

**Aus der Klinik für Chirurgie  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. H.-P. Bruch**

---

**Die Bedeutung der Expression der  
Mitogen-aktivierten Proteinkinase Kinase 4  
in Lebermetastasen kolorektaler Karzinome**

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

vorgelegt von  
Katja Oberhagemann  
aus Hamburg

Lübeck 2008

- |                      |                                 |
|----------------------|---------------------------------|
| 1. Berichterstatter: | Priv.- Doz. Dr. med. Lutz Mirow |
| 2. Berichterstatter: | Prof. Dr. med. Diether Ludwig   |

Tag der mündlichen Prüfung:	19.05.2009
-----------------------------	------------

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den	19.05.2009
----------------------------------	------------

Gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach  
- Dekan der Medizinischen Fakultät -

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Das kolorektale Karzinom	1
1.2 Die Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase 4	6
1.3 Zielsetzung der Arbeit	11
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>13</b>
2.1 Material	13
2.1.1 Patientenkollektiv	13
2.1.2 Gewinnung und Aufarbeitung der Proben	15
2.2 Methoden	17
2.2.1 Polymerase-Ketten-Reaktion	17
2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese	21
2.2.3 Immunhistochemie	22
2.3 Statistische Methoden	25
2.4 Methodenfindung	25
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>27</b>
3.1 Patientenkollektiv	27
3.2 Polymerase-Ketten-Reaktion	30
3.3 Immunhistochemie	33
3.4 Gesamtergebnisse	35
<b>4. Diskussion</b>	<b>37</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>48</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>49</b>
<b>7. Anhang</b>	<b>57</b>
7.1 Materialliste	57
7.2 Lösungen und Gemische	59
7.3 MKK4-Gensequenz	60
<b>8. Danksagung</b>	<b>61</b>
<b>9. Lebenslauf</b>	<b>62</b>

## Abkürzungsverzeichnis

µl	:	Mikroliter, 10 <sup>-6</sup> Liter
Abb	:	Abbildung
AEC	:	3-Amino-9-Ethylcarbazol
al	:	Alumni
ATF	:	Activating transcription factor; Transkriptionsfaktor
bzw	:	Beziehungsweise
C	:	Celsius
cDNA	:	Complementary DNA; komplementäre Desoxyribonukleinsäure
c-Jun	:	Transkriptionsfaktor
D	:	Deutschland
DK	:	Dänemark
DMSO	:	Dimethylsulfoxid
DNA	:	Desoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure
dNTP	:	Desoxyribonukleosid Triphosphat
E	:	Extinktion
EDTA	:	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	:	Extracellular Signal-regulierte Proteinkinase
G	:	Grading, Differenzierung
g	:	Gramm
g	:	Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
GeneID	:	Genetische Identifikation
h	:	Stunde
HE	:	Hämatoxylin-Eosin
HeLa	:	Helga-Lange-Zellen
HNPCC	:	Hereditary non-polyposis colorectal cancer; hereditäre nicht-polypöse kolorektale Karzinome
J	:	Jahre
JNK	:	c-Jun-amino-terminale Kinase
JNKK	:	c-Jun-amino-terminale Kinase Kinase
M	:	Molar

mA	:	Milliampere, $10^{-3}$ Ampere
MAP	:	Mitogen-aktiviertes Protein
MEK4	:	Synonym für MKK4; MAPK/ERK- Kinase 4
mg	:	Milligramm, $10^{-3}$ Gramm
MKK4	:	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase 4
min	:	Minute
ml	:	Milliliter, $10^{-3}$ Liter
mM	:	Millimolar, $10^{-3}$ molar
mMol	:	Millimol, $10^{-6}$ Mol
Mon	:	Monate
mRNA	:	Messenger-Ribonukleinsäure
n	:	Numerus; Anzahl
nm	:	Nanometer, $10^{-9}$ Meter
o.a.	:	Oben angegeben
PCR	:	Polymerase Chain Reaction; Polymerase-Ketten-Reaktion
pH	:	Pondus hydrogenii; Wasserstoffionenkonzentration
pTNM	:	Pathologische TNM-Einteilung
R0	:	Resektion im Gesunden
RNA	:	Ribonukleinsäure
RT	:	Reverse Transkriptase
s	:	Standardabweichung
SAPK	:	Stressaktivierte Proteinkinase
SCID	:	Severe combined immunodeficiency; schwere kombinierte Immundefizienz
SEK1	:	SAPK/ ERK Kinase 1
S (t)	:	Überlebensrate
Tab	:	Tabelle
TAE	:	Tris-Acetat-EDTA
TNF- $\alpha$	:	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TNM	:	Tumor, Nodulus, Metastasis; Klassifikation solider Tumore
UICC	:	Unio internationalis contra cancrum; International Union Against Cancer
UV	:	Ultraviolett
V	:	Volt

v/ v	:	Volumen/ Volumen
Vol	:	Volumen
WHO	:	World Health Organisation; Weltgesundheitsorganisation
w/ v	:	Gewicht/ Volumen
y	:	Years; Jahre
z. B.	:	Zum Beispiel

## **1. Einleitung**

### **1.1 Das kolorektale Karzinom**

#### Epidemiologie

Maligne Tumore im Bereich des Kolons und des Rektums zählen in den westlichen Industrieländern zu den häufigsten Krebserkrankungen. In Deutschland bilden sie mit einer Inzidenz von 70.000 Neuerkrankungen pro Jahr einen Anteil von etwa 16 % an allen malignen Tumorleiden. Kolorektale Karzinome stehen damit an zweiter Stelle der malignombedingten Todesfälle, nach Karzinomen der Lunge beim Mann und der Brustdrüse bei der Frau [4, 24, 30].

Die Inzidenz bei Männern und Frauen ist annähernd gleich. Das mittlere Alter bei Ersterkrankung liegt bei 69 Jahren bei Männern und 75 Jahren bei der Frau [24].

Etwa 60 % der kolorektalen Tumore sind im Bereich des linksseitigen Kolons lokalisiert, wobei fast 90 % davon im rektosigmoidalen Bereich auftreten, im Colon transversum nur etwa 10 % und etwa 30 % der Tumore entstehen im ascendierenden Kolon und Zäkum [6, 36, 44].

Über 90 % der Karzinome entstehen auf dem Boden von Adenomen (Adenom-Karzinom-Sequenz) aufgrund einer Reihe von genetischen Veränderungen [3, 25, 52].

Als Risikofaktoren zur Karzinomentstehung gelten sowohl genetische Prädispositionen als auch äußere Einflüsse. So kann eine eiweißreiche und ballaststoffarme Ernährung die Entstehung kolorektaler Karzinome begünstigen. Aber auch erbliche Erkrankungen wie die hereditären nicht-polypösen Kolonkarzinome (HNPCC oder Lynch-Syndrom) erhöhen die Erkrankungswahrscheinlichkeit [4, 25, 34, 52].

#### Histologische Einteilung

Die histologische Einteilung anhand der WHO-Klassifikation von 1989 unterscheidet kolorektale Karzinome nach histomorphologischen Kriterien in adeno- und adenomuzinöse Karzinome, Siegelringzell-, adenosquamöse, kleinzellige, Plattenepithel- und undifferenzierte Karzinome, wobei die beiden Erstgenannten mit über 95 % den größten Anteil ausmachen und die übrigen als Seltenheit anzusehen sind [3, 6, 11, 15].

---

## Stadieneinteilung

Eine Einteilung der Tumore in klinische Stadien erfolgt durch die Klassifizierung nach Dukes und Turnbull (Tabelle 1.1), orientierend an der Invasionstiefe des Primärtumors und der Bildung von Metastasen [15, 23].

Dukes-Stadium	
A	Tumor auf Mukosa und Submukosa beschränkt
B	Tumor infiltriert alle Wandschichten
C	Lokale Lymphknotenmetastasen
D	Fernmetastasen

**Tab. 1.1:** Einteilung in die Tumorstadien nach Dukes und Turnbull und die korrelierende histologische Morphologie [15, 23].

In den letzten Jahren hat die Einteilung nach Dukes und Turnbull im klinischen Bereich an Bedeutung verloren und ist mehr und mehr durch die differenziertere TNM-Klassifikation, erstellt durch die UICC (International Union Against Cancer), ersetzt worden.

T	Primärtumor
Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor infiltriert Submukosa
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
T3	Infiltration von Subserosa bzw. nicht peritonealisiertem parakolorektalem Gewebe
T4	Peritoneum und/ oder benachbarte Organe befallen

**Tab. 1.2:** T-Stadium abhängig von der Invasionstiefe, nach TNM-Klassifikation der UICC, 6. Auflage, 2002 [50].

Die TNM-Klassifikation berücksichtigt neben der Eindringtiefe des Karzinoms (siehe Tabelle 1.2) auch Lymphknoten- bzw. Fernmetastasen, sowie Differenzierungsgrad des Tumors (siehe Tabelle 1.3) [50].

<b>N</b>	<b>Regionale Lymphknoten</b>
Nx	Regionale Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine Lymphknoten befallen
N1	Metastasen in 1-3 Lymphknoten
N2	4 und mehr Lymphknoten betroffen
<b>M</b>	<b>Fernmetastasen</b>
Mx	Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
<b>G</b>	<b>Histopathologisches Grading</b>
Gx	Differenzierungsgrad kann nicht beurteilt werden
G1	Gut differenziert
G2	Mäßig differenziert
G3	Schlecht differenziert
G4	Undifferenziert

**Tab. 1.3:** Beurteilung von Lymphknoten- und Fernmetastasen (N- bzw. M-Stadium), sowie Differenzierung nach TNM-Klassifikation der UICC, 6. Auflage, 2002 [50]

Eine dritte Stadieneinteilung, ebenfalls von der UICC eingeführt, orientiert sich an klinischen und histologischen Parametern analog der oben beschriebenen Klassifizierungen [50]. Sie dient zur klinischen Risikoeinschätzung und damit zur Therapieplanung unter prognostischen Gesichtspunkten. Die folgende Tabelle **1.4** bietet einen vergleichenden Überblick über die verschiedenen Einteilungen.

<b>UICC</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>	<b>Dukes</b>
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

**Tab. 1.4:** Einteilung nach UICC, im direkten Vergleich zu den entsprechenden Einteilungen nach TNM bzw. Dukes und Turnbull [2, 11, 15, 23, 50].

---

## Metastasierung

Ein entscheidendes Merkmal maligner Tumore ist die Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung. Die sogenannte Metastasierungskaskade [1, 41] beschreibt die unterschiedlichen Schritte, die eine Tumorzelle bei der Absiedelung und Ausbildung einer Metastase durchläuft [5, 49, 62]. Dies ist ein für die Tumorzelle sehr traumatischer Prozess [49], die nur etwa eine von einer Million Zellen überlebt [3].

Der erste Schritt, auch als Intravasation bezeichnet, besteht dabei in der Auslösung aus dem Zellverband und dem Eindringen in die Metastasierungswege (z. B. Lymphbahnen oder Blutgefäße) [19, 49]. Die Verschleppung der Tumorzellen, der zweite Schritt in der Metastasierung, erfolgt entlang der Körperflüssigkeiten und unterliegt hierbei den anatomischen Gegebenheiten. Nach Arretierung, der Anhaftung am Kapillarfilter, erfolgt eine Extravasation, ein Austritt aus den Metastasierungswegen. Der letzte Schritt besteht erneut aus einer Invasion mit Ausbildung einer Tochtergeschwulst im erreichten Gewebe [3, 19, 49].

Der gesamte Metastasierungsprozess beruht auf verschiedensten genetischen und molekularen Begebenheiten und Fähigkeiten, sowohl vonseiten der Tumorzelle als auch der umgebenden Gewebe [5, 19, 41, 49]. Hierzu zählen unter anderem Aggregationsfähigkeit, z. B. durch Veränderungen von Molekülen wie Cadherinen oder Integrinen, aber auch proteolytische Enzyme und intrazelluläre Signalwege. Der Großteil der beteiligten Faktoren ist jedoch zum heutigen Zeitpunkt noch weitestgehend unbekannt [5].

Die Fähigkeit zur Metastasierung ist bei kolorektalen Tumorzellen unter anderem abhängig von der Invasionstiefe des Primärtumors, bei T1-Tumoren liegt das Risiko für ein Vorliegen von Lymphknotenmetastasen bei 8-14 % [18, 47], bei T3-Tumoren bereits bei über 40 % [47]. Die lymphogene Metastasierung verläuft entlang der arteriellen Gefäßversorgung hauptsächlich über die beiden Mesenterialarterien und über die Rektalarterien aus den Iliakalgefäßen. Auf diesem Wege gelangen Tumorzellen in die umliegenden Lymphknotenstationen, aber auch über den Venenwinkel in entferntere Regionen [4, 11].

Eine hämatogene Absiedelung kolorektaler Tumorzellen erfolgt primär über die Pfortader [4, 20]. Bereits 14-25 % der Patienten weisen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung Lebermetastasen auf [2, 20, 22, 34], beinahe jeder zweite Patient entwickelt im Krankheitsverlauf Tochtergeschwülste in der Leber [33, 38].

---

Etwa 75 % der hämatogenen Metastasen kolorektaler Karzinome finden sich in diesem Organ [22, 45] und machen den größten Anteil an allen metastatischen Tumoren der Leber aus [17]. Weitere häufig betroffene Organe sind die Lunge sowie Knochen und Gehirn [4, 20, 33, 45].

Bei tief sitzenden Rektumkarzinomen können Tumorzellen über die V. cava inferior unter Umgehung des Pfortaderkreislaufs auch direkt in die Lunge gelangen [20].

Hauptlokalisation bei Absiedelung in den Körperhöhlen ist das umgebende Peritoneum [29].

### Prognose

Wie bereits oben erwähnt ist die Stadieneinteilung von großer Bedeutung für die Prognose des Erkrankten. Während bei einem lokal begrenzten Befund die 5-Jahres-Überlebensraten noch bei gut 90 % liegen, verschlechtert sich das Outcome bei bereits erfolgter Fernmetastasierung auf unter 5 % [2, 11, 54] (siehe auch Tabelle 1.5). Die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate aller Patienten mit kolorektalen Karzinomen ist in Deutschland momentan mit 56 % angegeben [24].

UICC-Stadium	TNM-Einteilung	5-Jahres-Überlebensrate [in Prozent]
UICC 0/ I	Tis, T1-2; N0; M0	> 90 %
UICC II	T3-4; N0, M0	70-75 %
UICC III	Tx; N1-3; M0	25-75 %
UICC IV	Tx; Nx; M1	< 3 %

**Tab. 1.5:** 5-Jahres-Überlebensraten bezogen auf das vorliegende Tumorstadium nach UICC, bzw. TNM [11].

### Therapie

Als Therapie der Wahl aller Tumorstadien des kolorektalen Karzinoms gilt die radikale Resektion, die für lokal begrenzte Tumore bis UICC-Stadium II als kurativer Therapieansatz angesehen wird [2, 9]. Etwa die Hälfte der neu erkrankten Patienten kann durch diese Therapie geheilt werden [33]. Wichtige chirurgische Prinzipien sind hierbei *En-bloc-Lymphadenektomie* und *no-touch Technik* [4].

Adjuvante Chemotherapien sollten bei kolorektalen Karzinomen ab Stadium UICC III postoperativ erfolgen, bei Risikopatienten bereits im Stadium II (nach UICC) [2, 33, 34, 39, 40, 46]. In den letzten Jahren wurden neben den klassischen Substanzen 5-Fluorouracil und Leucovorin neuere Wirkstoffe wie Oxaliplatin oder Irinotecan zumeist im Rahmen klinischer Studien eingesetzt. Neuere Therapieansätze wie monoklonale Antikörper (z. B. Cetuximab) oder Angiogenesehemmstoffe (z. B. Bevacizumab) sind ebenfalls Bestandteil klinischer Studien mit zum Teil viel versprechenden Ergebnissen, besitzen jedoch derzeit noch keinen festen Platz in der kolorektalen Tumorthherapie [20, 33, 34, 39, 40, 46].

Eine Bestrahlung ist nur bei rektalen Karzinomen indiziert, bei lokal fortgeschrittenen Tumoren (ab Stadium T3) auch im Sinne einer neoadjuvanten Radiochemotherapie [34].

Bei solitären Lebermetastasen zeigt sich durch radikale Resektion eine Verbesserung der 5-Jahres-Überlebensrate auf bis zu 36% [20, 22, 33, 45, 54, 57]. Auch Hirn- und Lungenmetastasen sind aus prognostischer Sicht einer Resektion zuzuführen [20, 33, 45, 54]. Insgesamt kommen aber für eine operative Therapie der Metastasen nur etwa 5 % der betroffenen Patienten in Frage, in vielen Fällen liegen bereits multiple Metastasierungen vor [20, 22]. Neuere Ablationsverfahren wie Kryotherapie, Radiofrequenzablation oder laserinduzierte Thermoablation werden bereits bei nicht primär resezierbaren Metastasen der Leber angewandt, Langzeiterfahrungen im Rahmen klinischer Studien fehlen derzeit noch [20, 38].

## **1.2 Die Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase 4**

### Der Mitogen-aktivierte Protein-Signalweg

Innerhalb der menschlichen Zelle gibt es eine Reihe von so genannten Signalwegen, über die Informationen in die Zelle hinein gelangen und dann intrazellulär weiterverarbeitet werden. Wichtige Funktionen in mehreren dieser Signalwege erfüllt die Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen).

Bis jetzt sind drei große Untergruppen identifiziert worden:

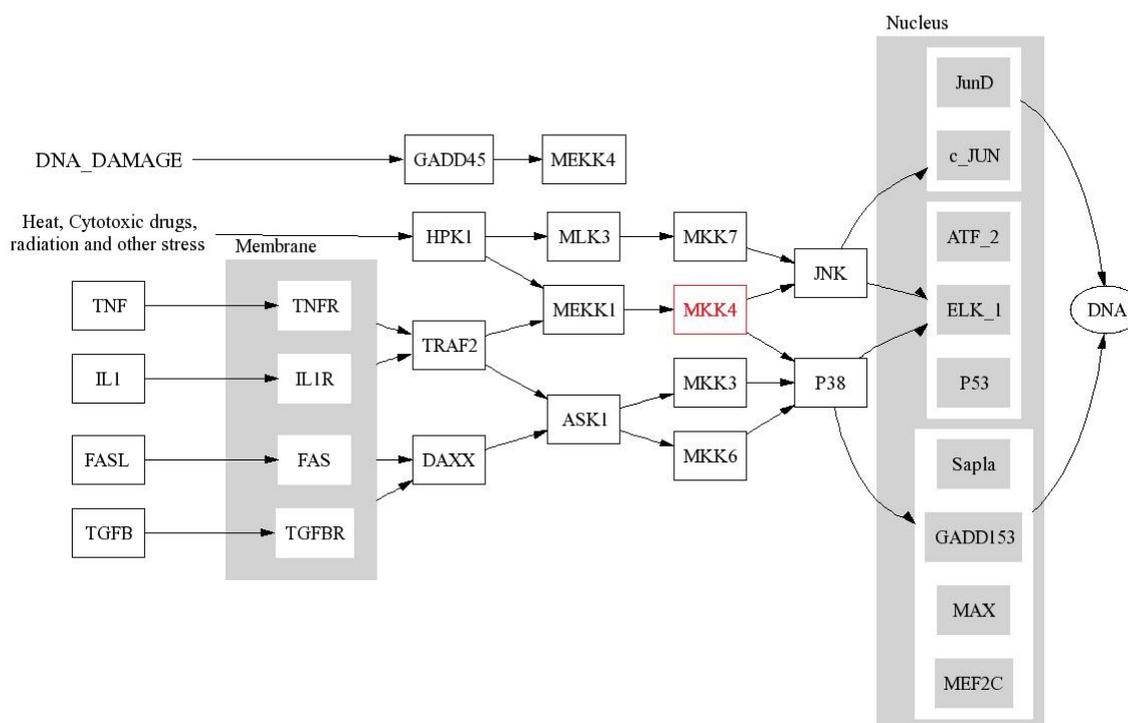
Extrazellulär Signal-regulierte Proteinkinase (ERK), c-Jun amino-terminale Kinase (JNK) und p38 mit jeweils eigenen Untergruppen [16, 59]. Während ERK an der Weiterleitung

---

der Informationen von Wachstumsfaktoren beteiligt ist, üben JNK und p38 essenzielle Funktionen in einem durch proinflammatorische Zytokine und Zellschäden verursachten Signalweg aus [59]. Gemeinsam werden sie auch als Stressaktivierte Proteinkinasen (SAPK) bezeichnet.

Reguliert werden die Kinasen über spezifische Aktivierungskinasen, MAP-Kinase Kinasen, die eine Phosphorylierung der MAP-Kinasen induzieren und diese damit aktivieren. Zu dieser Gruppe gehört die Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase 4 (MKK4). Sie aktiviert sowohl JNK [12, 13, 61] als auch p38 an der katalytischen Domäne über zweifache Phosphorylierung an Threonin und Tyrosin [13, 56].

Diese Aktivierung ist eine zentrale Komponente des bereits angesprochenen durch Stress aktivierten Signalweges (siehe Abbildung 1.1) der Zelle [12].



**Abb. 1.1: JNK und p38 Signalweg:** MKK4 dient als zentrale Komponente sowohl in der Weitervermittlung von physikalischen und chemischen Stressoren, als auch in der Stressreaktion nach Aktivierung körpereigener Botenstoffe wie TNF- $\alpha$ . Eine Weiterleitung erfolgt durch Aktivierung von JNK oder p38, die wiederum Transkriptionsfaktoren im Zellkern aktivieren. Hierüber kann eine Beeinflussung der Zellfunktion auf nuklearer Ebene erfolgen, z. B. die Einleitung des programmierten Zelltodes (adaptiert nach Kegg Pathway Database [26]).

Während chemische aber auch physikalische Aggressoren die Signalkaskade über JNK induzieren, lösen proinflammatorische Zytokine wie der Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )

und Interleukine hauptsächlich eine Kaskade aus, die durch die Aktivierung von p38 weitergeleitet wird [13]. Beide Kinasen, JNK und p38, führen zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie z. B. c-JUN und ATF und beeinflussen darüber zelluläre Prozesse auf molekulargenetischer Ebene, unter anderem auch Apoptose [13, 59]. Als Regulatoren dienen hemmende und aktivierende Enzyme, die zwischen und innerhalb der einzelnen Signalwege interagieren, wie z. B. MKK4. Es ist als Schnittstelle zwischen JNK und p38 zu sehen [8, 16].

#### Die Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase 4

Die zunächst in der Literatur mit SEK1 bezeichnete Kinase MKK4 kommt ubiquitär in vielen menschlichen Geweben vor und ist aufgrund ihrer Bedeutung in zwei wichtigen intrazellulären Signalwegen (siehe oben) in den letzten Jahren in vielen Studien untersucht worden. In der Literatur werden dabei eine Reihe von Pseudonymen verwendet, als häufig vorkommende seien an dieser Stelle JNKK, MEK4, SEK1 sowie SAPK/ERK Kinase 1 genannt [59].

Der genetische Code der Kinase (GeneID: 6416) befindet sich auf dem humanen Chromosom 17p11.2, die transkribierte mRNA umfasst etwa 3500 Basenpaare. Das entstehende Protein setzt sich aus 399 Aminosäuren zusammen und besteht in seinem katalytischen Zentrum aus 11 Subdomänen [27, 28].

Inzwischen sind mehrere Mutationen des MKK4-Gens in Tumorzelllinien entdeckt worden, die zu einem Verlust der Phosphorylierungsfähigkeit der Kinase *in vitro* führen. Hierbei handelte es sich um nonsense- sowie missense-Mutationen einzelner Gensequenzen [53].

Der homologe Verlust des gesamten Gens ist bereits an Mäusen untersucht worden und war mit dem Leben nicht vereinbar [21, 61]. Die Mäuse starben noch vor dem 14. Tag ihrer Embryonalentwicklung. Der Mangel an MKK4 führte zu einem Abbruch der Signalkaskade über JNK und darüber zu abnormer Hepatogenese und Hämorrhagien, die zum Tode der Embryonen führten [21, 61]. Dies impliziert eine wichtige Funktion von MKK4 in der Entwicklung der Leber. Während Leberzellen auf MKK4 angewiesen zu sein scheinen, zeigt sich in einer Studie von Comodo et al. eine Inhibition von hepatozellulären Karzinomzellen durch die Aktivierung von c-Jun über MEKK1 und MKK4 [10].

---

Hieraus wurde die Theorie abgeleitet, dass sich Tumorzellen in Hinblick auf die Expression von MKK4 von gesunden Zellen unterscheiden.

### MKK4 in der Tumorgenese

Eine ganze Reihe von Studien befasst sich mit der Expression von MKK4 in verschiedenen Tumorzelllinien. So wurde 1997 von Teng et al. nach Untersuchung von 88 Krebszelllinien verschiedener Organe festgestellt, dass in Pankreas-, Brust-, Kolon-, und Hodentumorzellen Mutationen im MKK4-Gen in einem Prozentsatz von 3 % nachweisbar sind. Diese Mutationen resultierten in einem Verlust der Phosphorylierungsfähigkeit der Kinase und damit eines fehlerhaften Aktivierungsvermögen im stressaktivierten Signalweg [53].

Ausgehend von diesen biochemischen Erkenntnissen gab es eine Reihe von klinisch experimentellen Studien, die sich mit dem Nachweis von MKK4 in menschlichen Tumoren und der klinischen Bedeutung befassten.

In Tumorzelllinien humaner Prostatakarzinome gelang der Nachweis von MKK4, jedoch in deutlicher geringerer Expression als in gesunden Epithel- und Stromazellen [32]. Weitere Untersuchungen wiesen eine Downregulierung des MKK4-Proteins während des Progress der Metastasierung *in vivo* nach, die eine mögliche Funktion als Tumorsuppressor implizierten [32].

In Tierversuchen an AT6.1 Ratten zeigte sich nach Gabe MKK4-suffizienter Zellen ein Rückgang der Metastasenbildung ohne Beeinflussung des Primärtumors [62]. Weitere *in vitro* Untersuchungen zeigten, dass durch Aktivierung von JNK durch MKK4 ein Wachstum von Fernmetastasen der Prostata in der Lunge gehemmt wurde [55].

Eine ähnliche Wirkung als Metastasensuppressor wird MKK4 auch in Ovarialkarzinomen zugeschrieben. Während der Untersuchung von gesundem und metastatischem Ovarialgewebe fielen Yamada et al. [60] eine deutlich geringere Expression von MKK4 in den Karzinomzellen auf. Auch hier zeigten sich in anschließenden Tierversuchen eine Reduktion der Anzahl von Metastasenabsiedlungen um fast 90%, untersucht an weiblichen SCID-Mäusen, denen MKK4-positive Krebszelllinien injiziert wurden [60].

Eine gegenteilige Funktion als pro-onkogenetisches Molekül in Lungenkarzinomen wurde MKK4 als Bestandteil des SAPK-Signalweges durch Lee et al. 2003 [35] zugeschrieben.

---

Zur Aufrechterhaltung einer Krebszelllinie erwies sich eine funktionierende MKK4-/ JNK-Signalkaskade als notwendig.

Einer genaueren Untersuchung der MAPK-Kinase 4 in der Tumorprogression von Mammakarzinomen widmeten sich Wang et al. In ihrer Studie zeigte sich *in vivo* durch Unterdrückung von MKK4 in Brustkrebszellen ein Rückgang der Tumorgröße in einem Maus-Xenograftmodell, gleichzeitig führte eine ektope Expression von MKK4 in zuvor MKK4-negativen Zelllinien zu einer Stimulation von Zellwachstum und Invasion [58]. Dies widerlegte eine zuvor aufgestellte Theorie von MKK4 als einen möglichen Metastasensuppressor in Mammakarzinomen [14].

Ähnliche Ergebnisse erreichten Wu et al., die MKK4 in 44,8 % von 96 untersuchten Magenkarzinomen nachwiesen. Hier übte die Expression keinen Einfluss auf Invasionstiefe, Lymphknotenmetastasen, Wachstumsform des Tumors und Stromareaktion aus [59], allerdings zeigte sich eine signifikante Minderung von rückfallfreier und Gesamtüberlebenszeit der Patienten bei MKK4-positiven Tumoren. Daraus ergab sich eine mögliche Verwendung von MKK4 als prognostische Faktor bei dieser Tumorerkrankung [37, 59]. Mutationsanalysen in Adenokarzinomen des Magens ließen jedoch keinen Schluss auf eine Tumorentstehung aufgrund genetischer Inaktivierung von MKK4 zu [7].

Eine bisher nicht veröffentlichte Studie von Mirow et al. [42] untersuchte die Expression von MKK4 in kolorektalen Karzinomen. Hier zeigte sich bei bisher 79 untersuchten Karzinomen eine MKK4-Positivität bei 71%. Eine statistische Korrelation mit dem Tumorstadium konnte nicht nachgewiesen werden [42]. Insgesamt zeigte sich jedoch der Trend zu einem längeren Überleben bei positivem Nachweis der Kinase und zu einer verlängerten rückfallfreien Überlebenszeit.

Eine Funktion von MKK4 als Tumorsuppressor lässt sich dadurch erklären, dass die Kinase als Aktivator von JNK eine wichtige Position in der JNK-Signalkaskade ausübt, durch die geschädigte Zellen dem programmierten Zelltod zugeführt werden [31, 48, 51]. Bei einem Verlust der Phosphorylierungsfähigkeit durch Mutation kann es zu ungehindertem Zellwachstum kommen.

---

Unklar ist jedoch, welche molekularen Mechanismen dazu führen, dass MKK4 in einigen Tumorgeweben Proliferation und Invasionsverhalten fördert [58].

### **1.3 Zielsetzung der Arbeit**

Die erörterten Studien befassen sich fast ausschließlich mit dem Vorkommen und der Bedeutung von MKK4 in Primärtumoren. Ein Nachweis der Expression von MKK4 in humanen Metastasen und deren Bedeutung wird bisher in der Literatur nicht beschrieben.

Das Ziel dieser Arbeit war es, ein geeignetes molekularbiologisches bzw. immunhistochemisches Verfahren zu etablieren, mit denen die Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase 4 zuverlässig in metastatischen Geweben beim Menschen nachgewiesen werden kann. Weiterhin sollte eine Bedeutung einer möglichen Expression in Bezug auf den klinischen Verlauf der betroffenen Patienten anhand prospektiv erhobener Daten der Tumordatenbank der Klinik für Chirurgie des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, untersucht werden. Eventuelle Unterschiede zwischen primärem Tumorgewebe und Metastasengewebe sollten durch Proben aus kolorektalen Primärtumoren untersucht werden.

Die Arbeit ist Teil eines Forschungsprojektes der Klinik für Chirurgie des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, das sich mit der Expression von MKK4 in kolorektalen Karzinomen befasst. Ein bereits erwähntes Vorläuferprojekt von Mirow et al. [42] befasst sich mit der Expression von MKK4 in kolorektalen Karzinomen und einer möglichen klinischen Bedeutung, ein drittes Projekt von Behra et al. mit der Mutationsrate der Gensequenz von MKK4 in kolorektalen Karzinomzellen.

Das am häufigsten betroffene Organ bei metastatischen kolorektalen Karzinomen ist die Leber. Bei Vorliegen solitärer Lebermetastasen erhalten einige der erkrankten Patienten im Rahmen ihrer Therapie eine operative Metastasenentfernung (siehe 1.1). Auf diesem Wege gelang eine Gewinnung und Aufarbeitung des metastatischen Gewebes der Leber betroffener Patienten.

Bereits in mehreren erwähnten Studien (siehe 1.2) konnte MKK4 im gesunden Lebergewebe nachgewiesen werden. Um mögliche Unterschiede im Vorkommen von MKK4 zwischen Normalgewebe der Leber und metastatischem Gewebe durch kolorektale

---

Karzinome zu unterscheiden, wurden im Rahmen dieser Arbeit Gewebeprobe­n aus gesunden Leberanteilen ebenfalls den genannten Nachweismethoden für MKK4 unterzogen.

---

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Patientenkollektiv**

In dieser Studie wurden 36 Proben aus Lebermetastasen von Patienten mit histologisch gesichertem kolorektalen Karzinom untersucht, die sich im Zeitraum vom Januar 2003 bis zum September 2006 in der Klinik für Chirurgie des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, einer onkochirurgischen Therapie der Metastasen unterzogen. Von diesen 36 untersuchten Proben mussten 2 aus der Auswertung ausgeschlossen werden, da es sich um Rezidivmetastasen von Patienten aus dem Kollektiv handelte. Insgesamt konnten daher 34 Proben untersucht und ausgewertet werden.

12 der Patienten aus der Gesamtgruppe hatten sich bereits im Vorfeld im Universitätsklinikum einer Resektion des Primärtumors unterzogen. Auch im Rahmen dieser Operation waren Proben entnommen worden, von denen 11 für eine weitere Aufarbeitung zur Verfügung standen und als Kontrollgruppe dienten (kolorektale Primärtumore). Diese Proben wurden mit freundlicher Unterstützung des Instituts für Pathologie der Universität zu Lübeck zur Verfügung gestellt.

Weiterhin wurde im Rahmen oben genannter chirurgischer Therapie bei 7 Patienten aus dem Kollektiv aufgrund notwendiger ausgedehnter Resektion ebenfalls gesundes Lebergewebe gewonnen. Diese Gewebeproben bildeten eine zweite Kontrollgruppe (Normalgewebe der Leber).

Die Daten der Patienten wurden aus der Tumordatenbank für kolorektale Karzinome der Klinik für Chirurgie übernommen. In diesem Register werden klinische Verlaufsangaben von allen Patienten mit kolorektalem Karzinom prospektiv erfasst und laufend aktualisiert, die sich aufgrund ihrer malignen Tumorerkrankung chirurgisch in dieser Klinik behandeln lassen.

---

Das Register enthält unter anderem folgende Angaben zu dem Primärtumor:

- Alter und Geschlecht des Patienten
- Lokalisation des Tumors
- Histologie und TNM-Einteilung
- UICC-Stadium zum Zeitpunkt der Primäroperation
- Zeitpunkt der Lebermetastasierung
- Differenzierungsgrad des Tumors
- Art der Therapie
- Überlebensstatus

Nachstehende Tabelle (Tabelle 2.1) soll einen kurzen Überblick über die Häufigkeiten und Verteilungen oben genannter Kriterien bei den Patienten innerhalb der drei untersuchten Probengruppen vermitteln.

		<b>Lebermetastasen</b> [n= 34]	<b>Kolorektale Primärtumore</b> [n=11]	<b>Normalgewebe Leber</b> [n=7]
<b>Geschlecht</b>	Weiblich	13	4	2
	Männlich	21	7	5
<b>Lokalisation</b>	Kolon	21	4	1
	Rektum	13	7	6
<b>Tumorstadium</b>	UICC I-II	7	1	2
	UICC III	8	2	3
	UICC IV	19	8	2
<b>Differenzierungsgrad</b>	G1-G2	19	7	3
	G3	9	4	2
<b>Therapieansatz</b>	Kurativ	25	6	4
	Palliativ	9	5	3
<b>Lebermetastasen</b>	Synchron	19	8	2
	Metachron	15	3	5
<b>Überlebensstatus (März 2007)</b>	Verstorben	13	3	0

**Tab. 2.1:** Häufigkeit des Vorkommens [n] der verschiedenen Patienten- und Tumormerkmale, Therapieansätze und Überlebensstatus innerhalb der drei Probengruppen: Lebermetastasen, kolorektale Primärtumore und Normalgewebe der Leber.

Ein Antrag zur Überprüfung ethischer und berufsrechtlicher Gesichtspunkte wurde der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck vorgelegt und bewilligt (Aktenzeichen 06-039, vom 27.06.2006).

### 2.1.2 Gewinnung und Aufarbeitung der Proben

Die Auswahl der Patienten erfolgte zufällig, unterlag jedoch den ärztlichen Auswahlkriterien für die Durchführung einer Leberresektion. Jeder resezierten Metastase wurde intraoperativ, falls die Operation es zuließ, eine Probe entnommen, die schnellstmöglich auf Eis gelagert und anschließend in Stickstoff tiefgekühlt wurde.

Ein Teil jeder Probe wurde in Formaldehyd (4,5 %) über mindestens 24 Stunden konserviert, in Paraffin gebettet und anschließend zu histologischen Schnitten weiterverarbeitet.

Für einen molekulargenetischen Nachweis wurde jeweils ein mindestens 0,1 g schweres Gewebstück entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung in flüssigem Stickstoff gelagert. Dieses Gewebe wurde im weiteren Verlauf den nachfolgend beschriebenen Methoden unterzogen.

### RNA-Isolierung

Auf das gefrorene Gewebstück (0,1 g) wurde 1 ml Trizol pipettiert und mit dem UltraTurrax<sup>®</sup> (Jahnke & Kunkel, Staufen, D) homogenisiert. Die Probe wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, anschließend wurden 0,2 ml Chloroform hinzugefügt. 15 Sekunden lang wurde das Gemisch kräftig geschüttelt und unter Raumtemperatur in ein Schraubdeckelcup überführt.

Bei 12000 g Umdrehung und einer Temperatur von 4°C wurde die Probe über 15 Minuten zentrifugiert und dann der entstandene wässrige Überstand in ein neues Cup überführt.

Danach wurden 0,5 ml Chloroform hinzugegeben, wieder kräftig gemischt und diesmal für 5 Minuten bei 12000 g und 4°C zentrifugiert. Erneut wurde der Überstand abpipettiert, mit 0,5 ml Chloroform vermischt und 5 Minuten lang zentrifugiert. Nach Überführung der oberen wässrigen Phase in ein neues Cup wurde mit dem gleichen Volumen (etwa 0,5 ml) Isopropanol aufgefüllt und die Probe für 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen.

---

Im Anschluss daran wurde die Probe für weitere 10 Minuten bei 12000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und auf das nun sichtbare Pellet 1 ml Ethanol (70 / 75 %) gefügt. Durch kurzes Mischen auf dem Vortex® (Scientific Industries, New York, USA) wurde das Pellet gewaschen. Die Probe wurde danach wiederum für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert, diesmal bei 7500 g.

Das Ethanol wurde abpipettiert und die Probe zum Antrocknen stehen gelassen, sodass das restliche Ethanol vollständig verdunstete. Anschließend wurden 50 µl autoklaviertes Wasser hinzugefügt und das Pellet durch Mischen auf dem Vortex® vollständig darin gelöst.

Die Probe wurde dann für 10 Minuten bei 55-60°C im Thermomixer® (Eppendorf, Hamburg, D) inkubiert und danach sofort auf Eis gekühlt.

Im Anschluss erfolgte die Messung der Konzentration der isolierten RNA mithilfe des Spektrophotometers (Beckmann-Coulter, Fullerton, USA) (siehe unten).

Um eine Denaturierung der isolierten RNA auszuschließen, wurden alle Proben auf einem Agarose-Gel (siehe 2.2.2) aufgetrennt. Anhand der Bandenbildung konnten Aussagen über die Intaktheit der Nukleinsäuren getroffen werden. Bei nicht eindeutig sichtbaren Banden musste von einer Denaturierung ausgegangen und die Isolierung wiederholt werden.

### Konzentrationsbestimmung

Die Messung der Konzentration erfolgte bei Wellenlängen von 260, 280 und 320 nm. Für eine exakte Messung musste die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm kleiner 1 sein. Hierfür mussten die Proben gegebenenfalls vorverdünnt werden und diese Verdünnung anschließend aus der Konzentration wieder heraus gerechnet werden.

Die Berechnung der Konzentration an Nukleinsäuren erfolgte mittels folgender Formel nach Warburg und Christian (1941) aus den gemessenen Absorptionen der beiden Wellenlängen:

$$\text{Nukleinsäurekonzentration } [\mu\text{g/ml}] = E_{260} * 62,9 + E_{280} * (-36).$$

Die bei 320 nm Wellenlänge gemessene Absorption wurde als systematischer Fehler aus allen gemessenen Absorptionen subtrahiert.

---

## Herstellung eines Reverse-Transkriptase-Ansatzes

Prinzip: Zur Amplifizierung einer Gensequenz mittels PCR muss die isolierte RNA in die zu ihr komplementäre DNA (cDNA) umgewandelt werden, dies geschieht mithilfe einer reversen Transkriptase.

Durchführung: Pro Ansatz mussten 3 µg isolierter RNA eingesetzt werden. Die entsprechende Probenmenge wurde in einem sterilen Cup mit autoklaviertem Wasser auf 25 µl aufgefüllt, kurz vermischt und bei 65°C für 10 Minuten im Thermomixer<sup>®</sup> inkubiert. Die Erwärmung führte zu einer Entfaltung des RNA-Stranges, um eine Anlagerung der Transkriptionsprimer zu ermöglichen. Anschließend erfolgte eine sofortige Kühlung auf Eis, um eine erneute Faltung zu verhindern.

Der Inhalt des Cups wurde auf Ready-To-Go-You-Prime-First-Beads<sup>®</sup> (Amersham Biosciences, Piscataway, USA) gegeben, die neben einer reversen Transkriptase auch die für die Herstellung von DNA benötigten Nukleotidtriphosphate enthielten. 1 µl oligo dT als Primer und 7 µl Wasser wurden hinzugefügt und die Probe 1 Minute bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurde zunächst auf dem Vortex<sup>®</sup> vermischt bis sich die Beads<sup>®</sup> aufgelöst hatten und dann für wenige Sekunden zentrifugiert.

Die Probe kam dann zum Inkubieren für 1 Stunde in den Thermomixer<sup>®</sup>. In dieser Zeit erfolgte die Bildung eines komplementären DNA-Einzelstrangs.

Als letzten Schritt wurde die Probe auf 100 µl Gesamtvolumen mit sterilem Wasser aufgefüllt und bei -20°C gelagert.

## 2.2 Methoden

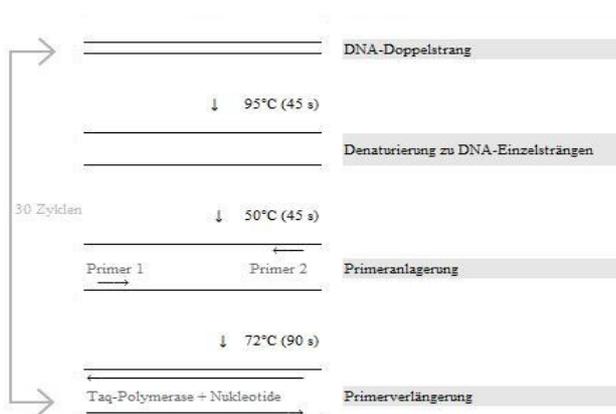
### 2.2.1 Polymerase-Ketten-Reaktion

Prinzip: Die Polymerase Chain Reaction (PCR) wurde 1984 von Kary B. Mullis entwickelt und hat seitdem einen festen Stellenwert in der molekularbiologischen Forschung [43]. Mit ihrer Hilfe gelingt es, einen DNA-Abschnitt mit bereits bekannter Sequenz *in vitro* exponentiell zu vervielfältigen (siehe Abbildung 2.1), ohne dabei auf Wirtszellen zurückgreifen zu müssen.

---

Zur Amplifizierung benötigt werden isolierte DNA und zwei Primer (zu der DNA komplementäre Oligonukleotide mit 15-25 Basenpaaren), eine thermostabile DNA-Polymerase und Desoxyribonukleosid-Triphosphate (dNTP). RNA kann über reverse Transkription (siehe 2.1.2) in cDNA umgewandelt werden und ebenso amplifiziert werden. Der Reaktionszyklus der PCR, der sich in der Regel zwischen 20 und 45 Mal wiederholt, kann in drei Abschnitte unterteilt werden, die sich durch ihre jeweiligen Reaktionstemperaturen und -dauern unterscheiden:

1. Thermische DNA-Denaturierung in Einzelstränge (95°C)
2. Primeranlagerung, sogenanntes Annealing (abhängig von Primer, z. B. 50°C)
3. Primerverlängerung (abhängig von Polymerase, bei Taq-Polymerase 72°C)



**Abb. 2.1:** schematische Darstellung der verschiedenen PCR-Schritte entsprechend des verwendeten  $\beta$ 2-PCR-Programms (siehe Tabelle 2.2): Nach Aufspaltung des DNA-Doppelstrangs kommt es zur Anlagerung der Primer und mithilfe der Polymerase zu einer Verlängerung und damit Bildung komplementärer Doppelstränge.

In dieser Arbeit wurde sowohl mit einer konventionellen PCR (siehe unten) als auch zum Nachweis von MKK4 mit einer sogenannten Zweistufen-PCR (Nested-PCR) gearbeitet. Letztgenannte besteht im Prinzip aus zwei konventionellen Polymerase-Ketten-Reaktionen mit geringerer Zykluszahl. Es wird dabei mit zwei verschiedenen Primerpaaren gearbeitet. Im ersten Schritt wird ein DNA-Abschnitt mit großer Anzahl an Basenpaaren amplifiziert. Dieses Produkt wird als Anfangsmolekül (Template) in die zweite PCR eingesetzt. Das zweite Primerpaar bindet spezifisch an einen Teil des Amplifikats, der dadurch nochmals vervielfältigt wird. Auf diese Weise erhöht sich die Spezifität der Amplifizierung. Die

---

Nested-PCR überliegt damit der konventionellen PCR in Spezifität und Sensitivität, da sie in der Lage ist, auch geringe Mengen an Templates zuverlässig nachzuweisen.

Die verwendeten Primerpaare setzten sich jeweils aus einem Sense- und einem Antisense-Oligonukleotid zusammen. Das Vorliegen eines cDNA-Einzelstrangs erforderte diese unterschiedliche Polarität.

1. Primer MKK-4 Sense/ Antisense

5' -AGA GAG GGT GAC TGT TGG AT- 3'

5' -TCT ATT CTT TCA GGT GCC AT- 3'

2. Primer MKK4 C12 Sense und

5' -GCA AAA TCA CTT TAG CAA CTG- 3'

Primer MKK4 C11 Antisense

5' -AGC CAG CAT CTC TTG TCT TG- 3'

Die Bindung des Antisense-Primers erfolgte dabei revers-komplementär zum cDNA-Einzelstrang.

Durchführung: Es wurde mit einem Mastermix gearbeitet, der sich zwischen den PCR-Programmen nur durch die verwendeten Primer unterschied. Er setzte sich pro Probe aus folgenden Inhaltsstoffen zusammen:

- 10 µl 10x PCR-Puffer
- 0,5 µl dNTP
- 1,5 µl Magnesiumchlorid
- 1 µl Primer-Mix (1:40 verdünnt)
- 39,75 µl steriles Wasser
- 0,25 µl Taq-Polymerase

Für den Primer-Mix wurden 76 µl steriles Wasser mit jeweils 2 µl Primer-Sense bzw. Primer-Antisense vermischt. Dieser Mastermix-Ansatz wurde unter sterilen Bedingungen auf Eis mit gestopften Pipettenspitzen pipettiert. Je 48 µl wurden pro Probe in speziellen PCR-Cups (Greiner bio-one, Frickenhausen, D) mit 2 µl des entsprechenden RT-Ansatzes vermischt und in die PCR eingesetzt.

---

Im ersten Schritt der Nested-PCR (siehe Tabelle 2.2) durchliefen die Proben 25 Reaktionszyklen bei einer Annealingtemperatur von 50°C.

Im zweiten Schritt (siehe Tabelle 2.2) wurden 48 µl Mastermix mit 1,5 µl des ersten PCR-Produktes vermischt und ebenfalls in die PCR eingesetzt. Diesmal wurden 20 Zyklen bei einer Annealingtemperatur von 55°C durchlaufen.

Die Auswertung erfolgte anschließend mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.2.2).

#### Kontrollen bei der PCR:

Als qualitative Standards liefen in jeder PCR zwei Cups mit, die anstelle einer Probe steriles Wasser als Negativkontrolle bzw. einen RT-Ansatz aus Hela-Zellen als Positivkontrolle enthielten. So wurde gewährleistet, dass Verunreinigungen der Materialien keine falsch positiven und fehlerhafte Durchführung keine falsch negativen Ergebnisse verursachen konnten.

Ebenfalls zum Ausschluss falsch negativer Ergebnisse wurde als Qualitätskontrolle für die extrahierte RNA und den RT-Ansatz auf ein sogenanntes House-keeping-Gen zurückgegriffen, das  $\beta_2$ -Mikroglobulin. Es war in jedem Ansatz in annähernd gleicher Menge enthalten. Die entsprechenden Primer wurden für eine dritte PCR verwendet, die unabhängig von der Nested-PCR durchgeführt wurde.

#### 3. Primer $\beta$ -2-Mikroglobulin Sense/ Antisense

5' -ATC CAG CGT ACT CCA AAG ATT- 3'

5' -CAT GTC TCG ATC CCA CTT AAC TAT- 3'

Der Mastermix-Ansatz erfolgte wie oben beschrieben. Bei einer Annealingtemperatur von 50°C wurden 30 Zyklen (siehe Tabelle 2.2) durchlaufen und die Produkte ebenfalls einer Auswertung mittels Gelelektrophorese unterzogen. Nur bei deutlicher Einzelbandenbildung wurden die Proben für die Nested-PCR verwendet. Gegebenenfalls musste die Aufarbeitung der Probe wiederholt werden.

---

<b>Nested-PCR Schritt I</b> Primerpaar 1	<b>Nested-PCR Schritt II</b> Primerpaar 2	<b>β2-PCR</b> Primerpaar 3
95 °C, 1:00 min	95 °C, 1:00 min	95 °C, 0:02 min
Lid Heat 105 °C	Lid Heat 105 °C	Lid Heat 105 °C
95 °C, 5:00 min	95 °C, 5:00 min	95 °C, 2:00 min
<i>Zyklenzahl 25:</i>	<i>Zyklenzahl 20:</i>	<i>Zyklenzahl 30:</i>
95 °C, 1:00 min	95 °C, 1:00 min	95 °C, 0:45 min
50 °C, 1:00 min	55 °C, 1:00 min	50 °C, 0:45 min
72 °C, 1:00 min	72 °C, 1:00 min	72 °C, 1:30 min
72 °C, 5:00 min	72 °C, 5:00 min	72 °C, 7:00 min
8 °C, forever	8 °C, forever	8 °C, forever

**Tab. 2.2:** Darstellung der verwendeten PCR-Programme mit Auflistung der einzelnen PCR-Abschnitte, der verwendeten Temperaturen und Zeiten, sowie der erforderlichen Zyklenzahlen.

### 2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Prinzip: Auf einem sogenannten Trägergel wandern aufgetragene Proben entlang eines angelegten elektrischen Feldes. Die Auftrennung erfolgt anhand der vorhandenen Molekülgröße, kleinere Moleküle wandern schneller. Umso mehr Material sich an einer bestimmten Stelle absetzt, desto größer ist die dort entstandene Bande. Durch zugefügtes Ethidiumbromid als Interkalationsfarbstoff können vorhandene Banden unter der UV-Lampe sichtbar gemacht werden.

Zur Auftrennung von Nukleinsäuren empfiehlt sich die Verwendung eines grobporigen Trägergels, da sich sonst größere Moleküle in den Poren verfangen und nicht wandern. Das hier verwendete Gel auf Agarose-Basis (Polysaccharid aus Algen) erfüllt diese Voraussetzungen.

Durchführung: Eine Darstellung der PCR-Resultate erfolgte mit Hilfe eines 1,5 % Agarose-Gels (siehe Tabelle 2.3). Dazu wurden 0,75 g Agarose in einem Reagenzglas mit 50 ml TAE-Puffer vermischt und in der Mikrowelle zweimal unter kurzem Umrühren aufgeköcht. Auf dem Magnetrührer wurde das Gemisch bei Raumtemperatur abgekühlt und anschließend 5 µl Ethidiumbromid hinzugefügt. Dann wurde das Gel zum Erkalten in eine bereitgestellte Form gegossen. In einer Horizontal-Elektrophoresekammer wurde das

erstarrte Gel mit einfach konzentriertem TAE-Puffer ausreichend bedeckt. 9  $\mu$ l jeder Probe wurde mit 1  $\mu$ l einer schweren Lösung (40 % Saccharose, 0,2 ml 0,1 M EDTA, 1,25 ml 0,25 % Xylencyanol, 4,55 ml Wasser) vermischt und vorsichtig in die vorgeformten Geltaschen aufgetragen. Als Standard kamen in eine der Taschen 3  $\mu$ l eines Molekulargewichtsmarkers mit 1  $\mu$ l schwerer Lösung und 6  $\mu$ l Wasser. Dieses diente zur Beurteilung der Position der Banden bei der späteren Auswertung.

Nach einer Laufzeit von 42 Minuten und einer angelegten Spannung von 80 V bei 250 mA wurden die Banden unter einem UV-Licht-Transluminator (Fröbel, Wasserburg am Bodensee, D) sichtbar gemacht und fotografiert.

Die Produkte der  $\beta$ 2-PCR wurden auf einem 1 % Agarose-Gel ausgewertet (siehe Tabelle 2.3), das auf die gleiche Weise hergestellt wurde. Aufgrund der geringeren Dichte des Gels genügte eine Laufzeit von 30 Minuten bei identisch angelegter Spannung.

Zur Überprüfung der isolierten RNA (siehe 2.1.2 und Tabelle 2.3) wurde ebenfalls ein 1 % Agarose-Gel verwendet. Je nach Konzentration der in Wasser gelösten RNA wurden 1-3  $\mu$ l Probe mit 1  $\mu$ l schwerer Lösung auf 10  $\mu$ l Gesamtvolumen mit Wasser aufgefüllt und in die Taschen gegeben. Bei oben angegebener Spannung erfolgte ebenfalls nach 30 Minuten Laufzeit die Auswertung unter dem UV-Schirm (MWG Biotech, New York, USA).

	<b>Nested-PCR</b>	<b><math>\beta</math>2-PCR</b>	<b>RNA-Testung</b>
Konzentration Agarose	1,5 %	1 %	1 %
Probenmenge	9 $\mu$ l	9 $\mu$ l	1-3 $\mu$ l
Schwere Lösung [Volumen]	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
Verwendeter Standard	Standard VI	Standard VI	Standard VI
Laufzeit	0,7 h	0,5 h	0,5 h

**Tabelle 2.3:** Auflistung der Unterschiede in der Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese und der verwendeten Materialien.

### 2.2.3 Immunhistochemie

Prinzip: Durch spezifische monoklonale Antikörper können Proteine in histologischen Schnitten gebunden und durch eine antikörpergebundene Färbung im Präparat angefärbt werden. Nach einer Gegenfärbung des restlichen Gewebes wird auf diese Weise eine genaue Aussage über die Proteine und ihr Vorkommen in den Geweben getroffen. In

---

diesem Fall erfolgte ein indirekter Nachweis von MKK4 in Lebermetastasen bzw. Lebernormalgewebe über antikörpervermittelte Peroxidase-Farbreaktion.

Dabei wird ein spezifischer Primärantikörper von einem gegen ihn gerichteten Sekundärantikörper gebunden, der mit Peroxidase beladen ist. Diese reagiert dann mithilfe eines Substratpuffers und Wasserstoffperoxid als Katalysator mit einem sogenannten Chromogen (Farbstoff) zu einem Farbkomplex.

Durchführung: Die Schnittpräparate mussten zunächst aus dem Paraffin gelöst werden. Dazu wurden sie dreimal über 10 Minuten in Xylol entparaffiniert und anschließend über jeweils 3 Minuten in Ethanol absteigender Konzentration (v/ v) (100 %, 100 %, 96 %, 96 %, 70 %) rehydratisiert.

Nach kurzem Wässern in Millipore-Lösung und Spülen mit Tris-Pufferlösung (pH 7,4-7,6) erfolgte ein Aufkochen bei 1100 W in der Mikrowelle und anschließendem Kochen bei 700 W über 15 Minuten. Dabei wurden die Schnitte in ausreichend Zitronensäurepuffer gebadet. Verdunsteter Puffer wurde durch Millipore-Lösung ersetzt.

Im Anschluss daran mussten die Schnitte mindestens 20 Minuten lang abkühlen.

Dann wurden die Objektträger erneut in Millipore gewässert, mit Tris-Puffer gespült und vorsichtig abgetrocknet.

Mit einem Fettstift (DakoPen<sup>®</sup> (Dako, Glostrup, DK)) wurden die Gewebestücke auf dem Objektträger umrandet und mäanderförmig in eine Küvette mit ausreichend 0,5 % Wasserstoffperoxid für 30 Minuten gestellt. Diese Inkubation stellte sicher, dass die endogene Peroxidase im Gewebe in ihrer Aktivität gehemmt wurde.

Nach Ablauf der 30 Minuten wurden die Objektträger durch vorsichtiges Abkippen von dem Wasserstoffperoxid befreit und dreimal à 5 Minuten in Tris-Puffer gewaschen. Hinterher wurden die Objektträger in eine feuchte Kammer (Kunststoffschale mit feuchtem Papier ausgekleidet) gelegt. Sie wurden mit je 2 Tropfen einer Protein-Blocking-Solution (Dako, Glostrup, DK) beträufelt, welche Interaktionen der Antikörper mit unspezifischen Gewebekomponenten verhinderte und für 15 Minuten in der feuchten Kammer verblieb. Die überschüssige Blocking-Lösung wurde anschließend abgekippt und die Objektträger vorsichtig abgetupft.

Auf jeden Objektträger wurden dann 200 µl der MAP-Kinase-Antikörper (Sigma-Aldrich, München, D) in einer 1:300-Vorverdünnung mit Antibody-Dilution (Dako-Cytomation, Glostrup, DK) gleichmäßig über das Gewebe verteilt.

---

Als Negativkontrolle wurde ein Gewebeschnitt mit 200 µl Kaninchenimmunglobulin (Dako, Glostrup, DK) versehen.

Über Nacht kamen die Schnitte in der feuchten Kammer in den Kühlschrank bei 8°C.

Am nächsten Tag wurde die Antikörper-Lösung dreimal über 5 Minuten mit Tris-Puffer gespült und 2 Tropfen Envision® (Dako, Glostrup, DK) auf die Objektträger gegeben. Dabei handelte es sich um mit Peroxidase versehene Anti-Kaninchen-Antikörper.

Nach 30 Minuten in der feuchten Kammer wurden die Schnittpräparate erneut dreimal mit Tris-Puffer gewaschen.

Für die Färbung wurde unter dem Abzug eine Tablette AEC-Farbstoff in 12 ml DMSO aufgelöst. Zu der gelösten Tablette wurden dann 100 ml Barbitolpuffer, 100 ml Millipore-Lösung und 10 µl Wasserstoffperoxid (30 %) hinzugefügt und das Gemisch durch Filterpapier in eine Küvette filtriert.

In diese Küvette wurden die Objektträger für etwa 15 Minuten zum Färben gestellt und anschließend unter fließendem Wasser mindestens 10 Minuten gespült.

Nach einminütigem Gegenfärben in Hämatoxylin und gründlicher Spülung konnten die Schnittpräparate mit Aquatex® (Merck, Darmstadt, D) eingedeckt werden.

#### Kontrollen bei der Immunhistochemie:

Um die Qualität der Färbung zu gewährleisten, wurde bei jedem Durchgang eine Negativ- und eine Positivkontrolle mittels Schnittpräparaten von kolorektalen Karzinomen durchgeführt. Sie dienten auch als Standard bei der Auswertung.

#### Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Von jeder Probe wurde auch eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung durchgeführt. Diese Färbepreparate dienten zur Beurteilung des gewonnenen Gewebes in Hinblick auf Intaktheit und zur Bestätigung des Gewebstyps.

Für diese Färbung wurden die Schnittpräparate nach dem Entparaffinieren (siehe oben) für 5 Minuten in Hämatoxylin und nach zehnminütigem Wasserbad für 1 Minute in Eosin gefärbt. Zum Fixieren der Färbung wurden die Präparate zuerst kurz in Wasser, dann in Ethanol aufsteigender Konzentration (v/ v) gegeben (70 %, 96 %, 100 %). Zum Schluss wurden sie dreimalig in Xylol für 5 Minuten belassen und zuletzt mit Eukitt<sup>□</sup> (Sigma-Aldrich, München, D) eingedeckt.

---

### **2.3 Statistische Methoden**

Alle im Folgenden erhobenen statistischen Daten wurden mithilfe des Statistikprogrammes SPSS 13.0 für Windows (SPSS Incorporation, Chicago, USA) berechnet.

Zur Berechnung der Survival-Analyse wurde die Kaplan-Meier-Methode verwendet, die es erlaubt, bei Überlebenszeiten die Überlebensrate  $S(t)$  zu schätzen. Die Überlebensrate  $S(t)$  ist der Anteil der Beobachtungseinheiten, die den Zeitpunkt  $t$  überleben. Die Kaplan-Meier-Methode berücksichtigt die Informationen aller Patienten so lange, wie diese beobachtet worden sind (siehe Kaplan und Meier, 1958).

Ein Vergleich der drei verschiedenen Probengruppen erfolgte durch Berechnung der Mittelwerte der Ergebnisse. Eine statistische Signifikanzprüfung war aufgrund des geringen Probenumfangs nicht möglich.

### **2.4 Methodenfindung**

Die oben beschriebenen molekularbiologischen Methoden sind in der medizinischen Forschung bereits etabliert. Dennoch ergaben sich bei der Durchführung einer konventionellen Polymerase Ketten Reaktion unter Verwendung von Lebergewebe als Template Probleme. Sie beruhten vor allem darauf, dass Lebergewebe aufgrund starker Enzymaktivität sehr schnell nach Entnahme aus dem menschlichen Körper denaturiert. Trotz sofortiger Kühlung der Präparate auf Eis kam es durch die kurzen ischämischen Phasen während Gewinnung und Verarbeitung der Proben zu ungehemmter Enzymaktivität im Gewebe. Dies verursachte zum Teil die Isolierung von qualitativ minderwertiger RNA, die sich durch Bildung mehrerer Bruchstücke in der Gelelektrophorese widerspiegelte (siehe 2.2.2).

Während die Amplifizierung kleinerer Sequenzen dieser RNA, bzw. cDNA, zum Beispiel des  $\beta$ 2-Mikroglobulins, keine Probleme bereitete, gelang die Vervielfältigung der MKK4-Sequenz in einer konventionellen PCR nicht. Die hierbei verwendeten Primer MKK4-Sense und MKK4-Antisense (siehe 2.2.1) schnitten eine über 300 Basenpaare lange Sequenz heraus. Die Vervielfältigung einer Sequenz dieser Länge gelang auch mit Hela-RT als Template nur unregelmäßig.

---

Da die Amplifizierung der kleinen Sequenz des  $\beta$ 2-Mikoglobulins erfolgreich war, wurde zur Vervielfältigung der MKK4-Sequenz ein Primerwechsel vorgenommen. Die zwischen den Primern MKK4-C12s und MKK4-C11a (siehe **2.2.1**) liegende Sequenz umfasst nur etwa 180 Basenpaare und ist damit auch in einem bruchstückhaften Template nachzuweisen. Allerdings führten auch kleinste Verschmutzungen durch gewebefremde DNA (z. B. durch Staubpartikel in der Luft) zu Veränderungen der Ergebnisse, sichtbar in einer positiven Negativkontrollprobe. Trotz sterilen Arbeitens, Austauschen aller Materialien und Ortswechsels gelang es nicht in allen Fällen, eine Kontamination zu verhindern.

Aus diesem Grunde erfolgte ein Wechsel der Methode zu einer Nested-PCR mit oben genannten Primern (siehe **2.2.1**), durch den die Herstellung eines reproduzierbaren, spezifischen Amplifikats der MKK4-Sequenz gelang.

Die Gewebeproben der kolorektalen Karzinome waren im Vorfeld im Rahmen der pathologischen Befundstellung einer Aufarbeitung zugeführt worden, bei der eine Einbettung in Paraffin stattgefunden hatte.

Eine RNA-Isolierung aus mit Paraffin vorbehandelten Gewebeproben ist jedoch mit den herkömmlichen Isolierungsverfahren (siehe **2.1.2**) nicht möglich. Daher standen die Gewebeproben der Primärtumore einer Auswertung mittels PCR nicht zur Verfügung. Infolge dessen erfolgte der MKK4 Nachweis in der Kontrollgruppe der kolorektalen Karzinome lediglich mittels immunhistochemischer Färbung.

---

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Patientenkollektiv

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 34 Proben aus Lebermetastasen kolorektaler Karzinome den oben beschriebenen Nachweismethoden unterzogen und der Auswertung zugeführt. Die Geschlechtsverteilung der den Proben zugehörigen Patienten war mit 21 männlichen (61,76 %) und 13 weiblichen Patienten (38,24 %) zu Gunsten des männlichen Geschlechts verschoben. Das durchschnittliche Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Primäroperation lag bei 62,74 Jahren (Standardabweichung (s) = 10,56 J.), wobei die jüngste Patientin 32 Jahre alt war und der älteste Patient 82 Jahre.

Von den 11 Patienten aus der Gruppe der kolorektalen Primärtumore waren 7 Patienten männlich (63,64 %), 36,36 % weiblich (n = 4). Die Patienten waren zum Zeitpunkt der Primäroperation zwischen 32 und 77 Jahren alt, das Durchschnittsalter in diesem Kollektiv lag bei 59,64 Jahren (s = 12,04 J.).

In der zweiten Kontrollgruppe erfolgte die Untersuchung von gesundem Lebergewebe von insgesamt 7 Patienten. Auch hier lag mit 71,43 % (n = 5) der Anteil der männlichen Patienten höher als der weiblichen mit 28,57 % (n = 2). Das mittlere Alter bei der Karzinomoperation betrug 63,43 Jahre (s = 7,28 J.), das höchste Alter eines Patienten in dieser Gruppe betrug 71 Jahre, das geringste 50 Jahre (siehe Tabelle 3.1).

	<b>Lebermetastasen</b>	<b>Kolorektale Primärtumore</b>	<b>Normalgewebe der Leber</b>
<b>Geschlecht</b>			
Männlich	21/ 61,76	7/ 63,64	5/ 71,43
Weiblich	13/ 38,24	4/ 36,36	2/ 28,57
<b>Durchschnittsalter</b>			
Gesamt	62,74	59,64	63,43
Männlich	64,71	62,86	64,60
Weiblich	59,54	58,50	59,00

**Tab. 3.1:** Vergleich der Geschlechtsverteilung (Anzahl n/ Anteil in Prozent) und des durchschnittlichen Patientenalters (in Jahren) zum Zeitpunkt der Primäroperation, aufgeschlüsselt nach Geschlecht, in den drei Patientengruppen.

Ebenfalls zum Zeitpunkt der Primäroperation lag bereits bei 55,88 % der Patienten (n = 19) ein fortgeschrittenes Malignomgeschehen mit Lebermetastasierung (UICC Stadium IV) vor, der durchschnittliche Abstand zwischen Primäroperation und Metastasenresektion betrug in der Gruppe der Lebermetastasen 13,09 Monate (s = 11,01 Mon.), in der Kontrollgruppe des Normalgewebes der Leber 13,86 Monate (s = 9,67 Mon.) und 7,27 Monate (s = 6,87 Mon.) in der Kontrollgruppe der kolorektalen Primärtumore.

Einen Überblick über das Tumorstadium (nach WHO/ UICC, siehe 1.1) der Erkrankten in den einzelnen Gruppen bietet Tabelle 3.2. Ein Tumorstadium 0 nach UICC zeigte sich bei keinem der Patienten.

UICC-Stadium	Lebermetastasen [n = 34]	Kolorektale Primärtumore [n = 11]	Normalgewebe der Leber [n = 7]
I	2/ 5,88	0/ 0	2/ 28,57
II	5/ 14,71	1/ 9,09	0/ 0
III	8/ 23,53	2/ 18,18	3/ 42,86
IV	19/ 55,88	8/ 72,73	2/ 28,57

**Tab. 3.2:** Verteilung der einzelnen Tumorstadien nach UICC (Anzahl n/ Anteil in Prozent) zum Zeitpunkt der Primäroperation in den drei Proben Gruppen Lebermetastasen, kolorektale Primärtumore und Normalgewebe der Leber.

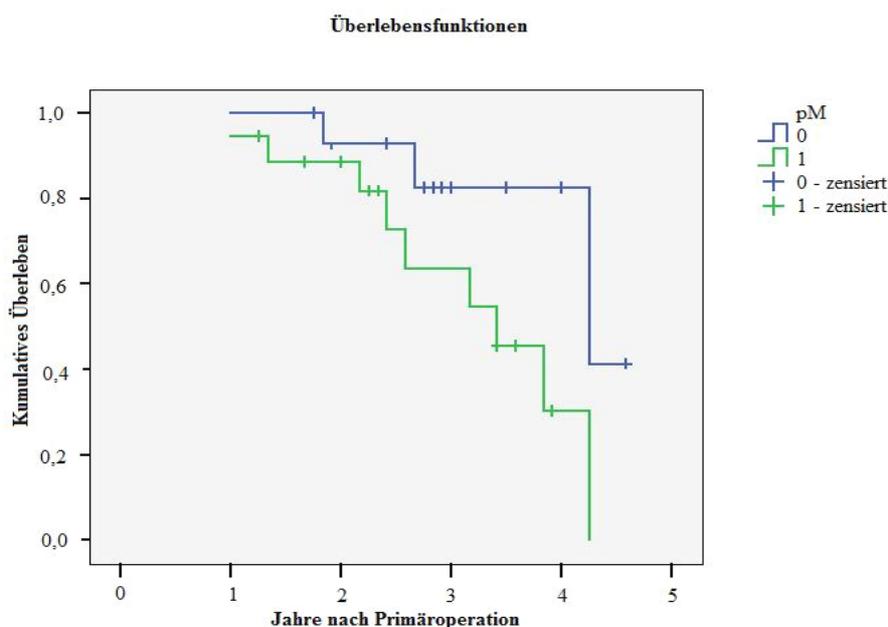
Hierbei zeigte sich in allen drei Gruppen ein geringerer Anteil der lokal begrenzten Tumoren (Stadium I und II) im Vergleich zu den bereits metastasierten Tumoren ( Stadium III und IV).

In Bezug auf die Differenzierungsgrade der Primärtumore lagen in der Datenbank bei 6 Patienten keine Angaben zum Grading vor. Aus diesem Grund war eine zuverlässige Bestimmung der Häufigkeitsverteilung in der Gruppe der Lebermetastasen sowie in der Gruppe des Normalgewebes der Leber nicht möglich. In der Gruppe der kolorektalen Primärtumore zeigte sich jedoch ein Trend zu den besser differenzierten Karzinomen mit 7 gut- bis mittelgradig differenzierten (G1 und G2) Karzinomen (63,64 %) und 4 schlecht differenzierten (G3) Karzinomen (36,36 %).

Ein kurativer Operationsansatz bei der Durchführung der kolorektalen Tumorresektion erfolgte in der Gesamtgruppe bei 14 der 15 lokal begrenzten Tumoren (93,33 %) und bei

11 der 19 fortgeschrittenen Malignome (57,89 %). In der Gruppe des Normalgewebes der Leber waren 4 der Primäroperationen (57,14 %) mit einem kurativen Ansatz erfolgt, in der Kontrollgruppe der kolorektalen Primärtumore 6 (54,55 %), hiervon 4 (36,36 %) mit zu diesem Zeitpunkt bereits diagnostizierten Fernmetastasen.

Zum Zeitpunkt der letzten Datenerhebung (März 2007) waren von den 34 Patienten, deren Gewebeproben untersucht wurden 13 verstorben (38,24 %), 10 (9,09 %) von ihnen hatten bereits bei Primäroperation ein metastasiertes Karzinom. Hieraus ergab sich nach der Kaplan-Meier-Methode (siehe 2.3) eine 3-Jahres-Überlebensrate von 83 % der 15 Patienten mit einem Karzinomstadium I-III nach UICC, im Vergleich hierzu bei Stadium UICC IV von 64 %. Die mediane Überlebenszeit lag bei 51 Monaten im Stadium I-III (nach UICC), im Stadium IV (nach UICC) bei 41 Monaten (siehe Abbildung 3.1).



**Abb. 3.1: Kumulatives Überleben** (berechnet nach Kaplan und Meier): Blaue Linie: kumulatives Überleben der Patienten im Tumorstadium UICC I-III ohne Fernmetastasierung (pM0) bei Primäroperation. Grüne Linie: kumulatives Überleben der Patienten mit vorliegenden Fernmetastasen (pM1) bei Primäroperation (Stadium IV nach UICC).

### 3.2 Polymerase-Ketten-Reaktion

Im ersten experimentellen Teil der Arbeit sollte der molekulargenetische Nachweis der entsprechenden DNA-Sequenz der MAP-Kinase Kinase 4 mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion in zuvor aufgearbeiteten Gewebeproben gelingen.

Hierfür erfolgte nach Isolierung der RNA (siehe 2.1.2) die Bestimmung der Konzentration an Nukleinsäuren im Probenansatz mittels photometrischer Absorptionsmessung und Berechnung nach Warburg-Christian (siehe 2.1.2 und Tabelle 3.3).

Dabei variierten die gemessenen Konzentrationen an isolierter RNA zwischen den einzelnen Proben (Mittelwert = 4,64 mg/ ml; s = 3,89 mg/ ml); um vergleichbare Ergebnisse in der PCR zu erhalten war es daher notwendig aus den Konzentrationen das benötigte Probenvolumen für 3 µg isolierte RNA zu berechnen.

Probe	RNA [mg/ml]	Probe	RNA [mg/ ml]	Probe	RNA [mg/ ml]	Probe	RNA [mg/ ml]
1	9,807	12	6,627	23	2,560	34	2,996
2	11,330	13	1,740	24	6,651	35	5,412
3	19,600	14	4,154	25	5,983	36	1,903
4	8,516	15	4,041	26	5,577	37	0,582
5	2,619	16	3,547	27	7,041	38	6,722
6	10,992	17	1,353	28	1,436	39	4,739
7	3,731	18	3,084	29	3,403	40	6,376
8	1,917	19	0,543	30	3,891	41	6,543
9	0,697	20	1,287	31	6,018		
10	4,504	21	3,542	32	3,906		
11	1,962	22	1,640	33	1,104		

**Tab. 3.3: RNA-Konzentrationen:** Probennummer und gemessene Konzentration der isolierten RNA im jeweiligen Probenansatz in mg/ ml. Proben 1 bis 34 aus Lebermetastasen, Proben 35 bis 41 aus Normalgewebe der Leber.

Trotz hoher Absorptionswerte war eine RNA-Denaturierung nicht sicher auszuschließen, aus diesem Grund wurden alle Proben nach der Konzentrationsbestimmung einer Gelelektrophorese unterzogen. Bei nicht eindeutiger Bandenbildung musste die RNA-Isolierung wiederholt werden, da denaturierte Proben zu einem falsch-negativen PCR-Ergebnis geführt hätten.

---

Nach dieser Qualitätskontrolle konnten die Proben in einen Reverse-Transkriptase-Ansatz eingesetzt werden, der die RNA in komplementäre cDNA überführte (siehe **2.1.2**).

Vor dem Einsetzen dieser cDNA in die Nested-PCR zum MKK4-Nachweis erfolgte wie bereits oben beschrieben (siehe **2.2.1**) erneut eine Überprüfung der Intaktheit der Proben. Hierzu durchlief jeder Probenansatz eine PCR, wobei  $\beta$ 2-Mikroglobulin als Primer diente. Im Anschluss daran wurden die PCR-Produkte auf einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Intaktheit galt dabei bei eindeutiger Einzelbandenbildung im entsprechenden Größenbereich als gesichert. Dies war bei allen Proben aus der Gruppe der Lebermetastasen und aus der Kontrollgruppe des Normalgewebes der Fall.

Jede Probe wurde nach Abschluss der Aufarbeitung einer Amplifizierung mittels Nested-PCR zugeführt und nachfolgend nach Produktgröße elektrophoretisch aufgetrennt.

Dafür wurden die PCR-Produkte wie oben beschrieben (siehe **2.2.2**) in ein vorbereitetes Agarose-Gel eingesetzt und nach 48-minütiger Laufzeit unter dem UV-Schirm ausgewertet.

Von jedem ausgewerteten Gel wurde eine Fotografie zur Auswertung angefertigt (siehe Abbildung **3.2**).

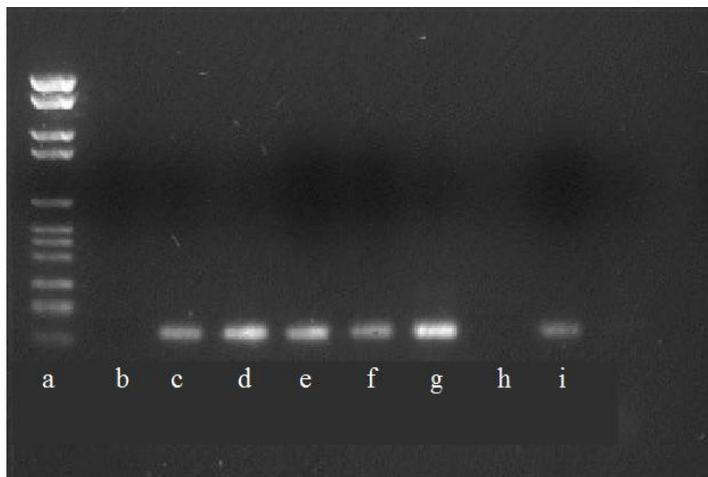
Orientierend am mitgelaufenen Standard konnte anhand der Bandenposition auf die Größe der DNA-Sequenz geschlossen werden und somit grobe Verschmutzungen durch Fremd-DNA ausgeschlossen werden. Weitere Kontrollen wurden durch Anwendung von Positiv- und Negativkontrollproben gewährleistet, die jedem einzelnen PCR-Durchlauf beigelegt wurden (siehe **2.2.1**).

Eine Auswertung des Elektrophoreseergebnisses erfolgte nur dann, wenn sowohl der mitgelaufene Standard als auch die Positivkontrollprobe eindeutige Bandenbildung aufwies, sowie die Negativkontrollprobe keine sichtbaren Banden bildete. Auch bei Doppelbandenbildung der Positivkontrolle war die PCR als ungültig zu deuten und musste wiederholt werden.

Unter Berücksichtigung dieser Kriterien erfolgte nun die Auswertung der Ergebnisse. Die Bandenbildung der einzelnen Proben orientierte sich dabei an der jeweils mitgelaufenen Positivkontrolle, die als positiv (1) gewertet wurde. Entsprechend wurden die Proben bei gleich starker Bandenbildung als positiv (1), bei stärkerer als stark positiv (2), bei

---

schwächerer Bande als schwach positiv (0,5) und bei keiner sichtbaren Bandenbildung als negativ (0) ausgewertet (siehe Abbildung 3.2).



**Abb. 3.2: Beispiel Gelelektrophorese** (Beschriftung der Banden von links nach rechts): a) Standard b) negativ c) positiv d) stark positiv e) stark positiv f) positiv g) stark positiv h) negativ i) schwach positiv.

Zunächst durchliefen alle Proben zweimalig die Nested-PCR und die anschließende elektrophoretische Auftrennung. Bei abweichendem Ergebnis wurde von einer Fehlbestimmung ausgegangen und die entsprechenden Proben ein weiteres Mal in die PCR eingesetzt, bis ein reproduzierbares Ergebnis auftrat. Dieser erneuten PCR mussten insgesamt 18 der Proben zugeführt werden.

In der weiteren Auswertung (siehe Tabelle 3.4) wurden nur die reproduzierbaren Ergebnisse berücksichtigt.

In der Gruppe der Lebermetastasen zeigten sich alle Proben als positiv für MKK4 (Mittelwert 0,96;  $s = 0,26$ ), wobei eine Probe stark positiv war und 5 Proben wegen schwacher Bandenbildung als schwach positiv gewertet wurden.

Auch in der Gruppe des Normalgewebe der Leber war bei allen Proben eine positive Bandenbildung zu sehen, wobei eine Probe als schwach positiv und 2 Proben als stark positiv ausgewertet wurden. Der Mittelwert lag in dieser Gruppe mit 1,21 höher als in der Gruppe der Lebermetastasen, die einzelnen Werte variierten mit einer Standardabweichung  $s$  von 0,57 stärker.

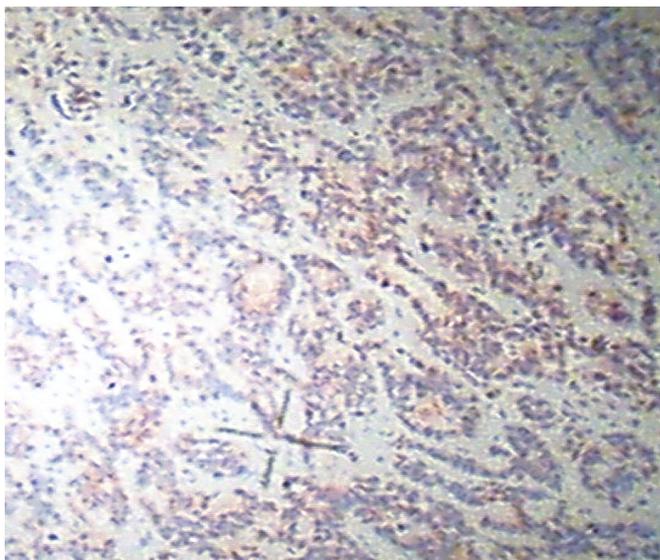
	<b>Lebermetastasen [n = 34]</b>	<b>Normalgewebe der Leber [n = 7]</b>
Negativ [0]	0/ 0	0/ 0
Schwach Positiv [0,5]	5/ 14,71	1/ 14, 29
Positiv [1]	28/ 82,35	4/ 57,14
Stark Positiv [2]	1/ 2,94	2/ 28,57
<b>Median</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Mittelwert</b>	<b>0,96</b>	<b>1,21</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>0,26</b>	<b>0,57</b>

**Tab. 3.4: Vergleich PCR:** Auswertung des semiquantitativen Nachweis von MKK4 in den Proben der Lebermetastasen bzw. im Normalgewebe der Leber, unterteilt in Stärke des Nachweis, sowie Anzahl [n] der jeweiligen Proben und Anteil [in Prozent] an der Probengruppe, sowie Mittelwerte und Standardabweichung. 0: negativ; 0,5: schwach positiv; 1: positiv; 2: stark positiv.

### **3.3 Immunhistochemie**

Durch spezifische Antikörper sollte ein *in-vitro* Nachweis der MAP-Kinase Kinase 4 in histologischen Schnittpräparaten in den gewonnenen Gewebeproben erbracht werden. Dabei wurden die Präparate nach entsprechender Vorbereitung (siehe 2.2.3) mit den betreffenden Antikörpern in Kontakt gebracht, im Anschluss daran konnte die Kinase in den Gewebezellen mit einer antikörpervermittelten Rotfärbung mittels AEC (Amino-Ethylcarbazol) sichtbar gemacht werden.

Die Auswertung erfolgte wie in Abbildung 3.3 zu sehen mikroskopisch, wobei eine deutliche Rotfärbung des Zellzytoplasma, in mehr als 50 % des untersuchten Gewebes, als positiver (1) Nachweis angesehen wurde, bei zusätzlicher Anfärbung des Zellkerns wurde die Probe mit stark positiv (2) ausgewertet. Zeigten sich weniger als 50 % des Gewebes mit einer Rotfärbung des Zytoplasmas wurde die Probe als schwach positiv (0,5) bezeichnet, bei negativer Rotfärbung als MKK4-negativ (0).



**Abb. 3.3: Immunhistochemische MKK4-Färbung:** Beispiel einer MKK4-antikörpervermittelten AEC-Färbung einer Lebermetastase.

Als Standard für die Auswertung liefen in jedem Färbungsansatz eine Positiv- und eine Negativkontrolle mit. Dafür dienten Schnittpräparate aus kolorektalen Karzinomen, die sich bereits in Vorversuchen [42] als MKK4-positiv herausgestellt hatten. Nur bei deutlicher Positivkontrolle und eindeutiger Negativkontrollprobe erfolgte eine Auswertung der Präparate, andernfalls musste die betreffende Färbung mit neuen Schnittpräparaten wiederholt werden.

Unter Beachtung der oben genannten Auswertungskriterien zeigte sich bei 14 Proben aus Lebermetastasen ein deutlicher Nachweis von MKK4, 2 Proben zeigten sich stark positiv, 8 Proben waren schwach positiv. Der Mittelwert lag bei 0,94 mit einer Standardabweichung von 0,34.

In der Kontrollgruppe der kolorektalen Primärtumore lag der Mittelwert bei 0,96 mit einer Standardabweichung von 0,14, bei 10 Proben gelang eine deutliche immunhistochemische Anfärbung von MKK4 im Zytoplasma, eine Probe zeigte sich als schwach positiv.

Im Gegensatz dazu war im Normalgewebe der Leber MKK4 in allen 7 Proben sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern nachweisbar, damit waren alle Proben stark positiv, der Mittelwert betrug 2, die Berechnung der Standardabweichung ergab 0.

Einen vergleichenden Überblick über die drei untersuchten Probenkollektive bietet die folgende Tabelle **3.5**:

	<b>Lebermetastasen [n = 34]</b>	<b>Kolorektale Primärtumore [n = 11]</b>	<b>Normalgewebe der Leber [n = 7]</b>
Negativ [0]	0/ 0	0/ 0	0/ 0
Schwach Positiv [0,5]	8/ 23,53	1/ 9,09	0/ 0
Positiv [1]	24/ 70,59	10/ 90,91	0/ 0
Stark Positiv [2]	2/ 5,88	0/ 0	7/ 100
<b>Median</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>Mittelwert</b>	<b>0,94</b>	<b>0,96</b>	<b>2</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>0,34</b>	<b>0,14</b>	<b>0</b>

**Tab. 3.5: Vergleich Immunhistochemie:** Auswertung des semiquantitativen Nachweis von MKK4 innerhalb der einzelnen Probengruppen, unterteilt in Stärke des Nachweis, sowie Anzahl [n] der jeweiligen Proben und Anteil [in Prozent] an der Probengruppe, sowie Mittelwerte und Standardabweichung. 0: negativ; 0,5: schwach positiv; 1: positiv; 2: stark positiv.

### **3.4 Gesamtergebnisse**

Um alle drei Gruppen miteinander zu vergleichen, erschien es sinnvoll die Ergebnisse des immunhistochemischen Nachweis mit den Ergebnissen der PCR zu verbinden, sowohl für die Proben aus Lebermetastasen als auch für das Normalgewebe der Leber.

Wie bereits beschrieben (siehe 2.3) war es nicht möglich, die Proben der kolorektalen Primärtumore einer PCR zu unterziehen. Deshalb lagen hier nur Ergebnisse des immunhistochemischen Nachweises vor.

Es wurden rechnerisch für jede Probe der Mittelwert aus den beiden Untersuchungsergebnissen berechnet, aus diesen Werten wurden dann Median, Mittelwert und Standardabweichung für die jeweilige Gruppe berechnet.

Wie in Tabelle 3.6 dargestellt zeigte sich im Vergleich PCR zu Immunhistochemie in der Gruppe der Lebermetastasen kein deutlicher Unterschied im Gesamtergebnis zu den Einzelwerten. Der Mittelwert betrug insgesamt 0,95 mit einer Standardabweichung s von 0,01, diese lag unterhalb der Standardabweichungen von 0,26 bzw. 0,34 bei den Einzelauswertungen, siehe auch 3.2 und 3.3.

	PCR	Immunhistochemie	Gesamtergebnis
Median	1	1	<b>1</b>
Mittelwert	0,96	0,94	<b>0,95</b>
Standardabweichung	0,26	0,34	<b>0,01</b>

**Tab 3.6: Vergleich Lebermetastasen:** Ergebnisse der PCR und immunhistochemischen Färbung, sowie Gesamtergebnisse in der Gruppe der Lebermetastasen, berechnet wurden Median, Mittelwert und Standardabweichung.

In der Gruppe des Normalgewebes (siehe Tabelle 3.7) unterschieden sich die Werte der PCR deutlicher von denen der immunhistochemischen Aufarbeitung, da bei der Färbung MKK4 in allen Präparaten stark positiv angefärbt wurde. Im Gesamtergebnis ergab sich dadurch ein Mittelwert von 1,61 mit einer Standardabweichung von 0,56.

	PCR	Immunhistochemie	Gesamtergebnis
Median	1	2	<b>1,5</b>
Mittelwert	1,21	2,0	<b>1,61</b>
Standardabweichung	0,57	0,0	<b>0,56</b>

**Tab. 3.7: Vergleich Normalgewebe Leber:** Ergebnisse der PCR und immunhistochemischen Färbung, sowie Gesamtergebnisse in der Gruppe des Normalgewebes der Leber, berechnet wurden Median, Mittelwert und Standardabweichung.

Durch den Abgleich der beiden unterschiedlichen Untersuchungsmethoden und ihrer Ergebnisse war nun eine direkte Gegenüberstellung der drei Gruppen (siehe Tabelle 3.8) mit jeweils einem Ergebnis möglich.

	Lebermetastasen [n = 34]	Kolorektale Primärtumore [n = 11]	Normalgewebe der Leber [n= 7]
Mittelwert	0,95	0,96	1,61
Standardabweichung	0,01	0,14	0,56

**Tab. 3.8: Gesamtergebnisse:** Mittelwert und Standardabweichung des MKK4-Nachweis in den drei untersuchten Probengruppen.

Hierbei zeigte sich, dass in allen drei Gruppen ein positiver Nachweis von MKK4 in den untersuchten Geweben gelang, wobei der Mittelwert des MKK4-Nachweises im Lebernorgangewebe mit 1,61 höher lag als die Werte der beiden anderen Gruppen.

---

## **4. Diskussion**

Die vorliegende Studie befasst sich mit der Expression der Mitogen-aktivierten Proteinkinase Kinase 4 in humanen Lebermetastasen bei kolorektalen Karzinomen. Das Ziel der Studie war es, ein zuverlässiges Verfahren, sowohl molekularbiologisch als auch immunhistochemisch, für den Kinasenachweis in Metastasengeweben zu etablieren. Eine mögliche klinische Relevanz sollte anhand einer Tumordatenbank prospektiv untersucht werden. Diese Studie stellte einen Teil eines Forschungsprojektes der Klinik für Chirurgie der Universität zu Lübeck über das Vorkommen und die Bedeutung von MKK4 in kolorektalen Karzinomzellen dar.

Sie basierte auf den Ergebnissen einer Studie von Mirow et al., die eine Expression von MKK4 in kolorektalen Karzinomen nachwies [42]. Hierbei zeigte sich eine positive Expression der Kinase in 71 % der untersuchten Tumore. Zum genaueren Verständnis der Funktion von MKK4 während des Metastasierungsvorgangs wurde der häufigste Fernmetastasierungsort kolorektaler Karzinome, die Leber, im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit auf die Expression von MKK4 untersucht. Zur Überprüfung einer möglichen direkten Korrelation zwischen der Expression von MKK4 in der Karzinomzelle des Primärtumors und der Expression in der Metastasenzelle wurde versucht, sowohl Primärtumor als auch Metastase desselben Patienten zu gewinnen. Um den Unterschied zwischen der Expression in Leberzellen und Metastasenzellen herauszuarbeiten, wurde auch gesundes Lebergewebe einer Prüfung auf ein Vorkommen von MKK4 untersucht.

Es gelang für diese Studie, 34 Gewebeproben aus Lebermetastasen kolorektaler Karzinome zu gewinnen und in Bezug auf die Expression von MKK4 zu untersuchen. Die Gewinnung der Proben erfolgte zufällig bei den Patienten, die sich im Verlauf der kolorektalen Tumorbehandlung einer Resektion von Lebermetastasen unterziehen mussten. Nur bei ausreichend großen Metastasen war eine Gewebegewinnung zur Untersuchung im Rahmen dieser Studie möglich. In 7 Fällen der 34 resezierten Metastasen mussten ausgedehnte Resektionen der Metastasen mit großem Sicherheitsabstand erfolgen, hier konnte auch gesundes Lebergewebe einer Untersuchung zugeführt werden. In den anderen Fällen wäre eine Entnahme gesunden Gewebes mit einer erhöhten Belastung der Patienten verbunden gewesen.

---

Die Kontrollgruppe mit 11 Proben aus den primären kolorektalen Karzinomen unterlag in ihrer Aussagekraft ebenfalls Einschränkungen durch den geringen Stichprobenumfang. Die Proben konnten erst einige Zeit nach der Primäroperation für die Studie verwendet werden, da zum Zeitpunkt der Operation noch nicht abzusehen war, welche Patienten zu einem späteren Zeitpunkt von einer Metastasenoperation betroffen sein würden. Weiterhin gab es viele Patienten in der Gesamtgruppe, deren Primäroperationen in auswärtigen Kliniken durchgeführt wurde, hier standen keine Gewebeproben für eine Untersuchung zur Verfügung.

Aufgrund dessen gelang es nur bei 11 der Patienten aus der Gesamtgruppe, die Primärtumoren zu untersuchen. Da die Proben bereits histologisch aufgearbeitet waren, standen sie zum molekularbiologischen Nachweis mittels PCR nicht mehr zur Verfügung. Ein MKK4-Nachweis durch immunhistochemische Färbung war jedoch ohne technische Probleme durchführbar.

Während der Stichprobenumfang der Gesamtgruppe als ausreichend groß angesehen werden konnte, fielen die Umfänge in den beiden Kontrollgruppen aus besagten Gründen relativ klein aus.

Die Untersuchung der Bedeutung einer Expression von MKK4 erfolgte anhand prospektiv erfasster Daten der Tumordatenbank der Klinik für Chirurgie. In die statistische Auswertung einbezogen wurden Daten zu Geschlecht und Alter der Patienten, UICC- (bzw. TNM-) Stadium bei Erstdiagnose, Art der Operation und Überlebensstatus.

Aus diesen Daten erfolgte die Berechnung der Mittelwerte, der Medianwerte und der Standardabweichungen im Vergleich der drei Kollektive, sowie die Berechnung der 3-Jahresüberlebensrate (nach Kaplan-Meier, 1958) und der medianen Überlebenszeit.

In allen drei Gruppen überwog das männliche Geschlecht (Lebermetastasen 62 %, kolorektale Primärtumore 71 %, Normalgewebe der Leber 64 %). Diese Geschlechtsverteilung variierte damit zu der Gesamtheit aller kolorektalen Karzinompatienten in Deutschland, da insgesamt eine annähernd geschlechtsneutrale Inzidenz vorherrscht [24, 34]. Diese Varianz der Studiengruppe von der Gesamtbevölkerung ist möglicherweise durch einen zu geringen Stichprobenumfang

---

---

bedingt. Die Varianz zwischen den einzelnen Studiengruppen war aufgrund des geringen Stichprobenumfangs einer weitergehenden Interpretation nicht zugänglich.

Das mittlere Alter bei Diagnosestellung liegt bei kolorektalen Karzinomen in Deutschland bei 69 Jahren bei Männern und 75 Jahren bei Frauen [24]. Hiervon weichen die Mittelwerte in allen drei untersuchten Gruppen ab (Lebermetastasen: 62,74 J. ( $s = 10,56$  J.), kolorektale Primärtumore: 59,64 J. ( $s = 12,04$  J.), Normalgewebe der Leber 63,43 J. ( $s = 7,28$  J.)). Diese Abweichung ist darauf zurückzuführen, dass bei allen Patienten dieser Studie eine operative Metastasen Chirurgie durchgeführt wurde, für die viele Patienten in höherem Alter aufgrund erhöhten Operationsrisikos nicht in Frage kommen.

Entsprechend dem Studiendesign lag bei allen Patienten insgesamt ein metastasiertes Karzinomgeschehen vor, bei fast 56 % der Patienten ( $n = 19$ ) bereits zum Zeitpunkt der Primäroperation. 11 dieser 19 Patienten wurden einem kurativen Operationsansatz zugeführt. Zum Zeitpunkt der Datenerhebung waren 13 Patienten aus der Gesamtgruppe verstorben, wobei etwa 77 % der Verstorbenen bereits bei Primäroperation ein fortgeschrittenes Karzinomleiden mit synchroner Fernmetastasierung aufwiesen.

Erwartungsgemäß zeigte sich insgesamt ein deutlich schlechteres Outcome bei den fortgeschrittenen Malignompatienten, das sich in den Überlebensraten widerspiegelte. Patienten mit Fernmetastasen zum Zeitpunkt der Primäroperation (Stadium IV nach UICC) zeigten eine mediane Überlebenszeit von 41 Monaten, bei zeitlich verzögertem Auftreten der Metastasen lag diese bei 51 Monaten.

Weiterhin stellte sich ein Unterschied in der 3-Jahres-Überlebensrate zwischen den Patienten mit synchroner Lebermetastasierung (Stadium IV nach UICC zum Diagnosezeitpunkt) von 64 % zu 83 % von denen mit metachroner Metastasierung (Stadien I-III nach UICC) dar.

Im Vergleich hierzu zeigen sich in der Literatur 5-Jahres-Überlebensraten von 25-60 % von Patienten, die eine Leberresektion bei kolorektalen Karzinomen erhielten [2, 20, 54], abhängig unter anderem vom diagnostizierten Tumorstadium bei Primäroperation.

Eine Berechnung der 5-Jahres-Überlebensraten war zum Zeitpunkt der Datenerhebung in dieser Arbeit nicht möglich und damit kein direkter Vergleich mit den in der Literatur genannten Daten. Jedoch werden in der Literatur mediane Überlebenszeiten von 24-40 Monaten angegeben [2], hier zeigten die Daten dieser Studie ein längeres medianes Überleben (siehe oben).

---

Karzinompatienten, die keiner Metastasenoperation zugeführt werden können, weisen in der Literatur ein erheblich kürzeres medianes Überleben von etwa 11 Monaten auf, mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von nahezu 0 % [2, 11, 20, 54].

Der Nachweis der Mitogen-aktivierten Proteinkinase Kinase 4 war mit in der Forschung bereits etablierten Nachweismethoden möglich [32, 42, 43, 62]. Für einen zuverlässigen molekularbiologischen Nachweis der Kinase in Lebermetastasen sowie im Normalgewebe der Leber wurde eine Nested-PCR-Methode (siehe **2.2** und **2.3**) verwendet, die in Bezug auf Temperatur und Zyklenzahl speziell auf die verwendeten Primer angepasst wurde. Mit dieser Methode wurde die transkribierte RNA der Kinase spezifisch aus den Gewebeproben vervielfältigt und mittels Gelelektrophorese anhand einer positiven Bandenbildung nachgewiesen.

Mögliche Fehlerquellen hierbei bestanden in falsch positiven Ergebnissen durch Verschmutzung durch Fremd-DNA und falsch negativen Ergebnissen, die vor allem durch Kettenabbrüche, z. B. durch denaturierte DNA, bzw. RNA verursacht wurden. Um diese Fehler zu vermeiden, durchliefen, wie bereits oben beschrieben (siehe **2.1.2** und folgende), in jedem Versuchsdurchlauf spezielle Standards dieselben Prozeduren und dienten als Kontrollproben. Bei Abweichung vom erwarteten Ergebnis (Positiv-, bzw. Negativkontrollprobe) wurde der Versuchsdurchlauf als ungültig erklärt und musste wiederholt werden. Auf diese Weise konnte die Richtigkeit der Ergebnisse in Bezug auf den MKK4-Nachweis gewährleistet werden.

Gleiches galt für den immunhistochemischen Nachweis der Kinase in Gewebeschnitten, auch hier gewährleisteten Kontrollproben (siehe **2.2.3**) die Richtigkeit der durchgeführten Färbungen.

Die Auswertung erfolgte semiquantitativ, unterschieden wurde in der Stärke des Nachweises anhand einer definierten Abgleichmethode (0: negativ; 0,5: schwach positiv; 1: positiv; 2: stark positiv). Diese Methode wurde gewählt, um mögliche geringe Unterschiede zwischen den drei Gruppen der untersuchten Proben aufzuzeigen. In der weiteren statistischen Auswertung wurden diese semiquantitativen Ergebnisse durch Mittelwerte und Standardabweichung wiedergegeben.

---

---

Insgesamt gelang es mittels Nested-PCR und Immunhistochemie in allen Gewebeproben aus Lebermetastasen die betreffende RNA bzw. MKK4 selbst nachzuweisen (Mittelwert 0,95; Standardabweichung 0,01). Bei 10 der Proben differierten die Ergebnisse zwischen Immunhistochemie und PCR-Nachweis in der Stärke der Positivität, wobei 4 Proben in der immunhistochemischen Färbung als stärker positiv gewertet wurden als im molekularbiologischen Nachweis, bei 6 Proben war das Ergebnis der PCR stärker positiv. Hierbei lag jedoch der Unterschied nur in der Stärke des Nachweises, nicht in dem Nachweis als solchen. Keine der Proben wies in einem der beiden Nachweismethoden einen positiven und mittels der anderen Methode einen negativen Nachweis auf. Insgesamt zeigten sich die verwendeten Methoden geeignet, das Vorkommen von MKK4 in Lebermetastasen kolorektaler Karzinome zuverlässig nachzuweisen, der Nachweis zeigte sich weiterhin positiv für alle untersuchten Proben. Damit sind Lebermetastasen kolorektaler Karzinome als MKK4-positiv anzusehen.

Ebenfalls gelang der Nachweis von MKK4 in kolorektalen Primärtumoren zuverlässig mit der verwendeten immunhistochemischen Färbung. Jede der 11 untersuchten Proben aus kolorektalen Primärtumoren zeigte einen positiven Nachweis von MKK4 (Mittelwert 0,96; Standardabweichung 0,14). Ein Nachweis der betreffenden Gensequenz mittels PCR gelang aus technischen Gründen nicht (siehe **2.1**), weiterhin fiel der Stichprobenumfang mit nur 11 Proben gering aus. Daher ist die Aussagekraft dieser Gruppe nur unter Vorbehalt zu betrachten.

Das in dieser Studie untersuchte Normalgewebe der Leber zeigte sich ebenfalls positiv für MKK4. Hier lag der Mittelwert bei 1,61 mit einer Standardabweichung von 0,56. Dabei unterschieden sich die Ergebnisse von PCR und immunhistochemischer Färbung. Während im ersten Verfahren der Mittelwert der Auswertung bei 1,21 lag (Standardabweichung 0,57), lag der Mittelwert bei der Färbung bei 2 (Standardabweichung 0), da sich hier alle Proben als stark positiv für MKK4 zeigten. Die Varianz zwischen den beiden Nachweismethoden lässt sich durch die Enzymaktivität des Lebergewebes erklären. Diese führte innerhalb kürzester Zeit nach Entnahme des Gewebes zu einer Zerstörung der Zellintegrität mit DNA-Denaturierung, ohne jedoch bereits gebildete Kinasen ebenso schnell zu zerstören. Obwohl alle Proben nach Gewinnung schnellstmöglich konserviert wurden, war es im Speziellen das gesunde Lebergewebe, das in der PCR mehrfach nicht verwertbare Ergebnisse lieferte. Hier mussten 5 von 7 Proben die Versuchsdurchläufe einer

---

PCR dreimal durchlaufen, da erst dann ein reproduzierbares Ergebnis vorlag. Unter Wahrung der bereits geschilderten Qualitätskontrollen können aber beide Nachweismethoden insgesamt als zuverlässiges Nachweisverfahren für MKK4 im Normalgewebe der Leber angesehen werden.

MKK4 war in dieser Studie positiv in allen untersuchten Proben aus Lebermetastasen. Es zeigten sich keine Einflüsse auf das Vorkommen durch Geschlecht oder Alter des Patienten sowie UICC-Stadium. Weiterhin konnten keine Unterschiede zwischen dem Nachweis der Kinase und dem Outcome bzw. dem Überleben der Patienten aufgezeigt werden.

Auch in den untersuchten Proben der Kontrollgruppen der kolorektalen Primärtumore und des Normalgewebes der Leber gab es keine auffälligen Unterschiede in dem Vorkommen der Kinase in Bezug auf Geschlecht, Alter oder Tumorstadium. Jedoch muss in den Kontrollgruppen einschränkend berücksichtigt werden, dass der Probenumfang in beiden Gruppen gering ausfiel.

Weder im untersuchten Metastasengewebe noch in den betreffenden Primärtumoren gab es eine Differenz im Nachweis der Kinase zwischen Proben mit synchronem gegenüber metachronem Auftreten der Lebermetastasen.

Eine Untersuchung der Expression von MKK4 in Hinblick auf die Differenzierung des Primärtumors war aufgrund fehlender Daten nur in der Gruppe der kolorektalen Primärtumore möglich (siehe **3.1**). Von den 7 gut- bis mittelgradig differenzierten (G1 und G2) Karzinomen zeigte sich bei einer Probe eines mittelgradig differenzierten Karzinoms ein schwacher Nachweis der Kinase. Die weiteren 6 Proben der G1- und G2-Tumore waren ebenso wie die 4 schlecht differenzierten Karzinome positiv für den Kinasennachweis in der Immunhistochemie (siehe **3.3**). Diese Daten deuten an, dass eine MKK4-Expression keinen Einfluss auf die Differenzierung eines kolorektalen Karzinoms ausübt, aufgrund des geringen Stichprobenumfangs ist diese Aussage jedoch durch größere Fallzahlen zu überprüfen.

Im Rahmen des Metastasierungsvorganges eines malignen Tumors kommt es zu einer Aussaat von Tumorzellen aus dem Primärtumor in die Körperflüssigkeiten und zu einem Transport in entfernte Körperregionen und Organe sowie zu einer Absiedelung von

---

---

Tochtergeschwulsten [1, 5, 41, 49, 62]. Ob eine Tumorzelle diesen Vorgang überlebt und ob eine Ausbildung in einem tumorfremden Organ möglich ist, hängt von vielen verschiedenen Zellfunktionen und Interaktionen ab [5, 19, 41, 49]. Neben Zellmembranmolekülen und proteolytischen Enzymen erwiesen sich in bisherigen Untersuchungen auch intrazelluläre Signalwege als entscheidend für die Metastasierungsfähigkeit maligner Tumorzellen [5].

Als einer der beteiligten Signalwege ist der stressaktivierte Signalweg (siehe **1.2**) bereits in früheren Studien untersucht worden. In einer Studie von Vander Griend et al. [55] zeigte sich in Tierversuchen durch Aktivierung von JNK und p38 in metastatischen Prostatakarzinomzellen eine Suppression des Metastasenwachstums in der Lunge. Da die JNK-Signalkaskade aus vielen verschiedenen Aktivierungsschritten mit beteiligten Mediatoren besteht (siehe Abbildung **1.1**) wurden einzelne dieser Mediatoren in weitergehenden Studien untersucht. Bei der Untersuchung von MKK4 zeigte sich ein verminderter Nachweis der Kinase in Prostatakarzinomzellen im Vergleich zu gesunden Zellen der Drüse. Weiterhin konnte in den Zellen des Primärtumors eine Downregulierung der Mitogen-activated Proteinkinase Kinase 4 während des Krebsprogresses nachgewiesen werden [32]. Damit wurde MKK4 als Signalmediator in der JNK-Signalkaskade eine wichtige Rolle als Tumorsuppressor in Prostatakarzinomen zugewiesen.

Diese Funktion als Tumorsuppressor konnte für MKK4 auch in Ovarialkarzinomen nachgewiesen werden. So zeigte sich in einer Studie von Yamada et al. 2002 [60] ein signifikanter Rückgang von Metastasenabsiedelungen um fast 90 % bei MKK4-positiven Ovarialkarzinomen der Maus im Gegensatz zu MKK4-negativen.

Eine ähnliche Wirkung von MKK als möglicher Tumorsuppressor deutete sich bei ersten Untersuchungen kolorektaler Karzinome des Menschen an [42]. Mirow et al. untersuchten 79 kolorektale Karzinome, wobei sich 56 als MKK4-positiv und 23 als negativ erwiesen. Es konnte in der Studie kein Zusammenhang zwischen der MKK4-Expression und dem Tumorstaging hergestellt werden. Statistisch zeigte sich jedoch eine Tendenz zu einem verlängerten Überleben aufgrund eines verlängerten rückfallfreien Intervalls bei positiver Expression von MKK4 [42]. Hier muss ergänzend gesagt werden, dass es sich um vorläufige Ergebnisse einer noch laufenden Studie handelt. In der Literatur sind bisher keine weiteren Studien beschrieben, die sich mit der Expression von MKK4 in kolorektalen Karzinomen und einer möglichen klinischen Relevanz beim Menschen befassen.

---

Der zunächst vermuteten Wirkung von MKK4 bei kolorektalen Karzinomen des Menschen mit einer aufgezeigten Verbesserung der Prognose bei positiver Expression [42] steht das hier vorliegende Studienergebnis gegenüber. In der Untersuchung von Mirow et al. [42] zeigte sich eine MKK4-Positivität bei 71 % der untersuchten Proben, 29 % der Proben waren negativ für die Kinase. Bei den 11 in der hier vorliegenden Studie untersuchten kolorektalen Primärtumoren zeigte sich sowohl eine positive MKK4-Expression als auch das Auftreten von Lebermetastasen. Es lag keine Probe mit positiver Expression der Kinase in der Lebermetastase und negativem Nachweis im Primärtumor vor. Es lag auch weiterhin kein negativer Primärtumor mit MKK4-positiver Lebermetastase vor. Eine mögliche Korrelation zwischen MKK4 in kolorektalen Primärtumoren und der Entstehung von Lebermetastasen kann daher mit letzter Konsequenz nicht ausgeschlossen werden.

Insgesamt geht ein metastasiertes Karzinomleiden mit einer deutlichen Verschlechterung der Überlebenszeit eines Patienten einher [2, 11, 24, 54]. Sollte eine MKK4-Positivität im Primärtumor mit einem erhöhten Auftreten von Lebermetastasen einhergehen muss ein kürzeres Überleben der Patienten befürchtet werden. Somit erscheint das vorliegende Ergebnis eine gegenteilige Wirkung von MKK4 in kolorektalen Karzinomen im Vergleich zu der vorhergehenden Untersuchung von Mirow et al. [42] aufzuzeigen. An dieser Stelle muss jedoch auf die geringe Anzahl der untersuchten kolorektalen Primärtumor (n = 11) eingegangen werden. In Bezug auf die Studie von Mirow et al. [42] ist nicht ausgeschlossen, dass nur aufgrund des geringen Stichprobenumfangs keine negativen Primärtumore mit Auftreten von Lebermetastasen nachgewiesen werden konnten. Aus diesem Grund sollten zur statistischen Kräftigung oder Widerlegung einer Korrelation zwischen der MKK4-Expression im kolorektalen Primärtumor und dem Auftreten von Lebermetastasen weitergehende Studien mit größerem Stichprobenumfang durchgeführt werden.

Weiterhin zeigte sich in der vorliegenden Arbeit eine positive Expression der Kinase in allen untersuchten Lebermetastasen. Dieses Ergebnis impliziert, dass im Rahmen einer Metastasenentstehung in der Leber die Expression von MKK4 im Metastasengewebe eine wichtige Funktion ausübt. Auch im normalen Lebergewebe zeigt sich eine Expression von MKK4, in dieser Studie wichen die Mittelwerte des Nachweises jedoch von denen des metastatischen Gewebes ab (1,61 Normalgewebe der Leber; 0,95 Lebermetastase). Ob die Expression im Normalgewebe in direktem Zusammenhang mit der Expression in der Metastase korreliert, lässt sich mit dem vorliegenden Studienmodell nicht untersuchen.

---

Anhand der hier vorliegenden Daten kann jedoch die Hypothese, dass MKK4 eine entscheidende Funktion während der kolorektalen Karzinogenese mit hämatogener Metastasierung zukommen könnte, aufgestellt werden.

Eine mögliche Funktion von MKK4 als pro-onkogenetischer Faktor in der Tumorgenese ist bereits 2003 in Lungenkrebszellen durch Lee et al. gezeigt worden. Zum Überleben von Lungenkrebszellen zeigte sich in Zellversuchen eine funktionierende JNK-Signalkaskade mit MKK4 als notwendig [35].

Eine pro-onkogenetische Funktion von MKK4 zeigte auch eine Studie von Wang et al. von 2004 [58], die eine Stimulation von Zellwachstum und Invasivität durch positive Expression von MKK4 in zuvor negativen Brust- und Pankreaszelllinien nachwies. Weitere Untersuchungen an Brustkrebszellen zeigten einen Rückgang des Tumorwachstums nach MKK4-Suppression. Nach erneuter Expression konnte ein weiteres Tumorwachstum nachgewiesen werden [14, 58].

Auch in Magenkarzinomen konnte durch Wu et al. [37] eine Minderung der rückfallfreien und Gesamtüberlebenszeit bei Patienten mit MKK4-positiven Karzinomzellen aufgezeigt werden. Daraus resultiert für MKK4 auch in Magenkarzinomen eine pro-onkogenetische Funktion.

Im Ganzen gesehen zeigt diese Studie, dass sich primäre Tumorzellen und abgesiedelte Metastasenzellen kolorektaler Karzinome in ihrer MKK4-Expression nicht unterscheiden. Zellen kolorektaler Karzinome scheinen bei positiver MKK4-Expression eine Fernmetastasierung auszubilden und diese Expression auch in den Metastasenzellen beizubehalten. Somit scheint MKK4 in kolorektalen Karzinomen als Bestandteil der stressaktivierten Proteinsignalkaskade ein notwendiger Faktor für eine Fernmetastasierung und Absiedelung in anderen Geweben zu sein.

Bezug nehmend auf die Tiermodelle von Yoshida et al. [62], bzw. Yamada et al. [60], die eine Tumorsuppression nach Transfektion MKK4-kompetenter DNA in zuvor MKK4-negativen Tumorzellen aufzeigten, wäre auch eine ähnliche Untersuchung an kolorektalen Karzinomzellen denkbar. Hierbei könnte die Hypothese bewiesen werden, dass ein Verlust der genetischen Sequenz für MKK4 in kolorektalen Karzinomen ein Metastasenwachstum hemmen, bzw. eine Metastasenregression verursachen würde. Somit könnte eventuell eine mögliche pro-onkogenetische Funktion von MKK4 auch in Lebermetastasen kolorektaler Karzinome bewiesen oder widerlegt werden.

---

Auch weitere Metastasierungsorte, wie z. B. Lymphknoten oder die Lunge, könnten im Rahmen zukünftiger Studienmodelle in Hinblick auf die MKK4-Expression untersucht werden.

Die Expression von MKK4 ist ein für die Entwicklung der Leber existenziell wichtiger Faktor. Bereits in früheren Studien war die Bedeutung der MKK4-Signalkaskade für die normale Entwicklung der Leber anhand von Mäuseembryonen untersucht worden [21]. Durch den homozygoten Verlust des MKK4-Genlokus trat ein Embryontod durch Hämorrhagien und abnormer Leberkonfiguration ein [21].

Auch in der hier vorliegenden Arbeit zeigten sich die Proben aus gesundem Lebergewebe als positiv für MKK4 (Mittelwert 1,61; Standardabweichung 0,56), in der immunhistochemischen Anfärbung sogar stark positiv (Mittelwert 2; Standardabweichung 0). Im Vergleich hierzu zeigte sich das metastatische Gewebe auch positiv, aber weniger stark (Mittelwert 0,95; Standardabweichung 0,01). Dieser Unterschied ist ein Anhaltspunkt dafür, dass sich Lebergewebe in Bezug auf die Expression von MKK4 von metastatischem Gewebe durch kolorektale Karzinome unterscheidet (siehe oben). Zur Bestärkung dieser Hypothese sind jedoch weitere Studien mit größerem Stichprobenumfang notwendig.

Dass sich gesunde Hepatozyten in der Regulierung von c-Jun über die MKK4-Signalkaskade von hepatozellulären Karzinomzellen unterscheiden, zeigte bereits 2002 eine experimentelle Arbeit von Comodo et al. [10]. Hier konnte sogar ein Rückgang der Proliferation von Zellformationen hepatozellulärer Karzinome durch Aktivierung der JNK-Signalkaskade nachgewiesen werden [10].

Unter der Annahme, dass sowohl die an Mäusen nachgewiesenen Ergebnisse [21] bzw. die in-vitro Zellmodelle [10] auf die humane Karzinogenese übertragbar sind, resultiert hieraus die Hypothese, dass auch während der humanen Karzinomentstehung und -proliferation in der Leber Änderungen in der JNK-Aktivierung entstehen. Inwieweit eine Änderung der MKK4-Expression diese Änderungen der JNK-Aktivierung bedingt, muss in weiteren Studien untersucht werden. Weiterhin ist fraglich, ob diese Mechanismen auch auf die Metastasenentstehung übertragbar sind.

---

---

Ziel dieser Arbeit war es, die Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase 4 in Lebermetastasen kolorektaler Karzinome nachzuweisen und eine klinische Bedeutung einer Expression anhand prospektiver Datenerhebung aufzuzeigen. Weiterhin sollte überprüft werden, ob Tumorzellen im Laufe ihrer Absiedelung Änderungen in der MKK4-Expression aufweisen und ob sich Metastasenzellen überhaupt von den in Vorstudien als MKK4-positiv nachgewiesenen Leberzellen unterscheiden.

Zum Nachweis von MKK4 in Lebermetastasen kolorektaler Karzinome haben sich sowohl die Nested-PCR, als auch die verwendete immunhistochemische Färbemethode als zuverlässig erwiesen. Beide Verfahren sind ebenso für den MKK4-Nachweis in gesundem Lebergewebe geeignet, das immunhistochemische Nachweisverfahren konnte erfolgreich auch für kolorektales Karzinomgewebe angewendet werden.

Die untersuchten Metastasenzellen kolorektaler Karzinome zeigten sich ohne Ausnahme als positiv für die Kinase. Auswirkungen der Expression von MKK4 in den Metastasen auf die Prognose der Patienten konnte nicht aufgezeigt werden. Es gab keine Abhängigkeit von Geschlecht oder Alter der betroffenen Patienten. Weiterhin zeigten sich keine Unterschiede in Bezug auf das bei Erstdiagnose vorliegende Tumorstadium oder den Differenzierungsgrad des Karzinoms.

Festgestellt werden konnte auch, dass sich die Primärtumoren in ihrer Expression von MKK4 nicht von Metastasenzellen unterscheiden. Alle untersuchten kolorektalen Karzinomzellen waren positiv für MKK4, weiterhin lagen bei den betreffenden Patienten Lebermetastasen vor. Die positive Expression von MKK4 könnte damit ein entscheidender Faktor für eine hämatogene Metastasierung sein, außerdem deutete sich an, dass Karzinomzellen die positive Expression von MKK4 während des Metastasierungs Vorgang beibehalten. Damit könnte MKK4 eine wichtige Bedeutung im Rahmen des Metastasierungsprozesses bei kolorektalen Karzinomen zukommen.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich Metastasenzellen vom gesunden Lebergewebe im Nachweis der untersuchten Kinase unterscheiden, wenn auch nur geringfügig.

Insgesamt sind diese Zusammenhänge jedoch in weiteren Studien mit größeren Fallzahlen einer weiteren Prüfung zu unterziehen. Sollten sich die aufgestellten Hypothesen hierbei bewahrheiten, könnte die Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase 4 in kolorektalen Karzinomen einen wichtigen Prognoseparameter in Bezug auf die Metastasierungs tendenz unabhängig vom klinischen Tumorstadium darstellen.

---

---

## **5. Zusammenfassung**

Die Zielsetzung dieser Arbeit war es, ein geeignetes Nachweisverfahren für die Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase 4 in Lebermetastasen kolorektaler Karzinome beim Menschen zu etablieren und eine klinische Bedeutung der Expression anhand einer prospektiven Datenbank der Klinik für Chirurgie des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, zu untersuchen. Weiterhin sollten zur Untersuchung der Funktion von MKK4 während des Metastasierungsvorgangs auch primäre kolorektale Karzinome den Nachweisverfahren unterzogen werden.

Es gelang, 34 Proben aus Lebermetastasen kolorektaler Karzinome mittels Nested-PCR und immunhistochemischer Färbung einem semiquantitativen MKK4-Nachweis zu unterziehen. 11 Proben kolorektaler Primärtumore der Patienten aus dem Metastasenkollektiv konnten ebenfalls mittels immunhistochemischer Färbung einem MKK4-Nachweis unterzogen werden. Zum Vergleich der metastatischen Leberzellen mit gesunden Zellen diente eine Kontrollgruppe mit 7 Proben aus Normalgewebe der Leber.

Es konnte in dieser Studie ein zuverlässiges Nachweisverfahren für MKK4 sowohl in Lebergeweben als auch in kolorektalen Karzinomzellen etabliert werden. Insgesamt zeigten sich alle Proben der drei Gruppen positiv für MKK4, es waren keine Unterschiede im Nachweis zwischen den Proben der Lebermetastasen (Mittelwert 0,95;  $s = 0,01$ ) und den kolorektalen Primärtumoren (Mittelwert 0,96;  $s = 0,14$ ) aufweisbar. Zwischen dem Normalgewebe der Leber (Mittelwert 1,61;  $s = 0,56$ ) und den Metastasenzellen konnte ein Unterschied in Bezug auf die Stärke der MKK4-Expression gezeigt werden.

Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass alle Lebermetastasenzellen kolorektaler Karzinome positiv für MKK4 sind, es zeigte sich keine Abhängigkeit von Geschlecht oder Alter der Patienten, vom Tumorstadium oder Tumorgrading der Primärtumore. MKK4-positive Tumorzellen kolorektaler Karzinome metastasieren in die Leber und verlieren auch während des Metastasierungsprozesses nicht die Expressionsfähigkeit für MKK4. Damit könnte MKK4 eine wichtige Funktion in der Entwicklung von Lebermetastasen kolorektaler Karzinome zukommen und einen möglichen prognostischen Faktor unabhängig vom Tumorstadium darstellen.

Weitere Untersuchungen mit größeren Fallzahlen sind jedoch notwendig, um diese Hypothese zu bestärken.

---

---

## **6. Literaturverzeichnis**

1. **Ahmad SA, Berman RS, Ellis LM:**  
Biology of colorectal liver metastases.  
Surg Oncol Clin N Am. 2003 Jan; 12(1): 135-50.
  2. **Benson AB:**  
Epidemiology, disease progression, and economic burden of colorectal cancer.  
J Manag Pharm 2007; 13(6): 5-18.
  3. **Böcker W, Denk H, Heitz P:**  
Pathologie, 2. Auflage.  
Urban & Fischer Verlag, München, 2001; 189-92, 204, 207-9; 693-7; 739.
  4. **Bruch HP, Trentz O:**  
Chirurgie, 5. Auflage. Berchtold R, Hamelmann H, Pieper HJ.  
Urban & Fischer Verlag, München, 2006; 833-67; 914-5; 281-92.
  5. **Cairns RA, Khokha R, Hill RP:**  
Molecular mechanism of tumor invasion and metastasis: an integrated view.  
Curr Mol Med. 2003 Nov; 3(7): 659-71.
  6. **Celestino A, Castillo T, Frisancho O, Contardo C, Espejo H, Tomioka C, Navarette J:**  
Colorectal cancer: study on 365 cases.  
Rev Gastroenterol Peru 1996 Sep-Dec; 16(3): 187-96.
  7. **Chae KS, Ryu BK, Lee MG, Byun DS, Chi SG:**  
Expression and mutation analysis of MKK4, a candidate tumor suppressor gene encoded by chromosome 17p, in human gastric adenocarcinoma.  
Eur J Cancer 2002 Oct; 38(15): 2048-57.
  8. **Chuang SM, Yang JL:**  
Comparison of roles of three mitogen-activated kinases induced by chromium (VI) and cadmium in non-small lung carcinoma cells.  
Molecular and Cellular Biochemistry 2001; 222: 85-95.
-

- 
9. **Colquhoun PH, Wexner SD:**  
Surgical management of colon cancer.  
Curr Gastroenterol Rep. 2002 Oct; 4(5): 414-9.
  10. **Comodo F, Shino Y, Hirano T, Okutomi Y, Okamoto H, Hayashi Y, Suyama T, Ebara M, Saisho H, Shirasawa H:**  
MEKK1 induces c-Jun complexes that act as negative regulators for cell survival and proliferation of HCC cells.  
Int J Oncol. 2002 Sep; 21(3): 553-9.
  11. **Compton C:**  
Colorectal carcinoma: Diagnostic, prognostic and molecular features.  
Mod Pathol 2003; 16(4): 376-88.
  12. **Cuenda A:**  
Mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4).  
Int. J. Biochem Cell Biol 2000 Jun; 32(6): 581-7.
  13. **Deacon K, Blank JL:**  
Characterization of the mitogen-activated protein kinase kinase 4(MKK4)/c-Jun NH2-terminal kinase 1 and MKK3/p38 pathways regulated by MEK kinases 2 and 3. MEK kinase 3 activates MKK3 but does not cause activation of p38 kinase in vivo.  
J Biol Chem 1997 May 30; 272(22): 14489-96.
  14. **Debies MT, Welch DR:**  
Genetic basis of human breast cancer metastasis.  
J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2001 Oct; 6(4): 441-51.
  15. **Denk H, Klimpfinger M:**  
Colorectal cancer: Classification and aspects of the proliferation kinetics.  
Wien Med Wochenschr. 1988 Jun 30; 138 (11-12): 288-92.
  16. **Derijard B, Raingeaud J, Barrett T, Wu IH, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ:**  
Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms  
Science 1995 Feb 3; 267(5198): 682-5.
  17. **Drebber U, Dries V, Dienes HP, Kasper HU:**  
Lebermetastasen. Inzidenz und Verteilung. Eine Untersuchung aus dem Leberregister der Universität zu Köln.  
Z Gastroenterol. 2005; 43 DOI: 10.1055/ s-2005-920160.
-

- 
18. **Fang WL, Chang SC, Lin JK, Wang HS, Yang SH, Jiang JK, Chen WC, Lin TC:**  
Metastatic potential in T1 and T2 colorectal cancer.  
Hepatogastroenterology. 2005 Nov-Dec; 52(66): 1688-91.
  19. **Fidler IJ:**  
Origin and biology of cancer metastasis.  
Cytometry. 1989 Nov; 10(6): 673-80.
  20. **Flieger D, Keller R, Fischbach W:**  
Palliative treatment for colorectal cancer.  
Der Internist 2004, 10.1007/00108-004-1215-6.
  21. **Ganiatsas S, Kwee L, Fujiwara Y, Perkins A, Tohru I, Labow MA, Zon LI:**  
SEK1 deficiency reveals mitogen-activated protein kinase cascade crossregulation and leads to abnormal hepatogenesis.  
Proc Natl Acad Sci USA. 1998; 95: 6881-86.
  22. **Gan S, Wilson K, Hollington P:**  
Surveillance of patients following surgery with curative intent for colorectal cancer.  
World J Gastroenterol 2007 13(28): 3816-23.
  23. **Gemsenjäger E:**  
The classification system of Dukes and its modification for rectal and colonic cancers.  
Helv Chir Acta. 1981 Apr; 48(1-2): 265-72.
  24. **Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das RKI:**  
Krebs in Deutschland.  
5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe. Saarbrücken, 2006.
  25. **Hamilton SR:**  
The adenoma-adenocarcinoma sequence in the large bowel: variations on a theme.  
J Cell Biochem Suppl. 1992; 16 G: 41-6.
  26. **[http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway/:](http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway/)**  
Tag des letzten Zugriffs: 31.12.2007
  27. **<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez:>**
-

- 
- Tag des letzten Zugriffs: 01.01.2008
28. **[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez:](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez)**  
Tag des letzten Zugriffs: 01.01.2008
29. **Jayne D:**  
Molecular biology of peritoneal carcinomatosis.  
Cancer Treat Res. 2007; 134: 21-33.
30. **Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ:**  
Cancer Statistics 2007.  
CA Cancer J Clin 2007; 57: 43-66.
31. **Kennedy NJ, Davis RJ:**  
Role of JNK in tumor development.  
Cell Cycle. 2003 May-Jun; 2(3): 199-201.
32. **Kim HL, Vander Griend DJ, Yang X, Benson DA, Dubauskas Z, Yoshida BA, Chekmareva MA, Ichikawa Y, Sokoloff MH, Zhan P, Karrison T, Lin A, Stadler WM, Ichikawa T, Rubin MA, Rinker-Schaeffer CW:**  
Mitogen-activated protein kinase kinase 4 metastasis suppressor gene expression is inversely related to histological pattern in advancing human prostatic cancers.  
Cancer Res 2001 Apr 1; 61(7): 2833-7.
33. **Kindler HL, Shulman KL:**  
Metastatic colorectal cancer.  
Curr Treat Options Oncol 2001 Dec; 2(6): 459-71.
34. **Kosmider S, Lipton L:**  
Adjuvant therapies for colorectal cancer.  
World J Gastroenterol 2007; 13(28): 3799-805.
35. **Lee HY, Srinivas H, Xia D, Lu Y, Superty R, LaPushin R, Gomez-Manzano C, Gal AM, Walsh GL, Force T, Ueki K, Mills GB, Kurie JM:**  
Evidence that phosphatidylinositol 3-kinase- and mitogen-activated protein kinase kinase-4/cJun NH2-terminal kinase-dependent Pathways cooperate to maintain lung cancer cell survival.  
J Biol Chem. 2003 Jun 27; 278(26): 23630-8.
36. **Lê P, Mehtari L, Billey C:**  
Carcinoma of the transverse colon.  
J Chir (Paris) 2006 Sep-Oct; 143(5): 285-93.
-

- 
37. **Lin W, Kao HW, Robinson D, King HJ, Wu CW, Chen HC:**  
Tyrosine kinases and gastric cancer.  
Oncogene. 2000 Nov 20; 19(49): 5680-9.
38. **Liu LX, Zhang WH, Jiang HC:**  
Current treatment for liver metastasis from colorectal cancer.  
World J Gastroenterol. 2003 Feb; 9(2): 193-200.
39. **Majer M, Akerley W, Kuwada SK:**  
Oncologists' current opinion on the treatment of colon carcinoma.  
Anticancer Agents Med Chem. 2007 Sep; 7(5): 492-503.
40. **Mamounas E, Wieand S, Wolmark N, Bear HD, Atkins JN, Song K, Jones J, Rockette H:**  
Comparative efficacy of adjuvant chemotherapy in patients with Dukes' B versus Dukes' C colon cancer: results from four National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project adjuvant studies (C-01, C-02, C-03, C-04).  
J Clin Oncol. 1999 May; 17(5): 1349-55.
41. **Marhaba R, Zöller M:**  
CD44 in cancer progression: adhesion, migration and growth regulation.  
J Mol Histol. 2004 Mar; 35(3): 211-31.
42. **Mirow L, Stannek L, Bruch HP:**  
Die Bedeutung der Expression von MKK4 in kolorektalen Karzinomen.  
Publikation in Vorbereitung.
43. **Mullis KB:**  
Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction.  
Ann Biol Clin (Paris). 1990; 48(8): 579-82.
44. **Papagiorgis P, Oikonomakis I, Karapanagiotou I, Wexner SD, Nikiteas N:**  
The impact of tumor location on the histopathologic expression of colorectal cancer.  
J Buon. 2006 Jul-Sep; 11(3): 317-21.
45. **Penna C, Nordlinger B:**  
Colorectal metastasis (liver and lung).  
Surg Clin North am. 2002 Oct; 82(5): 1075-90.
46. **Raghammar P, Hafström L, Nygren P, Glimelius B:**  
A systematic overview of chemotherapy effects in colorectal cancer.  
Acta Oncol. 2001; 40(2-3): 282-308.
-

- 
47. **Ricciardi R, Madoff RD, Rothenberger DA, Baxter NN:**  
Population-based analyses of lymph node metastases in colorectal cancer.  
*Clin Gastroenterol Hepatol.* 2006 Dec; 4(12): 1522-7.
48. **Robinson VL, Hickson JA, Vander Griend DJ, Dubauskas Z, Rinker-Schaeffer CW:**  
MKK4 and metastasis suppression: a marriage of signal transduction and metastasis research.  
*Clin Exp Metastasis.* 2003; 20(1): 25-30.
49. **Schirmacher V:**  
Cancer metastasis: experimental approaches, theoretical concepts and impacts for treatment strategies.  
*Adv Cancer Res.* 1985; 43: 1-73.
50. **Sobin LH, Wittekind CH:**  
TNM Classification of Malignant Tumours, 6. Auflage;  
Wileys-Liss Verlag, New York, 2002; 72-76.
51. **Su GH, Hilgers W, Shekher MC, Tang DJ, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE:**  
Alterations in Pancreatic, Biliary and Breast Carcinomas Support MKK4 as a Genetically Targeted Tumor Suppressor Gene.  
*Cancer Research* 58, 1998; 2339-42.
52. **Takahashi H, Yoneda K, Tomimoto A, Endo A, Endo H, Fusijawa T, Iida H, Mawatari H, Nozaki Y, Ikeda T, Akiyama T, Yoneda M, Inamori M, Abe Y, Saito Y, Nakajima A, Nakagama H:**  
Life style-related diseases of the digestive system: Colorectal cancer as a lifestyle-related disease: From carcinogenesis to medical treatment.  
*J Pharmacol Sci* 105 (2007); 129-32.
53. **Teng D HF, Perry III WL, Hogan JK, Baumgard M, Bell R, Berry S, Davis T, Frank D, Frye C, Hattier T, Ju R, Jammulapati S, Janecki T, Leavitt A, Mitchell JT, Pero R, Sexton D, Schroeder M, Su PH, Swedlund B, Kyriakis JM, Avruch J, Bartel P, Wong AKC, Oliphant A, Thomas A, Skolnick MH, Tavtigian SV:**  
Human mitogen-activated protein kinase kinase 4 as a candidate tumor suppressor.  
*Cancer Research* 57, 1997 Oct; 4177-82.54.
-

- 
54. **Tomlinson JS, Jarnagin WR, DeMatteo RP, Fong Y, Kornprat P, Gonen M, Kemeny N, Brennan MF, Blumgart LH, D'Angelica M:**  
Actual 10-year survival after resection of colorectal liver metastases defines cure.  
J Clin Oncol, Oct 2007, 25(29): 4575-80.
55. **Vander Griend DJ, Kocherginsky M, Hickson JA, Stadler WM, Lin A, Rinker-Schaeffer CW:**  
Suppression of metastatic colonization by the context-dependent activation of the c-Jun-NH2-terminal kinase kinases JNKK1/MKK4 and MKK7.  
Cancer Research 65, Dec 1, 2005; 10984-91.
56. **Wada T, Nakagawa K, Watanabe T, Nishitai G, Seo J, Kishimoto H, Kitagawa S, Sasaki T, Penninger JM, Nishina H, Katada T:**  
Impaired Synergistic Activation of Stress-activated Protein Kinase SAPK/JNK in Mouse Embryonic Stem Cells Lacking SEK1/MKK4.  
J Biol Chem 2001, 276(33); 30892-97.
57. **Wanebo HJ, Chu OD, Vezeridis MP, Soderberg C:**  
Patient selection for hepatic resection of colorectal metastases.  
Arch Surg 1996 Mar; 131(3): 322-9.
58. **Wang L, Pan Y, Dai JL:**  
Evidence of MKK4 pro-oncogenic activity in breast and pancreatic tumors.  
Oncogene 2004 Aug 5; 23(25): 5978-85.
59. **Wu CW, Li A, Chi CW, Huang CH, Shen KH, Liu WY, Lin WC:**  
Human gastric cancer kinase profile and prognostic significance of MKK4 kinase.  
American Journal of Pathology. 2000; 156(6): 2007-15.
60. **Yamada SD, Hickson JA, Hrobowski Y, Vander Griend DJ, Benson D, Montag A, Karrison T, Huo D, Rutgers J, Adams S, Rinker-Schaeffer CW:**  
Mitogen-activated protein kinase kinase acts as a metastasis suppressor gene in human ovarian carcinomas.  
Cancer Res 2002 Nov 15; 62(22): 6717-23.
61. **Yang D, Tournier C, Wysk M, Lu HT, Xu J, Davis RJ, Flavell RA:**  
Targeted disruption of the MKK4 gene causes embryonic death, inhibition of c-Jun-NH2-terminal kinase activation, and defects in AP-1 transcriptional activity.
-

Proc Natl Acad Sci USA. 1997 Apr 1; 94(7): 3004-9.

62. **Yoshida BA, Dubauskas Z, Chekmareva MA, Christiano TR, Stadler W, Rinker-Schaeffer CW:**

Mitogen-activated protein kinase kinase 4/ stress-activated protein/ ERK kinase 1 (MKK4/ SEK1), a prostate cancer metastasis suppressor gene encoded by human chromosome 17.

Cancer Research 59, 1999 Nov: 5483-7.

---

## 7. Anhang

### 7.1 Materialliste

Die nachfolgende Tabelle (Tabelle 7.1) bietet einen ergänzenden Überblick über verwendete Materialien. Weitere in 2.1 und 2.2 erwähnte Geräte gehören zum dauerhaften Inventar des chirurgischen Forschungslabors der Universität zu Lübeck und sind in den dortigen Inventarlisten zu finden.

Geräte	Firma	Ort	Land
Biofuge 22 R	Heraeus	Hanau	D
Cyclone 25	PEQLAB Biotechnology	Erlangen	D
Feinwaage Mettler PC 400	Mettler-Toledo	Giessen	D
Horizontal Elektrophoresekammer	Fröbel	Wasserburg am Bodensee	D
Magnetrührer IKA-Combimag RCT	Jahnke & Kunkel	Staufen	D
Mikroskop Axioplan	Zeiss	Jena	D
Mikroskop Axiovert	Zeiss	Jena	D
Nadeldrucker Citizen 120D	Citizen	Feltham	GB
Photodokumentationsanlage	Mitsubishi	Ratingen	D
Primus PCR-Thermo-Cycler 96plus	MWG Biotech	Ebersberg	D
Spektrophotometer DU 640	Beckmann-Coulter	Fullerton	USA
Sterilbank Class II Type A/B 3	NUAIRE	Plymouth	USA
Sterilbank GEALAIRES BSB 4A	ICN	Eschwege	D
Stromgeber E 443	Consort	Turnhout	B
Thermomixer Compact	eppendorf	Hamburg	D
UltraTurrax IKA	Jahnke & Kunkel	Staufen	D
UV-Schirm	Fröbel	Wasserburg am Bodensee	D
UV-Schirm Auswerteeinheit	MWG Biotech	Ebersberg	D
Vortex Genie 2	Scientific Industries	New York	USA

#### **Enzyme und Kits**

Antibody-Dilution	Dako-Cytomation	Glostrup	DK
DNA-Polymerization-Mix	Amersham Biosciences	New Jersey	USA
Envision Protein-Blocking Solution	DAKO	Glostrup	DK
Protein Block Serum-Free	Dako-Cytomation	Glostrup	DK
Ready-To-Go-You-Prime-First-Beads	Amersham Biosciences	Piscataway	USA
Taq-Polymerase	Invitrogen	Carlsbad	USA

#### **Primer und Antikörper**

HeLa-S3-Zellen	DSMZ GmbH	Braunschweig	D
MAP-Kinase Antikörper	Sigma-Aldrich	München	D
Oligo-dT	Amersham Biosciences	Piscataway	USA
Primer MKK4 c11a	MWG-Biotech	Ebersberg	D
Primer MKK4 c12s	MWG-Biotech	Ebersberg	D
Primer MKK4 s/a	MWG-Biotech	Ebersberg	D
Primer $\beta$ 2-Mikroglobulin s/a	MWG-Biotech	Ebersberg	D
Rabbit-Immunglobulin (Danish-Whites)	DAKO	Glostrup	DK

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Firma</b>	<b>Ort</b>	<b>Land</b>
Biosphere Filtertips 0,5-10 µl	Sarstedt	Nürnbergrecht	D
Biosphere Filtertips 10-100 µl	Sarstedt	Nürnbergrecht	D
Biosphere Filtertips 100-1000 µl	Sarstedt	Nürnbergrecht	D
Cryo Vials 2ml	Greiner bio-one	Frickenhausen	D
Deckgläschen	Wenzel	Dilsberg	D
Eppendorfcups	eppendorf	Hamburg	D
Faltenfilter 595 1/2	Schleicher & Schuell	Dassel	D
Fettstift	DAKO	Glostrup	DK
KIMWIPES Präzisionstücher	Kimberly-Clark	Mainz	D
Mikrosafety Röhrchen	Sarstedt	Nürnbergrecht	D
Mikroschraubröhre 1,5ml	Sarstedt	Nürnbergrecht	D
Objekträger SuperFrost® Plus	Menzel	Braunschweig	D
PCR-Cups	Greiner bio-one	Frickenhausen	D
Pipette 10-100 µl	eppendorf	Hamburg	D
Pipette 100-100 µl	eppendorf	Hamburg	D
Pipetten 0,5-10 µl	eppendorf	Hamburg	D
Pipettenspitzen	eppendorf	Hamburg	D
PP-Röhrchen steril 15 ml	Greiner bio-one	Frickenhausen	D
PP-Röhrchen steril 5 ml	Greiner bio-one	Frickenhausen	D
PP-Röhrchen steril 50 ml	Greiner bio-one	Frickenhausen	D
Schraubdeckelcups	Sarstedt	Nürnbergrecht	D

#### **Chemikalien**

AEC 3-Amino-9-Ethylcarbazol	Sigma-Aldrich	Steinheim	D
Agarose	Lifetechnologies	Paisley	GB
Aqua ad iniectabilia	Delta Select	Pfullingen	D
Aquatex	Merck	Darmstadt	D
DMSO	Merck	Darmstadt	D
Elektrophorese Standard	Roche	Grenzach-Wyhlen	D
Eukitt	Sigma-Aldrich	München	D
Paraffin	Roche	Grenzach-Wyhlen	D
SDS	Sigma-Aldrich	München	D
Ethidiumbromid	Roth	Karlsruhe	D

#### **Chemikalien aus der Apotheke des Universitätsklinikum**

Autoklaviertes Aqua			
Chloroform			
Eosin			
Ethanol			
Formalin			
Hämatoxylin			
Isopropanol			
Millipore-Lösung			
Stickstoff			
Trizol			
Wasserstoffperoxid			
Xylol			

Eine Genehmigung des Forschungsvorhabens durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck liegt unter dem Aktenzeichen 06-039 vom 27.06.2006 vor (siehe **2.1.2**).

---

## 7.2 Lösungen und Gemische

### Barbitalpuffer:

- 0,1 M Barbital
- pH 7,4

### TAE-Puffer :

- 40 mMol Tris-Acetat
- 2 mM EDTA
- pH 8,3- 8,5

### Agarosegel-Probenpuffer („Schwere Lösung“):

- TAE-Puffer mit 50 % (v/v) Glycerin
- 0,1 % (w/v) Bromphenolblau
- 1 % (w/v) Xylencyanol

### Tris-Puffer:

- 7,5 mM Tris-Base
- 43,5 mM Tris-HCl
- 150 mM NaCl
- pH 8,0 (7,4- 7,6)

### Citratpuffer :

- 100 mM Zitratmonohydrat
  - 110 mM Natriumcitrat
  - pH 6,0
-

### 7.3 MKK4-Gensequenz

```

1      ctccaacaa tggcggctcc gagcccgagc ggcggcggcg gctccggggg cggcagcggc
61     agcggcacc cggcccgcgt agggcccccg gcgcccaggcc acccggccgt cagcagcatg
121    cagggtaaac gcaaagcact gaagttgaat tttgcaaate cacctttcaa atctacagca
181    aggtttactc tgaatcccaa tcctacagga gttcaaaacc cacacataga gagactgaga
241    acacacagca ttgagtcate aggaaaactg aagatctccc ctgaacaaca ctgggatttc
301    actgcagagg acttgaaaga ccttgagaga attggacgag gagcttatgg ttctgtcaac
361    aaaatggctc acaaccaag tgggcaaata atggcagtta aaagaattcg gtcaacagtg
421    gatgaaaaag acaaaaaaca acttcttatg gatttggatg tagtaatgcg gagtagtgat
481    tgccataca ttgttcagtt ttatggtgca ctcttcagag agggtgactg ttggatctgt
541    atggaactca tgctacctc gtttgataag ttttacaat atgtatatag tgtattgat
601    gatagatttc tgaagaaat tttaggcaaa atcactttag caactgtgaa agcataaac
661    cacttaaaag aaaacttgaa aattattcac agagatatca aaccttcaa tattctctg
721    gacagaagtg gaaatatta gctctgtgac ttcggcatca gtggacagct tgtggactct
781    attgccaaga caagagatgc tggctgtagg ccatacatgg cactgaaag aatagacca
841    agcgcacac gacaaggata tgatgtccgc tctgatgtct ggagtttggg gatcacattg
901    atcagattgg ccacaggccg atttccttat ccaaagtgga atagtgtatt tgatcaacta
961    taataactcg attgatcaca tcctccgtag ctgagtaatt ctgaggaaag ggaattctcc
1021   ccgagtttca tcaactttgt caactgtgac ctacgaagg atgaatcaa aaggccaaag
1081   tataaagagc ttctgaaaca tccttttatt ttgatgtatg aagaacgtgc cgttgaggtc
1141   gcatgctatg tttgtaaaat cctggatcaa atgccagcta ctccagctc tcccattgat
1201   gtcgattgat atcgtctgta catcagactc tagaaaaaag ggctgagagg aagcaagacg
1261   taaagaattt tcatcccgtc tcacagtgtt ttatttgctc gccagacac catgtgcaat
1321   aagattgggt ttcgtttcca tcatgtctgt atactcctgt cacctagaac gtgcatcctt
1381   gtaataactg attgatcaca cagtgttagt gctggtcaga gagacctcat ctgctctttt
1441   tgtgatgaac atattcatga aatgtggaag tcagtacgat caagttgttg actgtgatta
1501   gatcacatct taaattcatt tctagactca aaacctggag atgcagctac tggaatgggtg
1561   ttttgtcaga cttccaaatc ctggaaggac acagtgatga atgtactata tctgaacata
1621   gaaactcggg cttgagtgag aagagcttgc acagccaacg agacacattg ccttctggag
1681   ctgggagaca aaggaggaat ttactttctt caccaagtgc aatagattac tgatgtgata
1741   tctgttagct ttacagttac agttagcttt tggggatcga tgtgctcagc caaatttctt
1801   gtttgaaata tcatgttaaa ttagaatgaa ttatcttcta ccaaaaacca tgttgcggtc
1861   aaagaggtga acattaaaat atagagacag gacagaatgt gttcttttct cctctaccag
1921   tcctattttt caatgggaag actcaggagt ctgccacttg tcaaagaagg tgctgatcct
1981   aagaattttt cattctcaga attcgggtgtg ctgccaactt gatgttccac ctgccacaaa
2041   ccaccaggac tgaagaaga aaacagtaca gaaggcaaaag tttacagatg tttttaattc
2101   tagtatttta ctggaacaa cttgtagcag ctatatattt ccccttggtc ccaagcctga
2161   tactttagcc atcataactc actaacaggg agaagttagt agtagcaatg tgctttgatt
2221   gattagataa agatttctag taggcagcaa aagaccaaat ctcagttggt tgcttcttgc
2281   catcactggg ccaggtcttc agtttcogaa tctctttccc ttcccctgtg gtctattgtc
2341   gctatgtgac ttgcgcttaa tccaatattt tgcctttttt ctatatcaaa aaacctttac
2401   agttagcagg gatgttctct accgaggatt ttaaccccc aatctctcat aatcgtagt
2461   gtttaaaagg ctaagaatag tggggcccaa ccgatgtggt aggtgataaa gaggcatcct
2521   ttctagagac acattggacc agatgaggat ccgaaacggc agcctttacg ttcacacctt
2581   gctagaacct ctcgtagtcc atcaccattt ctgggcattg gaattctact ggaaaaaaat
2641   acaaaaagca aaacaaaacc ctcagcactg ttacaagagg ccatttaagt atcttgtgct
2701   tcttacttta ccattagcc aggttctcat taggttttgc ttgggcctcc ctggcactga
2761   accttaggct ttgtatgaca gtgaagcagc actgtgagtg gttcaagcac actggaatat
2821   aaaacagtc tggcctgaga tgcaggtgat gccattacag aaccaaactg tggcacgtat
2881   tgctgtgtct cctctcagag tgacagtcat aaatactgtc aaacaataaa gggagaatgg
2941   tgctgtttaa agtcacatcc ctgtaaatg cagaattcaa aagtgattat ctctttgatc
3001   tacttgctc atttccctat ctctcccc acggtatcct aaactttaga ctcccactg
3061   ttctgaaagg agacattgct ctatgtctgc cttcgaccac agcaagccat catcctccat
3121   tgctcccggg gactcaagag gaatctgttt ctctgctgtc aacttcccat ctggctcagc
3181   atagggtcac tttgccatta tgc aaatgga gataaaagca attctggctg tccaggagct
3241   aatctgacc ttctattgtg tggatgacca cataagaagg caattttagt gtattaaatca
3301   tagattatta taaactataa acttaagggc aaggagtta ttacaatgta tctttattaa
3361   aacaaaaggg tgtatagtgt tcacaaactg tga aaatagt gtaagaactg tacattgtga
3421   gctctggtta tttttctctt gtaccataga aaaatgtata aaaattatca aaaagcta
3481   gtgcagggat attgccttat ttgtctgtaa aaaatggagc tcagtaacat aactgcttct
3541   tggagctttg gaatatttta tcctgtattc ttgttt

```

---

## **8. Danksagung**

Ich möchte mich bei allen Personen herzlich bedanken, die mich bei der Durchführung der Arbeit in jeglicher Art und Weise unterstützt haben.

### **Mein besonderer Dank gilt:**

Herrn PD Dr. med. Lutz Mirow als meinem Doktorvater für das Überlassen des Themas und die hervorragende Unterstützung während der gesamten Durchführung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. H.-P. Bruch als Leiter der Klinik für Chirurgie der Universität zu Lübeck für das Bereitstellen des Arbeitsplatzes im chirurgischen Forschungslabor, sowie für das Überlassen des Materials und der Patientendaten. An dieser Stelle nochmals Dank an Prof. Dr. Alfred C. Feller für das Überlassen der histologischen Schnitte der primären kolorektalen Karzinome aus dem Institut für Pathologie der Universität zu Lübeck.

Herrn Prof. Dr. med. R. Broll für seine fachliche Unterstützung bei der Erarbeitung der Promotionsschrift.

In Gedenken Herrn PD Dr. rer. nat. Michael Duchrow, der mir mit fachlicher Beratung und freundlicher Hilfe bei vielen Problemen in der Methodenerarbeitung zur Seite stand.

Frau Claudia Killaitis als Dokumentationsassistentin der kolorektalen Tumordatenbank für die Erfassung und Zusammenstellung der Patientendaten.

Den technischen Assistentinnen des chirurgischen Forschungslabors, Frau Regina Kaatz, Frau Elke Gheribi, Frau Gisela Grosser-Pape, Frau Vera Grobleben und Frau Annemarie Aumüller, für die Hilfe bei der Erarbeitung und Durchführung der Methoden und die freundliche Atmosphäre im Forschungslabor.

Meiner Familie und im Speziellen meinen Eltern für ihre Unterstützung während des gesamten Studiums und der Promotion.

---

---

## **9. Lebenslauf**

Name: Katja Oberhagemann  
Geburtsdatum: 20.06.1980  
Geburtsort: Hamburg

### **Schulische Ausbildung**

1986-1990 Grundschule am Schloss, Ahrensburg  
1990-1999 Gymnasium des Schulzentrums am Heimgarten, Ahrensburg

### **Studium**

09/ 1999 Immatrikulation an der Universität zu Lübeck  
09/ 2001 Ärztliche Vorprüfung  
09/ 2002 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
04/ 2005 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
04/ 2005- 03/ 2006 Praktisches Jahr:  
04/ 2005- 08/ 2005 Klinik für Chirurgie, UK-SH, Campus Lübeck  
08/ 2005- 11/ 2005 Klinik für Innere Medizin, Westküstenklinikum Heide  
11/2005- 03/ 2006 Klinik für Urologie, UK-SH, Campus Lübeck  
04/ 2006 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### **Ärztliche Tätigkeit**

Seit 05/ 2006 Assistenzärztin in der Abteilung für Urologie, AK Barmbek, Hamburg

### **Dissertation**

Seit 03/ 2003 06/ 2003 bis 10/ 2006 Experimenteller Abschnitt

### **Publikationen**

Expression and relevance of MKK4 in liver metastases of colorectal cancer.

Publikation in Vorbereitung

---