

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Chirurgische Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar
Abteilung für Allgemein- und Viszeralchirurgie
(Ärztlicher Direktor: Univ.- Prof. Dr. H. Friess)

Einfluss der purinergen Signalkaskade auf die Tumorprogression im humanen kolorektalen Karzinom

Stephan Heinrich Rath

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

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. D. Neumeier
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.- Prof. Dr. H. Friess
2. Priv.- Doz. Dr. D. K. M. Saur

Die Dissertation wurde am 06.07.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 28.09.2011 angenommen.

Meinen Eltern.

1. Einleitung	6
1.1. Das kolorektale Karzinom	6
1.1.1. Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms	6
1.1.2. Ätiologie.....	6
1.1.3. Morphologie und Pathologie	8
1.1.4. Klinische Symptomatik	11
1.1.5. Diagnostik.....	12
1.1.6. Therapie	13
1.1.7. Nachsorge und Prognose.....	16
1.1.8. Screening auf kolorektale Karzinome	16
1.2. Allgemeine Tumorpathogenese.....	17
1.2.1. Charakteristika maligner Tumoren.....	17
1.2.2. Allgemeine Karzinogenese	17
1.3. Molekularbiologische Grundlagen der kolorektalen Tumorgenese	18
1.3.1. Chromosomale Instabilität: Die Adenom-Karzinom-Sequenz.....	19
1.3.2. Mikrosatelliten-Instabilität: Mutation der Reparaturgene.....	21
1.4. Die purinerge Signalkaskade	22
1.4.1. Bestandteile der purinergeren Signalkaskade	22
1.4.2. Die Bedeutung der purinergeren Signaltransduktion im Rahmen von Neoangiogenese, Entzündung und Tumorwachstum	24
1.5. Ziele der vorliegenden Studie	26
2. Material und Methoden	28
2.1. Patienten und Gewebesammlung.....	28
2.2. Übersicht über die Untersuchungsmethoden	30
2.3. Analyse der messenger-RNA (mRNA)-Expression mittels qRT-PCR	30
2.3.1 RNA-Extraktion.....	30
2.3.1.1. Materialien	30
2.3.1.2. Durchführung	31
2.3.1.3. Konzentrationsbestimmung der RNA und Reinheitsmessung.....	32
2.3.2. Reverse Transkription von RNA in cDNA.....	32
2.3.2.1. Prinzip der reversen Transkription	33
2.3.2.2. Materialien	33
2.3.2.3. Durchführung	33
2.3.3. Bestimmung spezifischer Primer für P2X ₇ , P2Y ₂ und CD39.....	35

2.3.3.1 Bestimmung der Annealing-Temperatur (T_A)	36
2.3.4. Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)	40
2.3.4.1. Prinzip der qRT-PCR	40
2.3.4.2. Materialien	40
2.3.4.3. Durchführung	41
2.3.4.4. Auswertung	45
2.4. Bestimmung der Proteinmenge mittels Western Blot Analysen.....	46
2.4.1 Herstellung der Gewebelysate	46
2.4.1.1. Materialien	46
2.4.1.2. Durchführung	46
2.4.2 Messung der Proteinkonzentration	47
2.4.2.1. Materialien	47
2.4.2.2. Durchführung	48
2.4.2.3. Berechnung der Proteinkonzentration.....	49
2.4.3. Vorbereitung und Denaturierung der Proteinlysate.....	49
2.4.3.1 Materialien	49
2.4.3.2. Durchführung	50
2.4.4. Elektrophoretische Auftrennung der Proteinlysate.....	50
2.4.4.1. Materialien	51
2.4.4.2. Durchführung	51
2.4.5. Blotting	52
2.4.5.1. Materialien	52
2.4.5.2. Durchführung	52
2.4.6. Detektion der Proteinbanden von CD39, P2X ₇ und P2Y ₂ mittels spezifischer Antikörper	55
2.4.6.1. Blocken unspezifischer Bindungen	55
2.4.6.2. Inkubation der Membran-gebundenen Proteine mit Antigen- spezifischen Antikörpern (1 st - Antibody-Reaction).....	55
2.4.6.3. Inkubation mit sekundären Antikörpern (2 nd - Antibody Reaction).....	56
2.4.6.4 Nachweis von CD39, P2X ₇ und P2Y ₂ durch Enhanced Chemiluminescence (ECL)	57
2.4.7. Membrane-Stripping und erneute Inkubation	59
2.4.7.1. Materialien	59
2.4.7.2. Durchführung	59

2.4.8. Ladungskontrolle mit Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)	60
2.4.9. Auswertung der Radiographiefilme mittels Densitometrie	60
2.5. Immunhistochemische Analysen zur Untersuchung des Verteilungsmusters von CD39, P2X₇ und P2Y₂ im humanen KRK.....	61
2.5.1. Prinzip der Immunhistochemie	61
2.5.2 Primäre Antikörper.....	62
2.5.3. Gewebe-Fixation	62
2.5.4. Anfertigung von Gewebeschnitten.....	63
2.5.4.1. Materialien	63
2.5.4.2. Durchführung	63
2.5.5. Immunhistochemische Färbungen.....	63
2.5.5.1. Materialien	63
2.5.5.2. Durchführung	64
2.5.6. HE-Färbungen.....	66
2.5.7. Auswertung der immunhistochemischen und HE-Färbungen.....	66
2.6. Statistik	67
3. Ergebnisse	68
3.1. Expression der mRNA von CD39, P2X ₇ und P2Y ₂	68
3.2. Proteinexpression von CD39 und P2-Rezeptoren im gesunden und tumorösen kolorektalen Gewebe.....	70
3.3. Proteinexpression in Abhängigkeit des prozentualen Tumoranteils	72
3.4. Immunhistochemischer Nachweis von CD39, P2X ₇ und P2Y ₂	76
4. Diskussion	81
5. Zusammenfassung.....	88
6. Literaturverzeichnis	90
7. Danksagung	100

1. Einleitung

1.1. Das kolorektale Karzinom

1.1.1. Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms

Mit einer jährlichen Inzidenz von 30-50/100.000 und einer Lebenszeit-Inzidenz von 5% stellt das kolorektale Karzinom (KRK) in Europa und Nordamerika die zweithäufigste bösartige Erkrankung bei Frauen (nach Brustkrebs) und Männern (nach Bronchialkarzinom) dar ^[37, 80].

Obwohl die Mortalität aufgrund verbesserter diagnostischer und therapeutischer Möglichkeiten in den letzten Jahren leicht gesunken ist, ist das KRK dennoch die vierthäufigste krebsbedingte Todesursache weltweit ^[80].

Das KRK ist eine Erkrankung des höhern Lebensalters, mit einem Häufigkeitsgipfel im siebten und achten Lebensjahrzehnt. Vor dem 40. Lebensjahr tritt das KRK nur selten auf, jedoch verdoppelt sich die Inzidenz bei über 40-jährigen alle zehn Jahre, so dass sie im achten Lebensjahrzehnt bei 400/100.000 liegt. Das Auftreten eines kolorektalen Karzinoms in jungen Jahren ist häufig mit einer genetischen Alteration vergesellschaftet, von der besonders die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), das hereditäre nicht-polypöse kolorektale Karzinom (HNPCC) sowie die APC-Gen-Variabilität eine entscheidende Rolle spielen ^[50].

Bezüglich der geographischen Verteilung lässt sich ein deutliches Nord-Süd-Gefälle erkennen. So ist das kolorektale Karzinom in den Industrienationen wesentlich häufiger als in den Entwicklungsländern ^[80].

1.1.2. Ätiologie

Die überwiegende Mehrheit (88-94%) aller bösartigen kolorektalen Neubildungen tritt spontan auf:

Das Zusammenwirken individueller, diätetischer, endogen-metabolischer, ethnischer und genetischer Faktoren spielt hierbei eine wichtige Rolle.

Zu den individuellen Risiken, die für die Entstehung kolorektaler Karzinome von Bedeutung sein könnten, zählen unter anderem hohes Lebensalter, männliches Geschlecht, Cholezystektomie, Anastomosennarben im Rahmen von Darmoperationen und vorausgegangene Strahlenschäden ^[48, 80].

Darüber hinaus beeinflussen eine ballaststoff-, folsäure- und kalziumarme, aber fett- und fleischreiche Ernährung, Adipositas, hoher Nikotin- und Alkoholabusus entscheidend die Pathogenese kolorektaler Karzinome. Dies erklärt auch weshalb kolorektale Neoplasien in den Industrienationen gehäuft auftreten. In epidemiologischen Studien konnte gezeigt werden, dass sich das Risiko für ein KRK umweltabhängig ändert; so nahmen Immigranten aus Ländern niedriger Prävalenz das Risiko des Gastlandes an, sobald sich ihr Lebensstil an den dortigen adaptiert hatte ^[28, 47].

Zu den hormonellen Faktoren, die die Pathogenese des KRK beeinflussen, zählen insbesondere der Hyperinsulinismus, aber auch Kinderlosigkeit, späte Geburt des ersten Kindes und früher Eintritt der Menopause.

Gewisse, in der Krankengeschichte der Patienten vorausgegangene Karzinome, wie Endometrium-, Mamma- oder Ovarialkarzinome prädisponieren zur Ausbildung eines KRK ^[80].

Ca. 1-2% aller Darmkrebsfälle entstehen auf dem Boden entzündlicher Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn. Dabei ist das Risiko einer bösartigen Neubildung besonders von der Dauer und der Schwere der Entzündung abhängig: Meta-Analysen von Eaden et al. ^[18] konnten zeigen, dass bereits 10 Jahre nach der Erstdiagnose einer Colitis ulcerosa 2%, nach 20 Jahren 8% und nach 30 Jahren 18% aller Patienten ein KRK entwickeln. Die Ausbreitung über mehrere Wandschichten in der Histologie als auch assoziierte Begleiterkrankungen wie die primär sklerosierende Cholangitis (PSC) tragen zur weiteren Erhöhung des Erkrankungsrisikos bei. Ebenso spielt die Lokalisation der Entzündung auf einzelne Darmabschnitte eine Rolle: Patienten mit einer Pancolitis oder linksseitiger Colitis haben dabei ein höheres Risiko als Patienten mit einer Proktitis ^[85].

Ca. 20% aller Darmkrebs-Patienten zeigen eine familiäre Disposition. Gemäß der Bethesda Kriterien zählen dazu Patienten mit positiver Familienanamnese:

Verwandte 1. Grades eines Patienten haben ein 2,3-fach erhöhtes Risiko, sind zwei oder mehr Verwandte 1. Grades betroffen, erhöht sich das Risiko auf 4,25 ^[80].

Schätzungsweise 5-10% aller KRK-Fälle sind auf autosomal-dominant vererbte Tumor-Syndrome zurückzuführen. Neben den sehr seltenen Erkrankungen wie dem Peutz-Jeghers-Syndrom, der familiären juvenilen Polyposis oder dem Cowden-

Syndrom spielen vor allem die familiäre adenomatöse Polyposis coli (FAP) und das HNPCC (hereditary non-polyposis colorectal cancer)-Syndrom eine wichtige Rolle.

Das Auftreten zahlreicher (>100) kolorektaler Adenome bereits in frühen Lebensjahrzehnten charakterisiert die FAP. Ohne Therapie entwickeln die Betroffenen jenseits des 40. Lebensjahres zu fast 100% kolorektale Karzinome^[80].

Mit im Mittel 45 Jahren treten kolorektale Karzinome bei HNPCC-Patienten in Erscheinung; hier wird das kumulative Risiko bis zum 70. Lebensjahr an einem Karzinom zu erkranken bei Männern auf 91% und bei Frauen auf 69% geschätzt^[50].

1.1.3. Morphologie und Pathologie

Etwa 80% aller kolorektalen Karzinome finden sich im rektosigmoidalen Bereich, wobei über 50% der Tumoren im Rektum lokalisiert sind. Weitere 10% betreffen das Coecum und das proximale Colon ascendens, 10% das übrige Kolon.

Makroskopisch lassen sich schüsselförmig ulzerierende, polypoide und diffus-infiltrierende Wachstumsformen unterscheiden.

WHO-Klassifikation

Mikroskopisch unterscheidet die WHO-Klassifikation aus dem Jahr 2000 zwischen Adeno- und Plattenepithelkarzinomen:

Die verschiedenen Adenokarzinome lassen sich gemäß ihres Gradings weiter unterteilen in:

- low-grade-Karzinome:
 - gut differenziert (G1)
 - mäßig differenziert (G2)
- high-grade-Karzinome:
 - schlecht differenzierte muzinöse und nichtmuzinöse Adenokarzinome (G3)
 - Siegelringzellkarzinome, kleinzellige und undifferenzierte Karzinome (G4)

High-grade Karzinome neigen zu früher lymphogener Metastasierung. Da die intramuralen Lymphgefäße als überwiegend zirkuläre, durch radiäre Äste untereinander verbundene Netze angelegt sind, breiten sich kolorektale Karzinome überwiegend quer zur Darmachse aus und tendieren daher zu zirkulärem Wachstum.

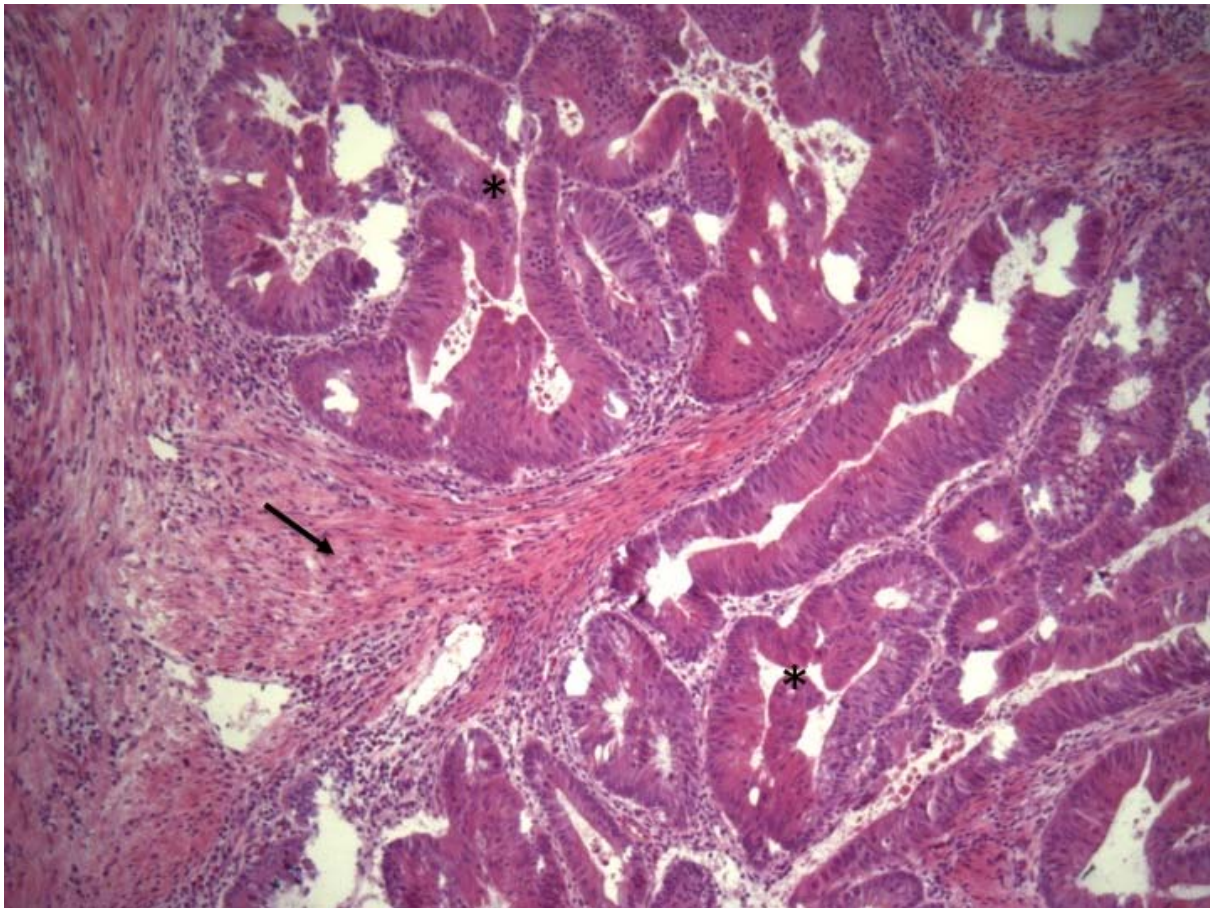


Abbildung 1: Mikroskopisches Bild eines Kolonkarzinoms: maligne Tumorzellen (Asterisk), Fibrose (Pfeil) (50x)

Besonderheiten des Rektums

Aufgrund der unterschiedlichen anatomischen Gegebenheiten des Rektums lassen sich dort drei unterschiedliche lymphogene Metastasenstraßen finden:

- oberes Rektumdr Drittel (12-16 cm proximal der Anokutanlinie): paraaortale Lymphknoten
- mittleres Rektumdr Drittel (6-12 cm): paraaortale Lymphknoten und Beckenwand
- unteres Rektumdr Drittel (<6cm): paraaortale Lymphknoten, Beckenwand und zusätzlich die inguinalen Lymphknoten

Aufgrund des portal-venösen Abflusses finden sich hämatogene Metastasen zunächst in der Leber, gemäß der ‚Kaskadentheorie‘ werden erst im Anschluss weitere Organsysteme befallen. Nur das distal gelegene Rektumkarzinom metastasiert durch seine Drainage in die V. cava inferior häufig zunächst auch in die Lunge.

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung lassen sich bei bis zu 25% aller Patienten bereits Lebermetastasen finden, bis zu 55% der Patienten entwickeln im weiteren Verlauf Lebermetastasen ^[59].

TNM-Stadieneinteilung

Zur Stadieneinteilung (Staging) kolorektaler Karzinome hat sich das TNM-Schema der UICC (union internationale contre le cancer) durchgesetzt. Die TNM-Klassifikation erfasst dabei das lokale Wachstumsverhalten, den Status der Lymphknoten-Metastasierung sowie die Fernmetastasierung. Diese Klassifikation spielt eine entscheidende Rolle zur weiteren Therapieplanung und zur Abschätzung der Prognose.

T – Primärtumor	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für einen Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor infiltriert die Submukosa
T2	Tumor infiltriert die Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert die Subserosa bzw. das nichtperitonealisierte parakolische bzw. pararektale Gewebe
T4	Tumor perforiert das viszerale Peritoneum und/oder infiltriert direkt andere Organe
N – Regionale Lymphknoten	
NX	Regionale Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in 1-3 regionalen Lymphknoten
N2	Metastasen in ≥ 4 regionalen Lymphknoten
M – Fernmetastasen	
MX	Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 1: TNM-Staging des Kolorektalen Karzinoms nach UICC ^[72]

Stage	TNM	Dukes	5-Jahres-Überleben
0	Tis N0 M0		
I	T1, T2 N0 M0	A	80-95%
II A	T3 N0 M0	B	72-75%
II B	T4 N0 M0		65-66%
III A	T1, T2 N1 M0	C	55-60%
III B	T3, T4 N1 M0		35-42%
III C	Tx N2 M0		25-27%
IV	Tx Nx M1	D	0-7%

Tabelle 2: TNM-Staging und Dukes-Klassifikation mit prognostizierter 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit ^[80]

1.1.4. Klinische Symptomatik

Die Symptomatik kolorektaler Karzinome ist häufig uncharakteristisch. Wie bei anderen Tumorentitäten treten Beschwerden oft erst in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung auf, und reichen von perianalem Blutabgang bis hin zum Passagehindernis infolge stenosierender Prozesse. Diese sind dann nicht selten Folge einer begleitenden Tumoranämie, die klinisch oft als Müdigkeit, Leistungsknick und allgemeine Schwäche seitens des Patienten beschrieben wird.

Gastrointestinale Symptome sind abhängig von der Tumorlokalisierung:

Rektumkarzinome und Karzinome des distalen Sigmas führen durch Ulzerationen des Tumors in bis zu 75% zu analen Blutungen, die teils vom Patienten als Blutauflagerungen auf dem Stuhl erkannt, vielfach jedoch als okkulte Blutverluste unbemerkt bleiben ^[57].

Dagegen gehen Karzinome proximaler Kolonabschnitte häufiger mit Änderungen der Stuhltätigkeiten einher. Neben der für die Patienten häufig auftretenden unangenehmen Flatulenz, führt die durch den Tumor bedingte Lumenobstruktion oder Stenosierung zu einem Wechsel aus Obstipation und Diarrhoe, begründet durch Aufstau und nachfolgender Verflüssigung des Stuhls. Eine Anämie ist oft das erste klinisch erkennbare Zeichen rechtsseitiger Kolonkarzinome ^[64].

Seltener klagten Patienten über Schmerzen im Unterbauch bis hin zu Koliken; bisweilen wird – vor allem bei rechtsseitig gelegenen Tumoren – eine tumoröse Masse im Unterbauch getastet.

Subileus- und Ileussyndromatik, (massive) Blutungen, Perforationen mit nachfolgender kotiger Peritonitis, Infiltrationen der Bauchwand mit Abszessbildung

und Einbruch bzw. Fistelbildung in benachbarte Organstrukturen wie Vagina und Blase zählen zu den schweren tumorbedingten Komplikationen ^[6, 57].

1.1.5. Diagnostik

Die Koloskopie gilt als Goldstandard zum Nachweis kolorektaler Karzinome. Sie bietet zusätzlich die Möglichkeit den Tumor bioptisch zu sichern. Durch Verbesserung der Technik bietet die 3D-Magnetresonanztomographie seit kurzem die Möglichkeit eine Koloskopie zu ersetzen, wenn diese beispielsweise aufgrund von Lumenobstruktionen nicht vollständig durchgeführt werden kann. Dennoch können beide Diagnoseverfahren eine vollständige körperliche Untersuchung nicht ersetzen. Bei proximaler Lokalisation ist der Tumor, besonders in fortgeschrittenen Stadien, als palpable Masse im Unterbauch zu tasten. Da Untersucher-abhängig ca. 10% aller KRK digital getastet werden können, ist eine digital-rektale Untersuchung des Patienten unerlässlich. Computertomographische und sonographische Untersuchung des Abdomens, Endosonographie des Gastrointestinaltraktes und Röntgen-Thorax sind weitere diagnostische Mittel um die lokoregionäre Ausbreitung des Tumors zu beurteilen und eine eventuelle Metastasierung ausschließen zu können. Körperliche Untersuchung, Koloskopie, Endosonographie, Abdomensonographie zum Ausschluss von Lebermetastasen und Röntgen-Thorax sind somit für ein genaues Staging der Tumorerkrankung dringend erforderlich ^[80].

Die Notwendigkeit einer routinemäßigen Computertomographie ist umstritten, da sie die chirurgische Herangehensweise nur in Einzelfällen entscheidend beeinflusst ^[55].

Die Beurteilung der Tumorausdehnung und der lokalen Operabilität von Rektumtumoren erfordert eine genaue Kenntnis der anatomischen Verhältnisse: Transrektaler Ultraschall, Spiral-CT des Abdomens bei unklarem Sonobefund, Zystoskopie bei Verdacht auf Blaseninfiltration und eine gynäkologische Untersuchung zum Ausschluß von Infiltrationen der Vagina, Uterus oder Adnexe erweitern das oben beschriebene diagnostische Spektrum ^[80].

In den letzten Jahren gewann die funktionelle Bildgebung zur Darstellung der biologischen Aktivität gastrointestinaler Tumoren an Bedeutung. Zur Rezidivabklärung wird zunehmend die kombinierte Positronen-Emissions-Tomographie/Computertomographie (PET/CT) eingesetzt. Im Rahmen des primären Stagings jedoch spielt die PET/CT weiterhin eine untergeordnete Rolle, da sie nur wenig Informationsgewinn bezüglich Tumorausdehnung und Lymphknoteninfiltration

gegenüber konventionellem CT und MRT bietet, beziehungsweise gezeigt werden konnte, dass diese zusätzlichen Befunde keine Auswirkungen auf das operative Vorgehen hatten ^[19, 24, 80].

Als Verlaufskontrolle nach Radikaloperationen eignet sich die regelmäßige Bestimmung des Tumormarkers CEA (carcino-embryonic-antigen), dessen präoperative Werte stadienabhängig in der Regel erhöht sind, sich nach R0-Resektion des Tumors normalisieren sollten, und im Falle eines Rezidivs wieder ansteigen können ^[52]. Als sensitivere Alternative könnte sich in Zukunft auch die Bestimmung der mRNA des tumorassoziierten Antigen L6 erweisen. Schiedeck et al. ^[68] konnten zeigen, dass die Bestimmung der mRNA des Antigens L6 einen wesentlich sensitiveren und genaueren Parameter zur Verlaufskontrolle bietet als CEA. So hatten präoperativ 79% der Patienten mit gesichertem KRK erhöhte L-6 mRNA Werte, dagegen zeigten jedoch nur 35% ein erhöhtes CEA. Nach der Therapie normalisierten sich die Werte für L6 signifikant schneller als die CEA-Werte.

1.1.6. Therapie

Die chirurgische Tumoresektion stellt bis heute die einzige kurative Therapieoption des kolorektalen Karzinoms dar.

Bei Kolontumoren erfolgt in der Regel eine en-bloc-Resektion des tumorbefallenen Darmabschnitts mitsamt des versorgenden Anteils des Mesenteriums unter Einhaltung einer ausreichenden Sicherheitszone von mindestens 2 cm gesunden Gewebes mit Entfernung des regionalen Lymphabflusses. Je nach Tumorlokalisierung bedeutet dies eine Hemikolektomie rechts bzw. links, bei Transversumbefall eine erweiterte rechts- oder linksseitige Hemikolektomie oder eine Sigmaresektion. Bei Patienten mit HNPCC-Syndrom empfiehlt sich eine Proktokolektomie, damit eine Karzinomentwicklung im belassenen Kolon ausgeschlossen werden kann.

Obwohl die radikal offenen Operationsverfahren in vielen Kliniken gegenüber den laparoskopisch-onkologischen Operationen beim Kolonkarzinom immer noch deutlich häufiger durchgeführt werden, zeigten umfangreiche Langzeit-Follow-up Studien, dass die beiden operativen Verfahren in Bezug auf das Gesamtüberleben und dem rezidivfreien Intervall gleichwertig sind ^[4].

Die Lokalisation von Rektumkarzinomen bestimmt das chirurgisch-therapeutische Vorgehen. Bei Tumoren des oberen und mittleren Rektumdrittels, sowie bei T2 und T3 Tumoren des unteren Drittels (falls ein ausreichender Sicherheitsabstand von ≥ 2

cm zur distal gelegenen Anokutanlinie gewährleistet werden kann) wird eine sphinkter- und damit kontinenzerhaltende, anteriore Rektumresektion mit totaler Exzision des Mesorektums als Goldstandard angestrebt. Nach Absetzen der A. mesenterica inferior wird dabei das Mesorektum ohne Eröffnung der mesorektalen Faszie mit dem darin enthaltenen Lymphabflussgebiet komplett entfernt. Seit der Einführung und Etablierung der totalen mesorektalen Exzision (TME) konnte die Lokalrezidivrate von vormals bis zu 55% auf unter 10% gesenkt werden [77, 80].

Ist bei Tumoren des unteren Rektumdrittels ein ausreichender Sicherheitsabstand nach distal nicht gegeben, erfolgt eine abdominoperineale Rektumexstirpation (Operation nach Miles) mit Anlage eines endständigen Anus praeter sigmoidalis. Obwohl bei Kolonkarzinomen als gleichwertig betrachtet, bleiben die Ergebnisse weiterer randomisierter Studien zur Beurteilung der Langzeitergebnisse der laparoskopischen Technik zur Therapie von Rektumkarzinomen abzuwarten [5, 42]. So konnten Guillou et al. [27] in einer prospektiven, randomisierten Multicenter-Studie (CLASICC-Trial) an 794 Patienten zeigen, dass die hohe Zahl an intraoperativen Konversionen von Laparoskopie zu offener Operationstechnik sowie eine – wenn auch nicht signifikant – erhöhte Zahl an Tumor-befallenen Schnitträndern einen routinemäßigen Einsatz der Laparoskopie bei der Therapie von Rektumkarzinomen aus onkologischer Sicht zunächst nicht rechtfertigen. In einer Folgestudie zur Bestimmung der Langzeitergebnisse dagegen konnte gezeigt werden, dass die 3-Jahres-Rezidivrate in beiden Patienten-Kollektiven nahezu identisch war (Lokalrezidivrate nach offener Therapie vs. laparoskopischer Therapie: 7,0% vs. 7,8%) [35].

Mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 26-49% bietet die Resektion solitärer Lebermetastasen (Anzahl ≤ 3 Metastasen) den Patienten eine Therapie mit potentiell kurativem Ansatz. Bei disseminierter Metastasierung erfolgt zur onkologischen Resektion eine additive systemische Chemotherapie [3].

Die peritoneale Tumoraussaat eines KRK bedeutet in der Regel eine infauste Prognose. Durch eine aggressive Zytoreduktion mit kombinierter intraperitonealer Chemotherapie jedoch konnte das mediane Überleben dieser Patienten von 12,6 auf 22,3 Monate insgesamt fast verdoppelt werden [80].

Bei fortgeschrittenen, aber prinzipiell operablen Tumoren wird eine adjuvante Chemotherapie (CT) oder eine neoadjuvante kombinierte Radio-Chemotherapie (RTCx) eingesetzt:

Eine adjuvante Chemotherapie mit 5-Fluorouracil (5-FU) ist die Standardtherapie von Stage-III-Kolonkarzinomen. Kombiniert mit neueren Therapeutika wie Oxaliplatin, Leukovorin, Irinotecan etc. sowie Antikörper-basierter Therapien (sog. Biologicals) im Rahmen von Studien, ist die 5-Jahresüberlebensrate auf über 70% gestiegen.

Bei fortgeschrittenen Rektumkarzinomen ab Stage II wird heute eine neoadjuvante Radio-Chemotherapie (RTCx) mit eventuell zusätzlicher adjuvanter, postoperativer Chemotherapie empfohlen. Obwohl Langzeitstudien keine Verbesserung der Überlebenschancen zeigen konnten, erhöht die neoadjuvante Therapie die lokale Tumorkontrolle, senkt die Lokalrezidivrate und ermöglicht in Einzelfällen doch noch eine R0- und gegebenenfalls sogar eine sphinktererhaltende Resektion, die bei der Primärdiagnostik unwahrscheinlich schien ^[6, 80].

Palliative Therapieregime bei inoperablen und/oder metastasierten KRK zielen auf die Verlängerung des Überlebens und gleichermaßen auf die Verbesserung der Lebensqualität. Transanale, kryochirurgische Eingriffe, Laserresektionen, Elektrokoagulationen oder Anlage von Entlastungs- oder Umgehungsanastomosen verbessern die Tumorkontrolle und damit nicht zuletzt die Lebensqualität der Patienten.

Neben der Standard-Polychemotherapie, bestehend aus 5-FU, Folsäure und Oxaliplatin oder Irinotecan, haben molekularbiologisch zielgerichtete Therapien metastasierter, kolorektaler Karzinome das therapeutische Spektrum entscheidend erweitert.

Bevacizumab (Avastin[®]), ein monoklonaler Antikörper gegen den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF), wird bei metastasiertem KRK als First-line-Therapeutikum mit großem Erfolg eingesetzt ^[75]. Eine signifikante Verlängerung des Überlebens konnte darüber hinaus auch für Cetuximab und Panitumumab nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu Bevacizumab zielen diese beiden neueren monoklonalen Antikörper auf den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) ^[36]. Das zunehmende Verständnis der biologischen Grundlagen und die damit einhergehende Entwicklung gezielter Medikamente könnte in Zukunft die Prognose kolorektaler Karzinome maßgeblich verbessern ^[33].

1.1.7. Nachsorge und Prognose

Abhängig von der chirurgischen Technik, dem Operateur und dem Tumorstadium treten trotz kurativen Ansatzes in 10-30% Rezidive auf. Um diese frühzeitig zu erkennen ist ein umfassendes Nachsorgeprogramm unerlässlich. Dazu zählen regelmäßige Koloskopien in Abständen von 3-5 Jahren, eine alle 3-6 Monate durchgeführte Bestimmung des CEA-Wertes über einen Zeitraum von 5 Jahren, regelmäßige Ultraschalluntersuchungen der Leber und Röntgenaufnahmen des Thorax. Die Notwendigkeit regelmäßiger CT-Untersuchungen des kleinen Beckens nach erfolgter Operation eines Rektumkarzinoms wird weiterhin diskutiert ^[10, 80].

Die TNM-Klassifikation (s.o.) ist bisher die zuverlässigste Methode zur Abschätzung der Prognose. Kolonkarzinome haben aufgrund ihrer weniger komplexen anatomischen Lage eine etwas bessere Prognose als Rektumkarzinome. Parameter wie Mutationsanalysen des Tumorsuppressorgens p53, Bestimmung des Chromosoms 18q oder Proteinexpressionsanalysen spielen zur Prognostik (noch) eine untergeordnete Rolle ^[88].

1.1.8. Screening auf kolorektale Karzinome

Im Rahmen der Früherkennung kolorektaler Karzinome empfiehlt die American Cancer Society (ACS) asymptomatischen Männern und Frauen jenseits des 50. Lebensjahres, die kein erhöhtes Darmkrebsrisiko haben, regelmäßige Krebsvorsorgeuntersuchungen wahrzunehmen:

- Fäkaler Okkultblut-Test (FOBT): jährliche Untersuchungen auf okkultes Blut im Stuhl dienen trotz geringer Sensitivität und Spezifität als kostengünstige Screeningmethode
- Koloskopie: alle 5 Jahre

Patienten mit FAP oder HNPCC wird empfohlen bereits in frühen Jahren mit jährlichen Kontroll-Koloskopien zu beginnen ^[71].

1.2. Allgemeine Tumorpathogenese

1.2.1. Charakteristika maligner Tumoren

Als Tumor bezeichnet man allgemein eine umschriebene Zunahme des Gewebavolumens jedweder Ursache, die durch die Vermehrung körpereigener Zellen entsteht. Im Gegensatz zu langsam, nur lokal expansiv-verdrängend und gut differenzierten benignen Tumoren, zeichnen sich maligne Tumoren durch ihr meist schnelles, invasives und destruierendes Wachstum über Zell- und Organgrenzen hinweg aus. Im Gegensatz zum Normalgewebe weisen maligne Tumoren histologisch häufig Zellatypien wie Zellpolymorphien, Anisonukleose oder Kernhyperchromasien auf. Charakteristisch für die maligne Dignität eines Tumors ist die Fähigkeit der Verschleppung und Absiedelung von Tumorzellen in andere Gewebe. Die Bildung von Metastasen ist ein komplexer Prozess, der durch drei Mechanismen gekennzeichnet ist: Invasion der extrazellulären Matrix durch die Tumorzellen, Dissemination der malignen Zellen in Lymph- und Blutgefäße und Absiedelung der Tumorzellen in entfernte Organsysteme.

1.2.2. Allgemeine Karzinogenese

Die Entwicklung einer genetisch-transformierten Zelle (monoklonale Entwicklungstheorie) bis hin zum invasiven Karzinom ist ein oft jahrelanger, phasischer Prozess, in dessen Verlauf für das Tumorwachstum entscheidende genetische und phänotypische Veränderungen stattfinden.

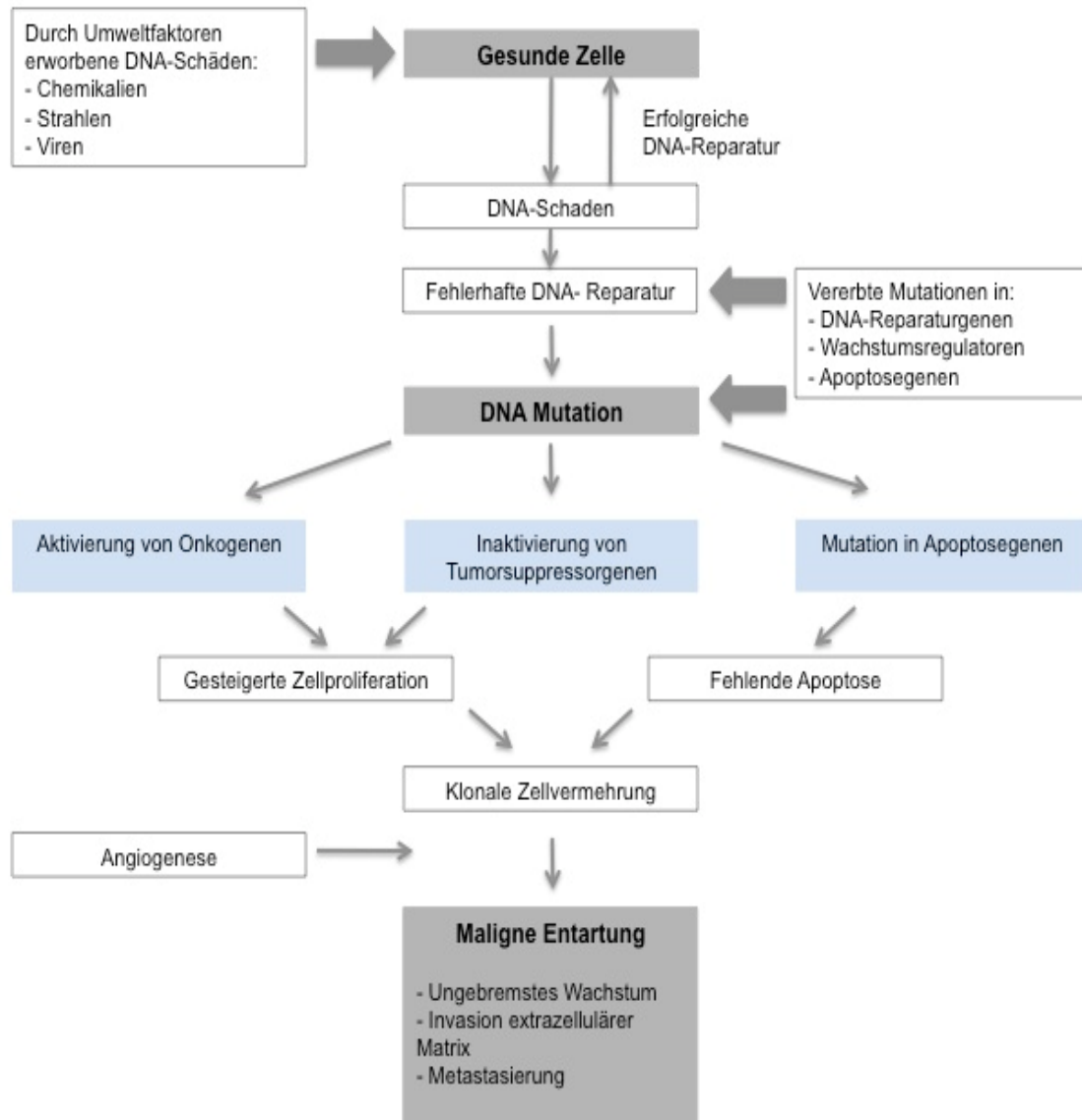


Abbildung 2: Vereinfachte, schematische Darstellung der molekularen Grundlagen der Karzinogenese nach Kumar ^[44]

1.3. Molekularbiologische Grundlagen der kolorektalen Tumorigenese

Die intensive Erforschung der kolorektalen Karzinogenese brachte neben dem Verständnis ihrer molekularen Grundlagen auch fundamentale Erkenntnisse der oben beschriebenen allgemeinen Entstehungsmechanismen bösartiger Tumoren.

Im Folgenden wird die schrittweise Progression von normaler Darmmukosa zum invasiven kolorektalen Karzinom dargestellt.

Zwei pathogenetisch unterschiedliche Wege stehen im Mittelpunkt der kolorektalen Tumorigenese, die beide mit einer allmählichen Anhäufung zahlreicher Genmutationen einhergehen, sich jedoch bezüglich der betroffenen Gene, der

Ursachen ihrer Mutationen sowie des makroskopischen Bildes grundsätzlich voneinander unterscheiden.

Dennoch stehen beide Wege nicht isoliert nebeneinander. Vielmehr ist die Tumorgenese ein Zusammenspiel aus vielen verschiedenen molekularbiologischen Veränderungen^[43].

1.3.1. Chromosomale Instabilität: Die Adenom-Karzinom-Sequenz

85% aller KRK entstehen durch chromosomale Instabilität, die zu einer Kumulation von genetischen Veränderungen in bestimmten Onkogenen und Tumorsuppressorgenen führt. Die makroskopische Morphologie spiegelt diese Entwicklung wider: Zu Beginn kommt es zu einer lokal begrenzten Proliferation des Epithels, es bilden sich kleine Adenome, die im Verlauf an Größe zunehmen, dysplastisch werden und auf deren Boden letztlich das invasive Karzinom entsteht. Folgende genetische Prozesse liegen dieser von Fearon und Vogelstein^[21] zuerst beschriebenen Adenom-Karzinom-Sequenz zu Grunde:

- **APC (Adenomatous Polyposis Coli)-Gen-Verlust:**

Das APC-Gen liegt auf dem Chromosom 5q21. Es wird vermutet, dass ein Verlust des APC-Gens zur Bildung von Adenomen führt und damit den Beginn der Adenom-Karzinom-Sequenz darstellt.

Als Tumorsuppressorgen kodiert das APC-Gen ein Protein mit zwei Aufgaben: Zum einen bindet es an Mikrotubuli und vermittelt Zellmigration und -adhäsion. Zum anderen fungiert es als Gatekeeper-Protein, indem es die Konzentration von β -Catenin in der Zelle reguliert. β -Catenin ist Teil des Wnt/ β -Catenin Signalweges. Als Transkriptionsfaktor steuert β -Catenin im Nucleus die Transkription von Genen wie c-myc und Cyclin D1, die die Zellproliferation fördern und Zelladhäsion vermindern. Das normale APC-Protein bildet im Zytoplasma einen Komplex mit Axin und GSK-3 β . Dieser Komplex bindet freies β -Catenin, und wird im Anschluss phosphoryliert, ubiquitinyliert und somit degradiert^[74].

Eine Mutation im APC-Gen liegt in 80% aller KRK vor, 50% aller Karzinome mit intaktem APC-Gen weisen eine Mutation im β -Catenin-Gen auf.

Eine Keimbahnmutation im APC-Gen ist die Ursache für Patienten mit FAP. Bei Geburt ist bereits ein Allel dieser Patienten mutiert („first hit“ nach

Knudson), eine spontane Mutation im zweiten Allel („second hit“) führt dann in jungen Jahren zur Entwicklung unzähliger kolorektaler Adenome ^[43].

- **K-ras-Mutation:**

Der Genlocus des Onkogens K-ras ist Chromosom 12p. Punktmutationen im K-ras Gen finden sich in 50% aller kolorektalen Karzinome. In gesunden Zellen fördert das aktivierte GTP-gebundene ras-Protein über die Aktivierung des MAP-Kinase Signalweges die Zellteilung. Spontane Punktmutationen im Codon 12, 13 oder 64 führen zu einer Daueraktivierung des ras-Proteins und somit zu einer ununterbrochenen Mitose.

Man vermutet, dass die Dysplasien in kolorektalen Karzinomen das morphologische Korrelat dieser ras-Genmutationen darstellen ^[40, 74].

- **Mutationen in SMAD-Genen:**

70% aller kolorektalen Karzinome zeigen Genverluste auf Chromosom 18q21. Lange wurde vermutet, dass dem DCC (deleted in colon cancer)-Gen eine Schlüsselrolle bei der Karzinogenese zukommt. Mäuse, bei denen jedoch beide Allele für DCC mutiert waren, zeigten keinerlei morphologische Veränderungen ^[43]. Eine wichtigere Rolle scheint dagegen weiteren auf Chromosom 18q gelegenen Genen zuzukommen. Die ebenfalls dort lokalisierten Tumorsuppressorgene SMAD2 und DPC4/SMAD4 kodieren für Proteine, die eine wichtige Rolle im Wachstum-inhibierenden TGF β -Signalweg einnehmen. Ferner geht ein Verlust von SMAD4 in humanen Kolonkarzinomzelllinien mit einem Verlust von E-Cadherin, einem Schlüsselprotein der Zell-Zell-Adhäsion, einher ^[63]. SMAD4 Mutationen treten im späteren Verlauf der Tumorgenese in hochgradig dysplastischen Adenomen auf und sind in über 30% aller metastasierten kolorektalen Karzinome nachweisbar ^[40, 63].

- **p53-Genverlust:**

Genverluste auf Chromosom 17p zeigen sich in bis zu 80% aller KRK, jedoch nur selten in kolorektalen Adenomen. Man geht daher davon aus, dass Mutationen im betroffenen Gen p53 beim Übergang eines Adenoms zum invasiven Karzinom entstehen ^[74]. Eine Schädigung der DNA (durch

Strahlung, UV-Licht, Chemikalien etc.) führt zu einer Phosphorylierung und damit Aktivierung von p53. Diese Proteine binden an die DNA und führen zu einer erhöhten Transkription von Genen, die einen Stopp des Zellzyklus in der G₁-Phase (p21), von DNA-Reparaturgenen (GADD45) oder Genen, die die Apoptose einleiten (BAX), bewirken. Kann während eines Arrests des Zellzyklus der Schaden behoben werden, wird p53 abgebaut und die Zellteilung fortgesetzt. Kann der Schaden dagegen nicht behoben werden, erfolgt die Apoptose. Eine maligne Transformation ist daher häufig die Folge eines Verlustes beider Allele für p53 auf Chromosom 17p13.1 ^[43].

Zusammenfassend ist jedoch weniger die bestimmte Abfolge der Ereignisse entscheidend, als vielmehr die Akkumulation der einzelnen Mutationen ^[21].

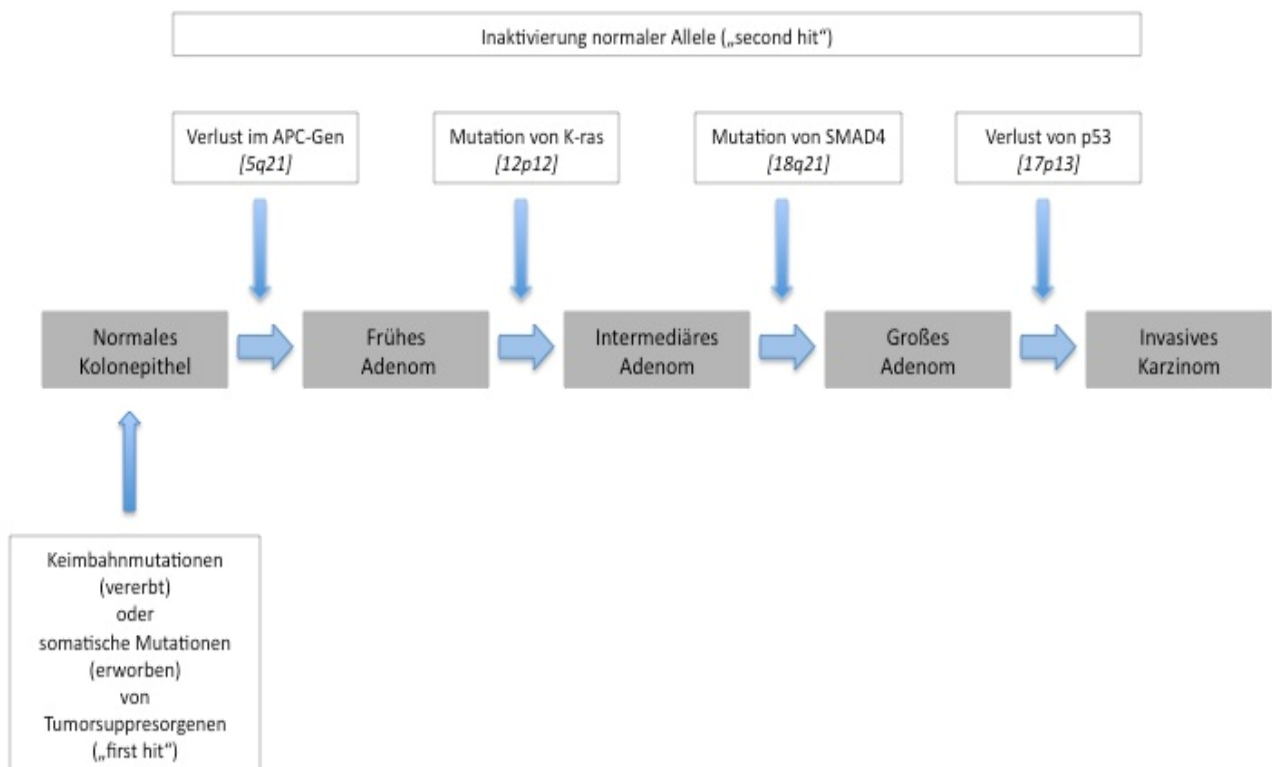


Abbildung 3: Schematische Darstellung molekularer Veränderungen, die die Entstehung kolorektaler Karzinome bedingen ^[21, 40, 43]

1.3.2. Mikrosatelliten-Instabilität: Mutation der Reparaturgene

15% aller sporadischen kolorektalen Karzinomen und über 95% aller HNPCC-Syndromen liegen genetische Defekte in DNA-Mismatch-Reparaturgenen zu Grunde

^[40]. Spontane oder vererbte Mutationen in den DNA-Mismatch-Reparaturgenen hMSH2 (Chromosom 2p22), hMLH1 (Chromosom 3p21), hMSH6 (Chromosom 2p21), hPMS1 (Chromosom 2q31-33) oder hPMS2 (Chromosom 7p22) führen zum Verlust der Korrekturlesefunktion während der DNA-Replikation. Ein homozygoter Defekt in den Reparaturgenen geht mit einer 1000-fach erhöhten Mutationsrate einher und führt somit zu einer Instabilität des menschlichen Genoms, besonders in kurzen, repetitiven DNA-Sequenzen, die als Mikrosatelliten-DNA bezeichnet werden. Die meisten Mikrosatelliten-Sequenzen befinden sich auf nicht-kodierenden Abschnitten der DNA, weshalb genetische Veränderungen keine Auswirkungen auf den Phänotyp zeigen. Mikrosatelliten-Sequenzen finden sich jedoch auch in Promoterregionen oder kodierenden Abschnitten von Genen, die Zellwachstum oder Apoptose regulieren, wie beispielsweise dem TGF β -II-Rezeptor oder BAX. Genetische Alterationen in diesen Sequenzen führen daher unweigerlich zur Dysregulation des Zellzyklus und bilden somit den Grundstein der Tumorgenese. Diese Tumoren zeigen makroskopisch keine der Adenom-Karzinom-Sequenz vergleichbare Progression. Dennoch konnte die Mikrosatelliten-Instabilität in potentiell präkanzerösen, hyperplastischen Polypen des rechtsseitigen Kolons nachgewiesen werden. Karzinome, die aufgrund eines Verlustes der Mismatch-Reparaturgene entstehen, fallen morphologisch durch ihre Lage im proximalen Kolon, durch ihre histologische Differenzierung zu Siegelringzell- oder muzinösen Karzinomen und durch hohe lymphozytäre Infiltrate auf ^[43, 74].

1.4. Die purinerge Signalkaskade

1.4.1. Bestandteile der purinerger Signalkaskade

Neben den bereits genannten, sind zahlreiche weitere genetische Veränderungen und alterierte Signalwege an der Entstehung pathologischer Prozesse beteiligt, deren Verständnis und Modulation zur Entwicklung neuer Therapieoptionen beitragen könnte.

In diesem Zusammenhang wurden extrazelluläre Nukleotide als ubiquitär im Organismus vorkommende molekulare Botenstoffe identifiziert, die - neben ihrer kurzwirksamen Funktion als Neurotransmitter oder Vasodilatator - entscheidend an Prozessen der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose beteiligt sind ^[7].

Die purinerge Signalkaskade beinhaltet drei essentielle Bausteine:

1. eine Quelle extrazellulärer Nukleotide,
2. spezifische Rezeptoren für diese Signalmoleküle und deren Derivate
3. Ektonukleotidasen

Extrazelluläre Nukleotide wie ATP, ADP, UTP und UDP werden von verschiedenen Körperzellen kontinuierlich in den Interzellularraum abgegeben, unter physiologischen Bedingungen beispielsweise durch Exozytose mit ATP - beladener Vesikel oder im Rahmen von Elektrodifusionsprozessen durch spezifische ATP-Kanäle ^[16, 22]. Insbesondere jedoch gelangen hohe Konzentrationen von Nukleotiden während pathologischer Vorgänge wie zum Beispiel Zellstress oder -untergang in das extrazelluläre Kompartiment ^[15, 16]. Die Effekte frei gesetzter, extrazellulärer Nukleotide auf das umliegende Gewebe und Zellen werden durch spezifische, auf der Zelloberfläche einer Vielzahl unterschiedlicher Zellen exprimierter, purinerger Typ-2-Rezeptoren (P2R) vermittelt. Zwei bezüglich ihrer Molekülstruktur unterschiedliche P2-Rezeptorgruppen lassen sich von einander abgrenzen: P2X- und P2Y-Rezeptoren. Die sieben bis heute klonierten Untergruppen der P2X-Rezeptoren (P2X₁ - P2X₇), sind schnell aktivierende, Liganden-gesteuerte Ionenkanäle, die für mono- und divalente Kationen (Na⁺, K⁺, Ca²⁺) durchlässig sind. Die acht humanen P2Y-Rezeptoren (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄) dagegen sind langsam agierende metabotrope Rezeptoren ^[1]. Als G_q- oder G_i- gekoppelter, heptahelikaler Rezeptor vermitteln P2Y-Rezeptoren die Signaltransduktion über eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC) und/oder Stimulation/Inhibierung der Adenylatcyclase (AC) ^[15]. Während P2X-Rezeptoren vorwiegend durch ATP stimuliert werden, können P2Y-Rezeptoren durch ATP, ADP, UTP, UDP sowie ITP aktiviert werden ^[66].

Seit langem ist bekannt, dass viele verschiedene Zelltypen auf ihrer Zelloberfläche ATP- und/oder seine Derivate hydrolysierende Enzyme aufweisen. Diese Enzyme, sog. Ekto-Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolasen (NTPDasen), sind somit ein entscheidender Bestandteil der purinergen Signalkaskade, da sie die Signalwirkung extrazellulärer Nukleotide beenden aber auch modulieren können ^[66].

Erst vor wenigen Jahren konnten Maliczewski et al. die molekulare Struktur und Funktion des ersten Enzyms aus der Familie der Ektonukleotidasen (NTPDase-1) identifizieren ^[53].

CD39 wurde zunächst als Aktivierungsmarker auf B-Zellen, Monozyten, aktivierten NK-Zellen sowie T-Lymphozyten identifiziert ^[39]. Kaczmarek et al. konnten jedoch zeigen, dass CD39 ein Ektoenzym ist, welches mit der NTPDase-1 identisch ist ^[38].

Acht verschiedene Ektonukleotidasen konnten bisher identifiziert werden. Vier dieser Nucleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolasen (NTPDase 4, 5, 6, 7) sind intrazelluläre Enzyme; die auf der Zelloberfläche lokalisierten NTPDasen-1, -2, -3 und -8 dagegen haben extrazelluläre katalytische Zentren ^[66]. Die Funktion der auf der Plasmamembran lokalisierten Ektoenzyme ist abhängig von der im jeweiligen Kompartiment vorherrschenden Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Konzentration: Inaktivität bei Abwesenheit - maximale Reaktionsgeschwindigkeit im millimolaren Bereich beider Ione ^[66, 87].

CD39 (NTPDase-1) wird besonders auf der Oberfläche von Endothelzellen und glatten Muskelzellen exprimiert und stellt die bedeutendste Ektonukleotidase des Gefäßsystems dar. Im Plasma spaltet CD39 mit gleicher Affinität ATP und ADP zu ADP bzw. AMP ^[86]. Weitere Ektonukleotidasen des vaskulären Systems sind CD39L1 (NTPDase-2) sowie die löslichen Ekto-ADPasen CD39L2 (NTPDase-6) und CD39L4 (NTPDase-5) ^[8].

1.4.2. Die Bedeutung der purinergen Signaltransduktion im Rahmen von Neoangiogenese, Entzündung und Tumorwachstum

Maligne Zellen kolorektaler Karzinome, ebenso wie Tumorzellen anderer Karzinome, zeichnen sich durch Veränderung zellulärer Prozesse im Vergleich zu gesunden Zellen aus; so führen alterierte Regulations- und Signaltransduktionsmechanismen zu ungehemmter Proliferation maligner Zellen, Tumor-bedingten Entzündungsprozessen, im Rahmen der Neoangiogenese zur Neubildung von minderwertigen, den Tumor versorgenden vaskulären Strukturen, Absiedelung von Metastasen, Dedifferenzierung und Zelltod durch Apoptose. Durch Beteiligung und Modulation vieler dieser Prozesse geht man davon aus, dass P2-Rezeptoren und Ektonukleotidasen eine wichtige Rolle bei der Entstehung und am weiteren Verlauf von Tumorerkrankungen spielen.

Enyoji et al. konnten durch die Etablierung CD39-defizienter und CD39-transgener Mäuse zeigen, dass CD39 Hämostase und thrombembolische Prozesse moduliert ^[20]. An Hand eines Matrigel-Modells in CD39-defizienten Mäusen zeigten Goepfert et al., dass die Phosphohydrolyse extrazellulärer Nucleotide durch CD39 einen

wichtigen Bestandteil bei der Regulation zellulärer Migration im Rahmen von Gefäßsprossung und im weiteren Verlauf der Neoangiogenese darstellt ^[23].

Künzli et al. wiesen nach, dass CD39 und P2-Rezeptoren in akuter und chronischer Pankreatitis fibrosierende Umbauvorgänge und Modulation der extrazellulären Matrix beeinflussen ^[45]. Ferner entwickelten CD39-defiziente Mäuse in einem tierexperimentellen Modell zur chronischen Pankreatitis zwar Entzündungsreaktionen, im Vergleich zu wild-typ-Mäusen jedoch nur geringe Atrophie und Fibrose. Künzli et al. ^[46] konnten zeigen, dass pankreatische Sternzellen (PSC) von CD39-defizienten Mäusen einen Proliferationsdefekt aufwiesen und trotz einer normalen Differenzierung zu myofibroblasten-ähnlichen Zellen eine signifikant verminderte Proliferationsrate und eine geringere Prokollagen- α 1-Produktion gegenüber wild-typ-PSC in vitro zeigten.

Die Effekte extrazellulärer Nukleotide auf das Wachstum von Tumorzellen wurden als erstes 1983 von Rapaport beschrieben. Behandlung von humanen Tumorzellen mit geringen Dosen ADP oder ATP führte dabei in vitro zum Arrest der Zellteilung in der S-Phase und anschließendem Zelltod ^[60]. In weiteren Untersuchungen zeigten Tumorzellen humaner kolorektaler und pankreatischer Zelllinien (u.a. HAT-29 und PANC-1) ebenfalls substantielle Wachstumshemmung nach Gabe kleiner Mengen ATP ^[62]. Intraperitoneale Injektionen von ATP in in vivo Studien an Mäusen mit CT26-Kolonkarzinomen konnten das Wachstum dieser Tumoren signifikant hemmen ^[61]. Randomisierte klinische Studien an 58 Patienten mit fortgeschrittenen NSCLC, die weder auf Chemo- noch auf Radiotherapie ansprachen, zeigten durch regelmäßige ATP-Injektionen eine Verlängerung der Lebensdauer, jedoch kam es zu keiner signifikanten Tumorregression bei alleiniger ATP-Therapie ^[2].

Neben der beschriebenen Wachstumshemmung verschiedener humaner Tumoren wie beispielsweise dem kolorektalen Karzinom, Ösophagustumoren, Prostatakarzinomen und dem malignen Melanom sowie den Erfolgen bei der Behandlung von Tumorkachexie konnte auch gezeigt werden, dass ATP die Resistenz nicht-maligner Zellen gegenüber Radio- und Chemotherapie erhöht ^[7].

In humanen Ösophagus-Karzinomzellen und Kolonkarzinomzellen führte die Aktivierung von P2Y₂-Rezeptoren zu einem Rückgang der Zellproliferation ^[30, 51].

Hohe ATP-Konzentrationen bzw. längere -Exposition führen über die spezifische Aktivierung von P2X₇-Rezeptoren zu einem programmierten Zelltod. Dabei kommt es

zur P2X₇ vermittelten Aktivierung der Caspase-Signalkaskade und Hochregulation von IL-1 β mit anschließender Apoptose [31, 73].

Seit Jahren wird häufig nach der onko-chirurgischen Therapie abdominalen Tumoren die Bauchhöhle mit sterilem Wasser gespült, unter anderem mit der Intention versprengte Tumorzellen nach Möglichkeit dadurch zu lysieren. Selzner et al. konnten zeigen, dass diese Spülung zu einer infolge der Hypoosmolarität bedingten Zellschwellung mit Freisetzung von ATP führt. Dadurch aktivierte P2X₇-Rezeptoren bedingen dann den apoptotischen Zelltod [69]. Apoptose im Zusammenhang mit P2X₇-Rezeptoren als Auslöser wurde ferner in humanen Kolonkarzinomzellen, Zervixkarzinomzellen, Melanomzellen, Basaliomen oder kutanen Plattenepithelkarzinomen beschrieben [12, 25, 79, 82].

Als vorherrschende Ektonukleotidase des Gefäßsystems spielt CD39 (NTPDase-1) eine wichtige Rolle im Rahmen von Angiogenese, Immunantwort, Hämostase und Thromboregulation [38, 70]. Indem Ektonukleotidasen extrazelluläre Nukleotide degradieren, reduzieren sie so die effektive Konzentration freigewordener Nukleotide. Dadurch stellen Ektonukleotidasen einen essentiellen Teil der purinerger Signalkaskade dar, indem sie die purinerge Signalwirkung entweder beenden oder verändern, die Rezeptor-Desensibilisierung modulieren oder sogar neue Signalmoleküle aus Vorstufen generieren, wie beispielsweise die Ektonukleotidase CD39L1 ADP aus ATP [65, 70]. Erst ein Zusammenwirken Nukleotid-sensibler P2-Rezeptoren und Nukleotid-degradierender Ektonukleotidasen ermöglicht eine regulierte purinerge Signalwirkung.

1.5. Ziele der vorliegenden Studie

Über die Bedeutung purinerger Signalkaskaden im humanen kolorektalen Karzinom ist bisher nur wenig bekannt [12, 30, 56]. In vorangegangenen Studien wurden purinerge Einflüsse auf zelluläre Prozesse zumeist in vitro an humanen Kolonkarzinomzelllinien beobachtet. Insbesondere der Einfluss der vaskulären Ektonukleotidase CD39 in Tumorgewebe bleibt jedoch weitgehend unerschlossen.

Das Verständnis der molekularen Prozesse aber, die der veränderten purinerger Signaltransduktion in kolorektalen Tumoren zugrunde liegen, könnte neue therapeutische Optionen eröffnen.

Ziel dieser Studie ist es daher, einen kleinen, wenn auch bescheidenen, Beitrag zum besseren Verständnis kolorektaler Karzinome zu leisten. Im vorliegenden

Forschungsprojekt untersuchten wir - aufbauend auf Studien an CD39-defizienten und -transgenen Mäusen - Expressionsmuster von CD39 und P2-Rezeptoren in gesunden humanen kolorektalen Geweben und in sieben verschiedenen Stadien humaner kolorektaler Karzinome. Ferner war es unser Ziel, die verschieden alterierten Expressionsmuster der untersuchten Ektonukleotidase und P2-Rezeptoren mit histo-morphologischen und klinischen Daten der Patienten zu korrelieren.

Studienziele im Einzelnen

- Vergleich der mRNA- und Proteinexpression von CD39, P2X₇ und P2Y₂ in sieben unterschiedlichen Stadien humaner kolorektaler Karzinome mit gesunden, humanen kolorektalen Geweben
 - Identifizierung der genauen Expressionsmuster von CD39, P2X₇ und P2Y₂ in den verschiedenen Geweben durch immunhistochemische Analysen
 - Korrelation der molekularbiologischen Resultate mit histo-morphologischen und klinischen Daten der Patienten.
-

2. Material und Methoden

2.1. Patienten und Gewebesammlung

In die Studie wurden Gewebeproben kolorektaler Karzinome von insgesamt 63 Patienten einbezogen, bei denen - je nach Tumorlokalisation - eine rechts- bzw. linksseitige Hemikolektomie, eine erweiterte rechts- bzw. linksseitige Hemikolektomie, eine Proktokolektomie, eine anteriore Rektumresektion oder eine abdominoperineale Rektumexstirpation durchgeführt wurde.

Entsprechend ihres Primärstaging wurden die Patienten in sieben unterschiedliche Gruppen eingeteilt:

TNM - Staging	Patientenzahl			Durchschnittsalter [y] / (Range)
	gesamt	männlich	weiblich	
T2N0M1	4	3	1	63 (56-68)
T3NxM0 survival 18-36 mo	7	5	2	74 (66-87)
T3NxM0 survival 72-110 mo	6	5	1	75 (53-86)
TxN2M0	3	0	3	71 (56-86)
T3NxM0 + M1hep metachron	17	10	7	67 (39-83)
T3NxM1 hep synchron	17	9	8	65 (26-86)
T4N0M0	9	7	2	73 (51-91)

Tabelle 3: Einteilung des Patientenkollektivs gemäß ihres TNM-Stagings nach UICC

Als Kontrollgewebe stand gesundes kolorektales Gewebe von 23 Patienten zur Verfügung, das infolge einer Kolonresektion bei benignen Krankheiten, wie beispielsweise einer Sigmaresektion, mitreseziert wurde.

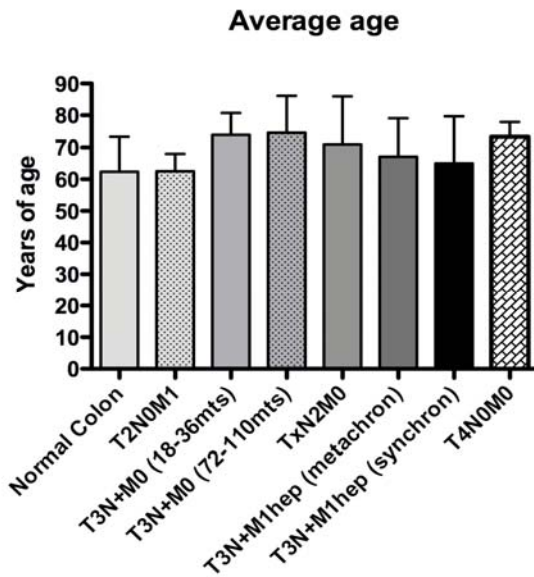


Abbildung 4:

Durchschnittsalter der in die Studie einbezogenen Patienten

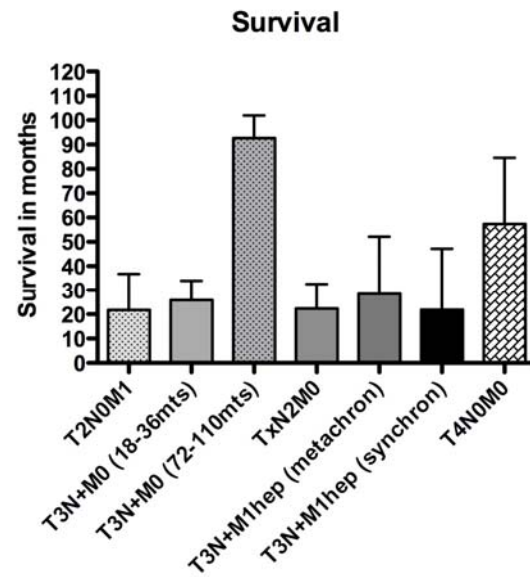


Abbildung 5:

Mittlere post-operative Überlebenszeit in Monaten (Patienten mit T3N+M0-Tumoren wurden entsprechend ihrer Überlebenszeit in zwei unterschiedliche Gruppen eingeteilt: 18-36mts vs. 72-110mts)

Sämtliche Gewebe wurden unverzüglich und nach gleicher Methode verarbeitet, um Fehler aufgrund degenerativer Prozesse ausschließen zu können. Sofort nach Entnahme wurden alle Gewebeproben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Analyse mittels quantitativer Real-Time-PCR (qRT-PCR), Western Blot und Immunhistochemie in flüssigem Stickstoff oder bei -80°C gelagert. Dadurch ließ sich eine optimale Gewebekonservierung und minimale Gefahr von Degradations-Artefakten gewährleisten.

Um zu verifizieren, dass sämtliche als Karzinomgewebe klassifizierten Proben ausreichend Tumorgewebe enthielten, beziehungsweise die 23 Kontrollgewebe frei von Tumor waren, wurden die tiefgefrorenen Gewebeproben in Sakura Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek Europe B. V., Zoeterwoude, Niederlande) eingebettet und 3, 5-7 μm dicke Cryostat-Schnitte (3 Schnitte/Objektträger) (Kammertemperatur -25°C , Messertemperatur -22°C) für eine anschließende Hämatoxylin-Eosin- (HE-) Färbung angefertigt. In der gleichen Sitzung wurden dann 30 μm dicke Schnitte für die Extraktion von RNA; 5-7 μm dicke Schnitte für immunhistochemische und HE-Färbungen und 10 μm dicke Schnitte für die Protein-Extraktion hergestellt. Die Schnitte für die RNA- und Proteinextraktion wurden

weiterhin bei -80°C bis zur Analyse gelagert; die Schnitte für die Immunhistochemie wurden luftdicht verpackt, bei -80°C gelagert und innerhalb von 14 Tagen weiter verarbeitet, um eine Austrocknung der Präparate zu vermeiden. Mittels der HE-gefärbten Präparate wurde durch einen Referenzpathologen die Konservierungsqualität sowie die histo-pathologische Diagnose aller Gewebeproben gesichert, und darüber hinaus der prozentuale Anteil von Normal-, Tumor- und fibrotischem Gewebe sowie Muskel, nekrotischem Gewebe, Fett und Entzündung erhoben.

2.2. Übersicht über die Untersuchungsmethoden

Um die Expression der mRNA von P2X_7 , P2Y_2 und CD39 in den Gewebeproben zu determinieren, wurde die mRNA in cDNA transkribiert und mittels quantitativer Real-Time-PCR (qRT-PCR) gemessen. Western Blot Analysen dienten der Bestimmung der Proteinexpression in den unterschiedlichen Proben. Durch immunhistochemische Verfahren wurde mittels spezifischer Antikörper das Verteilungsmuster der einzelnen Proteine im Gewebe untersucht.

2.3. Analyse der messenger-RNA (mRNA)-Expression mittels qRT-PCR

2.3.1 RNA-Extraktion

Die Extraktion der RNA erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) gemäß dem Protokoll des Herstellers:

2.3.1.1. Materialien

- Gewebeproben (20 x 30 μm dicke Schnitte) auf Trockeneis
- Eppendorf-Reaktionsgefäße
- 1ml Feindosierungsspritzen
- 23G Kanülen (Sterican®, B. Braun, Melsungen, Deutschland)
- RNeasy Mini Kit (Qiagen):
 - RNeasy Mini Spin Columns
 - Collection Tubes (1,5ml)
 - Collection Tubes (2ml)
 - RLT Puffer (vor Gebrauch: Zugabe von 10 μl β -Mercaptoethanol (β -ME) zu 1ml RLT-Puffer)

- RW1-Puffer
- RPE-Puffer (wird als Konzentrat geliefert, zur Herstellung einer *Working Solution* wird der Puffer im Verhältnis 5:1 mit 100% Ethanol verdünnt)
- RNase-freies H₂O
- Mikrozentrifuge (Centrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

2.3.1.2. Durchführung

1. Homogenisieren - Zugabe von 600µl RLT-Puffer (+ β-ME) zum tiefgefrorenen Gewebe; Gewebe wurde durch vorsichtiges auf-/abpipettieren gelöst und im Anschluss mit einer Feindosierungsspritze mit 23G Kanüle durch Auf-/Abziehen homogenisiert.
2. Zentrifugieren - Lysat wurde 3 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abpipettiert und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt (nur dieser Überstand wurde in den folgenden Schritten benötigt, das Pellet wurde verworfen)
3. 70% Ethanol - Zugabe von 600µl 70% Ethanol und vorsichtiges Mischen durch auf-/ abpipettieren
4. RNeasy spin column - 700µl des Lysates wurden in ein Collection Tube (2ml) mit RNeasy spin column transferiert, 15 s bei ≥ 10.000 rpm zentrifugiert und das Filtrat danach verworfen
5. RW1-Puffer - 700µl RW1 Puffer wurden auf die RNeasy spin column pipettiert, erneut 15 s bei ≥ 10.000 rpm zentrifugiert und das Filtrat danach verworfen
6. RPE-Puffer - Waschen der Membran: 500µl RPE-Puffer wurden auf die RNeasy spin column pipettiert, erneut 15 s bei ≥ 10.000 rpm zentrifugiert und das Filtrat danach verworfen
7. RPE-Puffer - Zweiter Waschschrift: 500µl RPE-Puffer wurden auf die RNeasy spin column pipettiert und 2 min bei ≥ 10.000 rpm zentrifugiert

8. Abzentrifugieren von Puffer-Überresten - RNeasy spin column wurde in ein neues Collection Tube (2ml) transferiert und 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, um eventuelle RPE-Puffer-Überreste ab zu zentrifugieren
9. Auslösen der RNA - RNeasy spin column wurde in ein neues Collection Tube (1,5ml) transferiert, 40µl RNase-freies H₂O direkt auf die Membran pipettiert und 1 min bei ≥ 10.000 rpm zentrifugiert. Dadurch wird die RNA aus der Membran gelöst.
10. Lagerung/Transkription - Nach diesem Schritt konnte die gewonnene RNA bei -80°C für mehrere Monate konserviert werden oder im nächsten Schritt in cDNA transkribiert werden (s.u.)

2.3.1.3. Konzentrationsbestimmung der RNA und Reinheitsmessung

Die Konzentration und der Reinheitsgrad der gewonnenen RNA wurden über die Messung der optischen Dichte von je 1µl Probenvolumen mittels Photospektrometer (IMPLEN, NanoPhotometerTM, München, Deutschland) bei 260nm, Lid Factor 50 ermittelt.

Das Verhältnis der Konzentration : Absorption wird durch das Lambert-Beer'sche Gesetz beschrieben: $A = E \times C \times D$.

Die Absorption (A) ist dabei gleich dem Produkt aus dem Substanz-spezifischen Extinktions-Koeffizient (E), der Konzentration der zu bestimmenden Probe (C) und der Wellenlänge in cm (D).

Im selben Wellenlängenbereich haben jedoch auch Verunreinigungen wie Phenolrückstände, Nukleotide, Proteine etc. ihr Absorptionsmaximum. Um den Reinheitsgrad zu bestimmen wird daher zusätzlich das Verhältnis verschiedener optischer Dichten zueinander bestimmt. So deutet beispielsweise ein Verhältnis $OD_{260nm} / OD_{280nm} < 1,8$ auf eine Verunreinigung durch Proteinrückstände hin, ein Verhältnis $OD_{260nm} / OD_{230nm} < 2,0$ auf Rückstände genomischer DNA.

2.3.2. Reverse Transkription von RNA in cDNA

Im nächsten Schritt wurde die gewonnene RNA in cDNA mit Hilfe des QuantiTect Rev. Transcription Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) gemäß dem Hersteller-Protokoll transkribiert.

2.3.2.1. Prinzip der reversen Transkription

Zur Replikation müssen Retroviren - wie beispielsweise das humane Immundefizienzvirus (HIV), das Avian Myeloblastosis Virus (AMV) oder das Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) - ihre RNA in DNA umschreiben. Dafür verfügen sie über ein spezielles Enzym: die Reverse Transkriptase. Dieses multifunktionale Enzym verfügt über drei verschiedene enzymatische Aktivitäten: eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, eine Hybrid-abhängige Exoribonuclease (RNase-H), die spezifisch den RNA-Strang des transkribierten RNA/DNA-Hybridstrangs degradiert, und eine DNA-abhängige DNA-Polymerase ^[9].

In vitro bedient man sich der ersten beiden Enzymaktivitäten um RNA in cDNA umzuschreiben und diese dann in weiteren Schritten mittels PCR zu amplifizieren.

2.3.2.2. Materialien

- 1µg Template-RNA (nötiges Volumen wurde entsprechend der photometrisch bestimmten Konzentration berechnet)
- QuantiTect Rev. Transcription Kit (Qiagen):
 - gDNA-Wipeout Puffer, 7x
 - Quantiscript Reverse Transcriptase
 - Quantiscript RT Puffer, 5x
 - RT Primer Mix
 - RNase-freies H₂O
- RNase-freie Eppendorf Reaktionsgefäße (500µl)
- Mikrozentrifuge (Centrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Thermoblock (Thermomixer, Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Nuclease-freie, Filter-Pipettenspitzen
- Sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße

2.3.2.3. Durchführung

1. Auftauen
 - Auftauen der Template-RNA auf Eis; gDNA Wipeout Puffer, Quantiscript Reverse Transcriptase, Quantiscript RT Puffer, RT Primer Mix und RNase-freies H₂O wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, durch schnelles Schütteln gemischt (nicht vortexen!), und die Flüssigkeiten kurz zentrifugiert.

- Im Folgenden wurden sämtliche Schritte zügig und auf Eis durchgeführt um das Risiko der Degradation der RNA zu verringern.
2. Eliminierung genomischer DNA (gDNA)

- Reaktionsansatz für 1 Reaktion:		
	gDNA Wipeout Puffer, 7x	2µl
	1µg Template RNA	Volumen variabel
	RNase-freies H ₂ O	Volumen variabel
	Gesamtvolumen	14µl

- Kurz mischen, bei 42°C für 2 min inkubieren und anschließend auf Eis stellen.
3. Reverse Transkription
- Parallel wurde der Master Mix für die Reverse Transkription angesetzt. (Für ≥ 1 Reaktionen empfiehlt es sich dabei einen Gesamtansatz, mit einem Volumen, das 10% über dem für alle Einzelreaktionen liegt, herzustellen. Im Anschluss wird der Gesamtansatz entsprechend aliquottiert.)
 - Reaktionsansatz für 1 Reaktion:

Master Mix für Reverse Transkription	
Quantiscript Reverse Transkriptase	1µl
Quantiscript RT Puffer, 5x	4µl
RT Primer Mix	1µl
Zugabe der Template RNA	
Reaktionsansatz aus Schritt 2	14µl
Gesamtvolumen	20µl

- Kurz mischen, zentrifugieren und 15 min bei 42°C inkubieren; danach auf Eis stellen.

4. Inaktivierung der Reversen Transkriptase - Durch die Inkubation für 3 min bei 95°C wurde die Quantiscript Reverse Transkriptase inaktiviert.
5. Lagerung/ qRT-PCR - Nach diesem Schritt, kann die cDNA bei -20°C eingefroren werden und bleibt über längere Zeit stabil.
- Alternativ wird das cDNA-Produkt mit PCR-tauglichem H₂O 1:5 verdünnt, aliquottiert und in der Folge durch qRT-PCR amplifiziert.

2.3.3. Bestimmung spezifischer Primer für P2X₇, P2Y₂ und CD39

Die richtige Wahl der Primer ist entscheidend für die Qualität des PCR-Produkts. Hierbei ist wichtig, dass die Primer spezifisch an den Start- und Endpunkt der zu detektierenden DNA-Sequenz binden. Ferner spielt die Annealing-Temperatur (T_A) der Primer eine wichtige Rolle. Die T_A ist die Temperatur, bei der sich ein Primer an seine spezifische DNA-Sequenz ligiert und liegt in der Regel bei 50 - 65°C, d.h. 3 - 5°C niedriger als seine Schmelztemperatur ^[56], bei der gemäß Definition die Hälfte der DNA denaturiert ist. Ist die T_m zu hoch, besteht die Gefahr, dass die Enzyme (z.B. die DNA-Polymerase) denaturieren, ist T_m wiederum zu gering, bindet der Primer unspezifisch auch an andere DNA-Abschnitte. Die T_m steigt linear mit der Anzahl der Basenpaare eines Primers an, daher sollte die Länge eines Primers 30 Basenpaare nicht übersteigen.

Für die Zielgene P2X₇ ^[12], P2Y₂ ^[12] und CD39 ^[49] spezifische Forward- und Reverse-Primer wurden der Literatur entnommen und zunächst mittels BLAST/Primer3-Software (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA) auf ihre Spezifität überprüft:

Gen	Forward-Primer	Reverse-Primer	Größe [bp]
P2X ₇	5' – CTT TCT CAA AAC AGA AGG CCA AGA – 3'	5' – CAA CCT CGG TCA GAG GAA CAG A – 3'	84
P2Y ₂	5' – CTC TAC TTT GTC ACC ACC AGC GC – 3'	5' – CCA CGA AGC GGC TGA AGA – 3'	85
CD39	5' – CAG GGA CCC ATG CTT TCA TCC – 3'	5' – GCT GGA ATG GAA GAG TCA TCT CA – 3'	104

Alle Primer wurden bei Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert, als lyophilisiertes Pulver geliefert und entsprechend der Herstellerinformationen in deionisiertem, PCR-tauglichem H₂O gelöst (*Stock Solution*).

2.3.3.1 Bestimmung der Annealing-Temperatur (T_A)

Zur Bestimmung der adäquaten T_A der drei verschiedenen Primersets wurde die cDNA einer Gewebeprobe eines Pankreaskarzinoms als Positivkontrolle mittels PCR amplifiziert. Je Primerset wurden vier verschiedene T_A getestet. Die PCR wurde mithilfe des KOD Hot Start DNA Polymerase Kit (Novagen, Madison, WI, USA) nach dem Hersteller Protokoll auf dem Eppendorf Mastercycler[®] Pro (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt.

2.3.3.2.1. Materialien

- 15µl cDNA einer humanen Pankreas-Karzinom Gewebeprobe
(Herstellung der Working Solution: Stock Solution / PCR-taugliches H₂O = 1 / 5)
- KOD Hot Start DNA Polymerase Kit (Novagen):
 - KOD Hot Start DNA Polymerase (1 U/µl)
 - 10x KOD Hot Start DNA Polymerase Puffer
 - 25mM MgSO₄
 - dNTPs (2mM)
 - PCR-grade H₂O
- Forward (5') Primer
(Herstellung der Working Solution: Stock Solution / PCR-taugliches H₂O = 1 / 10)
- Reverse (3') Primer
(Herstellung der Working Solution: Stock Solution / PCR-taugliches H₂O = 1 / 10)
- 5er-Reihe 0,2ml-PCR-Gefäße (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Eppendorf Mastercycler[®] Pro (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Nuclease-freie, Filter-Pipettenspitzen
- Sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße

2.3.3.1.2. Durchführung

1. Auftauen
 - Auftauen der Sample cDNA, KOD Hot Start Polymerase, 10x KOD Hot Start DNA Polymerase Puffer, 25mM MgSO₄, dNTPs und PCR-tauglichen H₂O auf Eis.
 - Zur Vermeidung von Degradation wurden die folgenden Schritte zügig und auf Eis durchgeführt.
2. PCR-Reaktionsansatz
 - Reaktionsansatz für 1 Reaktion; das im Protokoll des Herstellers angegebene Gesamtvolumen von 50µl wurde halbiert.

10x KOD Hot Start Polymerase Puffer	2,5µl
25mM MgSO ₄	1,5µl
dNTPs (je 2mM)	2,5µl
PCR-taugliches H ₂ O	15,5µl
KOD Hot Start DNA Polymerase (1U/µl)	0,5µl
Forward (5') Primer	0,75µl
Reverse (3') Primer	0,75µl
Pankreas cDNA	1,0µl
Gesamtvolumen	25µl

- Zur Bestimmung der T_A wurden pro Primerset vier verschiedene Temperaturen getestet. Daher wurde pro Primerset ein Reaktionsansatz von 125µl (um mögliche Pipettierfehler auszugleichen wurde das eigentlich benötigte Volumen von 100µl um 25µl erhöht) gewählt und je 25µl in vier Eppendorf-Tubes einer 5er-Reihe 0,2ml-PCR-Tubes pipettiert.

3. Annealing-Temperatur

- Folgende T_A wurden getestet:

Primer	T_m [°C] (lt. Synthese-Report des Herstellers)	Test T_A [°C]
CD39-F	61,8	55-58
CD39-R	60,6	55-58
P2X7-F	59,3	57-60
P2X7-R	62,1	57-60
P2Y2-F	64,2	57-60
P2Y2-R	58,2	57-60

4. Amplifikation

- Die Amplifikation erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers für PCR-Produkte < 500bp:

1. Aktivierung der Polymerase	95°C	2 min
2. Denaturierung	95°C	20 s
3. Annealing	T_A	10 s
4. Extension	70°C	10 s/kb

- Die Schritte 2-4 wurden für 40 Zyklen wiederholt.

5. Gelelektrophorese

- Die Identifikation der PCR-Produkte erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese: Hierbei wird die amplifizierte DNA in ein Agarose-Gel eingebracht und durch Anlegen elektrischer Spannung nach der Größe der DNA-Fragmente aufgetrennt; kleinere Fragmente bewegen sich dabei schneller durch die Poren des Gels auf den Pluspol zu als größere.
- Herstellung des Agarose-Gels:
 - 1,5g Agarose Pulver in 100ml 1x TAE Puffer geben
 - Gemisch für 3 min in der Mikrowelle kochen, bis Agarose gelöst ist
 - Zugabe von 3µl Ethidiumbromid
 - Gießen des Gels in Elektrophorese-Kammer und Einlegen eines „Kamms“ ca. 5-10mm entfernt vom

- oberen Rand (Minuspol) zur Formung der Geltaschen
- Nach Polymerisation des Gels, Kamm entfernen und die Elektrophoresekammer mit TBE-Running-Puffer (pH 8,0) füllen
- Laden des Agarose-Gels:
 - 5µl DNA-Ladder wurden in die äußere linke Tasche pipettiert
 - je 17µl des amplifizierten DNA-Produkts mit 5µl Farbmarker (Loading Dye) durch pipettieren gemischt und davon 20µl in die einzelnen Taschen geladen (vgl. Abb. 6)



Abbildung 6: Schema der Gelelektrophorese zur Bestimmung von T_A

- Auftrennung der DNA-Fragmente:
 - Durch Anlegen elektrischen Stroms ($U=120V$, $I=220mA$) für 30 min wurden die DNA-Fragmente im nächsten Schritt nach ihrer Größe aufgetrennt.
6. Auswertung
- Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die einzelnen DNA-Banden durch UV-Licht (Eagleeye-UV-Light-Detector) sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert.
 - Der Ladder diente dabei zur Abschätzung der Größe des PCR-Produkts und so zur Identifikation der gewünschten Bande.

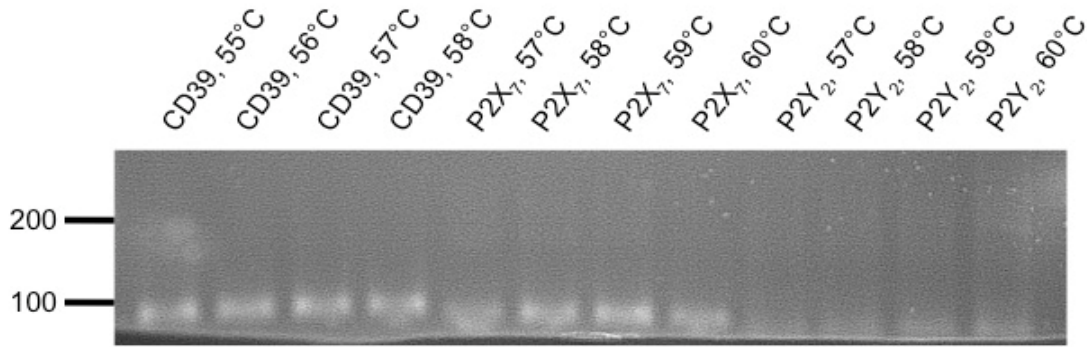


Abbildung 7: PCR-Produkte für CD39 (104bp), P2X7 (84bp) und P2Y2 (85bp)

Für die einzelnen Primer ergaben sich daher folgende optimale Annealing-Temperaturen:

Primer	T_A [°C]
CD39	57
P2X ₇	59
P2Y ₂	60

2.3.4. Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

2.3.4.1. Prinzip der qRT-PCR

Die quantitative Real-Time-Polymerase-Ketten-Reaktion ermöglicht zusätzlich zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren mittels PCR deren simultane Quantifizierung durch Messung eines proportional zur Amplifikation der entsprechenden Nukleinsäure zunehmenden Fluoreszenzsignals. Das Fluoreszenzsignal entsteht entweder durch die Spaltung eines an die DNA gebundenen, fluoreszierenden Donors (Reporter) von einem Licht absorbierenden Akzeptor (Quencher) durch die 5'-3' Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase (z.B. TaqMan[®]), oder - wie in dieser Studie - durch die Bindung eines SYBR Green I-Farbstoffs an ds-DNA. Durch Messung der Signalintensität während der exponentiellen Phase der PCR lassen sich somit Rückschlüsse auf die Ausgangskonzentration der gesuchten DNA-Sequenz und somit auf die Expression der mRNA im ursprünglichen Gewebe ziehen.

2.3.4.2. Materialien

- Sample cDNA

(Herstellung der Working Solution: Stock Solution / PCR-taugliches H₂O = 1 / 5)

- Forward (5') Primer, Reverse (3') Primer (Zielgen: CD39, P2X₇, P2Y₂)
(Herstellung der Working Solution: Stock Solution / PCR-taugliches H₂O = 1 / 10)
- Forward (5') Primer, Reverse (3') Primer (Housekeeping Gene HPRT)
(Herstellung der Working Solution: Stock Solution / PCR-taugliches H₂O = 1 / 10)
- LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland):
 - PCR-taugliches H₂O
 - Master Mix, 2-fache Konzentration
- LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland)
- LightCycler® 480 Multiwell Sealing Foil (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland)
- LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland)
- Mikrozentrifuge (Centrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Highspeed-Tischzentrifuge (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)
- Nuclease-freie, Filter-Pipettenspitzen
- Sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße

2.3.4.3. Durchführung

Die quantitative RT-PCR erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers am LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland).

1. Auftauen
 - Das Auftauen der Sample cDNA, Primer, LightCycler® 480 SYBR Green I Master und PCR-tauglichen H₂O erfolgte auf Eis.
 - Der Master Mix muss dabei vor Lichtexposition geschützt werden!
2. Vorbereitung
 - Zur Herstellung einer *Working Solution* wurden Sample cDNA 1:5 und Primer 1:10 in PCR-tauglichem H₂O verdünnt.
 - Vor Gebrauch wurden Sample cDNA, Primer und Master Mix durch vorsichtiges Pipettieren (nicht vortexen!)

gemischt und abzentrifugiert.

3. Reaktionsansatz: - In einem sterilen 1,5ml Eppendorf-Tube wurde der PCR-Mastermix

PCR-taugliches H ₂ O	3,0µl
F-Primer, 1:10	1,0µl
R-Primer, 1:10	1,0µl
Master Mix, 2x conc.	10,0µl
= Volumen Mastermix	15,0µl
+ Volumen Probe	5,0µl
= Volumen gesamt	20,0µl

- Für eine LightCycler[®] 480 Multiwell Plate 96 wurde der Ansatz entsprechend erweitert (Angaben inkl. Überschuss zum Ausgleichen möglicher Pipettierfehler):

PCR-taugliches H ₂ O	150µl
F-Primer, 1:10 (Zielgen)	50µl
R-Primer, 1:10 (Zielgen)	50µl
Master Mix, 2x conc.	500µl
Gesamtvolumen	750µl

PCR-taugliches H ₂ O	150µl
F-Primer, 1:10 (HPRT)	50µl
R-Primer, 1:10 (HPRT)	50µl
Master Mix, 2x conc.	500µl
Gesamtvolumen	750µl

4. Pipettieren der 96-Well-Plate

- Um Fehler durch Kontamination zu vermeiden, wurden die Proben stets in einem doppelten Ansatz für das Zielgen als auch für das Housekeeping-Gene auf die Platte aufgetragen (*vgl. Abb. 8A*); zur Kontrolle der Ergebnisse wurden sämtliche cDNA Proben in einem späteren PCR-Lauf in einfachen Ansätzen erneut untersucht (*vgl. Abb. 8B*):

- Der PCR-Mix wurde durch vorsichtiges Pipettieren (nicht vortexen!) gemischt und je 15µl PCR-Mix in

jedes Well pipettiert.

- Im Anschluss wurden 5µl Sample cDNA in jedes Well hinzugegeben und erneut vorsichtig durch Pipettieren gemischt.
- Als Negativkontrolle wurden statt Sample cDNA, 5µl PCR-taugliches H₂O zum PCR-Mix pipettiert um mögliche Verunreinigungen des PCR-Mix ausschließen zu können.

5. Versiegeln/
Zentrifugieren

- Die Platten wurden nun durch Aufkleben der LightCycler® 480 Multiwell Sealing Foil versiegelt und in einer Highspeed-Tischzentrifuge 2 min bei 3.000rpm zentrifugiert.

6. Amplifikation

- Im Anschluss wurde die qRT-PCR am LightCycler® 480 Real-Time PCR System mit für alle Samples und Ziel-Gene identischem Programm durchgeführt:

Phase	Zyklen	Temperatur [°C]	Temp. Anstieg [°C/s]
Prä-Inkubation	1	95	4,4
Amplifikation	45	95	4,4
		59	2,2
		72	4,4
Abkühlen	1	40	2,2

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CD39	A	PROBE 1	PROBE 2	PROBE 3	...								
CD39	B	PROBE 1	PROBE 2	PROBE 3	...								
HPRT	C	PROBE 1	PROBE 2	PROBE 3	...								
HPRT	D	PROBE 1	PROBE 2	PROBE 3	...								
CD39	E						N-COLON 1	N-COLON 2	N-COLON 3	...			H ₂ O
CD39	F						N-COLON 1	N-COLON 2	N-COLON 3	...			H ₂ O
HPRT	G						N-COLON 1	N-COLON 2	N-COLON 3	...			H ₂ O
HPRT	H						N-COLON 1	N-COLON 2	N-COLON 3	...			H ₂ O

Abbildung 8A: Beispiel eines Pipettierasters einer LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 für das Ziel-Gen CD39. Die Kolonkarzinomproben, die Normalgewebe (Kalibrator) sowie PCR-taugliches H₂O (Negativkontrolle) wurden für das Ziel-Gen (hier: CD39) sowie für das Housekeeping-Gen (HPRT) stets in Doppelansätzen auf die 96-Well Plate aufgetragen.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CD39	A	PROBE 1	PROBE 2	PROBE 3	...								
HPRT	B	PROBE 1	PROBE 2	PROBE 3	...								
CD39	C	...	PROBE 14	...									
HPRT	D	...	PROBE 14	...									
CD39	E					...	PROBE 30	N-COLON 1	N-COLON 2	N-COLON 3	...		
HPRT	F					...	PROBE 30	N-COLON 1	N-COLON 2	N-COLON 3	...		
CD39	G										...	N-COLON 17	H ₂ O
HPRT	H										...	N-COLON 17	H ₂ O

Abbildung 8B: Beispiel eines Pipettierasters einer LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 für das Ziel-Gen CD39. Zur Kontrolle der Ergebnisse aus den Doppelansätzen wurden alle Proben in Einzelansätzen in einem späteren PCR-Lauf erneut untersucht.

2.3.4.4. Auswertung

Die Auswertung und Quantifizierung der qRT-PCR erfolgte durch Vergleich der einzelnen C_T -Werte:

In der exponentiellen Phase der quantitativen Real-Time-PCR verdoppelt sich das PCR-Produkt mit jedem Zyklus, in der anschließenden linearen Phase verlangsamt sich die Amplifikation und kommt in der Plateau-Phase schließlich zum Erliegen. Daher bezieht sich die Quantifizierung der PCR-Ergebnisse auf die exponentielle Phase. Der C_T -Wert (cycle threshold) gibt dabei den PCR-Zyklus an, an dem das Fluoreszenz-Signal der jeweiligen Probe das Background-Signal übersteigt (threshold line).

Die Mittelwerte der C_T -Werte der einzelnen Kolonkarzinom-Proben wurden mit dem Mittelwert der C_T -Werte aller gesunden Kolonproben als Kalibrator verglichen. Für zulässige Ergebnisse wurden die C_T -Werte der Proben sowie der Normalgewebe, die auf die Expression von CD39, P2X₇ oder P2Y₂ als Zielgen getestet wurden, stets zu den C_T -Werten der selben Proben und Normalgewebe, die auf HPRT als Housekeeping-Gen untersucht wurden, normiert (ΔC_T).

Berechnung:

$$[C_{T1}(\text{Probe X, Zielgen Y}) + C_{T2}(\text{Probe X, Zielgen Y})] \div 2 = \text{Mittelwert } C_T(\text{Probe X, Zielgen Y})$$

$$[C_{T1}(\text{Probe X, HPRT}) + C_{T2}(\text{Probe X, HPRT})] \div 2 = \text{Mittelwert CT}(\text{Probe X, HPRT})$$

$$\text{Mittelwert } C_T(\text{Probe X, Zielgen Y}) - \text{Mittelwert } C_T(\text{Probe X, HPRT}) =$$

$$\Delta C_T(\text{Probe X})$$

$$[C_{T1}(\text{Normalgewebe 1, Zielgen Y}) + C_{T2}(\text{Normalgewebe 1, Zielgen Y})] \div 2 =$$

$$\text{Mittelwert } C_T(\text{Normalgewebe 1, Zielgen Y})$$

$$[C_{T1}(\text{Normalgewebe 1, HPRT}) + C_{T2}(\text{Normalgewebe 1, HPRT})] \div 2 =$$

$$\text{Mittelwert CT}(\text{Normalgewebe 1, HPRT})$$

$$\text{Mittelwert } C_T(\text{Normalgewebe 1, Zielgen Y}) - \text{Mittelwert } C_T(\text{Normalgewebe 1, HPRT}) =$$

$$\Delta C_T(\text{Normalgewebe 1})$$

$$\frac{[\Delta C_T (\text{Normalgewebe 1}) + \Delta C_T (\text{Normalgewebe 2}) + \dots + \Delta C_T (\text{Normalgewebe n})]}{\text{Anzahl Normalgewebe (n)}} = \Delta C_T (\text{Kalibrator})$$

$$\Delta C_T (\text{Probe X}) - \Delta C_T (\text{Kalibrator}) = \Delta \Delta C_T$$

$$\text{Expression Zielgen X (im Vergleich zum Normalgewebe)} = 2^{-\Delta \Delta C_T}$$

2.4. Bestimmung der Proteinmenge mittels Western Blot Analysen

Neben der Bestimmung der Expression von CD39, P2X₇ und P2Y₂ auf RNA Ebene, wurden die Gewebeproben lysiert und im Anschluss die Proteinkonzentration der Ektonukleotidase CD39 sowie der beiden P2-Rezeptoren in den unterschiedlichen Kolonkarzinomgeweben mittels Western Blot Analysen untersucht und mit deren Konzentration in den Normalgeweben korreliert.

2.4.1 Herstellung der Gewebelysate

2.4.1.1. Materialien

- pro Gewebesample 80x, 10µm dicke Kryoschnitte (vgl. S. 24) in 1,5ml Eppendorf Tubes
- RIPA-Lysis Puffer (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)
- Complete, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland)
- 1ml Feindosierungsspritzen
- 23G Kanülen (Sterican®, B. Braun, Melsungen, Deutschland)
- 1,5ml sterile Eppendorf Tubes
- Feinwaage
- Trockeneis
- Eis
- Mikrozentrifuge (Centrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

2.4.1.2. Durchführung

Nach Auftauen der Gewebe wurden sämtliche Schritte zügig und auf Eis durchgeführt, um einer Degradation der Proteine entgegen zu wirken.

1. Vorbereitung
 - Die Gewebeprobe wurde aus dem -80°C Gefrierschrank direkt auf Trockeneis bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.
 - Zur Bestimmung des benötigten Volumens an RIPA-Lysis Puffer wurde die Masse der Probe mit Hilfe einer Feinwaage determiniert. Dazu wurde die Masse eines Eppendorf-Tubes bestimmt und von der Masse der Probe subtrahiert.
2. Lyse
 - Zu je 10mg tiefgefrorener Probe wurden 100µl RIPA-Lysis Puffer (Zugabe 1 Protease-Inhibitor-Tablette zu 5ml RIPA-Lysis Puffer) gegeben, durch mehrmaliges Pipettieren aufgetaut und grob zerkleinert.
 - Die weitere Zerkleinerung erfolgte durch eine 1ml Feindosierungsspritze mit aufgesteckter 23G Kanüle bis zur vollständigen Homogenisierung.
 - Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Lysate dann auf Eis gelagert um eine Proteindegradation zu vermeiden.
3. Zentrifugieren
 - Anschließend wurden die Gewebelysate 10 min bei 13.000rpm, 4°C in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert, wodurch sich der Gewebedetritus vom Überstand absetzte.
4. Transfer des Überstandes
 - Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand in ein neues 1,5ml Eppendorf-Tube transferiert und der Gewebedetritus verworfen.

2.4.2 Messung der Proteinkonzentration

Für die Validität der Western Blots ist es unerlässlich, pro Gewebeprobe die gleiche Menge an Protein auf das Gel aufzubringen. Daher wurde die Proteinkonzentration jedes Gewebelysates durch Abgleich mit einem Standard-Protein (z.B. BSA) bekannter Konzentration vor jeder Durchführung eines Western Blots bestimmt.

2.4.2.1. Materialien

- Überstand der frischen Gewebelysate (Lagerung auf Eis)

- Bovine Serum Albumin (BSA) [2,0mg/ml] als Standard-Protein (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)
- BCA Protein Assay Reagent (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)
- 96-well-Platte (Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich)
- 37°C Inkubator
- Photometer 570nm (Opsys MR, Thermo LabSystems, Chantilly, VA, USA)
- Falcons (14ml)
- Vortexer
- 1,5 ml Cryotubes (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

2.4.2.2. Durchführung

1. Vorbereitung
 - Solution A und B des BCA Protein Assay Reagent wurden im Verhältnis 50:1 in einem Falcon gemischt und gevortext, bis zum Gebrauch auf Eis gelagert und durch Alufolie vor Lichtexposition geschützt.
 - Mittels Verdünnungsreihe in dH₂O wurden bekannte Konzentrationen ([2,0mg/ml] – [1,0mg/ml] – [0,5mg/ml] - [0,25mg/ml]) eines Standard-Proteins (BSA) angelegt.
2. Auftragen der Proben
 - Die Bestimmung der Proteinkonzentration des Standardproteins sowie der verschiedenen Gewebesamples erfolgte in Doppelansätzen mit anschließender Bildung des Mittelwertes.
 - Dazu wurden zunächst pro Probe je 200µl BCA Protein Assay Reagent (Solution A + B) in zwei Wells einer 96-Well-Platte pipettiert und im Anschluss je 5µl Gewebelysat dazugegeben und durch mehrmaliges Pipettieren gemischt.
3. Inkubation
 - Nach dem Auftragen des Standardproteins sowie der einzelnen Samples wurde die 96-Well-Platte 30 min in einem Inkubator bei 37°C inkubiert.
4. Messung der Konzentration
 - Durch die Inkubation erfolgte eine Farbreaktion, deren Stärke proportional zur Proteinkonzentration war und photometrisch bei 570nm gemessen wurde.

2.4.2.3. Berechnung der Proteinkonzentration

Aus den gemessenen Extinktionswerten (OD) wurde nun rechnerisch (Microsoft Windows Excel®) auf die Ausgangskonzentration der Proteine der einzelnen Samples rückgeschlossen:

Dabei wurde aus den Mittelwerten der Extinktion (OD_M) der bekannten Konzentrationen des Standardproteins eine Eichgerade mit folgender Funktion erstellt:

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = m \cdot OD_M + t$$

(m entspricht dabei der Steigung der Geraden, t dem y-Achsenabschnitt)

$$\{ OD_1 (\text{Standard } [2,0]) + OD_2 (\text{Standard } [2,0]) \} \div 2 = \text{Mittelwert } OD_M (\text{Standard } [2,0])$$

$$\{ OD_1 (\text{Standard } [1,0]) + OD_2 (\text{Standard } [1,0]) \} \div 2 = \text{Mittelwert } OD_M (\text{Standard } [1,0])$$

$$\{ OD_1 (\text{Standard } [0,5]) + OD_2 (\text{Standard } [0,5]) \} \div 2 = \text{Mittelwert } OD_M (\text{Standard } [0,5])$$

$$\{ OD_1 (\text{Standard } [0,25]) + OD_2 (\text{Standard } [0,25]) \} \div 2 = \text{Mittelwert } OD_M (\text{Standard } [0,25])$$

$$\text{Erstellung der Eichgerade: Konzentration } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = m \cdot OD_M + t$$

$$\{ OD_1 (\text{Gewebeprobe X}) + OD_2 (\text{Gewebeprobe X}) \} \div 2 = \text{Mittelwert } OD_M (\text{Gewebeprobe X})$$

Durch Einsetzen von OD_M (Gewebeprobe X) in die Eichgerade ergibt sich die Proteinkonzentration der Gewebeprobe X

In sämtliche Geltaschen wurden stets 20 μ l Gesamtvolumen mit 40 μ g Protein geladen:

$$20\mu\text{l}_{\text{Gesamtvolumen}} = 40\mu\text{g} \div \text{Konzentration}_{(\text{Gewebeprobe X})} \mu\text{g}/\mu\text{l} + \text{dH}_2\text{O } \mu\text{l}$$

2.4.3. Vorbereitung und Denaturierung der Proteinlysate

2.4.3.1 Materialien

- Überstand der frischen Gewebelysate (Lagerung auf Eis)
- NuPage® LDS Sample Buffer (4x) (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA)
- NuPage® Sample Reducing Agent (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA)
- dH₂O
- Eppendorf Reaktionsgefäße (500 μ l und 1,5ml)
- Thermoblock (Thermomixer, Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Mikrozentrifuge (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

2.4.3.2. Durchführung

1. Vorbereitung
 - Für die Proben, die auf die Expression der P2-Rezeptoren P2X₇ bzw. P2Y₂ untersucht wurden, war es nötig, die Proteine zu reduzieren:
 - Für 1 Probe:
 - 5,0µl NuPage[®] LDS Sample Buffer (4x) wurden mit 2,0µl NuPage[®] Sample Reducing Agent in einem Eppendorf Reaktionsgefäß (500µl) gemischt.
 - Proben, die auf die Expression von CD39 untersucht wurden, wurden im unreduzierten Zustand belassen:
 - Für 1 Probe:
 - 5,0µl NuPage[®] LDS Sample Buffer (4x) wurden in ein entsprechendes Eppendorf Gefäß pipettiert.
2. Pipettieren der Gewebeproben
 - Entsprechend der oben berechneten Proteinkonzentration der Gewebeproben und des daraus resultierenden Volumens an Sample und dH₂O, wurde zunächst das benötigte Volumen dH₂O und zuletzt das korrespondierende Volumen Protein zu Sample Buffer +/- Reducing Agent pipettiert und durch mehrmaliges Pipettieren gemischt (nicht vortexen!).
Gesamtvolumen pro Probe: 25µl bzw. 27µl
3. Denaturierung
 - Die Proben wurden dann für 10 min bei 70°C in einem Thermoblock erhitzt, was zur Auffaltung ihrer Tertiärstruktur und Denaturierung der Proteine führte. Danach Lagerung auf Eis.
4. Zentrifugieren
 - Vor dem Laden des Gels wurden die einzelnen Proben durch erneutes Pipettieren gemischt und, um die während des Erhitzens am Deckel der Reaktionsgefäße kondensierte Flüssigkeit wieder zu sammeln, kurz zentrifugiert.

2.4.4. Elektrophoretische Auftrennung der Proteinlysate

Für die elektrophoretische Auftrennung ist die Kenntnis der Molekülmasse und damit der Größe der gesuchten Proteine entscheidend, da sie die Porengröße des

Polyacrylamid-Gels, den Typ des Running Buffers (MOPS/MES), den Protein Ladder, sowie die Dauer der Auftrennung bestimmt:

Protein	Molekülmasse [kDa]
CD39	78
P2X ₇	75
P2Y ₂	60
GAPDH	38

2.4.4.1. Materialien

- Reduzierte bzw. unreduzierte Gewebeproben
- NuPage[®] 4-12% Bis-Tris Gel 1,0mm 12 Well (Invitrogen[™], Carlsbad, CA, USA)
- 500ml NuPage[®] MOPS SDS Running Buffer (20x) (Invitrogen[™], Carlsbad, CA, USA) [zur Herstellung einer 500ml *Working Solution* wurden 25ml MOPS SDS Running Buffer (20x) in 475ml dH₂O verdünnt]
- XCell[™] II Mini-Cell Elektrophorese Kammer (Invitrogen[™], Carlsbad, CA, USA)
- Stromquelle (Biometra, Göttingen, Deutschland)
- PageRuler[™] Prestained Protein Ladder (Fermentas, Burlington, ON, Kanada)
- Gel Loading Pipette-Tips

2.4.4.2. Durchführung

1. Vorbereitung
 - Pro Elektrophorese Kammer konnten maximal 22 Gewebeproben + 2 Protein Ladder in 2 NuPage[®] 4-12% Bis-Tris Gelen zur gleichen Zeit elektrophoretisch nach Proteingröße aufgetrennt werden:
 - Precast-Gel in die XCell[™] II Kammer einspannen und diese mit ca. 500ml MOPS SDS Running Buffer (20x) bis zur Markierung füllen. MOPS SDS Running Buffer eignet sich dabei insbesondere für die Auftrennung von Proteinen mittlerer Molekülmasse (> 200kDa - 14kDa).
 - Kamm entfernen und die einzelnen Taschen durch mehrmaliges Pipettieren von Gelrückständen befreien.
2. Laden der Taschen
 - Protein Ladder wurde stets in die äußerste linke Tasche mit Hilfe spezieller Gel Loading Pipette-Tips geladen.
 - Im Anschluss folgten die einzelnen Proben (max. 11/Gel).

3. Elektrophorese - Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte für sämtliche Proben bei 150V/200mA. Der in den vorangegangenen Schritten zugesetzte NuPage[®] LDS Sample Buffer enthält zusätzlich einen blauen Farbstoff, der während der Auftrennung die Lauffront markiert. Sobald der Farbstoff den unteren Rand des Gels erreichte, wurde die Elektrophorese gestoppt. So wurde eine optimale Auftrennung der verschiedenen Proteine gewährleistet.

2.4.5. Blotting

Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurden die nach ihrer Größe aufgetrennten Proteine im nächsten Schritt durch Anlegen eines senkrecht auf das Polyacrylamid-Gel einwirkenden elektrischen Feldes auf eine Nitrocellulose-Membran nach dem Prinzip des Wet-Blottings übertragen.

2.4.5.1. Materialien

- Gel, mit nach Proteingröße aufgetrennten Proben
- 500ml NuPage[®] Transfer Buffer (20x) (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA)
[zur Herstellung einer 500ml *Working Solution* wurden 25ml NuPage[®] Transfer Buffer (20x) mit 50ml Isopropanol und 425ml dH₂O verdünnt]
- XCell™ II Blot-Modul (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA)
- XCell™ II Mini-Cell (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA)
- Nitrocellulose-Transfer-Membran (GE Osmonics, Minnetonka, MN, USA) (1 pro Gel)
- Filterpapier (2 pro Gel)
- Schwämme
- Stromquelle (Biometra, Göttingen, Deutschland)

2.4.5.2. Durchführung

1. Vorbereitung - Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde das Gel mit dH₂O abgespült; ebenso wurde die XCell™ Kammer für den folgenden Blotting-Vorgang durch Spülen mit dH₂O von Running Buffer-Überresten befreit.

- Blotting-Membran, Filterpapier und Schwämme wurden auf die Größe des Gels bzw. des Blot-Moduls angepasst.
 - Nitrocellulose-Membran, Filter, Schwämme und Blot-Modul wurden nun mit ausreichend Transfer Buffer befeuchtet, und Sorge getragen, dass sämtliche Einzelteile stets nass waren.
2. Anordnung des Blot-Moduls (vgl. *Abb 9A,B*)
- In den nächsten Schritten dürfen keine Luftblase zwischen den einzelnen Lagen eingeschlossen werden, da dies den elektrischen Fluss hindern und dadurch der Protein-Transfer gestört würde!
 - Der elektrische Fluss erfolgt von der Kathode zur Anode. Aufgrund der negativen Ladung der Proteine, wurde daher die Nitrocellulose-Membran über dem Polyacrylamid-Gel platziert.
 - Anordnung des Moduls für ein 1 Gel, „Sandwich-Verfahren“ (von unten nach oben):
 - 1 Schwamm
 - 1. Filter
 - **Polyacrylamid-Gel**
 - **Nitrocellulose Transfer Membran**
 - 2. Filter
 - mehrere Schwämme um die Kammer bis zum Deckel auszukleiden
 - Anordnung für 2 Gele (von unten nach oben):
 - 1 Schwamm
 - 1. Filter
 - **1. Polyacrylamid-Gel**
 - **2. Nitrocellulose Transfer Membran**
 - 2. Filter
 - 1 Schwamm
 - 3. Filter
 - **2. Polyacrylamid-Gel**
 - **2. Nitrocellulose Transfer Membran**

- 4. Filter
 - mehrere Schwämme zum Auskleiden der Kammer
3. Transfer-Prozess
- Das Blot-Modul wurde nun in die XCell™ Kammer eingebracht und mit dem verbleibenden Transfer Buffer gefüllt, wobei die Bildung von Luftblasen möglichst zu vermeiden war.
 - Nach Verschluss der Kammer und Sicherung des Stromflusses erfolgte der Blotting-Prozess stets bei 30V/200mA für 80 min.
4. Kontrolle des Gels bzw. des Blot-Prozesses
- Optionale Färbung des Gels mit Coomassie-Blue über Nacht nach Beendigung des Transfers diente dem Nachweis von Proteinbanden auf dem Gel und damit der Kontrolle der elektrophoretischen Auftrennung und Übertragung der Proteine.

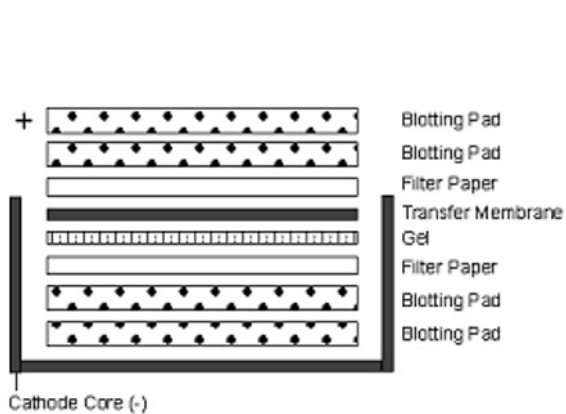


Abbildung 9A:

Anordnung des Blot-Moduls für 1 Gel ^[32]
 (Quelle: Invitrogen™)

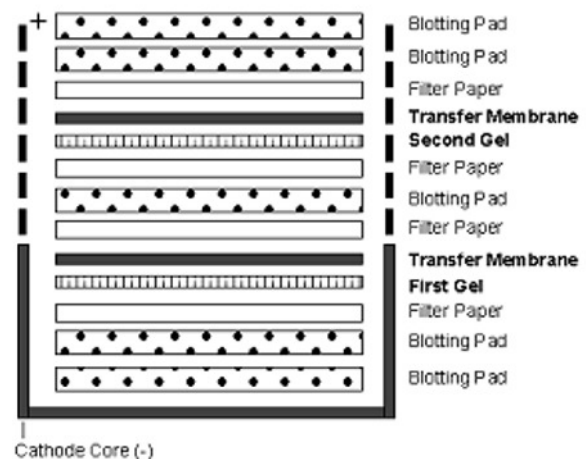


Abbildung 9B:

Anordnung des Blot-Moduls für 2 Gele ^[32]
 (Quelle: Invitrogen™)

2.4.6. Detektion der Proteinbanden von CD39, P2X₇ und P2Y₂ mittels spezifischer Antikörper

Im nächsten Schritt wurden die Banden der gesuchten Proteine CD39, P2X₇ und P2Y₂ durch spezifische Antikörperbindung detektiert.

2.4.6.1. Blocken unspezifischer Bindungen

2.4.6.1.1. Materialien

- Nitrocellulose-Membran mit den darauf geblotteten Proteinen
- TBST (1x):
 - Herstellung von 1l TBST (10x):
 - 12,11g Tris
 - 87,66g NaCl
 - 5ml Tween-20
 - Volumen mit dH₂O auf 1l bringen
 - Für 1l TBST (1x): 100ml TBST (10x) in 900ml dH₂O verdünnen
- 5% Milch: 0,5g Milchpulver in 10ml TBST (1x)
- Falcon-Röhrchen (50ml)

2.4.6.1.2. Durchführung

Nach Beendigung des Protein-Transfers wurde die Membran zunächst für fünf Minuten in TBST (1x) gewaschen. Um unspezifische Bindungen des primären Antikörpers an die Membran zu verringern, wurde die Membran in einem nächsten Schritt für 60 min in 10ml 5%-Milch in einem Falcon auf einem Rollinkubator geblockt.

2.4.6.2. Inkubation der Membran-gebundenen Proteine mit Antigen-spezifischen Antikörpern (1st - Antibody-Reaction)

2.4.6.2.1. Materialien

- Geblockte Nitrocellulose-Membran
- Primäre Antikörper für Western Blot:

Antigen	Hersteller	Typ - Quelle	Verdünnung (in 5% Milch)
CD39	Ancell Corporation, Bayport, MN, USA	Monoklonal - Maus	1 : 1000
P2X ₇	Alomone Labs Ltd., Jerusalem, Israel	Monoklonal - Kaninchen	1 : 666
P2Y ₂	Alomone Labs Ltd., Jerusalem, Israel	Monoklonal - Kaninchen	1 : 750
GAPDH	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	Polyklonal - Kaninchen	1 : 5000

- 5% Milch (0,5g Milchpulver in 10ml TBST (1x))
- Falcon-Röhrchen (50ml)

2.4.6.2.2. Durchführung

Nach Beendigung des Blockings wurde die Membran in einem neuen Falcon-Tube mit dem für das gesuchte Protein spezifischen Antikörper in entsprechender Verdünnung bei 4°C über Nacht auf einem Rollinkubator inkubiert.

2.4.6.3. Inkubation mit sekundären Antikörpern (2nd - Antibody Reaction)

2.4.6.3.1. Materialien

- Membran mit gebundenem Primärantikörper
- Horseradish-Peroxidase (HRP) - konjugierte - Sekundäre Antikörper:

Antigen	Hersteller	Quelle	Verdünnung (in 5% Milch)
Anti-Maus IgG, HRP-konjugiert	ECL™ Antibody, GE-Healthcare, Little Chalfont, UK	Schaf	1 : 2500
Anti-Kaninchen IgG, HRP-konjugiert	ECL™ Antibody, GE-Healthcare, Little Chalfont, UK	Esel	1 : 3000

- TBST (1x)
- 5% Milch
- Falcon-Röhrchen (50ml)

2.4.6.3.2. Durchführung

Nach der Inkubation mit dem ersten Antikörper wurde die Membran drei Mal je 10 min mit TBST (1x) gewaschen um bei der späteren Filmentwicklung ein durch ungebundene Primärantikörper entstehendes Hintergrundsignal zu minimieren. Im nächsten Schritt folgte dann die einstündige Inkubation der Membran mit dem zweiten Antikörper in entsprechender Verdünnung in 5% Milch bei Raumtemperatur. Der zweite Antikörper ist dabei gegen sämtliche Immunglobuline der Klasse G derjenigen Spezies gerichtet, in der der Primärantikörper produziert wurde. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Horseradish-Peroxidase (HRP), eine Peroxidase aus dem Meerrettich, katalysiert im letzten Schritt des Western Blots die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form und bewirkt somit die zum Nachweis der gesuchten Proteine nötige Chemilumineszenzreaktion.

2.4.6.4 Nachweis von CD39, P2X₇ und P2Y₂ durch Enhanced Chemiluminescence (ECL)

2.4.6.4.1. Materialien

- Nitrocellulose-Membran mit an den Primärantikörper gekoppelten Sekundärantikörper
- ECL™ Western Blotting Detection Reagents 1+2 (GE-Healthcare, Little Chalfont, UK)
- Radiographie-Film (Amersham Hyperfilm™, GE-Healthcare, Little Chalfont, UK)
- Licht-undurchlässige Röntgenfilm-Kammer
- Bäder für Entwicklungs-, Fixierlösung und Wasser
- Klemme
- Klarsichtfolien
- Licht-undurchlässige, 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäße
- TBST (1x)
- Falcon-Tubes (50ml)
- Vortexer

2.4.6.4.2. Durchführung

1. Waschschrift - Nach einstündiger Inkubation der Nitrocellulose-Membran wurde überschüssiger Sekundärantikörper durch

dreimaliges, zehn-minütiges Waschen in TBST entfernt.

2. Vorbereitung der Membran Für die Lichtreaktion einer Membran:
- 500µl Detection Reagent 1 wurden in einem Lichtundurchlässigen Eppendorf-Tube mit dem gleichen Volumen Detection Reagent 2 (1:1) durch Vortexen gemischt.
 - 1ml Detection Reagent 1+2 wurde nun gleichmäßig auf der Membran verteilt und eine Inkubationszeit von ca. 1 min eingehalten: Dazu wurde die Membran nach Aufbringen der Lösung mit einer Folie abgedeckt, wodurch eine ebene Verteilung der Detektionslösung gewährleistet wurde (CAVE: Bildung von Luftblasen)
 - Nach der Einwirkzeit wurde überschüssige Lösung entfernt und die Membran für die anschließende Lichtreaktion in einer Röntgenfilm-Kammer unter einer neuen Schutzfolie platziert (CAVE: Luftblasen).

- DIE FOLGENDEN SCHRITTE WURDEN UNTER **ROT LICHT-BELEUCHTUNG** IN EINER DUNKELKAMMER DURCHGEFÜHRT -

3. Vorbereitung des Radiographie-Films
- Der Radiographie-Film wurde der Größe der zu entwickelnden Membran angepasst und auf die Schutzfolie über der Membran platziert.
 - Zur Identifikation der gewünschten Proteinbande an Hand des Molekulargewichts wurde der obere Rand des Films mit dem oberen Rand der Membran zur Deckung gebracht und die rechte untere Ecke des Films geknickt um stets die Seitengleichheit zwischen Film und Membran zu garantieren.
4. Belichtung des Films
- Die Belichtungsdauer war abhängig von gesuchtem Protein sowie dem verwendeten Antikörper:

Protein	Belichtungszeit
CD39	1-2
P2X ₇	10-15
P2Y ₂	15-20
GAPDH	<1

5. Filmentwicklung - Nach Beendigung der Belichtung wurde der Film durch je einminütiges Schwenken in Entwicklerlösung, Wasser, Fixierlösung und Wasser entwickelt.

2.4.7. Membrane-Stripping und erneute Inkubation

Sämtliche Western Blots wurden für alle drei untersuchten Proteine standardisiert nach oben beschriebenem Protokoll durchgeführt. Für Western Blots, die der Untersuchung der unterschiedlichen Konzentration an P2X₇ und P2Y₂-Rezeptoren dienten, war es jedoch nötig, die einzelnen Proteinlysate - im Gegensatz zu Proben, die auf CD39 untersucht wurden - durch Verwendung von NuPage[®] Sample Reducing Agent zu reduzieren.

Daher konnten Membranen mit Gewebeproben, die zunächst auf die Konzentration von P2X₇ oder P2Y₂ untersucht wurden, in einem fortführenden Versuch anschließend auf P2Y₂ bzw. P2X₇ getestet werden. Dies wurde möglich, indem die spezifische Bindung der Primärantikörper an die auf die Membran geblotteten Antigene durch entsprechende Behandlung wieder gelöst wurde (Stripping). Danach wurde die gestrippte Membran erneut geblockt, mit dem entsprechend anderen, spezifischen Primärantikörper inkubiert und, wie bereits beschrieben, weiter prozessiert.

2.4.7.1. Materialien

- In TBST (1x) gewaschene Nitrocellulose Membran
- Stripping Buffer (Zusammensetzung für 1l):
 - 800ml dH₂O
 - Glycine: 15g
 - Tween-20: 250µl
 - pH-Wert mit 5M HCl auf 2,5 einstellen
 - auf 1l mit dH₂O auffüllen
- Wasserbad (80°C)
- Klarsichtfolien

2.4.7.2. Durchführung

Die Membran wurde nach der Chemilumineszenz-Reaktion zunächst in TBST (1x) gewaschen. Im Anschluss wurde die Membran in einer möglichst Luft-freien, mit

mindestens 10ml Stripping Buffer gefüllten, verschweißten Klarsichtfolie für 20 Minuten bei 80°C in einem Wasserbad behandelt. Dadurch wurden die Antigen-Antikörper-Bindungen gelöst. Nach erneutem Waschen zunächst mit Stripping Buffer, dann mit TBST (1x) konnte die Membran erneut geblockt werden und mit dem passenden Antikörper inkubiert werden.

2.4.8. Ladungskontrolle mit Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)

Um zu garantieren, dass in jede Geltasche die gleiche Konzentration an Proteinen geladen wurde, erfolgte für jede Membran im Anschluss die Kontrolle durch GAPDH. Dazu wurde die Membran nach Entwicklung des Films für die gesuchten Proteinbanden von CD39, P2X₇ oder P2Y₂ erneut in TBST (1x) gewaschen, geblockt, mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur (oder 4°C über Nacht) mit GAPDH-spezifischem Antikörper in oben genannter Verdünnung inkubiert, und wie beschrieben weiter prozessiert.

2.4.9. Auswertung der Radiographiefilme mittels Densitometrie

Nach dem Entwicklungsschritt erfolgte die Identifikation der gewünschten Proteinbanden. Dazu wurde der auf der Membran stets linksseitige Protein-Ladder mit einem Stift auf den entwickelten Röntgenfilm übertragen und die Proteinbanden anhand der Molekülgröße in Kilo-Dalton (kDa) identifiziert (vgl. S. 49). Die Filme wurden dann mit Hilfe eines Scanners digitalisiert und mit ImageJ-Software (Version 1.41, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) ausgewertet:

Dazu wurde eine ROI₁ (region of interest) mit einer Fläche (A) definiert, die der Fläche der Bande mit dem stärksten Signal entsprach. Mit Hilfe dieser ROI₁ wurde dann die Signaldichte (D) des Hintergrundsignals und der gesuchten Proteinbande (z.B. CD39 von Probe-1) bestimmt. Mit einer zweiten ROI₂ wurde dieser Schritt für die Signaldichte von GAPDH der gleichen Probe-1 (als Kontrollprotein) wiederholt. Durch die Relation der Signaldichten des gesuchten Proteins (z.B. CD39) zum Kontrollprotein (GAPDH) von Probe-1 kann dann die Expression (E) des gesuchten Proteins in der Probe berechnet werden.

Durch die Relation von $D_{\text{Protein X, Probe Y}} : D_{\text{GAPDH, Probe Y}}$ ist somit ein Vergleich der E-Werte eines gesuchten Proteins verschiedener Proben untereinander zulässig.

Berechnung der Expression (E) eines gesuchten Proteins (am Beispiel von CD39 in Probe-1; x, y, z fungieren als Substitut mit der Einheit [Dichte/Fläche]):

$$D_{\text{Hintergrund CD39 Probe-1}} \div A_{\text{ROI1}} = x \text{ [Dichte/Fläche]}$$

$$D_{\text{CD39 Probe-1}} \div A_{\text{ROI1}} = y \text{ [Dichte/Fläche]}$$

$$y - x = z_{\text{CD39 Probe-1}} \text{ [Dichte/Fläche]}$$

$$D_{\text{Hintergrund GAPDH Probe-1}} \div A_{\text{ROI2}} = x \text{ [Dichte/Fläche]}$$

$$D_{\text{GAPDH Probe-1}} \div A_{\text{ROI2}} = y \text{ [Dichte/Fläche]}$$

$$y - x = z_{\text{GAPDH Probe-1}} \text{ [Dichte/Fläche]}$$

$$z_{\text{CD39 Probe-1}} \text{ [Dichte/Fläche]} \div z_{\text{GAPDH Probe-1}} \text{ [Dichte/Fläche]} = E_{\text{CD39 Probe-1}}$$

2.5. Immunhistochemische Analysen zur Untersuchung des Verteilungsmusters von CD39, P2X₇ und P2Y₂ im humanen KRK

2.5.1. Prinzip der Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ermöglicht den Nachweis niedermolekularer Substanzen bis hin zu einzelnen Aminosäuren und deren Lokalisation im Gewebe. Die nachzuweisenden Proteine (in der vorliegenden Studie: CD39, P2X₇ und P2Y₂) stellen dabei Antigene dar, die mit spezifisch gegen sie gerichteten Antikörpern (primärer Antikörper) eine Bindung eingehen und so einen Antigen-Antikörper-Komplex bilden.

In den weiteren Schritten wird diese Antigen-Antikörper-Bindung sichtbar gemacht, wobei grundsätzlich zwei unterschiedliche Methoden zum Einsatz kommen:

Bei der direkten Methode bewirkt ein an den Primärantikörper konjugiertes Enzym (z.B. Rhodamin, Texas Red) durch Umsatz eines entsprechenden Substrates eine Farbreaktion.

Bei der - in dieser Studie verwendeten - indirekten Methode wird zunächst ein sekundärer Antikörper gegen den ersten Antikörper gerichtet; d.h. bei einem primären Antikörper, der bspw. in Kaninchen produziert wurde, kommt im nächsten Schritt ein spezifisch gegen Kaninchen-IgG gerichteter Sekundärantikörper zum Einsatz. Durch Koppelung des Sekundärantikörpers an bspw. einen Peroxidase-

Komplex kommt es nun nach Zugabe des passenden Substrates zur Farbreaktion, die der Auswertung mittels Hellfeld-Mikroskopie im Durchlichtverfahren zugänglich ist.

Vorteile der indirekten Methode ergeben sich durch den aus dem mehrstufigen Prozess resultierenden Signalverstärkungseffekt und der Möglichkeit einen Sekundärantikörper mit einer Vielzahl in der gleichen Spezies produzierter Primärantikörper zu kombinieren. Bei dieser Methode nachteilig sind jedoch der größere zeitliche Aufwand, die erhöhte Gefahr unspezifischer Bindungen sowie ein daraus resultierendes stärkeres Hintergrundsignal.

Eine anschließende, konventionelle Hämatoxylin-Gegenfärbung erlaubt zusätzlich eine morphologische Beurteilung des Präparates.

2.5.2 Primäre Antikörper

Die im Rahmen der immunhistochemischen Studien eingesetzten Antikörper entsprechen den im Rahmen der Western Blot-Analysen verwendeten:

Antigen	Hersteller	Typ - Quelle	Verdünnung (in Antibody Diluent)
CD39	Ancell Corporation, Bayport, MN, USA	Monoklonal - Maus	1 : 200
P2X ₇	Alomone Labs Ltd., Jerusalem, Israel	Monoklonal - Kaninchen	1 : 250
P2Y ₂	Alomone Labs Ltd., Jerusalem, Israel	Monoklonal - Kaninchen	1 : 250

2.5.3. Gewebe-Fixation

Die während der chirurgischen Therapie der kolorektalen Karzinome gewonnenen Gewebeproben wurden direkt nach Entnahme in TFM™ Tissue Freezing Medium (Triangle Biomedical Sciences, Durham, NC, USA) eingebettet und in Flüssigstickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Behandlung wurden die Proben entweder in flüssigem Stickstoff oder bei -80°C gelagert.

2.5.4. Anfertigung von Gewebeschnitten

2.5.4.1. Materialien

- tiefgefrorene Gewebeproben
- Cryostat (Kammertemperatur -25°C, Messertemperatur -22°C)
- Sakura Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek Europe B. V., Zoeterwoude, Niederlande) zur Befestigung der Gewebeblöcke auf Gefrierträgern
- Objektträger (SuperFrost Ultra Plus[®], Menzel, Braunschweig, Deutschland)
- Trockeneis (zum Transport der Proben)

2.5.4.2. Durchführung

Wie bereits auf S. 28 beschrieben, wurden alle Schnitte für die Isolierung von mRNA, Western Blot-Analysen und Immunhistochemie einer Probe während derselben Sitzung an einem Cryostat durchgeführt. Für die immunhistochemischen und HE-Färbungen wurden 5-7µm dicke Serienschnitte angefertigt.

2.5.5. Immunhistochemische Färbungen

2.5.5.1. Materialien

- Objektträger mit Gefrierschnitten (Lagerung bei -80°C, max. Lagerung: 14 d, CAVE: Austrocknung)
- Formalin 4%
- PAP Pen (Dako, Glostrup, Dänemark)
- TBS (1x) + 0,1% BSA: 0,01 M Tris-Base, 0,85% NaCl, pH 7,4
- TBS (1x) + 0,1% BSA + 0,05% TWEEN-20
- Peroxidase-Quench-Lösung (100ml Methanol + 2,5ml 30% H₂O₂ + 22,5ml dH₂O)
- PBS (1x) pH 7,2 (GIBCO™, Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA)
- Blockier-Lösung (0,2g BSA in 5ml PBS (1x))
- Primäre Antikörper (s. S. 60)
- Antibody Diluent (Dako, Glostrup, Dänemark)
- Sekundärer Antikörper

Antigen	Produkt-Name	Hersteller	Quelle
Maus IgG	Dako EnVision+System-HRP Labelled Polymer Anti-Mouse	Dako, Glostrup, Dänemark	Ziege
Kaninchen IgG	Dako EnVision+System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit	Dako, Glostrup, Dänemark	Ziege

- Farbreagenz: DAB + Chromogen (Dako, Glostrup, Dänemark)
- dH₂O
- Hämatoxylin
- Ethanol (70%, 96%, 100%)
- Roticlear[®] (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
- Permount Mounting Medium
- Deckgläser
- Feuchte Präparate-Kammer
- Küvetten

2.5.5.2. Durchführung

1. Fixierung
 - Die Kryoschnitte wurden dem -80°C Gefrierschrank entnommen, kurz aufgetaut und die einzelnen Schnitte mit einem PAP-Stift umfahren.
 - Fixierung in 4% Formalin für 15 min
2. Waschen
 - 3 x 5 min Waschen in TBS (1x) + 0,1% BSA
3. Peroxidase-Quench
 - Hemmung der endogenen Peroxidase in Peroxidase-Quench-Lösung erfolgte in einer Küvette für 10min auf einem Schüttler.
4. Waschen
 - 3 x 5 min waschen in TBS (1x) + 0,1% BSA

- DIE INKUBATIONS-SCHRITTE WURDEN IN EINER „FEUCHTEN“ KAMMER DURCHGEFÜHRT -
5. Blocking
 - 100µl Blockier-Lösung je Schnitt für 1h bei Raumtemperatur verringert unspezifische Bindungen des Primären-Antikörpers und somit Hintergrund-Signal.
6. Primärantikörper
 - Blockier-Lösung wurde durch Abschütteln von Objektträgern entfernt und je 100µl Primärantikörper auf die zu untersuchenden Proben (nach entsprechender Verdün-

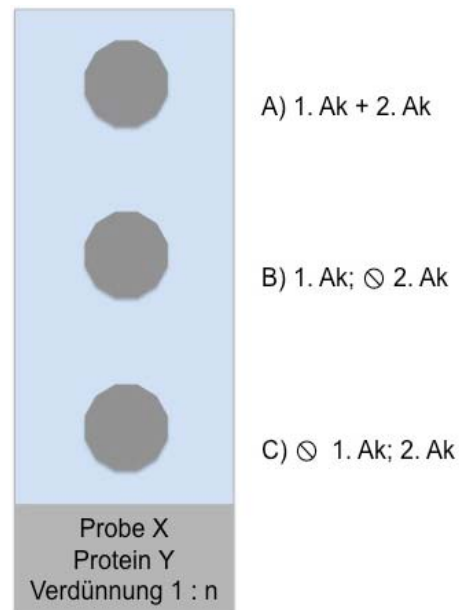
- nung in Antibody Diluent) gegeben. (vgl. Abb. 10).
- Inkubation bei 4°C über Nacht.
7. Waschen
- 3 x 5 min Waschen in TBS (1x) + 0,1% BSA + 0,05% TWEEN-20.
- Das beigesetzte Tensid TWEEN-20 diente der Verminderung eines möglichen Hintergrund-Signals.
8. Sekundärantikörper
- Einstündige Inkubation mit 100µl gegen IgG des Primärantikörpers gerichteten Sekundärantikörper (vgl. Abb. 10) bei Raumtemperatur
9. Waschen
- 3 x 5 min Waschen in TBS (1x) + 0,1% BSA + 0,05% TWEEN-20.
10. Farbreaktion
- Vorbereitung des Farbreagens:
 - Gabe von 20µl DAB zu 1ml Chromogen, vortexen.
Vor Lichtexposition schützen!
 - Je Schnitt wurden 100µl Farbreagenz aufgebracht, die Reaktion unter mikroskopischer Kontrolle verfolgt und bei ausreichender Braunfärbung durch Waschen in dH₂O beendet.
11. Gegenfärbung
- Zur Beurteilung der Morphologie erfolgte dann eine konventionelle Gegenfärbung. Die Schnitte wurden dazu ca. 20 s in Hämatoxylin-Lösung gefärbt.
12. Waschen
- 5 min Waschen unter fließendem Leitungswasser. Diese Erhöhung des pH-Wertes bewirkt den blauvioletten Farbumschlag.
13. Dehydratation
- Zur Dehydrierung der Schnitte wurde zunächst eine aufsteigende Alkoholreihe durchlaufen: Die Schnitte wurden dabei je 3 min in Ethanol 70%, Ethanol 96% und Ethanol 100% getaucht.
 - Darauf folgten 3 x 3 min Roticlear.
14. Mounting
- Die so entwässerten Schnitte wurden zuletzt mit Mounting Medium und Deckgläsern bedeckt.

Abbildung 10:

Die Abbildung skizziert einen Objektträger mit 3 Gewebeschnitten (A - C): Schnitt A) wurde auf Protein Y (als Antigen) untersucht, indem er zunächst mit Primär- und im zweiten Schritt mit Sekundärantikörper inkubiert wurde.

Proben B) und C) fungierten als Negativkontrollen, wobei bei B) die Inkubation mit dem 2. Antikörper [nur PBS (1x)], bei C) die Inkubation mit 1. Antikörper (nur Antibody-Diluent) unterblieb.

Sämtliche Schnitte wurden nach diesem Schema untersucht.



2.5.6. HE-Färbungen

HE-Färbungen wurden zur morphologischen Beurteilung nach einem Standardprotokoll angefertigt.

2.5.7. Auswertung der immunhistochemischen und HE-Färbungen

Die Schnitte wurden bei 50-, 100- und 200-facher Vergrößerung beurteilt und fotografisch dokumentiert. Geachtet wurde auf die Intensität des immunhistochemischen Signals in der Übersicht sowie auf die Verteilung des Signals auf Tumorzellen, gesunden Epithelzellen, neuralen Strukturen, Stromazellen oder Bindegewebe.

Bei der Analyse der HE-gefärbten Präparate wurde v.a. auf das Verhältnis tumorösen Gewebes zu normalem, faserigem, muskulärem oder bereits nekrotischem Gewebe geachtet. Darüber hinaus erfolgte die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen stets in Zusammenschau mit den HE-gefärbten Schnitten.

2.6. Statistik

Die Ergebnisse der Studie sind als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben. Die statistischen Analysen erfolgten mit Hilfe von GraphPad PRISM4 Software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Als Signifikanzniveau wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ($P < 0,05$) definiert.

3. Ergebnisse

3.1. Expression der mRNA von CD39, P2X₇ und P2Y₂

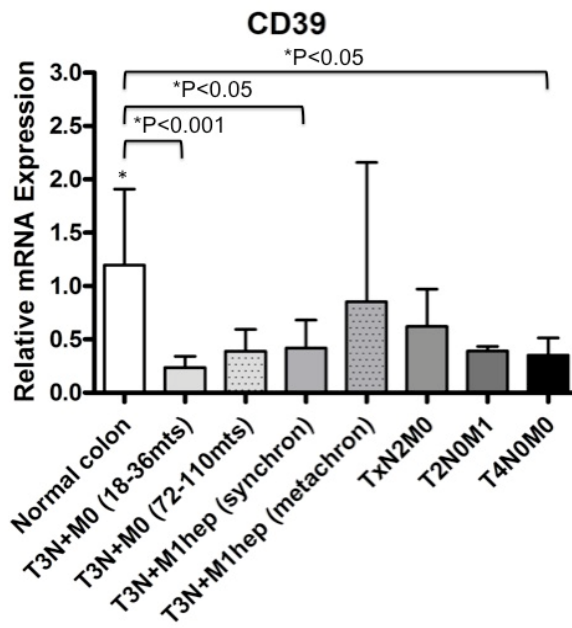
Die Analyse der mRNA Expression mittels qRT-PCR zeigte im gesunden kolorektalen Gewebe relativ hohe mRNA Spiegel für CD39 sowie für P2X₇ und P2Y₂. Im Vergleich dazu zeigten die Analysen in sämtlichen untersuchten Tumorgruppen durchwegs eine zum Teil stark erniedrigte mRNA Expression für CD39, P2X₇ und P2Y₂:

Die mRNA Expression von CD39 war in sämtlichen Tumorstadien relativ zum gesunden kolorektalen Gewebe statistisch signifikant ($P < 0,05$) erniedrigt. Weiter ließ sich erkennen, dass Tumoren, die mit einem verkürzten Überleben sowie einer synchronen Metastasierung assoziiert waren [T3N+M0 (survival 18-36mts), T3N+M1hep (synchron)] (*Abb. 11A*), eine niedrigere mRNA Expression aufwiesen als Tumoren, die mit einer metachronen, hepatischen Metastasierung respektive einer ausgeprägten nodalen Metastasierung [T3N+M1hep (metachron), TxN2M0] (*Abb. 11A*) auftraten.

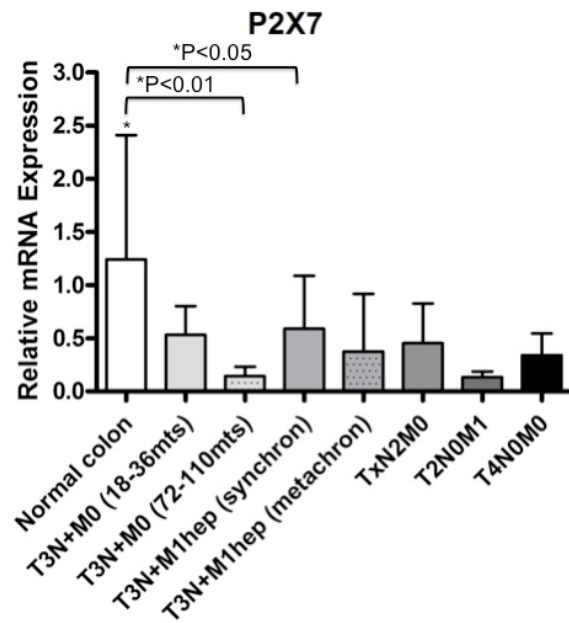
Die mRNA Expression von P2X₇ war über alle untersuchten Tumorstadien hinweg im Vergleich zum Normalgewebe ebenfalls erniedrigt. Gewebeproben von Patienten mit T3N+M0 Tumoren und langer Überlebenszeit (72-110mts) wiesen dabei wesentlich weniger P2X₇ mRNA auf, als Patienten mit Tumoren des selben Stadiums aber kürzerer Überlebenszeit (18-36mts) (*Abb. 11B*).

Relativ zum Normalgewebe waren ferner auch die mRNA Expression von P2Y₂ in sechs von sieben untersuchten Tumorgruppen [T3N+M0 (survival 18-36mts), T3N+M0 (survival 72-110mts), T3N+M1hep (synchron), T3N+M1hep (metachron), TxN2M0, T4N0M0] stark verringert. T2N0M1 Tumoren wiesen dagegen eine vergleichbare mRNA Expression auf, wie die untersuchten Normalgewebe (*Abb. 11C*).

A)



B)



C)

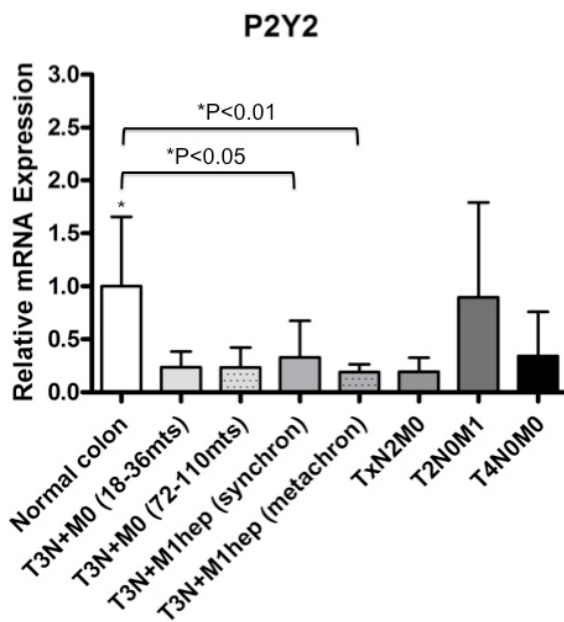


Abbildung 11:

Relative mRNA Expression von CD39 (A), P2X₇ (B) und P2Y₂ (C). Die Expression der mRNA in gesundem kolorektalen Gewebe wurde mit sieben unterschiedlichen Stadien kolorektaler Karzinome verglichen, wobei die Expression der untersuchten Gene zum Housekeeping-Gen Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyltransferase (HPRT) standardisiert wurde.

3.2. Proteinexpression von CD39 und P2-Rezeptoren im gesunden und tumorösen kolorektalen Gewebe

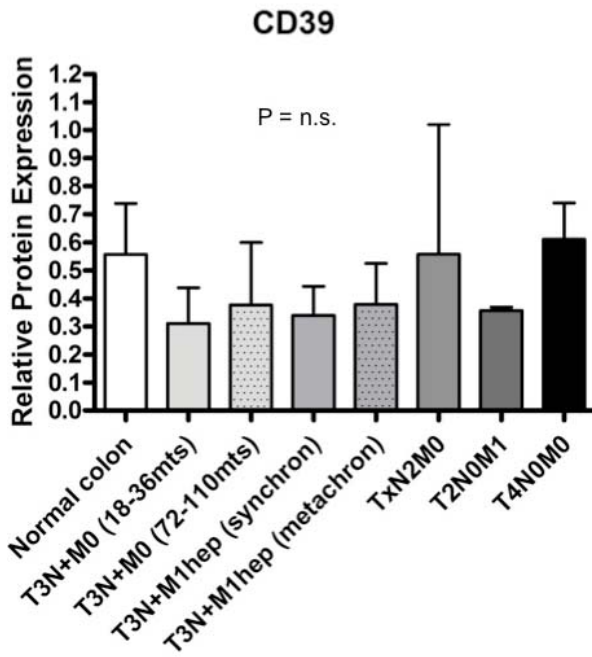
Zur Bestimmung der Proteinexpression von CD39 sowie der beiden P2-Rezeptoren, P2X₇ und P2Y₂, in den unterschiedlichen Geweben wurden Western Blot Analysen durchgeführt.

Die Messungen, die für sämtliche Proben im Verhältnis zu GAPDH als Referenzprotein erfolgten, zeigten für CD39 und P2X₇ einen Trend zu einer erniedrigten Expression im kolorektalen Karzinomgewebe im Vergleich zum Normalgewebe. Wenn auch nicht signifikant, konnte gezeigt werden, dass die Ektonukleotidase CD39 in den Tumorgruppen T3N+M0 (survival 18-36mts), T3N+M0 (survival 72-110mts), T3N+M1hep (synchron), T3N+M1hep (metachron) und T2N0M1 in Relation zu gesundem Gewebe geringer exprimiert wurde. Lediglich in den Tumorstadien TxN2M0 und T4N0M0 entsprach die Expression von CD39 der in den Normalgeweben. Jedoch ließen sich auf Proteinebene, anders als auf CD39-mRNA-Ebene, keine Unterschiede zwischen Tumoren mit kurzem Überleben sowie synchroner Metastasierung [T3N+M0 (survival 18-36), T3N+M1hep (synchron)] und Tumoren mit langem Überleben sowie Lymphknotenmetastasen [T3N+M1hep (metachron), TxN2M0] erkennen (*Abb. 12A*).

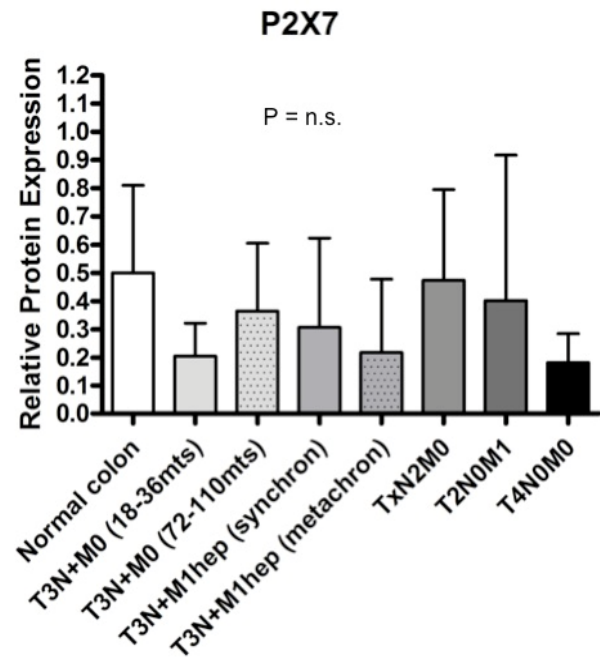
Ein ähnliches Expressionsmuster ließ sich auch für P2X₇ zeigen: Hier wurde der P2X₇-Rezeptor in den Tumoren der Stadien T3N+M0 (survival 18-36mts), T3N+M0 (survival 72-110mts), T3N+M1hep (synchron), T3N+M1hep (metachron), T2N0M1 sowie T4N0M0 relativ zum Normalgewebe schwächer exprimiert, jedoch nicht statistisch signifikant. Nur die P2X₇-Expression im Tumorstadium TxN2M0 glich der in den Normalgeweben gemessenen (*Abb. 12B*).

Die in Relation zum gesunden Gewebe auf mRNA-Ebene nachgewiesene signifikant verringerte P2Y₂-Expression in sechs von sieben untersuchten Tumorgruppen bestätigte sich auch auf Proteinebene. Eine stark verminderte Expression ließ sich in Tumoren der Stadien T3N+M0 (survival 18-36mts), T3N+M0 (survival 72-110mts), T3N+M1hep (metachron), TxN2M0 und T4N0M0 nachweisen; darüber hinaus auch in T2-Tumoren mit Fernmetastasen (T2N0M1), obwohl diese ähnlich hohe P2Y₂-mRNA-Spiegel wie gesundes kolorektales Gewebe zeigten. Dagegen war die Proteinexpression von P2Y₂ in T3N+M1 Tumoren mit synchroner Lebermetastasierung, trotz niedriger mRNA-Spiegel, nur moderat vermindert (*Abb. 12C*).

A)



B)



C)

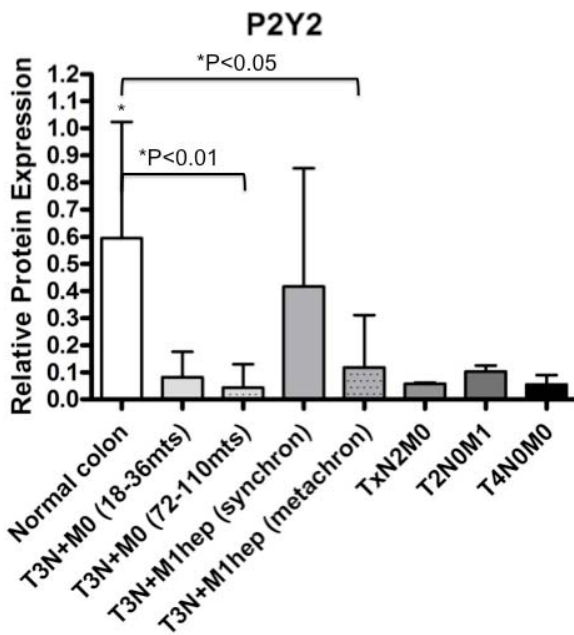


Abbildung 12:

Relative Proteinexpression für CD39 (A), P2X₇ (B) und P2Y₂ (C) in Normalgewebe und den untersuchten Stadien des kolorektalen Karzinoms. Die Expression der gesuchten Proteine wurde für alle untersuchten Proben zur Expression von GAPDH standardisiert.

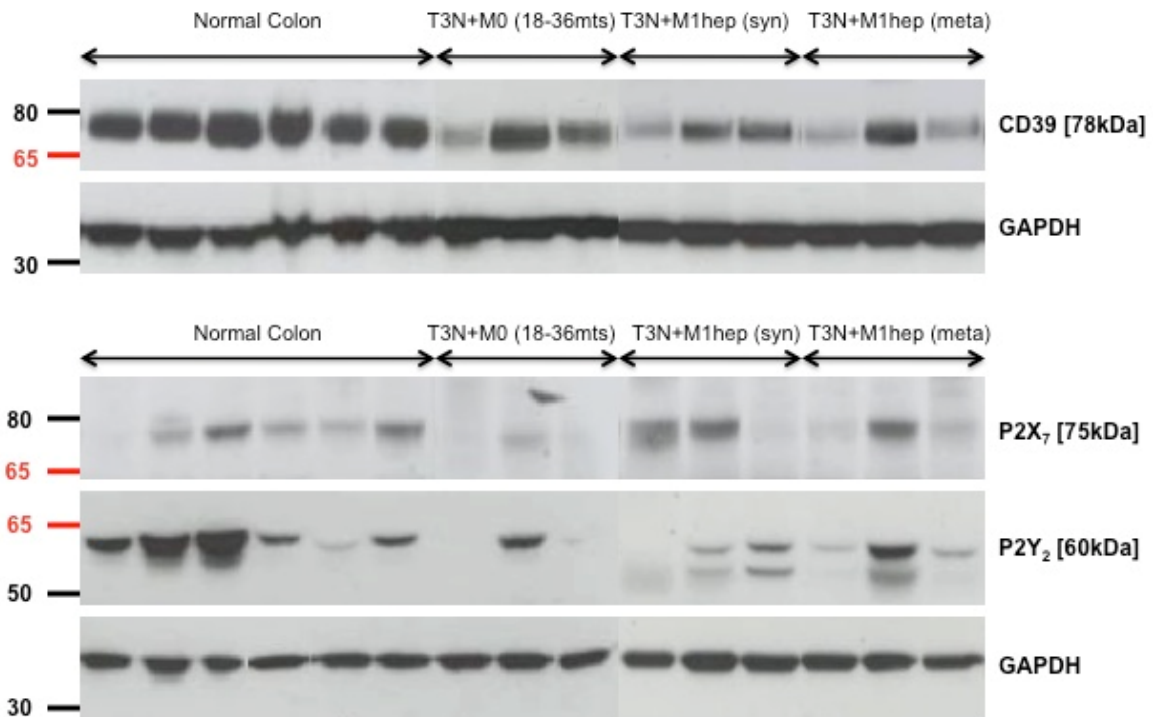


Abbildung 13:

Western Blot Analysen zur Bestimmung der Proteinexpression von CD39, P2X₇ und P2Y₂. GAPDH diene als interne Kontrolle.

3.3. Proteinexpression in Abhängigkeit des prozentualen Tumoranteils

Wie bereits beschrieben, wurden in einer Sitzung zunächst Gefrierschnitte für eine anschließende HE-Färbung angefertigt. Darauf folgten dann 30µm dicke Schnitte für die Herstellung der Proteinlysate und zuletzt konsekutive Schnitte für eine abschließende HE-Färbung. Die Auswertung der histologischen Präparate erfolgte dann durch einen Referenzpathologen, der, neben der Begutachtung der Qualität der einzelnen Präparate, auch den prozentualen Anteil von Normal-, Tumor- und fibrotischem Gewebe als auch Muskel, Nekrose, Fett und Entzündung erhob.

Um festzustellen, ob die gesuchten Proteine verstärkt in tumorösem oder in nicht-tumorösem Gewebe exprimiert werden, wurden die untersuchten Gewebe in drei Gruppen nach prozentualem Tumoranteil eingeteilt: geringer (0-30%), moderater (40-60%) und hoher (70-100%) Tumoranteil.

TNM - Staging	Tumoranteil in %		
	0 - 30	40 - 60	70 -100
T2N0M1	0	2	2
T3NxM0	0	2	5
survival 18-36 mo			
T3NxM0	0	5	1
survival 72-110 mo			
TxN2M0	0	0	3
T3NxM1	3	6	8
hep metachron			
T3NxM1	4	5	8
hep synchron			
T4N0M0	0	4	5

Tabelle 4:

Anzahl untersuchter Gewebeproben je Tumorstadium; aufgeführt nach dem prozentualen Anteil tumorösen Gewebes.

Gewebeproben mit geringem Tumoranteil der Stadien T3N+M1hep (synchron) und T3N+M1hep (metachron) zeigten in Relation zu gesundem Gewebe eine ähnliche bzw. sogar leicht erhöhte Expression von CD39 (*Abb. 14A*). Dagegen war die Expression von P2X₇ in beiden Tumorgruppen nur etwa halb so stark wie im Normalgewebe (*Abb. 14D*). Die Proteinspiegel des P2-Rezeptors P2Y₂ waren ebenfalls vermindert; hier zeigte sich ein ähnliches Bild wie bereits für alle Gewebeproben dieser Tumorstadien zusammen beschrieben: Samples von T3N+M1hep (synchron) zeigten nur eine moderat verminderte Expression, Samples von metachron metastasierten kolorektalen Karzinomen dagegen eine um etwa die Hälfte geringere Expression wie gesunde Proben (*Abb. 14G*).

Gewebeproben mit einem moderaten Tumoranteil von 40-60% zeigten mehrheitlich eine leicht verringerte CD39-Expression relativ zum Normalgewebe. Ausgedehnte Tumoren, die aber keine nodale- oder Fernmetastasierung zeigten (T4N0M0), hatten jedoch erhöhte Proteinspiegel. Gewebeproben der Stadien T3N+M1hep (synchron) und T3N+M1hep (metachron), deren Expression von CD39 bei geringem Tumoranteil (0-30%) gleich bzw. höher der in den Normalgeweben gemessenen war, zeigten bei höherem Tumoranteil (40-60%) nun eine leicht verminderte Expression (*Abb. 14B*).

Die Expression von P2X₇ war auch bei höherem Tumoranteil in diesen beiden Stadien um etwa die Hälfte relativ zum gesunden Gewebe vermindert; T3N+M0 Tumoren mit einer langen Überlebenszeit von 72-110 Monaten zeigten wiederum eine erhöhte Expression von P2X₇ (*Abb. 14E*).

Eine signifikant reduzierte Expression über alle untersuchten Tumorstadien hinweg zeigte sich für den P2Y₂-Rezeptor (*Abb. 14H*).

Proben mit prozentual hohem Tumoranteil (70-100%) wiesen eine deutlich verminderte Expression von CD39 auf: War die Expression von CD39 in T3-Proben mit synchroner und metachroner Lebermetastasierung mit geringem sowie moderatem Tumoranteil im Vergleich zum Normalgewebe noch leicht erhöht bzw. vermindert, zeigten diese beiden Stadien in Gewebeproben mit 70-100% Tumoranteil eine um die Hälfte verminderte Expression (*Abb. 14C*). Eine ähnlich verminderte Expression von CD39 zwischen 40-60% und 70-100% Tumorproben war auch für die anderen analysierten Tumorstadien zu beobachten.

Verglichen mit Gewebeproben mit moderatem Tumoranteil war die Expression von P2X₇ und P2Y₂ in Proben mit hohem Tumoranteil nur marginal verringert (*Abb. 14F, I*).

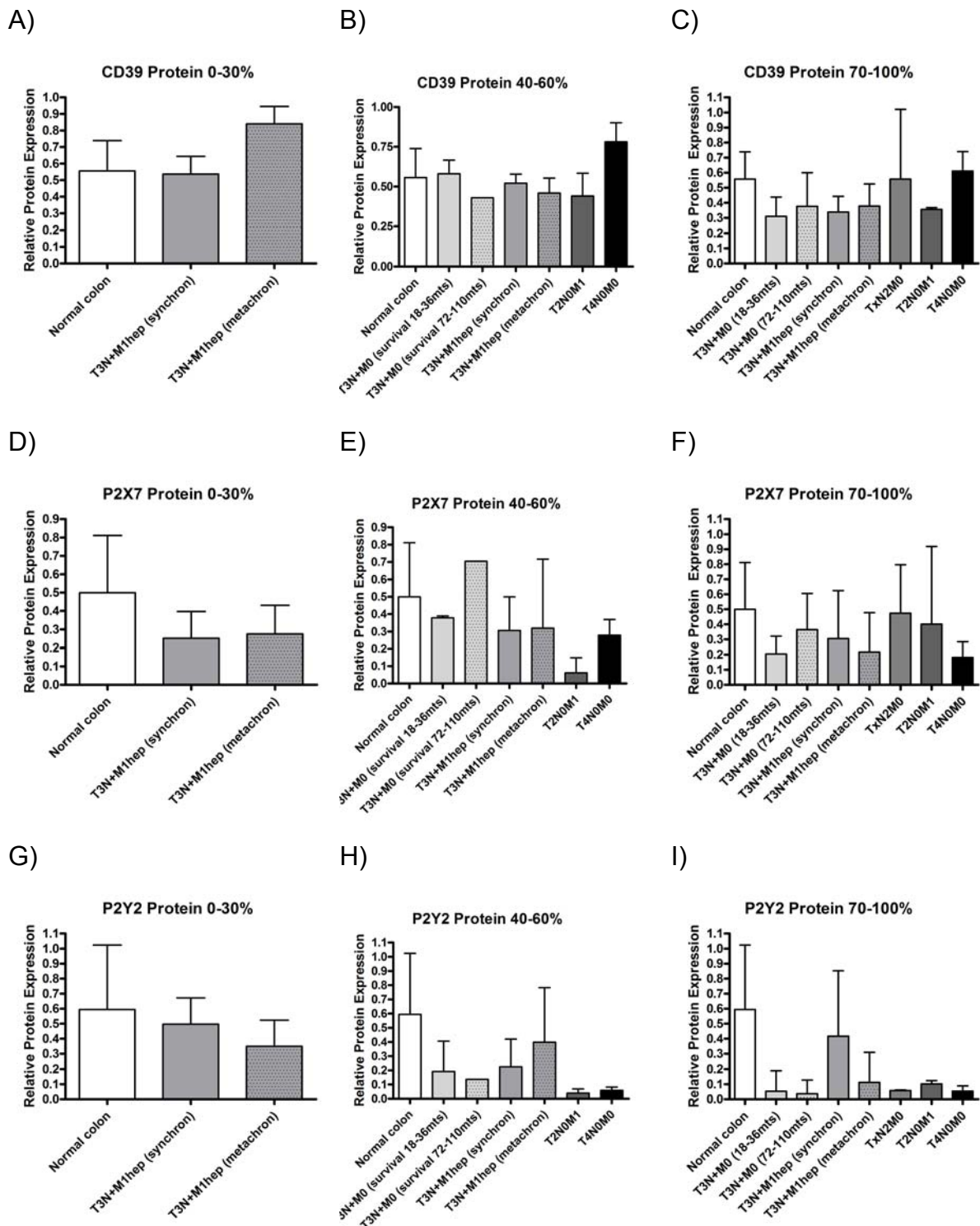


Abbildung 14:

Nach histologischer Bestimmung des prozentualen Tumoranteils wurden die Gewebeprobe in Gruppen mit geringem (0-30%) (A,D,G), moderatem (40-60%) (B,E,H) und hohem Tumoranteil (70-100%) (C,F,I) eingeteilt. So ließ sich ermitteln ob die untersuchten P2-Rezeptoren P2X₇ und P2Y₂ und die Ektonukleotidase CD39 verstärkt in Karzinom- oder in desmoplastischem Gewebe exprimiert wurden. Wegen fehlender Signifikanz aufgrund zu geringer Fallzahlen wurde auf die Angabe der Signifikanzniveaus (P-Werte) verzichtet.

3.4. Immunhistochemischer Nachweis von CD39, P2X₇ und P2Y₂

Mittels Immunhistochemie wurde die Verteilung der Ektonukleotidase CD39 und der P2-Rezeptoren in gesundem und tumorösem kolorektalen Gewebe ermittelt (*Abb. 15, 16, 17*).

Die Enterozyten und Becherzellen gesunder Kolonkrypten zeigten so gut wie keine Immunoreaktivität für CD39. Stark positiv färbte sich dagegen das zwischen den Krypten gelegene bindegewebige Stroma der Lamina propria und fibromuskuläre Zellen der Lamina muscularis mucosae (*Abb. 15A, C*). Neben Fibroblasten und mononukleären Zellen der Immunabwehr zeigten vor allem Endothelzellen der Blutgefäße in der Lamina propria, aber auch in der Submukosa, eine starke CD39-Immunoreaktivität (*Abb. 15E*).

Kolorektales Karzinomgewebe sämtlicher untersuchter Stadien wies eine deutliche CD39-Immunoreaktivität im fibrotischen Stroma zwischen den malignen Zellinseln auf (*Abb. 15B, D*). Endothelzellen der neugebildeten, den Tumor versorgenden Gefäße zeigten ebenfalls eine intensive Immunoreaktivität für CD39 (*Abb. 15F*). In den maligne entarteten Enterozyten aller in der Studie untersuchten Tumoren konnte dagegen keinerlei CD39-Immunoreaktivität beobachtet werden (*Abb. 15B, D*). Damit scheint CD39, wie bereits für maligne Tumorzellen anderer Tumorentitäten gezeigt (bspw. dem Pankreaskarzinom) ^[45], auch im kolorektalen Karzinom nicht exprimiert zu werden.

Moderate bis starke Immunoreaktivität für den purinergen P2X₇-Rezeptor zeigte sich für Enterozyten und Becherzellen gesunder Krypten (*Abb. 16C, E*). Ebenfalls war die Expression auf der Zelloberfläche mononukleärer Zellen inklusive Makrophagen nachweisbar. Im bindegewebigen Stroma dagegen ließ sich P2X₇ nur relativ schwach nachweisen (*Abb. 16A, C*).

Im Tumorgewebe zeigte sich eine intensive P2X₇-Immunoreaktivität in malignen Tumorzellen. Anders als beispielsweise in malignen Tumorzellen des Pankreas, in denen nur eine geringe P2X₇ Expression nachgewiesen werden konnte, wiesen entartete Enterozyten in allen untersuchten Tumorstadien eine deutliche Expression von P2X₇ auf (*Abb. 16F*). Relativ dazu zeigten Zellen des Stromas eine moderate Reaktivität, hier vor allem in Makrophagen und Leukozyten (*Abb. 16B, D*).

Das Stroma der Lamina propria zwischen gesunden Krypten sowie die Muscularis mucosae wiesen eine ausgeprägte P2Y₂-Immunoreaktivität auf (*Abb. 17A, C*). Im Gegensatz zu P2-Rezeptoren vom P2X₇-Typ war jedoch keine Expression in

gesunden Darmepithelzellen nachweisbar (*Abb. 17C*). Während sich zwar das bindegewebige Stroma der Submucosa nicht durch P2Y₂-spezifische Antikörper anfärben ließ und somit keine Expression zeigte, konnte P2Y₂ insbesondere in den Nervenfasergeflechten des Plexus submucosus (Meissner-Plexus) und des Plexus myentericus (Auerbach-Plexus) nachgewiesen werden (*Abb. 17A, E*).

In allen untersuchten Tumorstadien zeigte sich eine mäßige bis starke P2Y₂-Immunoreaktivität im bindegewebigen, fibroblastenreichen Stroma zwischen den Karzinomzellen (*Abb. 17B, D*). Die entarteten Tumorzellen selbst zeigten dagegen keine Expression (*Abb. 17B, D*). Eine moderate immunohistochemische Reaktion für P2Y₂ war zudem in glatten Myozyten noch erhaltener oder nur gering tumorös infiltrierter Areale der Ring- und Längsmuskelschicht detektierbar. Dazwischen gelegene Nervenfasergeflechte präsentierten wiederum eine intensive Immunoreaktivität (*Abb. 17F*).

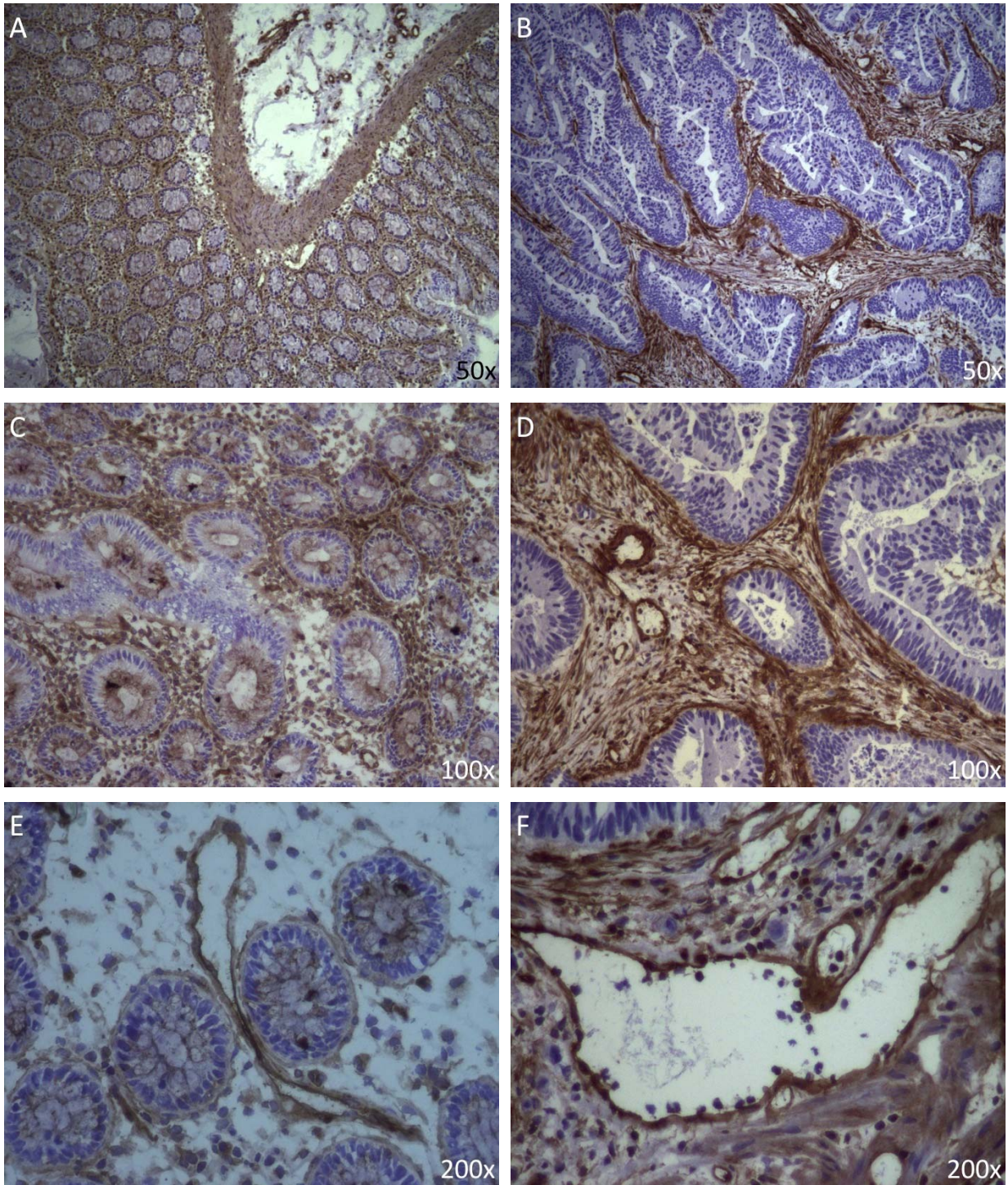


Abbildung 15:

Immunhistochemie für CD39 in Normalgewebe (A, C, E) und KRK-Gewebe eines T3-Tumors mit metachroner hepatischer Metastasierung (B, D, F). Maligne entartete Enterozyten zeigten keinerlei CD39-Immunreaktivität (D). Eine deutliche Expression ließ sich auf Gefäßendothelzellen in Normal- (E) als auch in Tumorgewebe (D, F) nachweisen.

Vergrößerung: A-B: 50-fach; C-D: 100-fach; E-F: 200-fach

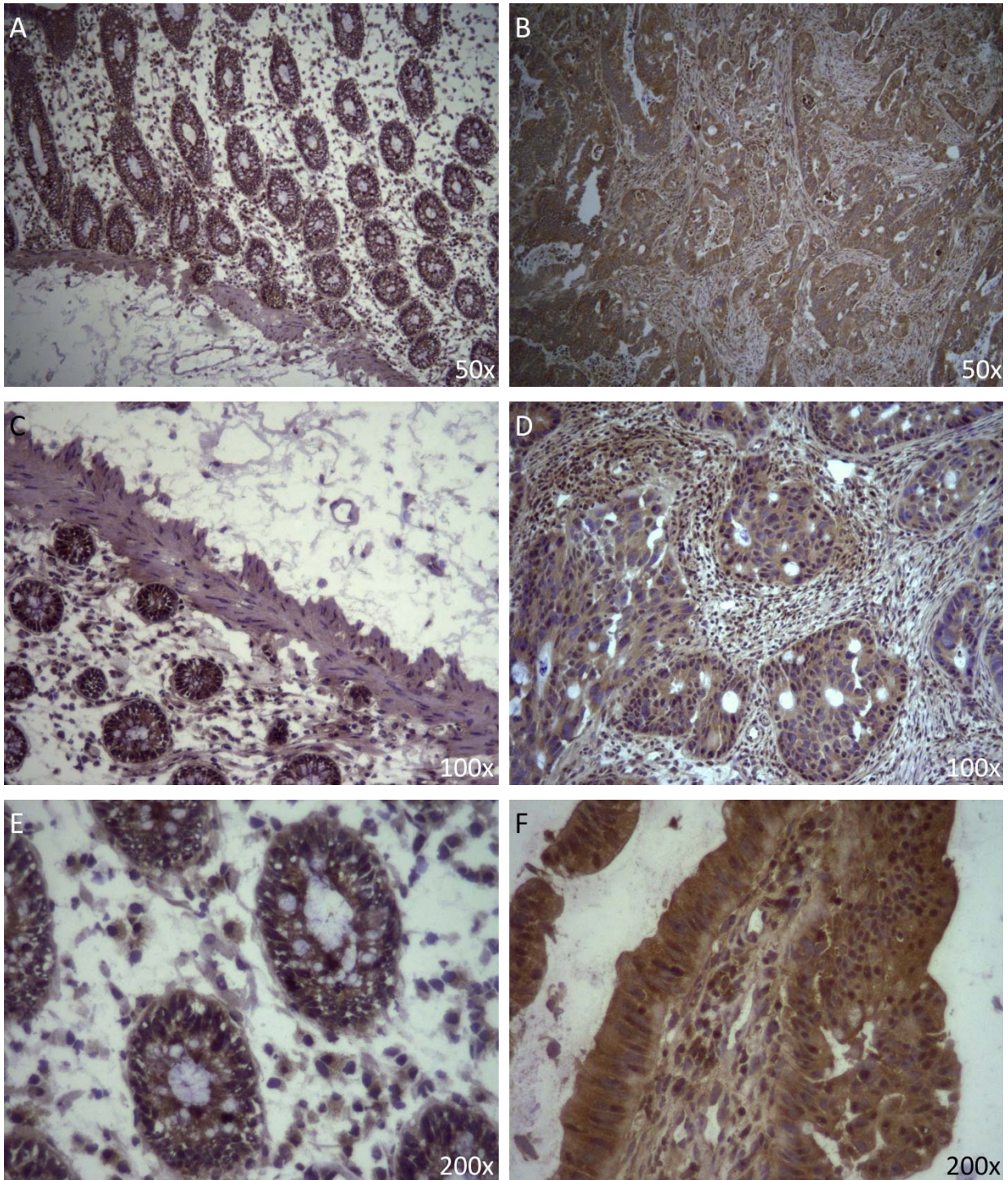


Abbildung 16:

Immunhistochemische Analysen für P2X₇. Dieser Rezeptor ließ sich im gesunden kolorektalen Gewebe (A, C, E) in Abwehrzellen und Enterozyten nachweisen, jedoch nur schwach im Stroma. Im Tumorgewebe (B, D, F) zeigte sich eine positive Färbung besonders in malignen Enterozyten und eine in Relation dazu moderate Expression im Stroma.

Abgebildete Tumoren: T4N0M0 (15B); TxN2M0 (15D); T3N+M1hep metachron (15F)

Vergrößerung: A-B: 50-fach; C-D: 100-fach; E-F: 200-fach

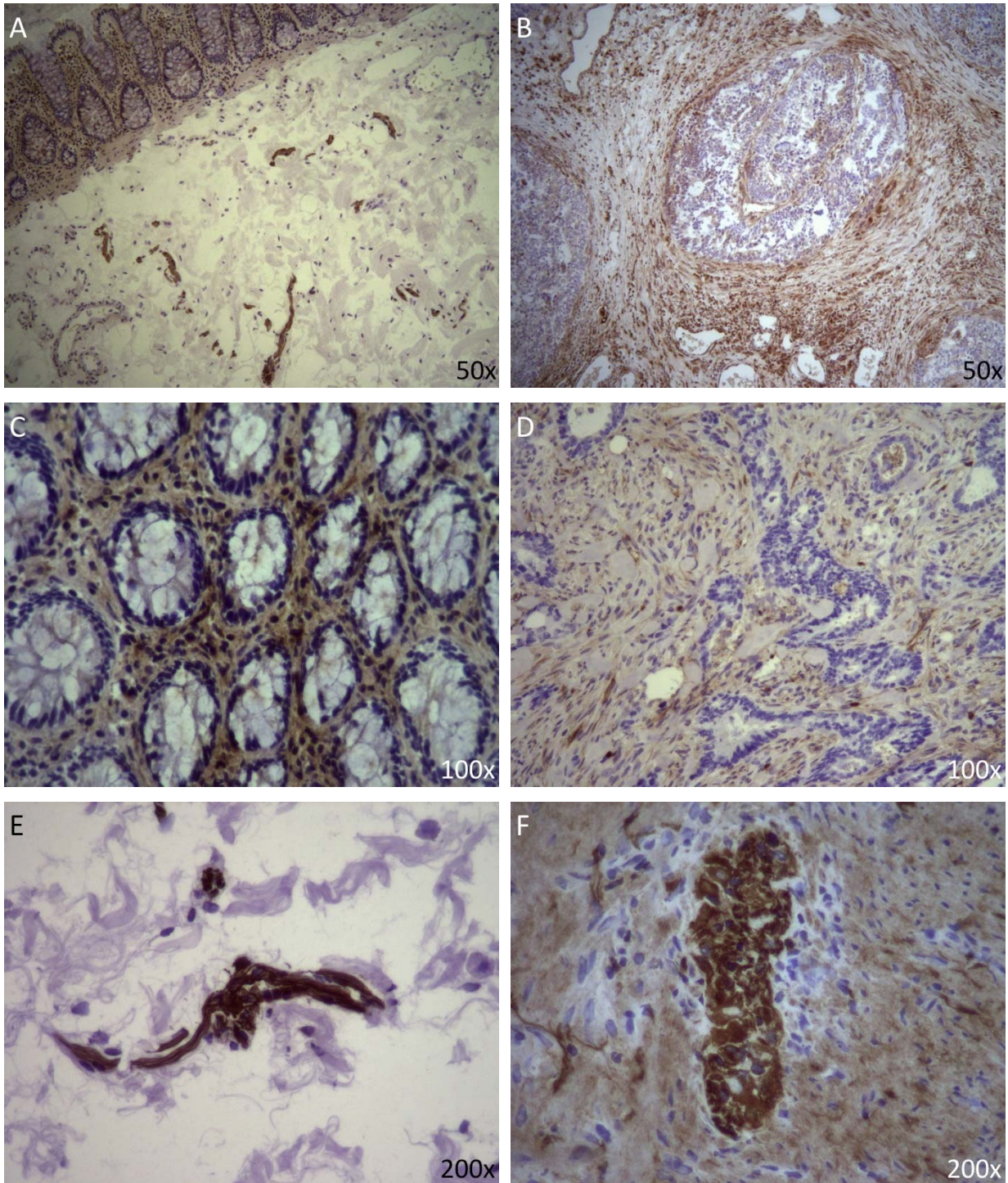


Abbildung 17:

Immunhistochemische Färbungen ergaben in Normalgewebe eine deutliche P2Y₂-Expression im bindegewebigen Stroma der Lamina propria und in den submukösen Nervenfasergeflechten der Meissner- und Auerbach-Plexus (A, E). Gesunde Darmepithelzellen (C) zeigten keinerlei Immunreaktivität für P2Y₂ ebenso wie Tumorzellen eines KRK im Stadium T3NM0 (survival 18-36mts) (B, D). P2Y₂ wurde dagegen im fibrösen Stroma zwischen den Tumorzellen (B) sowie in Nervenfasergeflechten der nur mäßig infiltrierten Muscularis exprimiert (F).

Vergrößerung: A-B: 50-fach; C-D: 100-fach; E-F: 200-fach

4. Diskussion

Das kolorektale Karzinom ist statistisch immer noch die vierthäufigste krebsbedingte Todesursache in den westlichen Industrienationen. Trotz der diagnostischen und therapeutischen Fortschritte der letzten Jahre mit zunehmend multimodalen und interdisziplinären Therapiekonzepten beträgt die Langzeitüberlebensrate über alle Tumorstadien hinweg lediglich ca. 50%. Die Prognose des Patienten wird dabei insbesondere durch die Ausbreitung von Metastasen bestimmt.

Die Entstehung, Progression und Metastasierung maligner Tumoren sind u.a. die Folge veränderter zellulärer Regulationsmechanismen mit einer Dysregulation des Zusammenspiels von Tumorsuppressor- und Onkogenen.

Der kolorektalen Karzinogenese liegen, nach aktuellem Konsens, vielfach eine Kumulation von Mutationen bspw. in den p53-, k-ras oder MAPK-Signaltransduktionswegen zu Grunde. Weniger bekannt ist bisher der Einfluss der purinerger Signalkaskade auf das kolorektale Tumorwachstum. Seit längerem ist jedoch bekannt, dass Purine wie z.B. ATP als Transmitter an purinergeren P2-Rezeptoren wie P2X₇ und P2Y₂ dosisabhängig zu einer Wachstumshemmung und Induktion der Apoptose in humanen Hauttumoren, Lungenkarzinom- sowie Kolonkarzinomzelllinien führen^[12, 67, 82]. Tierexperimentell zeigte sich, dass die Deletion der Ektonukleotidase CD39 - als Modulator der purinergeren Signaltransduktion - bspw. zu einer Störung der, für das weitere Tumorwachstum entscheidenden Neoangiogenese, zu einer verminderten Proliferation von Lungenkarzinomzellen sowie zu einer geringeren Absiedelung intravasal injizierter Tumorzellen führte^[23, 34].

Auf diesen und weiteren Studien aufbauend wurde in der vorliegenden Arbeit die mRNA- und Protein-Expression, die Gewebeverteilung und eine mögliche prognostische Bedeutung von CD39, P2X₇ und P2Y₂ im kolorektalen Karzinom beschrieben. Wir postulierten eine stadienabhängige Expression der purinergeren Rezeptoren und der Ektonukleotidase. Dazu untersuchten wir sieben verschiedene Tumorstadien. Besonderes Interesse galt den metastasierten Karzinomen, da eine mit Melanomzellen durchgeführte tierexperimentelle Studie bereits eine Assoziation von Tumorausbreitung und Metastasierung in Zusammenhang zur CD39-Expression gezeigt hatte^[17].

Über alle untersuchten Stadien kolorektaler Karzinome hinweg ergaben unsere Analysen eine z.T. deutlich verringerte mRNA- und Proteinexpression von CD39, P2X₇ und P2Y₂ relativ zum Normalgewebe.

Im Einzelnen zeigten Patienten mit kolorektalem Karzinom und assoziierter längerer Überlebenszeit von 72-110 Monaten oder metachroner Lebermetastasierung eine höhere CD39-mRNA-Expression als Karzinome mit kurzer Überlebenszeit respektive synchroner Metastasierung. Eine ähnliche, jedoch nicht signifikante Tendenz ergab sich für diese Subgruppen auch auf Proteinebene.

Immunhistochemisch war CD39 im Normalgewebe vorwiegend in der bindegewebigen Lamina propria sowie auf Gefäßendothelzellen nachweisbar, nicht jedoch in Enterozyten. Ebenso fand sich im Karzinomgewebe eine ausgeprägte Immunoreaktivität für CD39 im fibroblastenreichen, die Tumorzellen umgebenden Stroma, während sich die malignen Zellen selbst nicht anfärbten. Die anschließenden Analysen der Proteinexpression von CD39 in Abhängigkeit des prozentualen Tumoranteils bestätigten ferner die Ergebnisse der Immunhistochemie: Ausgeprägt fibrosierte Tumorproben, mit weniger als 30% Karzinomzellen, wiesen wesentlich höhere Werte auf, als solche mit moderatem oder hohem Anteil an kolorektalen Krebszellen (40-60% bzw. 70-100%). Beispielsweise ergaben Messungen stark fibrotischer Gewebeproben von T3-Tumoren mit metachroner Lebermetastasierung sogar höhere Expressionslevel von CD39 als gesundes Referenzgewebe.

Die gemessene Herunterregulierung purinerger Signalmoleküle in kolorektalen Karzinomen steht im Gegensatz zu vergleichbaren Studien an humanem Pankreasgewebe, wo chronische Entzündungen und maligne Tumoren mit einer deutlichen Hochregulation derselben Rezeptoren einhergehen^[45, 46]. Eine Korrelation zwischen hoher CD39 Expression und geringerer Tumoraggressivität bzw. längerer Überlebenszeit war beiden Tumorentitäten jedoch gemeinsam^[45]. Ferner zeigten sich analoge Ergebnisse für pankreatische und kolorektale Proben auch in Bezug auf die Immunhistochemie: Eine hohe Signalintensität für CD39 wurde in gesundem und malignem Pankreasgewebe auf Gefäßendothelzellen und im bindegewebigen Stroma um die, jedoch nicht in den malignen Tumorzellen selbst beobachtet^[45].

Die Diskrepanz zwischen der in der Literatur beschriebenen Hochregulierung von CD39 in Pankreaskarzinomen und der in unserer Studie gemessenen Herunterregulierung könnte darin begründet sein, dass es in malignen Tumoren des Pankreas im Laufe der Erkrankung zu einem massiven fibrotischen Gewebeumbau kommt: Der Anteil derartig fibrosierten Gewebes kann in Pankreaskarzinomen bis zu 95% betragen^[41]. Dieser als Desmoplasie bezeichnete Prozess ist charakterisiert

durch eine starke Proliferation von Fibroblasten und pankreatischen Sternzellen (PSC) mit exzessiver Produktion von Fibronectin und Kollagen. Begleitend kommt es zu einer vermehrten Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie Chemo- und Cytokinen aus inflammatorischen Zellen und Makrophagen ^[41, 46]. Als Besonderheit des Pankreas kommt hinzu, dass die Proliferation maligner Zellen als auch pankreatischer Sternzellen durch die unmittelbare Insulinwirkung und Exposition gegenüber zahlreichen Wachstumsfaktoren wie FGF (fibroblast growth factor), EGF (epidermal growth factor), NGF (nerve growth factor) oder TGF- β (transforming growth factor-beta) noch verstärkt wird ^[41, 58]. CD39-Ektonukleotidasen scheinen diesen fibrotischen Gewebeumbau im Pankreas entscheidend mit zu bestimmen: Wild-typ (wt) Mäuse entwickelten nach medikamentös induzierter Pankreatitis eine exzessive Kollagenproduktion durch PSCs mit einhergehender Fibrose und anschließender Atrophie des Pankreas ^[46]. CD39-null Mäuse wiederum zeigten zwar gewisse Entzündungsreaktionen, die Proliferationsrate pankreatischer Sternzellen und die Ausbildung einer Pankreasfibrose verglichen mit wild-Typ Mäusen war jedoch signifikant geringer ^[46]. In vitro folgte auf eine Stimulation von wt-PSCs mit TGF- β 1 ein deutlicher Anstieg der Prokollagen- α 1-Produktion; eine entsprechende Reaktion wurde in CD39-null PSCs dagegen nicht beobachtet ^[46]. Eine vergleichbar exzessive Stromareaktion wie im Pankreaskarzinom ist für Tumoren des Kolorektums aber eher untypisch. Ein Grund dafür könnte sein, dass kolorektales Gewebe aufgrund seiner anatomischen Lage in deutlich geringerem Maß durch eine direkte Wirkung anaboler Enzyme und hormoneller Wachstumsfaktoren beeinflusst wird als Pankreasgewebe.

Der im Vergleich zum Pankreaskarzinom deutlich geringere Stroma- aber höhere Anteil maligner Tumorzellen in kolorektalen Karzinomen und die hohe Expression von CD39 insbesondere im bindegewebigen Stroma, dürfte somit ein Grund für die geringere Expression von CD39 sein.

Ein weiterer Grund für die niedrige Expression von CD39 könnte sein, dass ein in unserer Studie relativ geringer Anteil hochgradig fibrosierter Proben (nur sieben der 63 in die Studie einbezogenen Proben zeigten einen Tumoranteil \leq 30%) in einer Verzerrung der tatsächlichen Verhältnisse resultierte: So hätte, aufgrund der oben beschriebenen Gewebeverteilung von CD39, bspw. eine große Zahl hochgradig fibrosierter Proben zu höheren Messresultaten geführt. Um diesen Fehler auszugleichen wäre jedoch eine höhere Fallzahl nötig gewesen.

Um der körpereigenen Immunantwort zu entgehen bilden Tumoren ein entsprechendes Mikromilieu, das die ungebremschte Proliferation maligner Zellen ermöglicht. Zentral ist dabei die Hemmung zytotoxischer T-Effektor-Zellen durch T-Regulator-Zellen (T_{reg} -Zellen) und Myeloide Suppressor-Zellen (MSC) [84]. Allgemein sind T_{reg} -Zellen durch die Oberflächenmoleküle CD4, CD25 und Foxp3 charakterisiert und lassen sich so von anderen $CD4^+$ -T-Lymphozyten abgrenzen [26]. Diese $CD4^+/CD25^+/Foxp3^+$ - T_{reg} -Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche die Ektonukleotidase CD39 sowie die 5'-Ektonukleotidase CD73, die im Zusammenspiel extrazelluläre Nukleotide zu Adenosin abbauen [13]. Perizelluläres Adenosin hemmt dann über G-Protein-gekoppelte A2A-Rezeptoren T-Effektor-Zellen und vermittelt somit immunologische Toleranz [13]. Am Beispiel des follikulären B-Zell-NHL konnten Hilchey et al. zeigen, dass eine Überexpression CD39-positiver T_{reg} -Zellen die gegen die Lymphomerkkrankung gerichtete T-Zell-Immunantwort kompromittierte [29]. Eine signifikant erhöhte Zahl $CD4^+/CD25^+/Foxp3^+$ - T_{reg} -Zellen peritumoral sowie im peripheren Blut - verglichen mit gesunden Kontrollgruppen - konnten Mandapathil et al. in Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches und Clarke et al. in Patienten mit kolorektalen Karzinomen nachweisen [11, 54]. Eine Hochregulation CD39-exprimierender $CD4^+/CD25^+/Foxp3^+$ - T_{reg} -Zellen könnte folglich mit einer schnelleren und aggressiveren Tumorprogredienz einhergehen, da eine adäquate, gegen den Tumor gerichtete Immunantwort ausbleibt. In der vorliegenden Studie jedoch waren die CD39-mRNA-Spiegel und die Protein-Expression in den fortgeschrittenen Tumorstadien, d.h. in Karzinomen mit nur kurzer Überlebenszeit (18-36 Monate), synchroner Lebermetastasierung und lokal begrenztem Wachstum aber bereits hämatogener Metastasierung (T2N0M1), z.T. signifikant niedriger, verglichen mit Tumoren mit langer Überlebenszeit (72-110 Monate) oder metachroner Metastasierung. So lässt sich lediglich ableiten, dass bestimmte Tumorentitäten eine Überexpression CD39-positiver T_{reg} -Zellen aufweisen; die Aggressivität kolorektaler Karzinome muss jedoch noch von weiteren Regulationsmechanismen abhängig sein:

Die Tumorangiogenese und damit indirekt das Tumorwachstum werden entscheidend durch die Expression von CD39-Ektonukleotidasen gesteuert. In lokoregional begrenzten Tumoren (z.B. T3N+M0) war die CD39-Proteinexpression deutlich geringer als in lokal ausgedehnten Tumoren (T4N0M0). Im Tiermodell resultierte eine Deletion des CD39-Gens in einer stark reduzierten bis fehlenden

Neovaskularisation: So hatten CD39-null-Mäuse in einem Matrigel-Modell zwar initial eine Sprossung neuer Gefäße gezeigt, eine weitere Einwanderung von Endothelzellen und Perizyten war jedoch ausgeblieben ^[23]. Ferner war die Proliferation von in CD39-null-Mäuse implantierten Tumorzellen signifikant geringer als in wild-Typ-Mäusen ^[34]. Eine durch eine geringe CD39-Expression bedingte insuffiziente Neoangiogenese und damit einhergehende, hypoxisch bedingte Wachstumshemmung maligner Tumoren würde die beschriebenen Ergebnisse erklären. Auch die beobachtete CD39-Immunoreaktivität speziell auf den Endothelzellen der kolorektalen Tumorgefäße legt eine direkte Beteiligung der Ektonukleotidase an neoangiogenetischen Prozessen nahe.

Extrazelluläre Nukleotide als Liganden an P2-Rezeptoren können abhängig von ihrer Konzentration, der Dauer ihrer Signalwirkung und des P2-Rezeptorsubtyps Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Zelltod beeinflussen ^[14, 81].

Bisherige Studien zur Expression purinerger Rezeptoren in kolorektalen Karzinomen beschränkten sich in erster Linie auf in vitro Analysen humaner Tumorzelllinien: Die humanen kolorektalen Karzinomzelllinien HT-29 und Colo320DM bspw. exprimieren beide den purinergeren Rezeptor P2Y₂. Eine Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration nach Aktivierung dieses Rezeptorsubtyps durch ATP führte in beiden Zelllinien zu einer erhöhten Apoptoserate (>150%) und Hemmung der Zellproliferation um bis zu 85% ^[30]. Ein ähnlicher Effekt konnte in den beiden humanen Kolonkarzinomzelllinien HCT8 und Caco-2 beobachtet werden. Anders als in der ersten Studie führte ATP in diesen Zellen aber über eine Aktivierung von P2X₇ Rezeptoren zu einer entsprechenden Wachstumsinhibierung und Steigerung der Apoptoserate ^[12]. Im Gegensatz dazu stimulierten UTP und niedrige Mengen an ATP in diesen Zelllinien die Zellproliferation über P2Y₂-Rezeptoren ^[12]. Dieser Effekt ließ sich auch in anderen Tumorentitäten beobachten: P2Y₂-Rezeptor-Agonisten induzierten dosisabhängig einen Anstieg der Zellzahl und eine gesteigerte Proliferation in humanen Melanom-, Mammakarzinom-, Gliom- oder Lungenkarzinomzelllinien ^[67, 76, 78, 83].

Eine Expression purinerger P2Y₂- und P2X₇-Rezeptoren war aber nicht nur in den humanen kolorektalen Zelllinien, sondern auch in sämtlichen humanen Gewebeproben unserer Studie nachweisbar: Auffallend war dabei eine z.T. massive Herunterregulierung der mRNA- und Proteinexpression des purinergeren P2Y₂-

Rezeptors über alle Tumorstadien hinweg verglichen zum Normalgewebe. Die Analysen für P2X₇ ergaben ebenso eine mehrheitlich signifikant erniedrigte Expression auf mRNA-Ebene (um bis zu 80% in T3-Tumoren mit langer Überlebenszeit) sowie eine tendenzielle Herunterregulierung auf Proteinebene. Immunhistochemisch ließ sich P2Y₂ insbesondere im peritumoralem Stroma und in den Nervenplexus der Darmwand darstellen, während die Tumorzellen selbst kein Signal zeigten. P2X₇ dagegen konnte v.a. auf Tumor- und Immunzellen detektiert werden, das Stroma wiederum blieb signalarm. Als einzige Gruppe hatten Nylund et al. bereits die Expression purinerger P2Y₂-Rezeptoren in humanen kolorektalen Geweben analysiert: Konträr zu unseren Ergebnissen hatten die Autoren in zehn humanen kolorektalen Karzinomgeweben jedoch signifikant erhöhte P2Y₂-Proteinspiegel sowie einen immunhistochemischen Nachweis des Rezeptors auf Tumorzellen beschrieben ^[56]. Fraglich bleibt, ob diese divergierenden Ergebnisse die realen Verhältnisse wiedergeben oder z.T. auch als Artefakt aufgrund unterschiedlicher Messtechniken zu werten sind, bspw. bedingt durch die Verwendung von P2Y₂-Antikörpern unterschiedlicher Hersteller (Alomone Labs Ltd. vs. Chemicon Inc. ^[56]) oder die geringere Fallzahl der schwedischen Studie (63 vs. 10 Tumorproben).

Im Einzelnen lässt sich aus dem Vergleich der untersuchten Tumorstadien zu einander aber eine Korrelation zwischen der Höhe der P2Y₂- und P2X₇-Expression und dem Fortschreiten der Erkrankung ableiten: Innerhalb der beobachteten Herunterregulierung der beiden P2-Rezeptoren über alle Stadien hinweg relativ zu den gesunden Referenzgeweben, konnte beispielsweise in nicht-metastasierten T3-Tumoren mit langer Überlebenszeit (72-110 Monate) eine höhere P2X₇-Proteinkonzentration gemessen werden als in Tumoren mit nur kurzem Überleben (18-36 Monate). Dies würde unsere Hypothese stützen, dass das Überleben von Patienten mit kolorektalen Tumoren, die eine höhere Konzentration Apoptose-induzierender purinerger P2X₇ Rezeptoren aufweisen, verlängert ist.

Wiederum hatten synchron metastasierte kolorektale Karzinome eine wesentlich höhere Expression von P2Y₂-Rezeptoren als metachron metastasierte; weniger signifikant traf dies auch auf lokal begrenzte, bereits aber metastasierte T2N0M1-Karzinome im Vergleich zu lokal ausgedehnten, jedoch noch nicht metastasierten T4N0M0-Tumoren zu. Dass in Tumoren, die zum Zeitpunkt der Diagnosestellung schon Fernmetastasen gebildet hatten, höhere P2Y₂-Spiegel gemessen wurden als

in metachron metastasierten Karzinomen könnte dabei auch im bereits beschriebenen Proliferation- und Mitose-fördernden Effekt geringer Konzentrationen von P2Y₂-Agonisten, beispielsweise über Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs, begründet sein ^[12, 78]. Untersuchungen an Zellen der humanen Lungenkarzinomzelllinie A549 hatten ebenfalls eine proliferative Wirkung der extrazellulären Nukleotide ATP und UTP nahegelegt ^[67]. Schäfer et al. hatten in diesem Zusammenhang jedoch eine weitere auf die Aktivierung von P2Y₂-Rezeptoren folgende Signalkaskade vermutet: Dabei kommt es infolge Rezeptoraktivierung durch ATP/UTP zu einer - von der Protein Kinase C (PKC) unabhängigen - Ca²⁺-abhängigen Aktivierung von NF-κB und der Ca²⁺/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII) mit folgender Phosphorylierung des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) und daraus resultierender Stimulation der Zellteilung ^[67]. Ob diese für die Lungenkarzinomzelllinie A549 postulierten Signalkaskaden eine Rolle im Rahmen purinerger Signalwirkungen in kolorektalen Karzinomen spielen ist jedoch unklar.

Die z.T. widersprüchlich erscheinenden Ergebnisse kennzeichnen wesentliche Aspekte purinerger Zellinteraktionen. In hoch komplexen und multifaktoriell-beeinflussten Regulationsmechanismen steuern extrazelluläre Nukleotide - abhängig von der jeweiligen Tumorentität, dem als Transmitter fungierenden Purin, dem P2-Rezeptorsubtyp-Besatz der Zielzelle und der Signalmodulation durch Ektokleotidasen - zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung oder Apoptose. Ein ggf. zukünftiger pharmakologischer Einsatz selektiver P2-Rezeptoragonisten oder -antagonisten in der Tumorthherapie wird daher nur unter Berücksichtigung dieser Balance zwischen Mitose-Stimulation und Apoptose-Induktion erfolgreich sein ^[81].

5. Zusammenfassung

Purinerge P2-Rezeptoren nehmen im Zusammenspiel mit Nukleotid-spaltenden Ektonukleotidasen Einfluss auf zelluläre Regulationsmechanismen wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose. Die vorliegende Arbeit untersuchte erstmals die Bedeutung purinerner Signalkaskaden auf die Tumorprogression im humanen kolorektalen Karzinom. Postuliert wurde eine stadienabhängige Expression purinerner P2X₇- und P2Y₂-Rezeptoren sowie der Ektonukleotidase CD39. Ferner war es Ziel die Gewebeverteilung purinerner Signalmodulatoren mittels Immunhistochemie zu untersuchen. Abschließend erfolgte die Korrelation der molekularbiologischen und histo-morphologischen Ergebnisse mit den klinischen Daten der Patienten.

Analysiert wurde kolorektales Tumorgewebe von insgesamt 63 Patienten, die entsprechend ihres Primärstaging in sieben unterschiedliche Kollektive eingeteilt wurden, darunter lokoregionär begrenzte als auch lymphogen und/oder hämatogen metastasierte Tumorstadien. Die mRNA-Expression wurde mittels qRT-PCR, die Proteinexpression mittels Western-Blot-Verfahren determiniert. Die Resultate der kolorektalen Tumorgewebe wurden mit insgesamt 23 gesunden kolorektalen Gewebeproben als Kontrollen verglichen. Mit spezifischen Antikörpern gelang der immunhistochemische Nachweis der P2-Rezeptoren und der Ektonukleotidase in gesundem Kontroll- als auch in Karzinomgewebe.

Die vorliegende Studie zeigte eine allgemeine Herunterregulierung purinerner Signalmediatoren in kolorektalen Tumoren relativ zu gesundem Referenzgewebe:

Im Einzelnen zeichneten sich z.B. aggressive, synchron metastasierte Karzinome durch niedrigere CD39-Level aus als langsamer wachsende Tumoren. Im Gewebe war CD39 vorwiegend im Stroma und auf Gefäßendothelzellen, nicht jedoch in Enterozyten oder Tumorzellen nachweisbar. Insbesondere stark fibrosierte Karzinomgewebe imponierten durch eine hohe CD39-Expression. Patienten mit T3-Tumoren und langer Überlebenszeit hatten höhere Werte für P2X₇ als Patienten mit kurzer Überlebenszeit. Dieser Rezeptor wurde vorwiegend auf Tumor- und Immunzellen, jedoch nur schwach auf Bindegewebszellen exprimiert. P2Y₂-Rezeptoren fielen durch die am stärksten verminderte mRNA- und Proteinexpression über fast alle untersuchten Tumorstadien auf. Immunhistochemisch gelang der Nachweis v.a. im peritumoralen Stroma und in den submukösen und intramuskulären Nervenplexus der Darmwand.

Die in der Literatur für andere Tumorentitäten beschriebene Hochregulierung purinerger Signalmodulatoren unterscheidet sich diametral von unseren Beobachtungen in kolorektalen Karzinomen. Wir führen dies im Wesentlichen auf die für diese Tumoren typische Gewebearchitektur und spezifische Entzündungsreaktion zurück. Aus der Korrelation unserer Ergebnisse mit den Daten der Patienten wurde deutlich, dass der Grad der Rezeptor- bzw. Ektonukleotidase-Expression das Fortschreiten der Erkrankung und damit die Überlebenszeit der Patienten entscheidend mit beeinflusst.

Die Prognose fortgeschrittener kolorektaler Karzinome bleibt trotz der Fortschritte der letzten Jahre limitiert. In kurativer Absicht durchgeführte Metastasen Chirurgie und neueste Antikörper-basierte Chemotherapien zeigen durchaus Erfolge, eine weitere intensive Forschung ist jedoch dringend von Nöten: Ein tiefgreifendes Verständnis der Zusammenhänge purinerger Signalkaskaden könnte daher in Zukunft neue Therapiestrategien eröffnen.

6. Literaturverzeichnis

1. Abbracchio M.P., Burnstock G., Boeynaems J.M., Barnard E.A., Boyer J.L., Kennedy C., Knight G.E., Fumagalli M., Gachet C., Jacobson K.A., Weisman G.A.
International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy.
Pharmacol Rev 58: (2006) 281-341
2. Agteresch H.J., Burgers S.A., van der Gaast A., Wilson J.H., Dagnelie P.C.
Randomized clinical trial of adenosine 5'-triphosphate on tumor growth and survival in advanced lung cancer patients.
Anticancer Drugs 14: (2003) 639-44
3. Biasco G., Derenzini E., Grazi G., Ercolani G., Ravaioli M., Pantaleo M.A., Brandi G.
Treatment of hepatic metastases from colorectal cancer: many doubts, some certainties.
Cancer Treat Rev 32: (2006) 214-28
4. Boller A.M., Nelson H.
Colon and rectal cancer: laparoscopic or open?
Clin Cancer Res 13: (2007) 6894s-6s
5. Breukink S., Pierie J., Wiggers T.
Laparoscopic versus open total mesorectal excision for rectal cancer.
Cochrane Database Syst Rev: (2006) CD005200
6. Bumm R., Harder F.
Kolon.
In: "Basiswissen Chirurgie", Siewert J. and Brauer R. (Hrsg.), Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2007, 1. Auflage, 272-283
7. Burnstock G.
Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling.
Pharmacol Rev 58: (2006) 58-86
8. Chadwick B.P., Frischauf A.M.
The CD39-like gene family: identification of three new human members (CD39L2, CD39L3, and CD39L4), their murine homologues, and a member of the gene family from *Drosophila melanogaster*.
Genomics 50: (1998) 357-67
9. Champoux J.J., Schultz S.J.
Ribonuclease H: properties, substrate specificity and roles in retroviral reverse transcription.
FEBS J 276: (2009) 1506-16

10. Chau I., Allen M.J., Cunningham D., Norman A.R., Brown G., Ford H.E., Tebbutt N., Tait D., Hill M., Ross P.J., Oates J.
The value of routine serum carcino-embryonic antigen measurement and computed tomography in the surveillance of patients after adjuvant chemotherapy for colorectal cancer.
J Clin Oncol 22: (2004) 1420-9
11. Clarke S.L., Betts G.J., Plant A., Wright K.L., El-Shanawany T.M., Harrop R., Torkington J., Rees B.I., Williams G.T., Gallimore A.M., Godkin A.J.
CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells suppress anti-tumor immune responses in patients with colorectal cancer.
PLoS One 1: (2006) e129
12. Coutinho-Silva R., Stahl L., Cheung K.K., de Campos N.E., de Oliveira Souza C., Ojcius D.M., Burnstock G.
P2X and P2Y purinergic receptors on human intestinal epithelial carcinoma cells: effects of extracellular nucleotides on apoptosis and cell proliferation.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 288: (2005) G1024-35
13. Deaglio S., Dwyer K.M., Gao W., Friedman D., Usheva A., Erat A., Chen J.F., Enjoji K., Linden J., Oukka M., Kuchroo V.K., Strom T.B., Robson S.C.
Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression.
J Exp Med 204: (2007) 1257-65
14. Di Virgilio F., Chiozzi P., Falzoni S., Ferrari D., Sanz J.M., Venketaraman V., Baricordi O.R.
Cytolytic P2X purinoceptors.
Cell Death Differ 5: (1998) 191-9
15. Di Virgilio F., Chiozzi P., Ferrari D., Falzoni S., Sanz J.M., Morelli A., Torboli M., Bolognesi G., Baricordi O.R.
Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells.
Blood 97: (2001) 587-600
16. Dubyak G.R., el-Moatassim C.
Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides.
Am J Physiol 265: (1993) C577-606
17. Dzhandzhugazyan K.N., Kirkin A.F., Straten P., Zeuthen J.
Ecto-ATP diphosphohydrolase/CD39 is overexpressed in differentiated human melanomas.
FEBS Lett 430: (1998) 227-30
18. Eaden J.A., Abrams K.R., Mayberry J.F.
The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis.
Gut 48: (2001) 526-35

19. Eglinton T., Luck A., Bartholomeusz D., Varghese R., Lawrence M.
Positron-Emission Tomography/Computed Tomography (PET/CT) in the Initial Staging of Primary Rectal Cancer.
Colorectal Dis: (2009)
20. Enjyoji K., Sevigny J., Lin Y., Frenette P.S., Christie P.D., Esch J.S., 2nd, Imai M., Edelberg J.M., Rayburn H., Lech M., Beeler D.L., Csizmadia E., Wagner D.D., Robson S.C., Rosenberg R.D.
Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation.
Nat Med 5: (1999) 1010-7
21. Fearon E.R., Vogelstein B.
A genetic model for colorectal tumorigenesis.
Cell 61: (1990) 759-67
22. Fitz J.G.
Regulation of cellular ATP release.
Trans Am Clin Climatol Assoc 118: (2007) 199-208
23. Goepfert C., Sundberg C., Sevigny J., Enjyoji K., Hoshi T., Csizmadia E., Robson S.
Disordered cellular migration and angiogenesis in cd39-null mice.
Circulation 104: (2001) 3109-15
24. Goh V., Halligan S., Bartram C.I.
Local radiological staging of rectal cancer.
Clin Radiol 59: (2004) 215-26
25. Greig A.V., Linge C., Healy V., Lim P., Clayton E., Rustin M.H., McGrouther D.A., Burnstock G.
Expression of purinergic receptors in non-melanoma skin cancers and their functional roles in A431 cells.
J Invest Dermatol 121: (2003) 315-27
26. Grimm M., Gasser M., Bueter M., Strehl J., Wang J., Nichiporuk E., Meyer D., Germer C.T., Waaga-Gasser A.M., Thalheimer A.
Evaluation of immunological escape mechanisms in a mouse model of colorectal liver metastases.
BMC Cancer 10) 82
27. Guillou P.J., Quirke P., Thorpe H., Walker J., Jayne D.G., Smith A.M., Heath R.M., Brown J.M.
Short-term endpoints of conventional versus laparoscopic-assisted surgery in patients with colorectal cancer (MRC CLASICC trial): multicentre, randomised controlled trial.
Lancet 365: (2005) 1718-26

28. Harriss D.J., Atkinson G., George K., Tim Cable N., Reilly T., Haboubi N., Zwahlen M., Egger M., Renehan A.G.
Lifestyle factors and colorectal cancer risk (1): systematic review and meta-analysis of associations with body mass index.
Colorectal Dis: (2009)
29. Hilchey S.P., Kobie J.J., Cochran M.R., Secor-Socha S., Wang J.C., Hyrien O., Burack W.R., Mosmann T.R., Quataert S.A., Bernstein S.H.
Human follicular lymphoma CD39+-infiltrating T cells contribute to adenosine-mediated T cell hyporesponsiveness.
J Immunol 183: (2009) 6157-66
30. Hopfner M., Maaser K., Barthel B., von Lampe B., Hanski C., Riecken E.O., Zeitz M., Scherubl H.
Growth inhibition and apoptosis induced by P2Y2 receptors in human colorectal carcinoma cells: involvement of intracellular calcium and cyclic adenosine monophosphate.
Int J Colorectal Dis 16: (2001) 154-66
31. Humphreys B.D., Rice J., Kertesy S.B., Dubyak G.R.
Stress-activated protein kinase/JNK activation and apoptotic induction by the macrophage P2X7 nucleotide receptor.
J Biol Chem 275: (2000) 26792-8
32. Invitrogen. Blotting Protocols for Novex® Pre-Cast Gels. 2009 [cited 2009 10.08.2009]; Available from: <https://commerce.invitrogen.com/index.cfm?fuseaction=iProtocol.unitSectionTree&objectId=88CDDE6B9C3048025FD75A6F140D0A8C&treeNodeId=56C5CC7ACECAE238EE183B269F86D316>
33. Iqbal S., Lenz H.J.
Integration of novel agents in the treatment of colorectal cancer.
Cancer Chemother Pharmacol 54 Suppl 1: (2004) S32-9
34. Jackson S.W., Hoshi T., Wu Y., Sun X., Enjoji K., Cszimadia E., Sundberg C., Robson S.C.
Disordered purinergic signaling inhibits pathological angiogenesis in cd39/Entpd1-null mice.
Am J Pathol 171: (2007) 1395-404
35. Jayne D.G., Guillou P.J., Thorpe H., Quirke P., Copeland J., Smith A.M., Heath R.M., Brown J.M.
Randomized trial of laparoscopic-assisted resection of colorectal carcinoma: 3-year results of the UK MRC CLASICC Trial Group.
J Clin Oncol 25: (2007) 3061-8
36. Jean G.W., Shah S.R.
Epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies for the treatment of metastatic colorectal cancer.
Pharmacotherapy 28: (2008) 742-54

37. Jemal A., Siegel R., Ward E., Hao Y., Xu J., Murray T., Thun M.J.
Cancer statistics, 2008.
CA Cancer J Clin 58: (2008) 71-96
38. Kaczmarek E., Koziak K., Sevigny J., Siegel J.B., Anrather J., Beaudoin A.R., Bach F.H., Robson S.C.
Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase.
J Biol Chem 271: (1996) 33116-22
39. Kansas G.S., Wood G.S., Tedder T.F.
Expression, distribution, and biochemistry of human CD39. Role in activation-associated homotypic adhesion of lymphocytes.
J Immunol 146: (1991) 2235-44
40. Kitisin K., Mishra L.
Molecular biology of colorectal cancer: new targets.
Semin Oncol 33: (2006) S14-23
41. Korc M.
Pancreatic cancer-associated stroma production.
Am J Surg 194: (2007) S84-6
42. Kuhry E., Schwenk W.F., Gaupset R., Romild U., Bonjer H.J.
Long-term results of laparoscopic colorectal cancer resection.
Cochrane Database Syst Rev: (2008) CD003432
43. Kumar V., Abbas A.K., Fausto N.
Neoplasia.
In: "Pathologic basis of disease", Robbins S.L. and Cotran R.S. (Hrsg.), Elsevier Saunders, Philadelphia, 2005, 7. Auflage, 862-864
44. Kumar V., Abbas A.K., Fausto N.
Neoplasia.
In: "Pathologic basis of disease", Robbins S.L. and Cotran R.S. (Hrsg.), Elsevier Saunders, Philadelphia, 2005, 7. Auflage, 290
45. Kunzli B.M., Berberat P.O., Giese T., Csizmadia E., Kaczmarek E., Baker C., Halaceli I., Buchler M.W., Friess H., Robson S.C.
Upregulation of CD39/NTPDases and P2 receptors in human pancreatic disease.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 292: (2007) G223-30
46. Kunzli B.M., Nuhn P., Enjoji K., Banz Y., Smith R.N., Csizmadia E., Schuppan D., Berberat P.O., Friess H., Robson S.C.
Disordered pancreatic inflammatory responses and inhibition of fibrosis in CD39-null mice.
Gastroenterology 134: (2008) 292-305

47. Le Marchand L., Wilkens L.R., Kolonel L.N., Hankin J.H., Lyu L.C.
Associations of sedentary lifestyle, obesity, smoking, alcohol use, and diabetes with the risk of colorectal cancer.
Cancer Res 57: (1997) 4787-94
48. Lin O.S.
Acquired risk factors for colorectal cancer.
Methods Mol Biol 472: (2009) 361-72
49. Lu W., Reigada D., Sevigny J., Mitchell C.H.
Stimulation of the P2Y1 receptor up-regulates nucleoside-triphosphate diphosphohydrolase-1 in human retinal pigment epithelial cells.
J Pharmacol Exp Ther 323: (2007) 157-64
50. Lynch H.T., de la Chapelle A.
Hereditary colorectal cancer.
N Engl J Med 348: (2003) 919-32
51. Maaser K., Hopfner M., Kap H., Sutter A.P., Barthel B., von Lampe B., Zeitz M., Scherubl H.
Extracellular nucleotides inhibit growth of human oesophageal cancer cells via P2Y(2)-receptors.
Br J Cancer 86: (2002) 636-44
52. Macdonald J.S.
Carcinoembryonic antigen screening: pros and cons.
Semin Oncol 26: (1999) 556-60
53. Maliszewski C.R., Delespesse G.J., Schoenborn M.A., Armitage R.J., Fanslow W.C., Nakajima T., Baker E., Sutherland G.R., Poindexter K., Birks C., et al.
The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization.
J Immunol 153: (1994) 3574-83
54. Mandapathil M., Szczepanski M.J., Szajnik M., Ren J., Lenzner D.E., Jackson E.K., Gorelik E., Lang S., Johnson J.T., Whiteside T.L.
Increased ectonucleotidase expression and activity in regulatory T cells of patients with head and neck cancer.
Clin Cancer Res 15: (2009) 6348-57
55. McAndrew M.R., Saba A.K.
Efficacy of routine preoperative computed tomography scans in colon cancer.
Am Surg 65: (1999) 205-8
56. Nylund G., Hultman L., Nordgren S., Delbro D.S.
P2Y2- and P2Y4 purinergic receptors are over-expressed in human colon cancer.
Auton Autacoid Pharmacol 27: (2007) 79-84

57. Otto H., Gabbert H.
Kolon und Rektum.
In: "Pathologie", Böcker W., Denk H. and Heitz P. (Hrsg.), Urban & Fischer, München, Jena, 2004 725-754
58. Pandol S., Edderkaoui M., Gukovsky I., Lugea A., Gukovskaya A.
Desmoplasia of pancreatic ductal adenocarcinoma.
Clin Gastroenterol Hepatol 7: (2009) S44-7
59. Pawlik T.M., Choti M.A.
Surgical therapy for colorectal metastases to the liver.
J Gastrointest Surg 11: (2007) 1057-77
60. Rapaport E.
Treatment of human tumor cells with ADP or ATP yields arrest of growth in the S phase of the cell cycle.
J Cell Physiol 114: (1983) 279-83
61. Rapaport E.
Experimental cancer therapy in mice by adenine nucleotides.
Eur J Cancer Clin Oncol 24: (1988) 1491-7
62. Rapaport E., Fishman R.F., Gercel C.
Growth inhibition of human tumor cells in soft-agar cultures by treatment with low levels of adenosine 5'-triphosphate.
Cancer Res 43: (1983) 4402-6
63. Reinacher-Schick A., Baldus S.E., Romdhana B., Landsberg S., Zapatka M., Monig S.P., Holscher A.H., Dienes H.P., Schmiegel W., Schwarte-Waldhoff I.
Loss of Smad4 correlates with loss of the invasion suppressor E-cadherin in advanced colorectal carcinomas.
J Pathol 202: (2004) 412-20
64. Renz-Polster H., Krautzig S., Braun J.
Kolorektales Karzinom.
In: "Basislehrbuch Innere Medizin", Renz-Polster H., Krautzig S. and Braun J. (Hrsg.), Urban & Fischer, München, Jena, 2006 590-594
65. Robson C.N., Enyoji K., Goepfert C., Imai M., Kaczmarek E., Lin Y., Sevigny J., Warny M.
Modulation of Extracellular Nucleotide-Mediated Signaling by CD39/Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-1.
Drug Development Research: (2001) 193-207
66. Robson S.C., Sevigny J., Zimmermann H.
The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance.
Purinergic Signal 2: (2006) 409-30

67. Schafer R., Sedehizade F., Welte T., Reiser G.
ATP- and UTP-activated P2Y receptors differently regulate proliferation of human lung epithelial tumor cells.
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 285: (2003) L376-85
68. Schiedeck T.H., Wellm C., Roblick U.J., Broll R., Bruch H.P.
Diagnosis and monitoring of colorectal cancer by L6 blood serum polymerase chain reaction is superior to carcinoembryonic antigen-enzyme-linked immunosorbent assay.
Dis Colon Rectum 46: (2003) 818-25
69. Selzner N., Selzner M., Graf R., Ungethuen U., Fitz J.G., Clavien P.A.
Water induces autocrine stimulation of tumor cell killing through ATP release and P2 receptor binding.
Cell Death Differ 11 Suppl 2: (2004) S172-80
70. Sevigny J., Sundberg C., Braun N., Guckelberger O., Csizmadia E., Qawi I., Imai M., Zimmermann H., Robson S.C.
Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase1) and NTPDase2 have implications for thromboregulation.
Blood 99: (2002) 2801-9
71. Smith R.A., Cokkinides V., Brawley O.W.
Cancer screening in the United States, 2009: a review of current American Cancer Society guidelines and issues in cancer screening.
CA Cancer J Clin 59: (2009) 27-41
72. Sobin L., Wittekind C.
UICC: TNM classification of malignant tumours.
In: "UICC: TNM classification of malignant tumours", Sobin L. and Wittekind C. (Hrsg.), John Wiley & Sons, Hoboken, 2002, 6. Auflage, 1-264
73. Solle M., Labasi J., Perregaux D.G., Stam E., Petrushova N., Koller B.H., Griffiths R.J., Gabel C.A.
Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors.
J Biol Chem 276: (2001) 125-32
74. Takayama T., Miyanishi K., Hayashi T., Sato Y., Niitsu Y.
Colorectal cancer: genetics of development and metastasis.
J Gastroenterol 41: (2006) 185-92
75. Tol J., Koopman M., Cats A., Rodenburg C.J., Creemers G.J., Schrama J.G., Erdkamp F.L., Vos A.H., van Groenigen C.J., Sinnige H.A., Richel D.J., Voest E.E., Dijkstra J.R., Vink-Borger M.E., Antonini N.F., Mol L., van Krieken J.H., Dalesio O., Punt C.J.
Chemotherapy, bevacizumab, and cetuximab in metastatic colorectal cancer.
N Engl J Med 360: (2009) 563-72

76. Tu M.T., Luo S.F., Wang C.C., Chien C.S., Chiu C.T., Lin C.C., Yang C.M.
P2Y₂ receptor-mediated proliferation of C(6) glioma cells via activation of Ras/Raf/MEK/MAPK pathway.
Br J Pharmacol 129: (2000) 1481-9
77. Ulrich A., Weitz J., Friess H., Buchler M.
[Fiction and facts about multi-modal therapy in rectal cancer].
Zentralbl Chir 131: (2006) 134-9
78. Wagstaff S.C., Bowler W.B., Gallagher J.A., Hipskind R.A.
Extracellular ATP activates multiple signalling pathways and potentiates growth factor-induced c-fos gene expression in MCF-7 breast cancer cells.
Carcinogenesis 21: (2000) 2175-81
79. Wang Q., Wang L., Feng Y.H., Li X., Zeng R., Gorodeski G.I.
P2X₇ receptor-mediated apoptosis of human cervical epithelial cells.
Am J Physiol Cell Physiol 287: (2004) C1349-58
80. Weitz J., Koch M., Debus J., Hohler T., Galle P.R., Buchler M.W.
Colorectal cancer.
Lancet 365: (2005) 153-65
81. White N., Burnstock G.
P2 receptors and cancer.
Trends Pharmacol Sci 27: (2006) 211-7
82. White N., Butler P.E., Burnstock G.
Human melanomas express functional P2 X₇ receptors.
Cell Tissue Res 321: (2005) 411-8
83. White N., Ryten M., Clayton E., Butler P., Burnstock G.
P2Y purinergic receptors regulate the growth of human melanomas.
Cancer Lett 224: (2005) 81-91
84. Whiteside T.L.
The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth.
Oncogene 27: (2008) 5904-12
85. Xie J., Itzkowitz S.H.
Cancer in inflammatory bowel disease.
World J Gastroenterol 14: (2008) 378-89
86. Zimmermann H.
Nucleotides and cd39: principal modulatory players in hemostasis and thrombosis.
Nat Med 5: (1999) 987-8
87. Zimmermann H.
Two novel families of ectonucleotidases: molecular structures, catalytic properties and a search for function.
Trends Pharmacol Sci 20: (1999) 231-6

88. Zlobec I., Lugli A.
Prognostic and predictive factors in colorectal cancer.
Postgrad Med J 84: (2008) 403-11

7. Danksagung

An erster Stelle möchte ich besonders Herrn Univ.-Professor Dr. med. Helmut Friess für die Überlassung des Themas danken.

Ferner geht mein ganz besonderer Dank an Herrn PD Dr. med. Beat Künzli für die Problementwicklung, die theoretische Planung und unerschöpfliche fachliche Hilfestellung bei der Realisierung der vorliegenden Studie.

Herrn PD Dr. med. Robert Rosenberg und Herrn Professor Dr. med. Aurel Perren gebührt mein Dank für die zur Verfügung Stellung der kolorektalen Gewebeproben sowie für die kompetente Hilfe bei der Auswertung der histologischen Präparate.

Ein großes Dankeschön speziell an Herrn Dr. med. Philipp Nuhn, Herrn Dr. Tiago de Oliveira, Frau Dr. Danguole Sauliunaite und das restliche Team um Herrn Dr. med. Christoph Michalski, die mir durch ihre fachliche und technische Kompetenz den Einstieg in die Grundlagen der Molekularbiologie ermöglichten und überdies durch ihr freundschaftliches Verhältnis meine Zeit im Labor unvergesslich machten.

Meinen Eltern, Margarete und Heinrich Rath, danke ich von tiefstem Herzen für ihre unersetzbare Unterstützung, ihren elterlichen Beistand und die Ermöglichung meiner medizinischen Ausbildung.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Schwester, Dr. rer. pol. Verena Rath, für ihre große Hilfe bei der Korrektur und Überarbeitung der Dissertation bedanken.

Allen hier nicht namentlich aufgeführten Personen, die mir durch ihre Anregungen und Hilfestellungen stets beistanden, sei ebenfalls herzlich gedankt.