow M., Oevermann E., Wellm C., Schwandner O., Schimmelpenning H., Roblick U.J., Bruch H.P. & Windhoevl U. (2001):** p53 autoantibodies in sera of patients with a colorectal cancer and their association to p53 protein concentration and p53 immunohistochemistry in tumor tissue.  
Int J Colorectal Dis, 1, 22-27
- 14. Brown D.C. & Gatter K.C. (1990):** monoclonal antibody Ki-67 – its use in histopathology.  
Histopathology, 17, 489-503
- 15. Brown D.C. & Gatter K.C. (2002):** Ki-67 protein: the immaculate deception?  
Histopathology, 40, 2-11

- 16. Bruno S. & Darzynkiewicz Z. (1992):** Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells.  
Cell Prolif, 25, 31-40
- 17. Bruno S., Gorczyca, W., & Darzynkiewicz, Z. (1992):** Effect of ionic strength in immunocytochemical detection of the proliferation associated nuclear antigens p120, PCNA, and the protein reacting with Ki-67 antibody.  
Cytometry, 13, 496-501.
- 18. Buglioni S., D'Agnano I., Cosimelli M., D'Angelo C., Tedesco M., Zupi G. & Mottolise M. (1999):** Evaluation of multiple bio-pathological factors in colorectal adenocarcinomas: independent prognostic role of p53 and bcl-2.  
Int J Cancer, 84, 545-552
- 19. Chang C., Simmons D.T., Martin M.A. & Mora P.T. (1979):** Identification and partial characterization of new antigen from simian virus 40-transformed mouse cells.  
J Virol, 31, 463-467
- 20. Chang S.C., Lin J.K., Lin T.C. & Liang W.Y. (2005):** Genetic alteration of p53, but not overexpression of intramural p53 protein, or serum p53 antibody is a prognostic factor in sporadic colorectal adenocarcinomas.  
Int J Oncol, 1, 65-75
- 21. Crawford L.V., Pim D.C. & Lamb P. (1984):** The cellular protein p53 in human tumors.  
Mol Biol Med, 2, 261-272
- 22. Cunnigham D., Humblet Y., Siena S., Khayat D., Bleiberg H., Santoro A., Bets D., Mueser M., Harstrick A., Verslype C., Chau I. & Van Cutsem E. (2004):** Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecanrefractory metastatic colorectal cancer.  
N Engl J Med, 2004, Jul 22, 351(4), 337-345

- 23. Diehl F., Dressman D., He Y., Shen D., Szabo S., Diaz L.A. Jr., Goodmann S.N., David K.A., Juhl H., Kinzler K.W. & Vogelstein B. (2005):** Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors.  
Proc Natl Acad Sci USA. 2005 Nov 8; 102(45):16368-73
- 24. du Manoir S., Guillaud P., Camus E., Seigneurin D. & Brugal G. (1991):** Ki-67 labeling in postmitotic cells defines different Ki-67 pathways within the 2c compartment.  
Cytometry, 12, 455-463
- 25. Duchrow M. (2004):** Klonierung , Charakterisierung und Funktionsanalyse des proliferationsassoziierten Ki-67 Antigens.  
Kumulative Habilitationsschrift der Med. Universität zu Lübeck
- 26. Duchrow M., Gerdes J. & Schlüter C. (1994):** The proliferation-associated Ki-67 protein: definition in molecular terms.  
Cell Prolif, 27, 235-242
- 27. Duchrow M., Schlueter C. & Gerdes J. (1994):** Molekularbiologische Charakterisierung des proliferationsassoziierten Ki-67 Proteins.  
Focus MUL, 11, 219-225
- 28. Duchrow M., Schmidt M.H., Zingler M., Anemüller S., Bruch H.P. & Broll R. (2001):** Suppression of cell division by Pki-67 antisense-RNA and recombinant protein.  
Cell Physiol Biochem, 11, 331-338
- 29. Finlay C.A. & Hinds P.W. (1990):** the p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation.  
Cell, 57, 1083-1093
- 30. Flemming W. (1882):** Zellsubstanz, Kern- und Zellteilung.  
Vogel, Leipzig

- 31. Fonatsch C., Duchrow M., Rieder H., Schluter C. & Gerdes J. (1991):** Assignment of the human Ki-67 gene (MK167) to 10q25-qter.  
Genomics, 11, 476-477
- 32. Galle P.R. & Volkmann M. (1994):** p53 autoantibodies in malignant disease: Significance and clinical relevance.  
Klin Lab, 40, 1193-1197
- 33. Gautier T., Dauphin Villement C., Andre C., Masson C., Arnoultz J. & Hernandez Verdun D. (1992):** Identification and characterization of a new set of nucleolar ribonucleoproteins which line the chromosomes during mitosis.  
Exp Cell Res, 200, 5-15
- 34. Gerdes J., Lemke H., Baisch H., Wacker H.H., Schwab U. & Stein H. (1984):** Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67.  
J Immunol, 133, 1710-1715
- 35. Gerdes J., Li L., Schluter C., Duchrow M., Wohlenberg C., Gerlach C., Stahmer I., Kloth S., Brandt E. & Flad H.D. (1991):** Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67.  
Am J Pathol, 138, 867-873
- 36. Gerdes J., Schwab U., Lemke H. & Stein H. (1983):** Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation.  
Int J Cancer, 31, 13-20
- 37. Gerlach C., Kubbutat M., Schwab U., Key G., Flad H.D. & Gerdes J. (1998):** Proliferation-associated Ki-67 Protein is a target for autoantibodies in the human autoimmune disease systemic lupus erythemathosus.  
Lab Inv, 78, 129-131

- 38. Grundmann E. (1971):** Der mitotische Zellzyklus.  
Springer Verlag in: Altmann H.W., Büchner F., Cottier H., Grundmann E., Holle G., Letterer E., Masshof W., Meesen H., Roulet F., Seifert G. & Siebert G.: Handbuch der allgemeinen Pathologie II/2, Der Zellkern I; 282-479, Berlin, Heidelberg, New York.
- 39. Hammel P., Boissier B., Chaumette M.T., Piedboies P., Rotman N., Kouyoumdjian J.C., Lubin R., Delchier J.C. & Soussi T. (1997):** Detection and monitoring of serum p53 antibodies in patients with colorectal cancer.  
Gut, 40, 356-361
- 40. Hammel P. & Soussi T. (2000):** Serum p53 antibody assay: evaluation in colorectal cancer.  
Rev Med Interne, 2,167-73
- 41. Hermanek (1997):** TNM Atlas: illustrated guide to the TNM/pTNM classification of malignant tumors/ UICC, International Union against Cancer. Ed. by P. Hermanek  
Berlin, Heidelberg, New York : Springer Vela
- 42. Hind P.W. & Finlay C.A. (1990):** Mutant p53 DNA clones from human colon carcinoma cooperate with ras in transforming primary rat cells: a comparison of the hotspot mutant phenotypes.  
Cell growth & differ, 1, 571-580
- 43. Houbiers J.G.A., van der Burg S.H., Van der Watering L.M.G., Tollenaar R.A.E.M., Brand A., van der Velde C.J.H. & Melief C.J.M. (1995):** Antibodies against p53 are associated with poor prognosis of colorectal cancer.  
Brit. J Cancer, 72, 637-641
- 44. Howard A. & Pelc S.R. (1951):** Synthesis of nucleoprotein in bean root cells.  
Nature, 167, 560-569
- 45. Howard A. & Pelc S.R. (1953):** Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage.  
Heridity, Suppl.6, 261

**46. Hitchcock C.L. (1991):** Ki-67 staining as a means to simplify analysis of tumor cell proliferation [editorial].

Am J Clin Pathol, 96, 444-446

**47. Hurwitz H., Fehrenbacher L., Novotny W., Cartwright T., Hainsworth J., Heim W., Berlin J., Baron A., Griffing S., Holmgreen E., Ferrara N., Fyfe G., Rogers B., Ross R. & Kabbinavar F. (2004):** Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer.

N Engl J Med, 2004, Jun 3, 350(23), 2335-2342

**48. Ihmann T. (2004):** Vergleich der pKi-67 Protein- mit der pKi-67 mRNA- Expression mittels Immunhistologie und Realtime RT-PCR in kolorektalen Karzinomen.

Dissertationsschrift der Med. Universität zu Lübeck

**49. Institut für Krebs epidemiologie e.V.** an der Universität Schleswig Holstein Campus Lübeck, Krebsregister Schleswig-Holstein, Beckergrube 43-47

D-23552 Lübeck

**50. Kill I.R. (1996):** Localisation of the Ki-67 antigen within the nucleolus. Evidence for a fibrillin-deficient region of the dense fibrillar component.

J Cell Sci, 109, 1253-1263

**51. Kill I.R., Faragher R.G. Lawrence K. & Shall S. (1994):** The expression of proliferation dependent antigens during the lifespan of normal and progeroid human fibroblasts in culture.

J Cell Sci, 107, 571-579

**52. Krauss, G. (1997):** Biochemie der Regulation und Signaltransduktion.

WILEY-VCH: Weinheim.

**53. Laemmli, U.K. (1970):** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature, 227, 680-685

- 54. Levine A.J., Momand J. & Finlay C.A. (1991):** The p53 tumor suppressor gene.  
Nature, 351, 453-456
- 55. Linzer D.I. & Levine A.J. (1997):** Characterization of a 54 K dalton cellular SV 40 tumor antigen present in SV 40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells.  
Cell , 17, 43-72
- 56. Lopez F., Belloc F., Lacombe F., Dumain P., Reiffers J., Bernard P. & Boisseau M.R. (1994) :** The labelling of proliferating cells by Ki-67 and MIB- 1 antibodies depends on the binding of a nuclear protein to the DNA.  
Exp Cell Res, 210, 145-153
- 57. MacCallum D.E. & Hall P.A. (1999):** Biochemical characterization of the pKi-67 with the identification of a mitotic-specific form associated with hyperphosphorylation and altered DNA binding.  
Exp Cell Res, 525, 186-188
- 58. McCormick D., Yu C., Hobbs C. & Hall P.A. (1993):** The relevance of antibody concentration to the immunohistological quantification of cell proliferation-associated antigens.  
Histopathology, 22, 543-547
- 59. Miller C., Mohandas T., Wolf D., Prokocimer M., Rotter V. & Koeffler H.P. (1986):** Human p53 gene localized to short arm of chromosome 17.  
Nature, 319, 783-784
- 60. Montenarh M. (1998):** Das Wachstumssuppressorprotein p53 – von der Grundlagenforschung bis zur klinischen Anwendung.  
Magazin Forschung 1/1998, 43-48
- 61. Montenarh M. (2000):** Autoantikörper in der klinischen Diagnostik.  
Deut. Med. Wochenschrift 125, 31/32, 941-943

**62. Muro Y., Kano T., Sugiura K. & Hagiwara M. (1997):** Low frequency of autoantibodies against Ki-67 antigen in Japanese patients with systemic autoimmune diseases.

J Autoimm, 10, 499-503

**63. Nanashima A., Yamaguchi H., Shibasaki S., Sawai T., Yasutake T., Tsuji T., Nakagoe T. & Ayabe H. (1999):** Proliferation of hepatic metastases of colorectal carcinoma: relationship to primary tumors and prognosis after hepatic resection.

J Gastroenterol Hepatol, 14, 61-66

**64. Palmquist R., Sellberg P., Öberg A., Tavelin B., Rutegard J.N. & Stenling R. (1999):** low tumor cell proliferation at the invasive margin is associated with a poor prognosis in Dukes' stage B colorectal cancers.

Brit J Cancer, 79, 577-581

**65. Pardee A.B. (1989):** G<sub>1</sub> events and regulation of the cell proliferation.

Science, 246, 603-608

**66. Plaat B., Kole A., Mastik M., Hoekstra H., Molenaar W. & Vaalburg W. (1999):** Protein synthesis rate measured with L-[1-<sup>11</sup>C]tyrosine positron emission tomography correlates with mitotic activity and MIB-1 antibody-detected proliferation in human soft tissue sarcomas.

Eur J Nucl Med, 26, 328-332

**67. Ross W. & Hall P.A. (1995):** Ki-67: from antibody to molecule to understanding?

J Clin Pathol: Mol Pathol, 48, M113-M117

**68. Saleh J., Kreissler-Haag D. & Montenarh M. (2000):** p53 autoantibodies from patients with colorectal cancer recognize common epitopes in the N- or C-terminus of p53.

Int J Oncol. 2004 Oct; 25, 1149-55

**69. Sasaki K., Murakami T., Kawasaki M. & Takahashi M. (1987):** The cell cycle associated change of the Ki-67 reactive nuclear antigen expression.

J Cell Physiol, 133, 579-584

**70. Sawhney N. & Hall P.A. (1992):** Ki-67 structure, function, and new antibodies [editorial].

J Pathol, 168, 161-162

**71. Scheithauer W., McKendrick J., Begbie S., Borner M., Burns WI., Burris HA., Cassidy J., Jodrell D., Koralewski P., Levine EL., Marschner N., Maroun J., Garcia-Alfonso P., Tujakowski J., Van Hazel G., Wong A., Zaluski J., Twelves C. & X-ACT Study Group (2003):** Oral capecitabine as an alternative to i.v. fluorouracil-based adjuvant therapy for colon cancer: safety results of a randomised, phase III trial.

Ann Oncol, 2003, Dec, 14(12), 1735-1743

**72. Schluter C., Duchrow M., Wohlenberg C., Becker M.H., Key G., Flad H.D. & Gerdes J. (1993):** The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins.

J Cell Biol, 123, 513-522

**73. Schmidt M. (2001):** Funktionsanalyse des Proliferationsmarkers pKi-67.

Dissertationsschrift der Med. Universität zu Lübeck

**74. Schmidt M.H., Broll R., Bruch H.P., Bögl O. & Duchrow M. (2003):** The proliferation marker pKi-67 organizes the nucleolus during the cell cycle depending on Ran and cyclin B.

J Pathol, 199

**75. Scholzen T. & Gerdes J. (2000):** The Ki-67 protein: from the known and the unknown.

J Cell Physiol, 182, 311-322

**76. Shi S.R., Cote R.J., Hawes D., Thu S., Shi Y., Young L.L. & Taylor C.R. (1999):** Calcium-induced modification of protein conformation demonstrated by immunohistochemistry: What is the signal?

J Histochem Cytochem, 47, 463-470

**77. Shiota G., Ishida M., Noguchi N., Oyama K., Takano Y., Okuobo M., Katayama S., Tomie Y., Harada K., Hori K., Ashida K., Kishimoto Y., Hosada A., suou T., Kanbe T., Tanaka K., Nosaka K., Tanida O., Kojo H., Miura K., Ito H., Kaibara N. & Kawasaki H. (2000):** Circulating p53 antibody in patients with colorectal cancer: relation to clinicopathologic features and survival.  
Dig Dis Sci, 1, 122-128

**78. Sobin L., Wittekind C. (1997):** TNM Classification of malignant tumors. New York-Chichester-Weinheim-Brisbane-Singapore-Toronto-Wiley.

**79. Takeda A., Shimada H., Nakajima K., Imaseki H., Okazumi S., Takayama W., Iwasaki K., Makino H., Natsume T., Kouno T., Kondo S., Suzuki T., Ochiai T. & Isono K. (2000):** Clinical significance of serum p53 antibody detection in a chemosensitivity assay in cases of human colorectal cancer.  
Gan To Kagaku Ryoho, 6,879-883

**80. Takeda A., Shimada H., Nakajima K., Imaseki H., Suzuki T., Asano T., Ochiai T. & Isono K. (2001a):** Monitoring of p53 autoantibodies after resection of colorectal cancer: relationship to operative curability.  
Eur J Surg, 1, 50-53

**81. Takeda A., Shimada H., Nakajima K., Imaseki H., Suzuki T., Asano T., Ochiai T. & Isono K. (2001b):** Serum p53 antibody as a useful marker for monitoring of treatment of superficial colorectal adenocarcinoma after endoscopic resection.  
Int J Clin Oncol, 1, 45-49

**82. Tan M.I., Strunck E., Scholzen T., Gerdes J. & Vollmer G. (1999):** Extracellular matrix regulates steady-state mRNA levels of the proliferation associated protein Ki-67 in endometrial cancer cells.  
Cancer Lott, 110, 145-152

- 83. Tang R., Ko M.C., Wang J.Y., Changchien C.R., Chen H.H., Chen J.S. Hsu K.C., Chiang J.M. & Hsieh L.L. (2001):** Humoral response to p53 in human colorectal tumors: a prospective study of 1209 patients.  
Int J Cancer, 6, 859-863
- 84. Traverso G., Shuber A., Levin B., Johnson C., Olsson L., Schoetz D.J. Jr., Hamilton S.R., Boynton L., Kinzler K.W. & Vogelstein B. (2002) :** Detection of APC mutations in fecal DNA from patients with colorectal tumors.  
N Engl J Med. 2002 Jun 13;346(24)1912-3.
- 85. van Dierendonck J.H., Keijzer R., van de Velde C.J. & Cornelisse C.J. (1989):** Nuclear distribution of the Ki-67 antigen during the cell cycle: comparison with growth fraction in human breast cancer cells.  
Cancer Res, 49, 2999-3006
- 86. Verheijen R., Kuijpers H.J., Schlingemann R.O., Boehmer A.L., van Driel R., Brakenhof G.J. & Ramaekers F.C. (1989):** Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation related antigen. I. Intracellular localization during interphase.  
J Cell Sci, 92, 123-130
- 87. Verheijen R., Kuijpers H.J., van Driel R., Beck J.L., van Dierendonck J.H., van Dierendonck J.H., Brakenhoff G.J. & Ramaekers F.C. (1989):** Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation related antigen. II. Localization in mitotic cells and association with chromosomes.  
J Cell Sci, 107, 571-579
- 88. Vogelstein B. & Kinzler K.W. (1993):** The multistep nature of cancer.  
Trends Genet, 4,138-141
- 89. Wang Y.D., Li Y., Xu G.B, Dong X.Y., Yang X.A., Feng Z.R., Tian C. & Chen WF. (2004):** Detection of antibodies against SARS-CoV in serum from SARS-infected donors with ELISA and Western blot.  
Clin Immunol. 2004 Nov;113(2):145-50

**90. Weigmann F. (1998):** p53-Autoantikörper im Serum bei Patienten mit Magen-, Pankreas- und Ösophaguskarzinom.

Dissertationsschrift an Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

**91. Willsher P.C., Pinder S.E., Robertson L., Nicholson R.I., Ellis I.O., Bell J.A., Blamey R.W., Green J.A. & Robertson J.F.R. (1996):** The significance of p53 autoantibodies in the serum of patients with breast cancer.

Anticancer Res, 16, 927-930

**92. Ziemann T. (2003):** Nachweis der Ki-67 mRNA und Protein Expression durch *in situ* Hybridisierung und Immunhistochemie beim kolorektalen Karzinom.

Dissertationsschrift der Med. Universität zu Lübeck

## 7) Anhang

### 7.1) Klassifizierung und Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms

Im Wesentlichen erfolgt die Klassifizierung des Kolonkarzinoms nach histomorphologischen Kriterien. Dabei unterscheidet man vor allem zwischen dem Adenokarzinom mit einer Häufigkeit von 85%, dem muzinösen Adenokarzinom, dem Siegelringkarzinom und dem undifferenziertem Karzinom. Selten kommen Plattenepithelkarzinome, adenosquamöse Karzinome sowie Lymphome vor.

Das kolorektale Karzinom wird nach Dukes, orientierend an Infiltrationsgrad und Metastasierung des Tumors, in 4 Stadien eingeteilt.:

- Dukes A: Tumorwachstum auf Mukosa und Submukosa beschränkt
- Dukes B: Tumorwachstum in allen Darmwandschichten, keine Lymphknotenmetastasen
- Dukes C: Lymphknotenmetastasen, unabhängig vom Infiltrationsgrad des Primärtumors
- Dukes D: Fernmetastasen, unabhängig vom Infiltrationsgrad des Primärtumors und des Lymphknotenbefalls.

Dieser in den USA gebräuchlichen Einteilung gegenüber hat sich das TNM-System durchgesetzt in weiten Teilen der Welt durchgesetzt.

**UICC-Stadien I bis IV und TNM-Klassifizierung:** Diese Stadieneinteilung stammt von der "Union Internationale Contre le Cancer" (UICC, Internationale Union gegen Krebs, 1997). Sie ist heute die gebräuchlichste, modernste und klarste Einteilung. Jedes Stadium wird mit der TNM-Klassifizierung genau beschrieben. Die beiden verschiedenen Systeme der Klassifizierung sind in Tabelle 2 (siehe 1.6.2 Prognose) gegenübergestellt.

## **TNM – Klinische Klassifikation: (UICC Ausgabe 1997) (Sobin et al. 1997)**

- T – Primärtumor
- T<sub>x</sub> Primärtumor kann nicht beurteilt werden
- T<sub>0</sub> Kein Anhalt für Primärtumor.
- T<sub>is</sub> Karzinoma *in situ*
- T<sub>1</sub> Tumor infiltrierte Submukosa
- T<sub>2</sub> Tumor infiltrierte Muscularis propria
- T<sub>3</sub> Tumor infiltrierte durch die Muscularis propria in die Subserosa oder in nichtperitonealisiertes oder perirectales Gewebe
- T<sub>4</sub> Tumor perforiert das viscerale Peritoneum oder infiltrierte direkt in andere Organe oder Strukturen
- 
- N – Regionäre Lymphknoten
- N<sub>x</sub> Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
- N<sub>0</sub> Keine regionären Lymphknotenmetastasen
- N<sub>1</sub> Metastasen in 1 – 3 Lymphknoten
- N<sub>2</sub> Metastasen in 4 oder mehr Lymphknoten
- 
- M – Fernmetastasen
- M<sub>x</sub> Das Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
- M<sub>0</sub> Keine Fernmetastasen
- M<sub>1</sub> Fernmetastasen

## **G – Histopathologischer Tumorgrad**

- G<sub>x</sub> Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden
- G<sub>1</sub> Gut differenziert
- G<sub>2</sub> Mäßig differenziert
- G<sub>3</sub> Schlecht differenziert
- G<sub>4</sub> Undifferenziert

Die Risikoeinschätzung orientiert sich an der Stadieneinteilung, die auf klinischen und histopathologischen Parametern beruht. Jedoch wird unter Umständen dadurch den individuellen tumorbiologischen Eigenschaften nicht genügend Rechnung getragen. Vor diesem Hintergrund wäre es wünschenswert, über das morphologische Erscheinungsbild hinaus weitere objektive Kriterien zur Verfügung zu haben, mit deren Hilfe Aussagen über Dignität und Prognose getroffen werden könnten.

Dukes	TNM	Befall	5-Jahresüberleben
A	T1N0M0	Krebs geht nicht über die Mukosa und Submukosa hinaus	> 90%
B1	T2N0M0	Krebszellen infiltrieren auch die Muscularis	ca 85%
B2	T3N0M0	Krebszellen erreichen und infiltrieren die Serosa	70-80%
C	TxN1M0	Regionale Lymphknoten befallen	35-65%
D	TxNxM1	Organmetastasen (meist Leber)	ca 5%

**Tabelle 17:** 5 -Jahreüberlebensrate für das kolorektale Karzinom. (Quelle: Hermanek et al. SGK RK 1997)

7.2) **Angaben über Stadienhäufigkeiten des kolorektalen Karzinoms für das Bundesland Schleswig-Holstein im Zeitraum von 1998 - 2005**

Kategorie	Angaben für Schleswig-Holstein 1998-2005
<b>Tumorgrad</b>	
1	6,8%
2	58,70%
3	18,20%
4	0,50%
x = keine Angaben	15,80%
<b>T Kategorie</b>	
1	9,60%
2	14,70%
3	48,10%
4	17,00%
Is	0%
x = keine Angaben	10,50%
<b>N Kategorie</b>	44,20%
0	20,60%
1	19,20%
2	16,00%
x = keine Angaben	
<b>M Kategorie</b>	45,20%
0	17%
1	37,80%
x = keine Angaben	
<b>UICC Stadium</b>	0%
0	11,40%
1	15,90%
2	17,40%
3	17,20%
4	38,10%
x = k. Angaben	

### 7.3) Chemikalien und Antikörper

CHEMIKALIE	FIRMA	ORT	LAND
2-Mercaptoethanol	SIGMA	Steinheim	D
Acrylamidlösung 29:1	BIO-RAD	München	D
Ammoniumpersulfat	Aldrich	Steinheim	D
Bromphenolblau	Aldrich	Steinheim	D
BSA	Roche	Mannheim	D
Complete®protease inhibitor cocktail tablets	Roche	Mannheim	D
EDTA	Merck	Darmstadt	D
EGTA	Sigma	Steinheim	D
Glycerin	Apotheke MUSH Campus Lübeck		
Hepes	Sigma	Steinheim	D
Kaliumhydrogenphosphat	Merck	Darmstadt	D
Lauryl Sulfat	SIGMA	Steinheim	D
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	MERCK	Darmstadt	D
Mercaptoethanol	Sigma	Steinheim	D
Methanol	Apotheke MUSH Campus Lübeck		
Natrimkarbonat	MERCK	Darmstadt	D
Natriumchlorid	MERCK	Darmstadt	D
Natriumhydrogenphosphat	Merck	Darmstadt	D
NBT/BCIP Stock Solution	Roche	Mannheim	D
PBS	GibcoBRL	Eggenstein	D
Saccharose	SERVA	Heidelberg	D
Salzsäure 2M	MERCK	Darmstadt	D
SDS	Sigma	Steinheim	D

<b>Chemikalie</b>	<b>Firma</b>	<b>Ort</b>	<b>Land</b>
TEMED	GibcoBRL	Eggenstein	D
Triton X-100	SIGMA	Steinheim	
Trizma® Base	SIGMA	Steinheim	D
Tween®20	MERCK	Darmstadt	D

<b>Antikörper</b>	<b>Firma</b>	<b>Ort</b>	<b>Land</b>	<b>Verdünnung</b>
MIB- 1 Monoclonal mouse anti-human	DakoCytomation	Glostrup	Dänemark	1:2000
p53 monoklonal anti-human	Oncogene, Bayer Health Care	Cambridge	USA	1:2000
IgG goat anti mouse - AP conjugated	Sigma	Steinheim	D	1:5000
IgG rabbit anti-human - AP conjugated	DakoCytomation	Glostrup	Dänemark	1:5000

## 7.4) Puffer und Lösungen

- Acrylamid-Lösung (30% T, 3,3% C)

Es wird die Acrylamid-Lösung 29:1 der Firma BIO-RAD verwendet.

- Ammoniumpersulfat-Lösung (10%)

1 g Ammoniumpersulfat in 10 ml bidestilliertem Wasser lösen.

- Alkalische Phosphatase Puffer (0,1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0,01 M  $\text{MgCl}_2$ )

4,2 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  und  
1.015 g  $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$

in 400 ml bidestilliertem Wasser lösen, mit HCl auf pH 9,6 einstellen und auf 500 ml auffüllen.

- Blockierlösung (3% BSA, 5% FKS)

3 g Bovines Serum Albumin  
5 ml Fötale Kälberserum (Firma Biodrome)

in 100 ml TBST 0,5% lösen.

- 10 x Blotting Puffer (25 mM Tris Base, 192 mM Glycin)

30.3 g Tris Base  
144 g Glycin

in 900 ml bidestilliertem Wasser lösen, mit HCl auf pH 8,3 einstellen und auf 1000 ml auffüllen.

- Bromphenol Blau-Lösung (0,5%)

0,5 g            Bromphenol Beau

in 10 ml bidestilliertem Wasser lösen

- DMEM 450ml mit L-Glutamin

50 ml FKS inaktiviert

5 ml Penicillin/Streptomycin

5 ml Glucose

3 ml Hepes

- Extraktionspuffer I (10 mM HEPES, 100 mM NaCl, 300 mM Saccharose, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 0,5% Triton X-100)

1,3 g            HEPES

2,92 g          NaCl

51,35 g        Saccharose

0,23 g          EGTA

0.19 g         EDTA

2,5 ml          Triton X-100

in 500 ml bidestilliertem Wasser lösen. Vor Verwendung noch 1 Tablette Complete® auf 50 ml Puffer lösen.

- Extraktionspuffer II (10 mM HEPES, 150 mM Ammoniumsulfat, 300 mM Saccharose, 1 mM EGTA , 1 mM EDTA, 0,5% Triton X-100)

1,3 g	HEPES
9,91 g	Ammoniumsulfat
51,35 g	Saccharose
0,23 g	EGTA
0.19 g	EDTA
2,5 ml	Triton X-100

in 500 ml bidestilliertem Wasser lösen. Vor Verwendung noch 1 Tablette Complete® auf 50 ml Puffer lösen.

- Lämmli Probenpuffer (62,5 mM Tris Base, 2% SDS, 5% DTT, 0,01% Bromphenol Blau)

3,55 ml	bidestilliertes Wasser
1,25 ml	Sammelgelpuffer
2,5 ml	Glycerin (87%)
2 ml	10%ige SDS-Lösung
0,2 ml	0,5%ige Bromphenol Blau-Lösung
0,5 ml	$\beta$ -Mercaptoethanol

mischen und  $\beta$ -Mercaptoethanol erst kurz vor der Verwendung zusetzen. Die Probe wird 2:1 mit der Probe versetzt.

- 10 x Laufpuffer (25 mM Tris Base, 192 mM Glycin, 0,1% SDS)

30,3 g	Tris Base
144 g	Glycin
10 g	SDS

in 1000 ml bidestilliertem Wasser lösen.

- Phosphat Buffered Saline PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

8,2 g	NaCl
0,2 g	KCl
1,42 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
0,24 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

in 900 ml bidestilliertem Wasser lösen, mit HCl auf pH 7,4 einstellen und auf 1000 ml auffüllen.

- RPMI-1640 450ml

50 ml FKS inaktiviert  
5 ml L-Glutamin  
5 ml Penicillin/Streptomycin  
5 ml Glucose  
3 ml Hepes

- Sammelgelpuffer (0,5 M Tris Base)

6 g	Tris Base
-----	-----------

in 90 ml bidestilliertem Wasser lösen, mit HCl auf pH 6,8 einstellen und auf 100 ml auffüllen.

- SDS-Lösung (10%)

10 g	SDS
------	-----

in 100 ml bidestilliertem Wasser auflösen.

- TBS (50 mM Tris Base, 150 mM NaCl)

6 g            Tris Base

8,8 g         NaCl

in 900 ml bidestilliertem Wasser lösen, mit HCl auf pH 7,4 einstellen und auf 1000 ml auffüllen.

- TBST 0,1 % (50 mM Tris Base, 150 mM NaCl, 0,1% Tween®20)

6 g            Tris Base

8,8 g         NaCl

1 ml          Tween®20

in 900 ml bidestilliertem Wasser lösen, mit HCl auf pH 7,4 einstellen und auf 1000 ml auffüllen.

- TBST 0,5 % (50 mM Tris Base, 150 mM NaCl, 0,5% Tween®20)

6 g            Tris Base

8,8 g         NaCl

5 ml          Tween®20

in 900 ml bidestilliertem Wasser lösen, mit HCl auf pH 7,4 einstellen und auf 1000 ml auffüllen.

- Trenngelpuffer (1,5 M Tris Base)

27,23 g       Tris Base

in 140 ml bidestilliertem Wasser lösen, mit HCl auf pH 8,8 einstellen und auf 150 ml auffüllen.

- Triton X-Lösung

250 µl      Triton X-100

in 100 ml Waschpulver lösen.

<b>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)</b>	<b>powder (mg/L)</b>
<b>Inorganic Salts</b>	
CaCl <sub>2</sub> (anhyd.)	200.00
Fe(NO <sub>3</sub> ) 9H <sub>2</sub> O	0.10
KCl	400.00
MgSO <sub>4</sub> (anhyd.)	97.67
NaCl	6400.00
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	125.00
<b>Other Components</b>	
D-Glucose	4500.00
Phenol Red	15.00
Sodium Pyruvate	110.00
<b>Amino Acids</b>	
L-Arginine HCl	84.00
L-Cystine 2HCl	63.00
L-Glutamine	584.00
Glycine	30.00
L-Histidine HCl H <sub>2</sub> O	42.00
L-Isoleucine	105.00
L-Leucine	105.00
L-Lysine HCl	146.00
L-Methionine	30.00
L-Phenylalanine	66.00
L-Serine	42.00
L-Threonine	95.00
L-Tryptophan	16.00
L-Tyrosine 2Na 2H <sub>2</sub> O	104.33
L-Valine	94.00
<b>Vitamins</b>	
D-Ca pantothenate	4.00
Choline Chloride	4.00
Folic Acid	4.00
i-Inositol	7.20
Niacinamide	4.00
Riboflavin	0.40
Thiamine HCl	4.00

Quelle: [www.cellbank.snu.ac.kr](http://www.cellbank.snu.ac.kr)

**RPMI ( Roswell Park Memorial Institute )**

<b>Composants</b>	RPMI 1629 mg / l	RPMI 1630 mg / l	RPMI 1634 mg / l	<b>RPMI 1640</b> Le plus utilise mg/l
<b>Acides Amines</b>	--			
L-Ala				
L-Arg ( base libre )	13,4			--
	42,1 (HCl)			200
L-Asp				
Acide L-Aspartic	45,0			50
L-Cysteine	19,9			20
L-Cystine	31,5			--
Ac.L-Glutamique	--			50
L-Glu	22,1			20
Glutathion ( reduit )	219,2			300
Gly	0,5			1
L-His	7,5			10
	20,9 ( HCl, H2O )			15
L-Hydroxyproline				
L-ILeu	19,7			20
L-Leu	39,3			50
L-Lys, HCl	39,3			50
L-Met	36,5			40
L-Phe	14,9			15
L-Pro	16,5			15
L-Ser	17,3			20
L-Thr	26,3			20
L-Try	17,9			20
L-Tyr	3,1			0,5
L-Val	18,1			20
	17,6			20
<b>Vitamines</b>	--			--
Acide ascorbique				--
Biotine	0,5			--
Vitamine B12	0,2			0,2
D-Pantothenate, Ca	2,0			0,005
Choline,Cl	0,2			0,25
Acide folic	5,0			3
i-Inositol	10,0			1
Niacin	36,0			35
Nicotinamide	0,5			--
Ac. Para	0,5			1
Aminobenzoique				
Piridoxal, HCl	1,0			1
Pyridoxine, HCl	0,5			--
Riboflavine	0,5			1
Thiamine, HCl	0,2			1
	0,2			0,2
Bactopeptone				---
	600,0			

**Einverständniserklärung**

des Patienten/der Patientin

Name, Vorname

geb.

zur Teilnahme an der Studie

***Nachweis von Autoantikörpern im Serum von Patienten mit  
gastrointestinalen Tumoren.***

Ich bin einverstanden, an der o.g. Studie teilzunehmen. Ich wurde von dem zuständigen Arzt \_\_\_\_\_ mündlich und schriftlich über Wesen, Bedeutung und Tragweite dieser Untersuchung in verständlicher Form aufgeklärt, konnte Fragen stellen und stand nicht unter Zeitdruck. Ich weiß, daß ich diese Erklärung jederzeit und ohne Angabe von Gründen oder Nachteilen für mich widerrufen kann.

Ich stimme ferner zu, daß meine Krankenakte mit meinen Studiendaten verglichen werden kann, sowie die Untersuchungsdaten gespeichert und zu wissenschaftlichen Zwecken verarbeitet werden können, wobei die Vertraulichkeit der Daten dabei gewahrt bleibt.

Lübeck, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Unterschrift des Patienten

Lübeck, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Unterschrift des aufklärenden Arztes

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT LÜBECK  
Klinik für Chirurgie

Serum-Auto-AK bei gastrointestinalen Tumoren

**PATIENT** Lfd. Patientenummer: \_\_\_\_\_

Name: \_\_\_\_\_ Vorname: \_\_\_\_\_

Anschrift: \_\_\_\_\_

Telefon: \_\_\_\_\_ Geburtsdatum: \_\_\_\_\_.\_\_\_\_\_.\_\_\_\_\_

Geschlecht: 1  männlich 2  weiblich Station: \_\_\_\_\_

Aufnahmedatum: \_\_\_\_\_.\_\_\_\_\_.\_\_\_\_\_ Entlassungsdatum: \_\_\_\_\_.\_\_\_\_\_.\_\_\_\_\_

---

**HAUSARZT**

Name: \_\_\_\_\_

Anschrift: \_\_\_\_\_

---

Diagnose \_\_\_\_\_ ICD \_\_\_\_\_

Wuchsform  polypös  ulzerierend  sonstige

Histologie \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Grading \_\_\_\_\_

Klassifikation p T\_\_ N\_\_ M\_\_ Tumorstadium \_\_

Fernmetastasenlokalisierung \_\_\_\_\_

infiltrierte Organe \_\_\_\_\_

Laurén-Klassifikation  intestinal  diffus  Mischtyp

---

**Therapie**

OP-Datum \_\_\_\_\_.\_\_\_\_\_.\_\_\_\_\_

Operation \_\_\_\_\_

Radikalität  O R 0  1 O R 1  2 O R 2

andere Therapie  O nein  1 O ja

Chemo  O nein  1 O ja

Radio  O nein  1 O ja

sonstige  O nein  1 O ja \_\_\_\_\_

---



## 8) Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Michael Duchrow für die Vergabe des Dissertationsthemas sowie für die hervorragende Betreuung der Arbeit, die ohne die hilfreichen Ideen und Lösungsvorschläge seinerseits nie so schnell zustande gekommen wäre.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. R. Broll und Herrn Prof. Dr. med. H-P. Bruch für die Bereitstellung aller erforderlichen Mittel und Räumlichkeiten.

Ein besonderer Dank gilt den Mitarbeiterinnen des chirurgischen Forschungslabors Frau Elke Gheribi, Frau Gisela Grosser-Pape, Frau Vera Grobleben-Lembke, Frau Annemarie Aumüller und besonders Frau Regina Kaatz.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Claudia Killaitis für die prompte Unterstützung bei allen statistischen Problemen.

Ich bedanke mich bei Herrn Priv.-Doz.Dr.med.Dr.h.c. Peter Sterk für die unkomplizierte und schnelle Übernahme der Dissertation nach dem traurigen Ereignis des frühzeitigen Todes meines Doktorvaters.

Der größte Dank gilt natürlich meinen Eltern, die mich die ganze Zeit mit voller Kraft unterstützt und im notwendigen Moment angetrieben haben.

Und Dich, Theresa, hab ich nicht vergessen, sondern nur bis zum Schluss aufgehoben. Denn ohne Dich hätte es nie und nimmer diese Arbeit gegeben. Danke für all die Lebensfreude und einen Schuss Disziplin... .

Aus aktuellem Anlass ein Riesendank an Thomas, der alle Daten vom „gestorbenen“ Computer rettete.

Eigentlich sollte diese Arbeit meiner Oma gewidmet werden, deren ständiger Optimismus mich schon als Kind beeindruckte. Nun wünsche ich Ihr weitehin Kraft im Kampf gegen ihre Krankheit.

Der Witwe und den drei verbliebenen Söhnen meines verstorbenen Doktorvaters Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Michael Duchrow wünsche ich Kraft für das weitere Leben.

## 9) Curriculum vitae

- Persönliche Daten: Christian Hagen Ziems  
geboren am 28.04.1979 in Dresden  
ledig
- Wohnanschrift: Walderseestrasse 33  
23566, Lübeck
- Schulbildung: 1985-1992 115. Oberschule „Michael Scholochow“  
Rathener Strasse 80, Dresden  
1992-1997 Marie-Curie-Gymnasium  
Zirkusstrasse 7, Dresden  
1997 Abitur
- Wehrpflicht: 1997- 1998 Zivildienst im Krankenhaus Dresden Friedrichstadt  
Friedrichstrasse 41, Dresden
- Hochschulbildung: 1998-2001 Studium der Humanmedizin an der medizinischen  
Fakultät „Carl Gustav Carus“ der technischen  
Universität Dresden  
2001 Ärztliche Vorprüfung  
2001 Studium der Humanmedizin an der Universität  
Schleswig-Holstein, Campus Lübeck  
2002 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
2005 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
2005 Beginn des Praktischen Jahres an dem Universitäts-  
klinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck  
2006 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- Promotionsbeginn: 2003 Klinik für Chirurgie, chirurgisches Forschungslabor  
des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein,  
Campus Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. med. Hans-Peter Bruch

**10) Eigenständigkeitserklärung:**

Hiermit versichere ich, Christian Hagen Ziems, an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift mit dem Titel: „Untersuchung zur Bildung von pKi-67 Autoantikörpern beim kolorektalen Karzinom“ selbständig verfasst habe und die Literaturquellen vollständig angegeben sind.

Als Hilfsmittel bei der Durchführung der Studie und Verfassung der Schrift dienten mir die darin angegebenen Materialien und Geräte.

.....  
Christian Hagen Ziems