

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. Hermann Einsele

**Allelotypisierung und prognostische Relevanz der
Regionen 1p32-36, 4p14-16 und 17p12
beim kolorektalen Karzinom**

Inaugural - Dissertation

**zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät**

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Constantin Wei-te Caspar Reiter

aus Würzburg

Würzburg, Oktober 2007

Referent: Prof. Dr. med. Wolfgang Scheppach

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Stephan Timm

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 15.10.2007

Der Promovend ist Arzt.

MEINEN ELTERN

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Epidemiologie.....	1
1.2.	Ätiologie	1
1.3.	Histologie	4
1.4.	Stadieneinteilung	4
1.5.	Pathogenese	5
1.5.1.	Adenom-Karzinom-Sequenz	5
1.5.2.	Molekularbiologie	6
1.5.2.1.	Onkogene.....	6
1.5.2.2.	Tumorsuppressorgene, Antionkogene	6
1.5.2.3.	Tumorprogressionsmodell.....	6
1.5.2.4.	Knudson Hypothese (Knudson et al. 1971).....	8
1.5.2.5.	DNA-Sequenzanalyse, Loss of Heterozygosity	9
1.5.2.6.	Mikrosatelliten.....	10
1.6.	Allelische Verluste beim kolorektalen Karzinom	11
2.	Material und Methoden	12
2.1.	Material.....	12
2.1.1.	Geräte	12
2.1.2.	Chemikalien.....	14
2.1.3.	Kommerzielle Kits.....	15
2.1.4.	Primer	16
2.1.5.	Zelllinien.....	16
2.1.6.	Standardlösungen	17
2.2.	Methoden.....	17
2.2.1.	LOH-Analyse	17
2.2.2.	DNA Isolierung	17
2.2.3.	Ultraviolett-Photometrie.....	18
2.2.4.	PCR.....	19
2.2.5.	Multiplex-PCR	20
2.2.6.	Agarose-Gelelektrophorese	21
2.2.7.	Polyacrylamid-Elektrophorese	22

2.2.7.1.	Technische Voraussetzungen	22
2.2.7.2.	Aufbau	22
2.2.7.3.	Arbeitsverfahren	23
2.2.7.4.	Sequenzier-Parameter	25
2.2.7.5.	Vorbereitung der DNA-Proben für die Elektrophorese.....	26
2.2.7.6.	Daten-Kollektion und LOH-Analyse.....	26
3.	Ergebnisse.....	29
3.1.	Multiplex-PCR	29
3.1.1.	Gesamtübersicht über die getesteten Primer-Kombinationen	29
3.1.2.	Primer Einzelaustestung	32
3.1.3.	Duplex-PCR	33
3.1.4.	Triplex-PCR	35
3.1.5.	Quadruplex-, Quintuplex-, und Sexaplex-PCR	38
3.1.6.	Multiplex I und II	41
3.2.	Molekulargenetische Schleimhaut- und Tumoruntersuchung.....	42
3.2.1.	Voraussetzungen der Untersuchung auf LOHs	42
3.2.2.	Molekulargenetische Untersuchung mittels Mono- und Multiplex PCR	43
3.2.3.	Heterozygoten-und LOH-Ergebnisse	43
3.3.	UICC-Stadien der analysierten Tumoren	48
3.4.	Beobachtungszeiträume, Überlebenszeiten und LOH-Häufigkeiten.....	48
3.5.	Korrelation der LOH-Untersuchungsergebnisse mit Patientendaten	49
3.6.	Überlebenszeitanalyse mittels der Kaplan-Meier Methode.....	49
3.7.	Kaplan-Meier Überlebenskurven	50
3.8.	Ergebnisse bei erweiterter Fallzahl (n=100).....	56
3.8.1.	Heterozygoten-und LOH-Ergebnisse (n=100)	56
3.8.2.	UICC-Stadien der analysierten Tumoren (n=100)	59
3.8.3.	Beobachtungszeiträume, Überlebenszeiten und LOH-Häufigkeiten (n=100)	60
3.8.4.	Korrelation der LOH-Untersuchungsergebnisse mit Patientendaten (n=100)	61
3.8.5.	Kaplan-Meier Überlebenszeitanalyse (n=100).....	62
4.	Diskussion	70
4.1.	Allelische Verluste der Region 1p32.....	70
4.2.	Klinische Korrelation von allelischen Verlusten auf Chromosom 1p.....	70

4.3.	Allelische Verluste der Region 4p15.2 und klinische Korrelation.....	71
4.4.	Allelische Verluste der Region 17p12 und klinische Korrelation.....	72
4.5.	Ursachen divergierender Studienergebnisse und Bedeutung der chromosomalen Verlustanalyse.....	74
5.	Zusammenfassung	76
6.	Quellen	77

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie

Das kolorektale Karzinom (KRK) ist mit einer variierenden Inzidenz von <20/100000/Jahr (Griechenland) bis zu 40/100000/Jahr (Deutschland) das zweithäufigste Karzinom sowohl beim Mann als auch bei der Frau. Ab dem 40. Lebensjahr verdoppelt sich dabei die Inzidenz alle 10 Jahre, weshalb 90% der kolorektalen Karzinome nach dem 50. Lebensjahr zu finden sind. Der Mortalitätsgipfel liegt dabei circa im 70. Lebensjahr. Es kann eine deutlich höhere Inzidenz in Industrieländern im Gegensatz zu Entwicklungsländern verzeichnet werden, bei Migration wird die für das Gastland typische Inzidenz innerhalb von zwei Generationen erreicht.

1.2. Ätiologie

Beim sporadischen kolorektalen Karzinom, welches in mehr als 90 % der Fälle angetroffen wird, sind Ernährungsfaktoren als wichtigste Einflußgrößen zu nennen. Bestandteile der Nahrung bzw. ihre Metaboliten wirken auf die Adenom-Karzinom-Sequenz ein, teils im inhibierenden, teils im akzelerierenden Sinne. Das individuelle Erkrankungsrisiko ergibt sich nach dieser Modellvorstellung aus dem Tag für Tag schwankenden Verhältnis aus akzelerierenden und protektiven Ernährungsfaktoren.

Die Ergebnisse epidemiologischer Studien sprechen für den protektiven Effekt einer hohen Gemüseaufnahme. Dies gilt für verschiedene Populationen und für alle Tumorlokalisationen (rechtes und linkes Kolon, Rektum). Angesichts der komplexen stofflichen Zusammensetzung von Gemüse ist derzeit unklar, welche Komponenten für die Protektion verantwortlich sind. Antioxidative Vitamine (Vitamin A, C, E und β -Karotin) waren in einigen Fall-Kontroll-Studien mit einem verminderten Tumorrisiko assoziiert. Jüngst wurde den in verschiedenen Gemüsesorten in variablen Mengen enthaltenen sekundären Pflanzenstoffen Aufmerksamkeit zuteil. Diese mehrheitlich polyphenolischen Pflanzenpigmente (Flavonoide u.a.) neutralisieren zytotoxische Sauerstoffradikale und induzieren zelluläre Abwehrmechanismen. Bislang ist es jedoch

nicht gelungen, Einzelsubstanzen zu identifizieren, die für den antikarzinogenen Effekt des entsprechenden Lebensmittels hauptsächlich verantwortlich sind.

Zum Thema "Ballaststoffe" liegen aus der Epidemiologie widersprüchliche Daten vor. Während Fall-Kontroll-Studien überwiegend auf eine Protektion durch Ballaststoffe hinweisen, zeigte die jüngste Auswertung der Nurses' Health Study keinen Zusammenhang zwischen Ballaststoffaufnahme und kolorektalem Tumorrisiko (Fuchs et al. 1999). Demgegenüber ließ die europäische EPIC-Studie (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) eine dosisabhängige Risikoverminderung beim Verzehr von Ballaststoffen erkennen (Bingham et al. 2003). Die europäische Studie hat dabei den Vorteil, dass die Spannweite der Ballaststoffaufnahme deutlich größer war als in der amerikanischen Studie (EPIC: 15-40 g/d, Nurses' Health: 9-24 g/d). Interventionsstudien mit Ballaststoffen ließen in der Mehrzahl keinen Effekt auf die Rekurrenz von Kolonadenomen erkennen (Schatzkin et al. 2000, Alberts et al. 2000). Ein Problem bei diesem Studienansatz ist jedoch die mit 3 Jahren kurze Beobachtungszeit und die Fixierung auf ein spätes Stadium der Adenom-Karzinom-Sequenz.

Große prospektive Kohortenstudien (Norat et al. 2005) zeigen konsistent eine positive Korrelation zwischen dem Verzehr „verarbeiteten“ und „roten“ Fleisches einerseits und dem Kolonkrebs-Risiko andererseits; diese Beziehung gilt nicht für "weißes" Fleisch (Geflügel, Fisch). Verschiedene Hypothesen wurden zur Erklärung der genannten epidemiologischen Daten herangezogen. Ein möglicher Mechanismus ist die bakterielle Decarboxylierung von Aminosäuren zu Aminen und Amiden und die nachfolgende Umsetzung zu N-Nitroso-Verbindungen unter Katalysierung von Häm (prothetische Gruppe von in rotem Fleisch enthaltenem Myoglobin). Diese Verbindungen führen im Tierversuch zu Stammzellmutationen in den Kolonkrypten und DNA-Adduktbildung als Vorläufer oder Marker des Kolonkarzinoms (Cross et al. 2003, Donnelly et al. 2004).

Epidemiologische Daten legen nahe, dass der Genuß alkoholischer Getränke, auch in geringen Mengen, das Risiko für kolorektale Adenome und Karzinome erhöht. Diese

Assoziation erscheint besonders konsistent für Alkoholkonsum und Rektumkarzinome (Pedersen et al. 2003). Bei Versuchstieren führt chronische Alkoholfuhr zur Hyperproliferation der Rektumschleimhaut, zurückzuführen am ehesten auf die Akkumulation des zytotoxischen Azetaldehyds (Simanowski et al. 2001). Eine vermehrte Gewebskonzentration von Azetaldehyd wird bei hoher Aktivität der Alkoholdehydrogenase bei gleichzeitig geringer Aktivität der Acetaldehyddehydrogenase beobachtet (genetischer Polymorphismus). Dieses Phänomen könnte die Interaktion von Suszeptibilitätsgenen und Umweltfaktoren in der Karzinogenese erklären.

Körperlich aktive Menschen beiderlei Geschlechts weisen ein um bis zu 50 Prozent vermindertes Erkrankungsrisiko auf; bereits moderates körperliches Training (Treppensteigen, schnelles Gehen = "brisk walking") senkt das relative Risiko. Umgekehrt tragen adipöse Menschen ein erhöhtes Krebsrisiko. In einigen epidemiologischen Studien ist eine positive Energiebilanz (Imbalanz zwischen Energieaufnahme und -verbrauch) positiv mit dem Krebsrisiko assoziiert (Chao et al. 2004).

Bei der Entstehung des kolorektalen Karzinoms sind auch endogene Risikofaktoren zu beachten. Es handelt sich bei der Mehrzahl der kolorektalen Karzinome um sporadisch auftretende Formen, nur etwa 10% sind hereditäre Formen. Verwandte 1. Grades von Patienten mit kolorektalen Karzinomen müssen mit einem um 10% erhöhten Erkrankungsrisiko rechnen. Das hereditäre, nichtpolypöse Kolonkarzinom-Syndrom (HNPCC, Lynch-Syndrom), welches autosomal-dominant vererbt wird und durch einen Defekt der mismatch repair Gene bedingt ist, führt zu einem Erkrankungsrisiko von circa 75% für das kolorektale Karzinom. Die autosomal-dominante familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), welche in 100% der Fälle mit einer Erkrankung am kolorektalen Karzinom einhergeht, lässt sich auf eine Mutation des APC-Tumorsuppressorgens zurückführen.

1.3. Histologie

Histologisch handelt es sich bei dem kolorektalen Karzinom um Adenokarzinome, welche in 2-5% der Fälle multipel auftreten. Hinsichtlich des histologischen Gradings werden Low-grade-Karzinome und High-grade-Karzinome unterschieden, wobei letztere eine frühe lymphogene Metastasierung aufweisen. Low-grade-Karzinome werden in gut (G1) und mäßig (G2) differenzierte Karzinome unterteilt, während High-grade-Karzinome in schlecht differenzierte muzinöse und nicht-muzinöse Adenokarzinome (G3) sowie in Siegelringzellkarzinome, kleinzellige und undifferenzierte Karzinome (G4) unterteilt werden.

60% der kolorektalen Karzinome sind im Rektum, circa 20% im Sigma und circa 10% im Coecum bzw. Colon ascendens lokalisiert. Colon transversum und Colon descendens sind in den übrigen 10% der Fälle betroffen.

1.4. Stadieneinteilung

Es existieren verschiedene Systeme zur Stadieneinteilung kolorektaler Karzinome, wobei vorwiegend die TNM-, Dukes- und UICC Systeme zur Anwendung kommen.

Definition	UICC-Stadium	TNM-System	Dukes
Carcinoma in situ	0	TIS N0 M0	
Ia: Beschränkung auf Mukosa und Submukosa	I	T1 N0 M0	A
Ib: Infiltration Muscularis propria (nicht darüber hinaus)		T2 N0 M0	
Infiltration aller Wandschichten, Überschreitung der Darmwand	II	T3 N0 M0 T4 N0 M0	B
Regionale Lymphknoten oder Infiltration der Umgebung	III	Tx N1-3 M0	C
Fernmetastasen	IV	Tx Nx M1	D

Tab. 1. Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms

1.5. Pathogenese

1.5.1. Adenom-Karzinom-Sequenz

Entsprechend der Adenom-Karzinom-Sequenz entwickelt sich das kolorektale Karzinom über verschiedene Adenom-Zwischenstufen aus dem Normalepithel, wobei die Stadien des frühen, intermediären und fortgeschrittenen Adenoms durchlaufen werden. Der Zeitraum der Entwicklung eines Karzinoms aus den adenomatösen Vorstufen umfasst einen Zeitraum von etwa 10 Jahren.

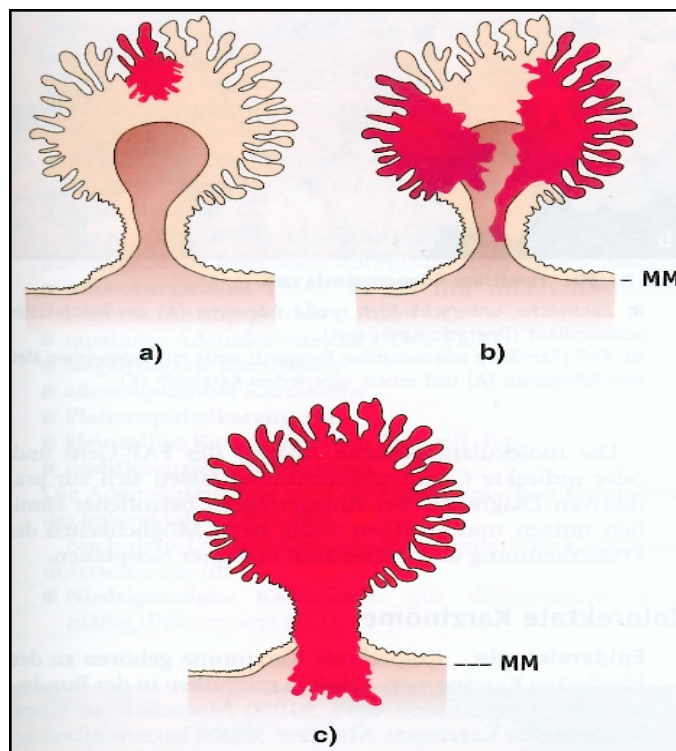


Abb. 1. Schematische Darstellung der Adenom-Karzinom-Sequenz (aus Böcker, Pathologie, Urban&Fischer, München, 2001)

a) Tubuläres Adenom mit fokaler schwerer Atypie, ausschließlich innerhalb der Schleimhaut lokalisiert, Muscularis mucosae (MM) ist intakt.

b) Tubuläres Adenom mit herdförmig schweren Atypien, die die Muscularis mucosae durchbrechen und unterschiedlich weit in die Submukosa bzw. in den Polypenstiel vorwachsen (=Karzinom)

c) Polypoides Karzinom

1.5.2. Molekularbiologie

1.5.2.1. Onkogene

Expressionsprodukte von Onkogenen regulieren vor allem Proliferation, Mobilität und Differenzierung von Zellen. Durch Mutationen fehlgesteuerte Onkogene weisen eine gesteigerte Eigenfunktion auf oder führen zu einer erhöhten Aktivität der entsprechenden Genprodukte (gain of function). Zwei Mechanismen sind dabei zu verzeichnen: Mutationen in Protoonkogenen führen zu Onkoproteinen mit gestörten Regulationsmechanismen, welche konstitutiv aktiviert sind, also qualitativ verändert sind und dadurch eine eigenständige Aktivität erworben haben. Andererseits können allelische Mutationen in Onkogenen zu einer übermäßigen Synthese von intakten Genprodukten führen, wodurch über den physiologischen Signalweg eine gesteigerte Signalantwort induziert wird. Da bei der Aktivierung von Onkogenen bereits die Mutation eines Allels ausreicht, weisen Onkogene ein dominantes Verhalten auf.

1.5.2.2. Tumorsuppressorgene, Antionkogene

Tumorsuppressorgene verhalten sich im Gegensatz zu den Onkogenen rezessiv, eine Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen setzt den allelischen Verlust beider Genkopien voraus. Es handelt sich bei diesen Genen um supprimierende Regulatoren des Zellwachstums, welche z.B. für die DNA-Reparatur verantwortlich sind (MLH1, MSH2) oder Adhäsionsproteine beeinflussen (DCC). Molekulargenetisch wird diese Inaktivierung vor allem durch Punktmutationen, Deletionen von kurzen DNA-Regionen sowie Chromosomen-Verluste, welche zur Monosomie führen, verursacht. Ferner sind Chromosomenverluste kombiniert mit Duplikationen (uniparenterale Disomie, Murthy et al. 2002) verantwortlich für Tumorsuppressorgen-Inaktivierungen. Genetische Rekombinationen sowie die CpG-island-Methylation führen ebenfalls zum Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen (Cavenee et al. 1983).

1.5.2.3. Tumorprogressionsmodell

Die Tumorgenese lässt sich auf eine Störung im genetischen Programm zurückführen, welche zu einem abnormen zellulären Verhalten, vor allem hinsichtlich des Wachstums,

der Invasion und der Metastasierung führt. Als wichtigste betroffene Systeme gelten die antagonistisch wirkenden Tumorsuppressorgene und die Onkogene. Darüber hinaus tragen Mutationen in DNA-Reparaturgenen zur Tumorprogression bei.

Die Entstehung des kolorektalen Karzinoms lässt sich auf eine sequenzielle Aktivierung von Onkogenen und auf die Inaktivierung von Tumorsuppressorgen zurückführen, deren Funktionen bzw. Genprodukte im Normalepithel in einem Gleichgewicht stehen. Mit Hilfe dieses Tumorprogressions-Modells (Vogelstein et al. 1988) werden den einzelnen Entwicklungsstufen der Karzinogenese die jeweiligen allelischen Mutationen zugeordnet.

Dabei spielt weniger die bestimmte Reihenfolge genetischer Veränderungen eine Rolle für die Entstehung des Karzinoms, als vielmehr deren Akkumulation zu einer kritischen Gesamtzahl.

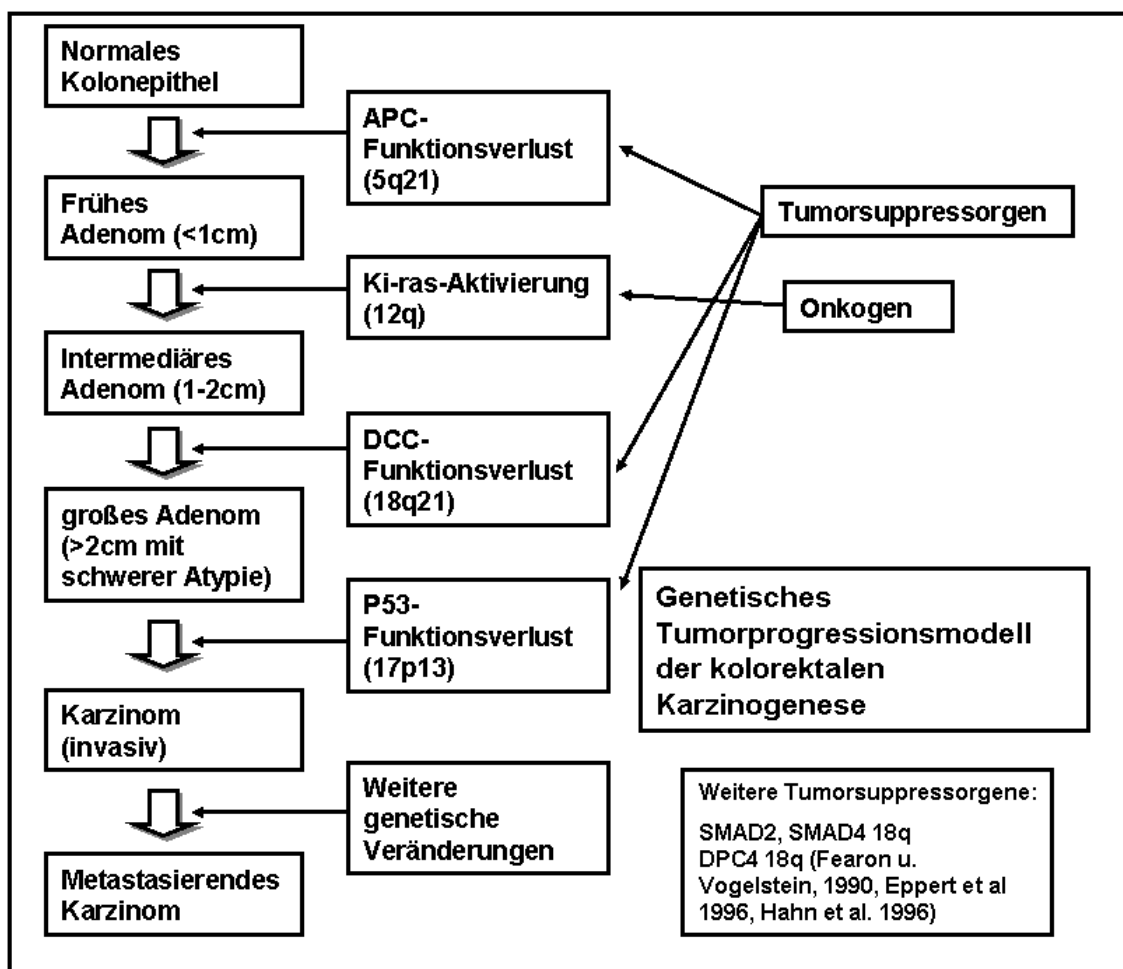


Abb. 2. Genetisches Tumorprogressionsmodell

Das Früh-Adenom entsteht durch eine Mutation bzw. Deletion des APC-Gens (adenomatous polyposis coli gene, 5q21), welche eine veränderte Signalvermittlung bewirkt. Dieses Adenom zeichnet sich durch eine tubuläre, geringgradige Dysplasie und eine Ausdehnung von <1 cm aus. Durch eine zusätzliche Aktivierung des Onkogens K-RAS entsteht das intermediäre Adenom, welches tubulo-villöse mittelgradige Dysplasien aufweist und Größen von 1-2 cm erreicht. Große Adenome resultieren aus einem weiteren Funktionsverlust des DCC-Tumorsuppressor-Gens (18q21), welches einen Differenzierungsfaktor darstellt und zu einem Zelladhäsionsproteinddefekt führt (Fearon et al. 1990). Es handelt sich hierbei um >2 cm große villöse Adenome mit hochgradigen Dysplasien. Der Übergang des Adenoms in ein invasiv progredientes Karzinom wird der Mutation oder dem Verlust des p53-Suppressor-Gens (17p13) zugeschrieben, welches für die Apoptose-Regulation verantwortlich ist. Deletionen in den chromosomalen Bereichen 17p13 und 18q21 sind vor allem mit einer erhöhten Metastasierungswahrscheinlichkeit assoziiert (Kern et al. 1989). Weitere tumorspezifische Mutationen, welche beispielsweise bei dem HNPCC vorkommen, sind MLH1 (3p21), MSH2 (2p16), MSH6 (2p16), PMS1 (2q31-33), PMS2 (7p22) und MLH3 (14q24.3), welche Mutationen in DNA-Reparaturgenen darstellen. Untersucht werden derzeit ferner die Tumorsuppressorgene SMAD4 (=DPC4) und SMAD2 (=MADR2) (Carethers et al. 1998), die in unmittelbarer Nähe zu dem DCC-Tumorsuppressorgen auf 18q liegen, mit einem Abstand von etwa jeweils 10cM (Eppert et al. 1996). Diese beiden Gene bilden integrale Bestandteile des TGF- β Signalwegs (transforming growth factor β signaling pathway) (Heldin et al. 1997).

1.5.2.4. Knudson Hypothese (Knudson et al. 1971)

Die Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens erfordert aufgrund des rezessiven Verhaltens den Funktionsverlust beider Allele, welcher entsprechend der Knudson-Hypothese durch einen zweistufigen Prozess verursacht wird. Im ersten Schritt kommt es durch eine Mutation in einem Allel des Tumorsuppressorgens zu dessen Inaktivierung. In einem dazu nicht genau definierbaren zeitlichen Abstand führt anschließend eine Deletion in dem verbliebenen, intakten Allel ebenfalls zu dessen

Inaktivierung und somit zum vollständigen Funktionsverlust des Tumorsuppressorgens („two-hit hypothesis“) (siehe Abb. 3).

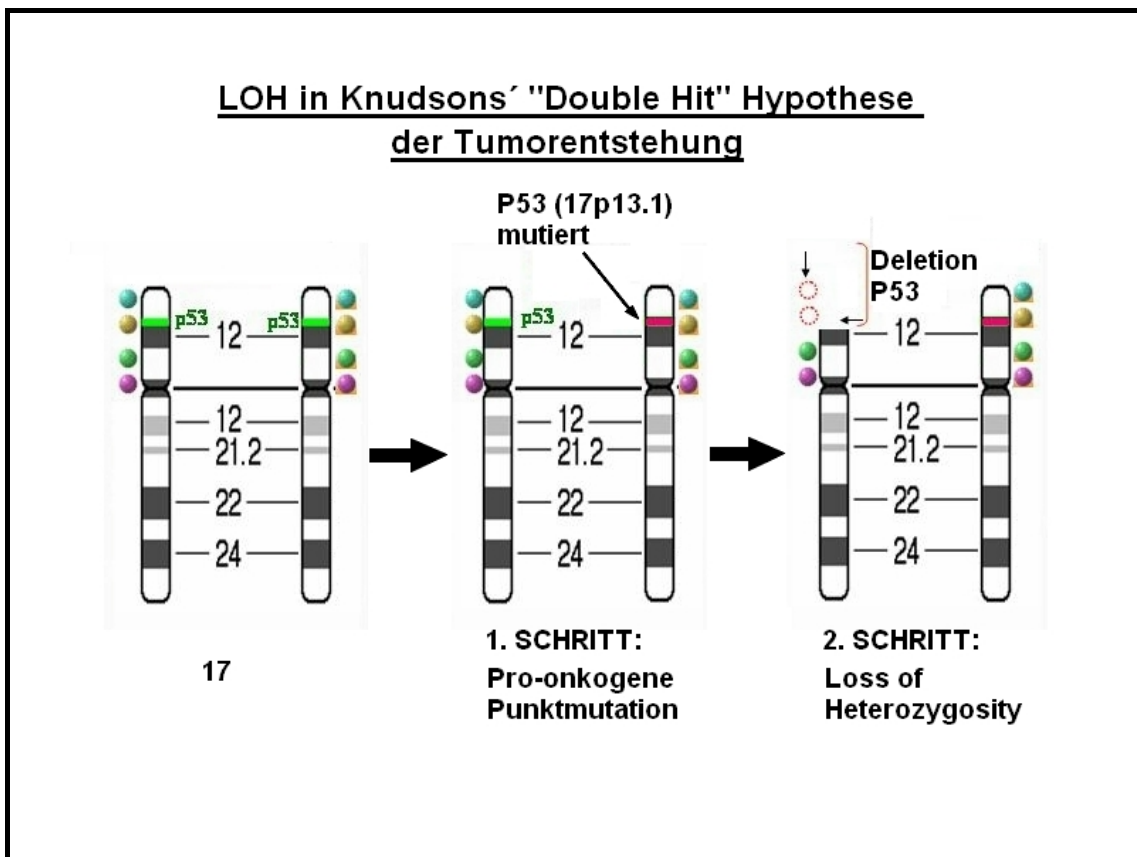


Abb. 3. 2-Stufen-Modell der Tumorsuppressorgen-Inaktivierung nach Knudson, (http://path.upmc.edu/cases/case287/images/LOH_P53.jpg , modifiziert)

1.5.2.5. DNA-Sequenzanalyse, Loss of Heterozygosity

Die Untersuchung eines Genoms auf sogenannte „Loss of Heterozygosity“ ermöglicht die Identifikation von chromosomalen Regionen, welche möglicherweise Tumorsuppressorgene enthalten. Unter einem „Loss of Heterozygosity“ (LOH) versteht man eine somatische Mutation, welche zu dem Verlust der Heterozygotie des betroffenen Allels führt. Daher ist bei dem Verfahren der LOH-Identifikation durch Mikrosatelliten die Heterozygotie des untersuchten Allels eine Voraussetzung. Die Heterozygotie führt in der graphischen Darstellung der DNA-Sequenzanalyse zur Entstehung zweier Banden für dieses Allel, bedingt durch Unterschiede der Länge des Mikrosatelliten-Abschnitts. Eine Deletion des einen Allels in einer Tumorprobe kann,

durch den Vergleich mit einer verbliebenen gesunden Gewebeprobe, durch den entsprechenden Bandenverlust dargestellt werden. Im Fall der Deletion weist die Tumorprobe nur noch eine Bande auf. Aus diesem Grund ist die Untersuchung von Allelen, welche homozygot sind und daher bereits im gesunden Zustand nur eine Bande aufweisen, nicht möglich. Einen Hinweis auf die Existenz von Tumorsuppressorgenen und deren Inaktivierung in dem untersuchten DNA-Abschnitt lässt sich bei einer gehäuften Beobachtung von LOH in Tumorproben daher mit der Knudson-Hypothese und der damit verbundenen, der Deletion vorausgehenden Mutation des zweiten Allels erklären. Es lässt sich daraus folgern, dass charakteristische Genloci, welche gehäuft in Tumoren LOH aufweisen, Kandidatenregionen für bisher noch nicht identifizierte Tumorsuppressorgene sind, deren Inaktivierung in der jeweiligen Karzinogenese eine entscheidende Rolle spielt.

1.5.2.6. Mikrosatelliten

Mikrosatelliten sind die häufigste Form repetitiver DNA. Sie besitzen einen tandemartigen Aufbau aus Di-, Tri- oder Tetranukleotiden. Das menschliche Genom enthält zirka 50 000 bis 100 000 dieser Tandemwiederholungen, wobei allerdings die Funktion bisher unbekannt ist. Die Zahl der Kopien der Repetitionen ist auf beiden Chromosomen oft unterschiedlich ausgeprägt, so dass der Genotyp in über 80% der Fälle heterozygot ist.

Aufgrund der gleichmäßigen Verteilung über das gesamte menschliche Genom sind die Mikrosatelliten gut für die molekulare Kopplungs- sowie LOH-Analyse geeignet. Vorteilhaft für den Einsatz von Mikrosatellitenmarkern als molekularbiologisches Werkzeug ist ferner die Möglichkeit, die Mikrosatellitenmarker mittels PCR analysieren zu können. Die DNA-Sequenzen, welche die einzelnen Mikrosatelliten flankieren, sind mittlerweile meist bekannt, so dass entsprechende Oligonukleotid-Primer erstellt werden können.

1.6. Allelische Verluste beim kolorektalen Karzinom

Im Rahmen der Karzinogenese des kolorektalen Karzinoms können schon in frühen Stadien chromosomale Instabilitäten beobachtet werden. Die genetischen Veränderungen umfassen dabei sowohl partielle Verluste von Chromosomen, welche als „Loss of Heterozygosity“ (LOH) bezeichnet werden, als auch Verluste von ganzen Chromosomen (Lengauer et al. 1998). Es sind zwei unabhängige Wege der genomischen Instabilität bekannt. Zum einen wird die sequentielle Inaktivierung von Tumor-Suppressor-Genen wie APC, DCC, SMAD 2 und 4 als ein Weg der Karzinogenese betrachtet, zum anderen gilt die Mikrosatelliteninstabilität (MSI) als ein wichtiger Faktor (Kinzler et al. 1996, Toft et al. 1998), wobei aber auch Überlappungen der beiden Wege beschrieben werden. Chromosomal instabile Tumoren sind dabei mikrosatellitenstabil, und chromosomal stabile Tumoren sind mikrosatelliteninstabil (Melcher et al. 2002). Neoplasien mit einer hochgradigen Mikrosatelliten-Instabilität akkumulieren Mutationen in Mikrosatelliten innerhalb der kodierenden Region von bestimmten Genen (Jiricny et al. 2000), (Boland et al. 1998), (Fujiwara et al. 1999). Diese Mutationen stellen vor allem Deletionen und Insertionen von Nukleotiden innerhalb sich wiederholender Sequenzen der DNA dar und beruhen auf einer defekten Reparatur von fehlgepaarten („mismatched“) Nukleotiden (Prolla 1998). Diese führen zu „Frameshift-Mutationen“, wobei das Leseraster der DNA verschoben wird. Tumore mit hochgradiger Mikrosatelliteninstabilität (MSI-H) sind charakteristisch für Tumore des HNPCC (Kane et al. 1997, Herman et al. 1998), welche 10-15% aller kolorektaler Karzinome ausmachen.

Chromosomale Verluste und Deletionen betreffen beim kolorektalen Karzinom unter anderem Tumor-Suppressor-Gene (Stanbridge et al. 1989), wobei vor allem Deletionen von TS-Genen auf 17p (p53 Gen) und auf 18q (DCC-Gen) als Indikatoren für ein aggressives Verhalten eines Tumors betrachtet werden (Kern et al. 1989, Laurent-Puig et al. 1992, Jen et al. 1994). Meist beginnen die genetischen Alterationen mit einer Inaktivierung des APC-Tumorsuppressor-Gens und des β -Catenin (Laurent-Puig et al. 1999; Chung et al. 1998).

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Biofuge fresco	Kendro Laboratory Products Heraeus, Osterode, Deutschland
Biometra BioDoc, Videodokumentationssystem	Biometra GmbH, Goettingen, Germany
Biometra TI3, Transilluminator	Biometra GmbH, Goettingen, Germany
Biometra Video Graphic Printer UP- 890CE	Kaiser Fototechnik GmbH & Co. KG, 74722 Biometra GmbH, Goettingen, Germany
Eismaschine „AF-10“	Scotsman Ice Systems Vernon Hills, IL, USA
Feinwaage AB204	Mettler, Toledo, Schweiz
Gefrierschränke: -Bosch Automatik GS 368 (-18°C) -Liebherr Premium (-20°C) -Forma Scientific (-80°C)	Robert Bosch GmbH, 70839 Gerlingen- Schillerhöhe, Germany Liebherr-Hausgeräte Ochsenhausen GmbH, Ochsenhausen, Germany Klein, Medizin & Labortechnik Würzburg, Germany
GeneAmp [®] PCR System 9700	PE Applied Biosystems; Perkin Elmer, Norwalk, USA
Kaiser RLR, Kameraarm	Kaiser Fototechnik GmbH & Co. KG, 74722 Buchen, Germany
Kaiser RS1, Repröstanter	Kaiser Fototechnik GmbH & Co. KG, 74722 Buchen, Germany
Laborabzug	Köttermann GmbH & Co KG, D-31311 Uetze/Hänigsen
Li-COR DNA-Sequencer model 4000	Li-COR, Lincoln, Nebraska, USA; MWG- Biotech (Gesellschaft für angewandte

	Biotechnologie mbH)
LI-COR 9840-161, Geltaschenkamm (3mm x 4mm x 0,25mm (BxHxT))	Li-COR, Lincoln, Nebraska, USA; MWG-Biotech (Gesellschaft für angewandte Biotechnologie mbH)
MicroCentrifuge Model SD Speed 6000 RAM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Pharmacia Biotech Ultraspec 3000 Spectrophotometer	Biochrom Ltd. Cambridge CB4 0FJ, England
Schüttelmaschine Model K550GE	Scientific Industries Inc., Bohemia, NY 11716, USA
Ultra-Turrax (bis 24'000 U/Min)	IKA-Werke GmbH & Co, D79219 Staufen, Deutschland
Wasserbad „GFL 1083“	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, D30938 Burgwedel
Hardware	
PC: Peacock Professional, Pentium 90 MHz, 24MB Ram	Peacock GmbH & Co. KG, Soest, Westfalen, Deutschland
Zip-Drive 100 pp	Iomega International S.A., Geneva, Switzerland
Software	
Image Manipulation	Li-COR, Lincoln, Nebraska, USA
Li-COR Base ImagIR™ Image Analysis Model 4000 & 4000L DNA Sequencers	Li-COR, Lincoln, Nebraska, USA
Operating System/2 Warp Version 3, 32-bit	IBM Corporation, United Kingdom Limited, Portsmouth, England
PhotoImpact Version 4.2	Ulead Systems, Inc., C-Cube Microsystems
Prism 4 for Windows	GraphPad Software, Inc., USA
Quick SeqencIR v.2.10	Li-COR, Lincoln, Nebraska, USA
LabImage 2.7.1	Kapelan GmbH, Bio-Imaging Solutions, Halle/Saale, Deutschland

Tab. 2. Geräte

2.1.2. Chemikalien

Agarose SeaKem (niedrige EEO) Seaplaque (niedrig schmelzend).....	Biozym, Hess. Oldendorf
Ammonium Persulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Aqua dest.	
Boric acid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Bromphenolblau, 3',3'',5',5''- Tetrabromophenolsulfonephthalein	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Dichlordimethylsilan 2%ige Lösung in 1,1,1- trichlorethan	Merck, Darmstadt, Deutschland
0,5M EDTA pH 8,0	Life Technologies GibcaBRL ultra pure, Paisley, Scotland,U.K.
Ethanol absolute	J. T. Baker, Mallinckrodt Baker B.V., 7400AA Deventer- Holland
Ethidiumbromid	Boehringer, Mannheim
Filtereinheit FP 30/0,2 CA-s	Schleicher&Schuell, Dassel, Deutschland
Formamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
H ₂ O, aqua ad iniectabilia	Delta Select, Pfullingen
5mM NaOH	Merck, Darmstadt, Deutschland

Saccharose	Roth, Karlsruhe
SequaGel complete	National Diagnostics, Atlanta, Georgia, USA
SequaGel-6 ultra pure	National Diagnostics, Atlanta, Georgia, USA
Size Standard IRDye 800	Licor, Lincoln, USA
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylenecyanole FF	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Tab. 3. Chemikalien

2.1.3. Kommerzielle Kits

DNeasy [®] Tissue Kit enthält: -DNeasy Mini Spin Column -Lyse-Puffer ATL -Proteinase K -AL-Puffer -AW1-Puffer -AW2 Puffer -AE-Puffer	QIAGEN , Hilden, Deutschland
HotStar Taq Master Mix Kit enthält: -HotStar Taq DNA Polymerase -PCR-Puffer mit 3 mM MgCl ₂ , 400µM je dNTP	QIAGEN , Hilden, Deutschland

Tab. 4. Kommerzielle Kits

2.1.4. Primer

Primer, oligo, 5' IRD 800 modifiziert	
D1S228	MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland
D3S100	
D3S1300	
D3S1312	
D3S647	
D4S2397	
D6S136	
D8S13	
D8S1771	
D17S1303	
D18S474	
D18S58	
D18S61	
D18S851	
G21S9511	
HYTM1	
NEFL	

Tab. 5. Primer

2.1.5. Zelllinien

SW480	Kolon-Adenokarzinom, Grad 4, Duke B
SW620	Metastase des gleichen Patienten

Tab. 6. Zelllinien

2.1.6. Standardlösungen

Ethidiumbromid	5 mg/ml, in dest. H ₂ O gelöst
Loading-Buffer	95% Formamid [v/v] 5mM NaOH 0.1% [w/v] Bromphenolblau 3',3'',5',5''- Tetrabromophenolsulfonephthalein 0.1% [w/v] Xylenecyanole FF 4,5% H ₂ O, aqua ad iniectabilia
Probenpuffer L IV	0,25% (w/v) Bromphenolblau 40% (w/v) Saccharose, in dest. H ₂ O gelöst
5x TBE-Puffer	54 g Trisbase 27,5 g Borsäure 20 ml 0,5M EDTA pH 8,0

Tab. 7. Standardlösungen

2.2. Methoden

2.2.1. LOH-Analyse

Das Arbeitsverfahren zur Analyse der LOH beinhaltet mehrere Schritte, welche sequenziell abgearbeitet werden. Zu Beginn stehen die DNA-Isolierung aus dem Nativmaterial und die Konzentrationsmessung, an die sich die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) anschließt. Dieser folgt die Elektrophorese der PCR-Produkte mittels Fluoreszenz-Scanner. Die ermittelten Rohdaten der Elektrophorese werden anschließend graphisch aufgearbeitet und auf LOH analysiert.

2.2.2. DNA Isolierung

Die für die molekulargenetische Untersuchung verwendete DNA wird aus Karzinomen und gesunder Darmschleimhaut isoliert, welche im Rahmen eines Projekts der „Interdisziplinären Forschergruppe Kolonkarzinom Würzburg“ asserviert worden sind.

Die DNA-Proben werden mit Hilfe des kommerziellen Kits „DNeasy[®] Tissue Kit“ von QIAGEN, Hilden, Deutschland, aus dem Nativ-Material gewonnen. Dieses Kit, mit dem sowohl genomische, mitochondriale als auch virale DNA isoliert werden kann, nutzt die Silizium-Gel-Technologie, um selektiv die DNA direkt nach der Zell-Lyse an die DNeasy-Membran zu binden und durch anschließende Zentrifugation zu isolieren.

In dem ersten Schritt werden 25 mg Gewebe mit dem Skalpell sorgfältig zerkleinert, mit 180 µl Lyse-Puffer (ATL) und 20 µl Proteinase K durchmischt und anschließend bei 55°C in einem Schüttel-Wasserbad über Nacht inkubiert. Im folgenden Schritt werden die Proben nach Zugabe von 200 µl AL-Puffer bei 70°C für 10 min inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Ethanol (100%) werden die Proben in die DNeasy Mini Spin Columns (entsprechen Filtersäulen mit Silizium-Gel-Membranen) pipettiert, und bei 10000 RPM für 1 min zentrifugiert. Als Zentrifuge kommt dabei die Biofuge fresco (Kendro Laboratory Products Heraeus, Osterode, Deutschland) zum Einsatz. Nach Verwerfen des Eluats und Zugabe von 500 µl AW1-Puffer wird erneut bei 10000 RPM für 1 min zentrifugiert, und anschließend das neue Eluat verworfen. Dieser Schritt wird mit 500 µl AW2-Puffer und 3 min Zentrifugationsdauer wiederholt. Schließlich wird die DNA, welche nun gereinigt und an der Membran der Filtersäulen gebunden vorliegt, durch Zugabe von 200 µl AE-Puffer, 1 min Inkubation bei Raumtemperatur und folgender Zentrifugation bei 10000 RPM herausgewaschen.

Die Konzentration der DNA in der Lösung wird mit einem UV-Spektrophotometer bei einer Absorption von 260 nm bestimmt und anschließend mit H₂O auf 100 ng/µl verdünnt.

2.2.3. Ultraviolett-Photometrie

Die Ultraviolett-Spektrophotometrie wird zur Konzentrationsbestimmung der Primer und der Desoxyribonukleinsäure eingesetzt und wird mit dem Pharmacia Biotech Ultraspec 3000 Spectrophotometer (Biochrom Ltd. Cambridge CB4 0FJ, England) durchgeführt. Dieses Spektrophotometer bestimmt die Lichtabsorption der Proben in den drei Bereichen UV-A (260 nm), UV-B (280 nm) und UV-C (320nm), welche als optische Dichte (OD) ausgegeben wird. Gleichzeitig berechnet es den Quotienten OD(260nm)/OD(280nm), welcher Auskunft über die Reinheit der Probe gibt. Ein

Quotient von 1,8 weist auf eine reine DNA-Probe hin. Bei höheren Werten ($>1,8$) ist eine RNA-Kontamination, bei niedrigeren Werten ($<1,8$) eine Protein-Kontamination wahrscheinlich.

Zur Durchführung der photometrischen Quantifizierung werden die Primer oder die DNA mit H₂O (aqua ad iniectabilia, Delta Select, Pfullingen) im Verhältnis 1:50 verdünnt. Es werden je 2 µl der Probe mit 98 µl H₂O in eine 100 µl Küvette gegeben und anschließend unter Verwendung des Programms „Oligonukleotid Quantifizierung“ mit dem Faktor 33 in der Dimension µg/ml mit dem Spektrophotometer gemessen. Vor jeder Messung wird die Küvette nur mit H₂O beladen und abgelesen, um den Nullwert zu bestimmen.

Die Konzentration in pmol/µl der Primer- bzw. DNA-Ausgangssprobe wird aus dem Absorptionswert bei 260 nm berechnet, wobei drei Annahmen gelten:

- Primer : 1 OD \cong 33 µg/mol
- DNA: 1 OD \cong 50 µg/mol
- 1 µg (= 20 mer) \cong 152 pmol

2.2.4. PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ist eine der heute am häufigsten eingesetzten Standardmethoden der Molekularbiologie und dient der Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen.

Das Prinzip der PCR (polymerase chain reaction) besteht in der Wiederholung von folgenden drei Reaktionsschritten:

- a. Denaturierung der DNA-Vorlage zu Einzelsträngen
- b. Anheften der Primer (Oligonukleotide), Annealing-Phase
- c. Extension der Einzelstränge zu Doppelsträngen entsprechend dem semikonservativen Mechanismus der DNA-Replikation

Die mehrfache Wiederholung führt zu einer exponentiellen Vervielfachung der DNA-Sequenz.

Für die PCR-Reaktionen kommt das GeneAmp® PCR System 9700, PE Applied Biosystems; Perkin Elmer, Norwalk, USA, zum Einsatz. Pro Reaktionsansatz werden jeweils 2 µl DNA (100ng/ml), 12,5 µl taq-Polymerase, 1 ml Primer (0,5 µl forward- und

0,5 µl reward- Primer) und 9,5 µl H₂O zugegeben. Die für die Synthese notwendigen Trinukleotide sind in dem fertigen Polymerase-Kit bereits mitenthalten. Bei Multiplex-PCR-Reaktionen (siehe unten) werden je kombiniertem Marker 1 µl Primer und entsprechend weniger H₂O zugegeben, um das Gesamtvolumen von 25 µl je Reaktionsansatz zu erhalten.

In den PCR-Reaktionen wird die HotStarTaq-DNA-Polymerase (HotStar Taq Master Mix Kit; QIAGEN, Hilden, Deutschland) eingesetzt. Es handelt sich hierbei um eine hitzeresistente, rekombinante 94-kDa DNA-Polymerase, welche aus dem Bakterium „*Thermus aquaticus*“ isoliert und modifiziert wurde. Diese so genannte „hot start Polymerase“ liegt zu Beginn der Reaktion in einem inaktivierten Zustand ohne Polymerase-Aktivität vor und wird durch eine initiale Inkubationsphase von 15 min bei 95°C, welche den drei repetitiven Reaktionsschritten vorangeht, aktiviert. Die hohe Temperatur der Aktivierung nahe der Denaturierungstemperatur (94 °C) verhindert die Entstehung von unspezifischen Nebenprodukten durch Polymerase-Aktivität bei niedrigen Temperaturen während der ersten Aufwärmphase im Thermocycler („Hot-Start PCR“). Die DNA-Polymerase liefert eine Extensions-Rate von 2-4 kb/min bei der verwendeten Replikationstemperatur von 72 °C.

Als Primer werden Mikrosatelliten-Marker verwendet, welche mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sind und so von dem Scanner detektiert werden können. Es handelt sich hierbei um 5' IRD 800 modifizierte Primer (5' IRD 800 modifiziert; MWG Biotech, Ebersberg).

Jede PCR startet mit der initialen Aktivierungsphase der HotStarTaq-DNA-Polymerase bei 95°C und 15 min, worauf 30 Zyklen und abschließend eine terminale Phase von 77°C für 10 min folgen. Jeder Zyklus besteht aus einer Denaturierungsphase (94°C und 30 sek.), einer Annealing-Phase (55°C und 30 sek.) und einer Replikationsphase (72°C und 1 min). Nach Abschluss der letzten Phase werden die Produkte automatisch auf 4°C abgekühlt und bei dieser Temperatur bis zur Weiterverarbeitung gehalten.

2.2.5. Multiplex-PCR

In einer Multiplex-Reaktion werden zwei oder mehr Mikrosatelliten-Marker in dem gleichen Reaktionsansatz kombiniert, so dass mit einem einzigen PCR- und

Elektrophorese-Arbeitsgang mehrere Markerregionen erfasst werden können. Die Mikrosatellitenmarker-Kombinationen werden dabei so gewählt, dass die Länge der Produkte der einzelnen Primer sich um mindestens 30b unterscheiden. Dies ist notwendig, um die verschiedenen Marker, welche gemeinsam in der gleichen Spur auf einem Gel laufen, voneinander ausreichend trennen zu können und somit die verschiedenen Banden eindeutig den Markerregionen zuordnen zu können.

Das Ziel ist, eine Kombination von drei verschiedenen Markern zu erhalten, die nach Möglichkeit auf verschiedenen Regionen liegen sollen. Initial wird Kontroll-DNA der Kolonkarzinom-Zelllinien SW480 und SW620 mit neu angesetzten Primern untersucht, wobei vorerst nur ein Primer pro PCR-Reaktion zugegeben wird, um die Funktionstüchtigkeit der neuen Marker zu testen. Anschließend werden pro PCR-Reaktion jeweils zwei Primer kombiniert, und diejenigen Kombinationen, welche mit Kontroll-DNA in beiden Markerregionen verwertbare Banden aufzeigen, mit einem dritten Marker kombiniert. Anhand dieser Vorgehensweise werden ferner Vierer-, Fünfer- und Sechser-Kombinationen von Mikrosatelliten-Markern getestet.

2.2.6. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wird zum Erfolgs-Nachweis einer PCR eingesetzt und kann DNA-Moleküle der Länge 500 bis 50 000 bp detektieren. Die Agarose-Gelelektrophorese trennt die PCR-Produkte nach ihrer Größe auf, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit von linearer DNA umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichts ist.

Zur Vorbereitung einer Gelelektrophorese wird die Agarose (Biozym, Hess. Oldendorf) in 1 x TAE-Puffer gelöst, in einem Mikrowellenherd 2 min erhitzt und anschließend nach Abkühlen auf 55°C mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml Endkonzentrat) versetzt. Das noch flüssige Gel wird auf die horizontale Fläche des Gelschlittens gegossen, und der Probenaschen-Kamm eingesetzt.

Nach Erstarren des Gels wird der Probenaschen-Kamm entfernt und die Elektrophoresekammer mit 1x TBE-Puffer gefüllt. Die Proben werden mit Probenpuffer L IV (0,25 % (v/v) Bromphenolblau, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland, (6 x) 40 % (v/v) Saccharose, Roth, Karlsruhe) versetzt, in die

Probentaschen pipettiert und anschließend bei 6 V/cm Elektrodenabstand getrennt. Aufgrund der Interaktion von Ethidiumbromid mit der DNA lässt sich diese bei UV-Licht (312 nm) visualisieren, als UV-Quelle kommt dabei der Transilluminator „Biometra TI3, Biometra GmbH, Goettingen, Germany“ zum Einsatz. Detektiert werden die DNA-Banden über das Videodokumentationssystem „Biometra BioDoc, Biometra GmbH“. Die dargestellten DNA-Banden werden anschließend zur Dokumentation über den Monochromdrucker „Biometra Video Graphic Printer UP-890CE, Biometra GmbH, Goettingen, Germany“ ausgedruckt.

2.2.7. Polyacrylamid-Elektrophorese

2.2.7.1. Technische Voraussetzungen

Zur Darstellung der PCR-Produkte wird das Fluoreszenz-Scanner-System Li-COR DNA-Sequencer Model 4000, Li-COR (Lincoln, Nebraska, USA), MWG-Biotech (Gesellschaft für angewandte Biotechnologie mbH) verwendet.

Gesteuert wird dieser Scanner durch einen PC mit folgenden Spezifikationen:

Pentium 90 MHz, 24 MB Ram, Operating System/2 Warp Version 3. Als Steuerungssoftware werden die Programme Li-COR Base ImagIR™ Image Analysis Model 4000 & 4000L DNA, Sequencers Version 02.10 950213 und Quick SeqencIR v.2.10. eingesetzt.

Die Rohdaten werden mit den Programmen Image Manipulation (Li-COR, Lincoln, Nebraska, USA) und PhotoImpact Version 4.2 (Ulead Systems, Inc.) bearbeitet und ausgewertet; archiviert werden die Elektrophorese-Ergebnisse letztendlich als MS-Powerpoint Folien.

2.2.7.2. Aufbau

Der automatische DNA-Sequencer Li-COR 4000 nutzt die Infrarot-Technologie zur Detektion von DNA mit Hilfe eines Laser-Mikroskops, welches aus einem fest mit dem Detektor zusammengesetzten Infrarot-Laser besteht. Dieses tastet als bewegliche Einheit das Gel, welches senkrecht in dem Gerät installiert wird, vertikal zur Laufrichtung der PCR-Produkte kontinuierlich ab. Der Aufbau des LICOR DNA-

Sequencers besteht neben dem Lasermikroskop ferner aus einem Gelsandwich, welches das Polyacrylamid-Gel zwischen zwei Glasplatten enthält. Dieses senkrecht montierte Glassandwich weist eine Lauflänge von 41 cm für die DNA-Fragmente auf, die Geldicke beträgt 0.25 mm. Es ragt sowohl mit der oberen als auch mit der unteren Glaskante jeweils in einen Flüssigkeitstank, gefüllt mit Puffer-Lösung, über welche die zur Elektrophorese nötige Spannung angelegt wird. Da die PCR-Produkte geladene Teilchen darstellen, werden diese, nachdem sie in die sich an der oberen Glaskante befindlichen Geltasche eingebracht wurden, während des Elektrophoreseverfahrens durch das angelegte Spannungsfeld durch das Gel vom oberen zum unteren Puffertank transportiert. Die Geschwindigkeit, mit der die DNA-Fragmente dabei im Gel wandern, ist abhängig von deren Größe und elektrischen Ladung. Dabei wandern kleine Fragmente aufgrund des geringeren Widerstandes im Gel schneller als größere, sowie stärker geladene schneller als schwächer geladene Moleküle aufgrund der größeren Anziehungskraft des elektrischen Feldes. Das Lasermikroskop, das auf Höhe des untersten Viertels des Glassandwiches sich auf einer horizontalen Linie bewegt, detektiert die vorbeiwandernden DNA-Fragmente mithilfe deren fluoreszenz-markierten Primern und stellt diese als Banden in einer Grafik dar.

2.2.7.3. Arbeitsverfahren

Die Glasplatten des Gelsandwiches werden zunächst in mehreren Schritten gereinigt. Zuerst werden beide Glasplatten mit Leitungswasser und anschließend mit doppelt destilliertem Wasser gereinigt. In den folgenden drei Waschschrritten wird dem destillierten Wasser schrittweise eine zunehmende Menge an technischem Alkohol zugefügt, um die Glasplatten zu entfetten; beginnend mit dem Verhältnis von 1:2 Alkohol: Wasser, dann 1:1 und anschließend 2:1. Abschließend werden die Glasplatten solange mit reinem Alkohol gereinigt, bis im Lichtreflex keinerlei Hinweise auf Verunreinigungen mehr zu finden sind. Die Seiten der beiden Glasplatten, welche später dem Gel zugewandt werden, werden unter dem Abzug dreimal mit Dichlordimethylsilan (2%ige Lösung in 1,1,1-trichlorethan; Merck, Darmstadt, Deutschland) behandelt. Die Einwirkzeit zwischen dem einzelnen Auftragen des Silans beträgt jeweils 5 min. Anschließend werden die beiden Glasplatten in waagrechter

Position mit Hilfe von zwei seitlich angebrachten Klemmen miteinander fixiert, wobei unter den seitlichen Rändern zwischen den Glasplatten jeweils ein Spacer von 0.25 mm Dicke eingebracht wird, welcher für den korrekten Abstand der Glasplatten zueinander sorgt. In den dadurch gebildeten Spalt wird später das Gel gegossen.

Zur Vorbereitung des Gels werden 24 ml SequaGel-6 ultra pure (National Diagnostics, Atlanta, Georgia, USA) mit 6 ml SequaGel complete (National Diagnostics, Atlanta, Georgia, USA) in einem Becherglas gemischt. Unmittelbar vor dem Gießen des Gels zwischen die Glasplatten werden 100 µl einer APS-Lösung hinzugefügt, welche aus 400 mg Ammonium Persulfat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) und 800 µl H₂O (aqua ad iniectabilia; Delta Select, Pfullingen) besteht. Diese APS-Lösung löst die Vernetzung des löslichen Polyacrylamidgels aus. Das noch flüssige Gel wird mit einer 50 ml Spritze, der eine Filtereinheit FP 30/0,2 CA-s (Schleicher&Schuell, Dassel, Deutschland) vorgeschaltet ist, auf die obere Kante der Schmalseite des Glasplatten-Sandwiches aufgetragen, und durch leichtes Kippen der vorderen Glaskante nach oben zum Durchfließen des gesamten Glasspalts gebracht. In die Oberkante des Glassandwiches zwischen die beiden Glasplatten wird ein weiterer Spacer eingefügt, welcher die spätere Hohlraum-Tasche der Größe 5 mm x 162 mm im Gel formt, in welche die PCR-Produkte bei der Beladung des Gels pipettiert werden. Über diesem Spacer werden die Glasplatten mit einer starken Klemme verstärkt fixiert, um eine möglichst enge und damit dichte Tasche nach Entfernen des Spacers zu ermöglichen. Anschließend benötigt das Gel circa eine Stunde zur vollständigen Auspolymerisation, bevor es weiterverarbeitet und zur Sequenzierung mittels Scanner genutzt werden kann. Das fertige Gel kann aber auch unter Luftabschluss und mit Aqua dest. angefeuchtet bis zu 2 Wochen bei 4 °C aufbewahrt werden, bevor es zur Sequenzierung eingesetzt wird. Nach der vollständigen Polymerisation des Gels und dem erneuten Reinigen der äußeren Seiten der Glasplatten mit Ethanol wird das Glassandwich senkrecht in den LICOR-Scanner eingespannt. Zwei Puffertanks, in die das Glassandwich mit der Ober- und Unterkante eintaucht, werden mit insgesamt 1 Liter Elektrophorese-Puffer befüllt, welcher aus 160ml 5x TBE Puffer und 840 ml destillierten Wasser besteht. Der 5x TBE-Puffer besteht aus 54 g Trisbase (Tris(hydroxymethyl)aminomethan; Merck, Darmstadt, Deutschland), 27,5 g Borsäure (Boric acid; Sigma-Aldrich Chemie GmbH,

Steinheim, Deutschland) und 20 ml 0,5M EDTA pH 8,0 (Life Technologies Gibca BRL ultra pure, Paisley, Scotland, U.K.) gelöst in 1 Liter destillierten Wassers.

Bevor der Zahnkamm (25 Taschen á 2,5 mm x 4 mm) in die Hohlraum-Tasche, mit welcher die obere Kante des Gelsandwiches in den oberen Tank ragt, eingesetzt werden kann, wird diese gründlich mit der TBE-Pufferlösung durchgespült und somit von eventuell vorhandenen Gelresten gesäubert. Anschließend wird die Durchgängigkeit der Tasche mithilfe von Loading-Buffer überprüft, welcher testweise in die Geltasche pipettiert und anschließend wieder ausgespült wird. Zum gleichen Zweck wird auch nach Einsetzen des Kamms wiederum etwa jede dritte Kammer mit Loading-Buffer beladen und mit TBE-Puffer durchgespült.

Vor Beginn des Elektrophorese-Durchlaufs und noch vor Beladung des Gels mit den PCR-Produkten benötigt das Gel einen Vorlauf von circa 20 min unter Sequenzier-Bedingungen, um die optimalen Bedingungen im Gel zu erreichen.

2.2.7.4. Sequenzier-Parameter

Folgende Parameter werden vor dem Sequenzierstart über die Software festgelegt:

Voltage: 1500V	HVPSInitStatus:Off
Current: 35.0 mA	ForMS:999999
Power: 42.0 W	RevMS:0
Temperatur: 48 °C	HeatPostRunStatus:Off
Scan Speed: 3	ScanInitStatus:Off
Signal Channel: 3	StartCol:0
Frames to collect: 15/hour	StopCol:768
SignalGainSetPt: 25	BackgroundAverage:20
SignalOffsetSetpt: 107	BackgroundNoise:10
VideoDataSize:16	

Tab. 8. Sequenzierparameter

2.2.7.5. Vorbereitung der DNA-Proben für die Elektrophorese

Die PCR-Produkte werden vor dem Auftragen auf das Gel verdünnt und mit Loading-Buffer aufbereitet. Dazu werden die DNA-Fragmente zunächst 3 min lang bei 95 °C denaturiert. Der verwendete Loading-Buffer setzt sich aus 95% Formamid [v/v] (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland), 5mM NaOH (Merck, Darmstadt, Deutschland), 0.1% [w/v] Bromphenolblau, 3',3'',5',5''-Tetrabromophenolsulfonephthalein (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland), 0.1% [w/v] Xylenecyanole FF (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) und 4,5% H₂O, aqua ad iniectabilia (Delta Select, Pfullingen) zusammen.

Von jeder Tumor- bzw. Schleimhautprobe werden die PCR-Produkte mit dem Loading-Buffer in 2 getrennten Ansätzen auf 50% und 12.5% verdünnt. Von diesen Verdünnungen werden jeweils 2 µl in die einzelnen Taschen des Kammes im Gelsandwich pipettiert. Die erste, letzte und eine Tasche aus der Mitte des Kammes werden mit dem Größenmarker Size Standard IRDye 800 (Licor, Lincoln, USA) beladen, welcher mit Loadingbuffer auf 25% verdünnt wurde. Pro Tasche werden 2 µl dieser Verdünnung einpipettiert.

Unter Verwendung der oben angegebenen Elektrophorese-Parameter werden 30 min benötigt, bis die Primerfront detektiert wird. Das kleinste DNA-Fragment der Multiplex I taucht nach etwa 50 min, das mittelgroße Fragment nach 75 min und das größte Fragment nach etwa 120 min auf. Der Scanvorgang dauert somit insgesamt etwa 180 min.

2.2.7.6. Daten-Kollektion und LOH-Analyse

Die Daten des Scans werden als 16 bit - GEM-Bild (*.img - Datei) ausgegeben. Diese werden mit dem Programm Image Manipulation (Li-COR, Lincoln, Nebraska, USA) in *.tif-Dateien umgewandelt. Um die Bearbeitung zu ermöglichen und um Datenverluste zu verhindern werden die Dateien anschließend mit dem Programm PhotoImpact Version 4.2 (Ulead Systems, Inc.) in 24-bit tif-Dateien konvertiert.

Eventuell vorliegende LOH lassen sich anhand der Signalintensitäts-Differenzen zwischen den Banden der Schleimhautprobe und der Tumorprobe ablesen. Ein LOH

wird ab einer Intensitätsdifferenz von 30 % identifiziert. Um die Intensitätsdifferenzen zu verifizieren, wurde das Programm LabImage 2.7.1 (Kapelan GmbH) eingesetzt. Dieses erfasst automatisch sowohl die Laufbahnen der Proben („automatic lane detection“) als auch die Banden selbst („automatic band detection“) und entfernt Hintergrundrauschen, falls vorhanden. Anschließend berechnet es die Signalstärke der Banden und den Quotienten der Signalstärken zwischen korrespondierenden Banden. So können eventuell vorliegende LOHs unmittelbar abgelesen werden. Für die Berechnung und Generierung der Kaplan-Meier Kurven kommt das Programm GraphPad Prism zum Einsatz.

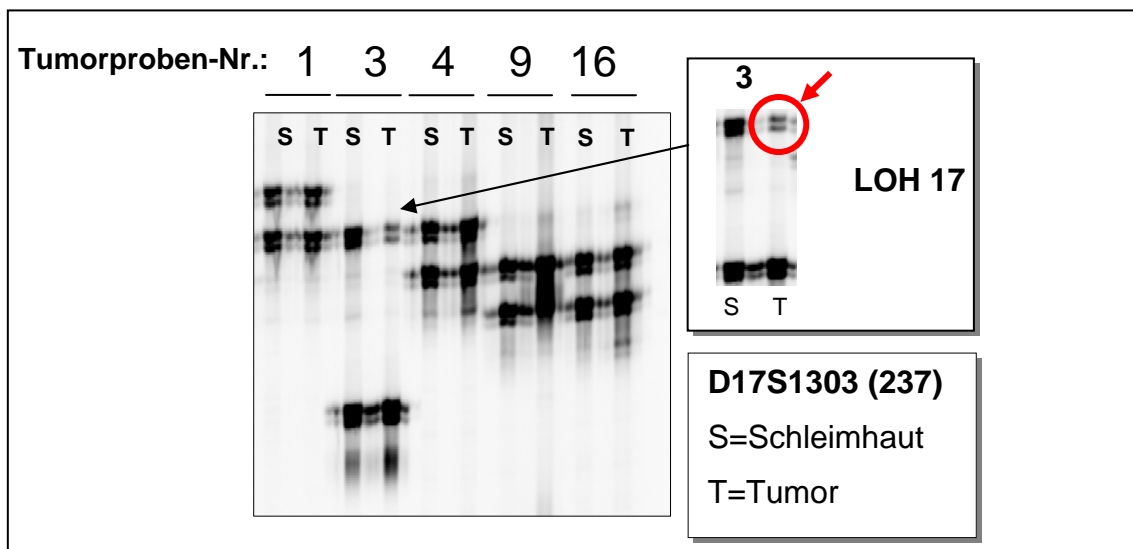


Abb. 4. Beispiel eines LOH (roter Pfeil)

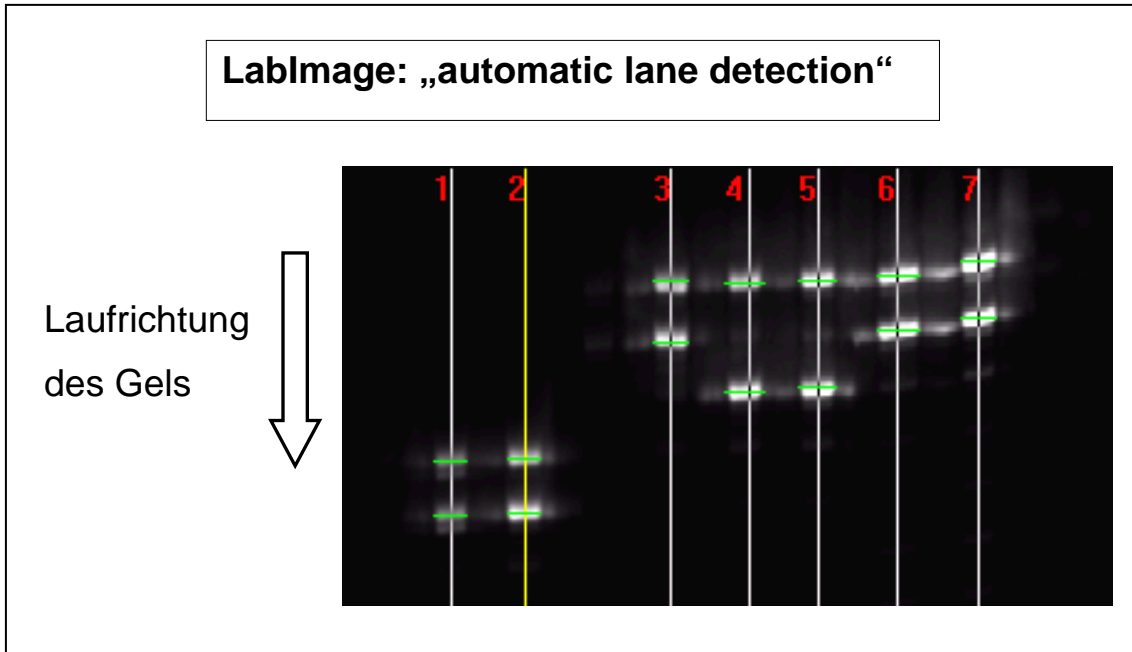


Abb. 5. Bandenanalyse: automatische Identifizierung der Laufbahnen („automatic lane detection“) und der Banden selbst („band detection“)

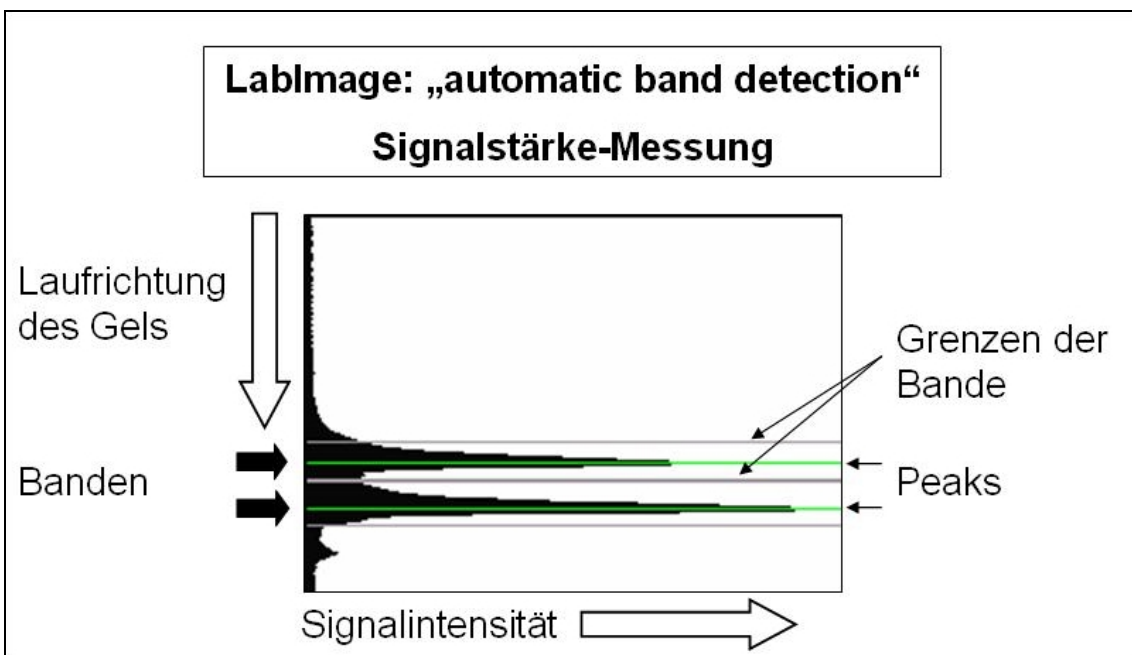


Abb. 6. LabImage: Signalintensitätsmessung und automatische Peak-Erkennung

3. Ergebnisse

3.1. Multiplex-PCR

3.1.1. Gesamtübersicht über die getesteten Primer-Kombinationen

Kombinationen mit 2 Markern		
D8S136 D18S61	NEFL D8S136	NEFL D18S61
NEFL D18S474	D6S136 D18S474	G21S9511 D8S136
NEFL D18S851	G21S9511 D18S851	G21S9511 D18S851
D8S136 D18S851	G21S9511 D18S61	G21S9511 D18S474
G21S9511 NEFL		
Kombinationen mit 3 Markern		
D3S100 NEFL D18S61	G21S9511 D8S136 D18S61	D3S100 D8S136 D18S61
G21S9511 NEFL D18S61	D3S100 NEFL D18S61	D3S100 NEFL D18S474
G21S9511 NEFL D18S474	G21S9511 D8S136 D18S474	D3S100 D8S136 D18S474
NEFL D18S474 D18S61	D3S647 NEFL D18S61	HYTM1 NEFL D18S61

Kombinationen mit 4 Markern		
HYTM1	HYTM1	D3S100
D3S100	G21S9511	NEFL
D8S136	D8S136	D18S474
D18S474	D18S474	D18S61
HYTM1	G21S9511	
G21S9511	NEFL	
D8S136	D8S136	
D18S851	D18S851	
Kombination mit 5 Markern		
	G21S9511	
	D8S136	
	D18S474	
	D18S61	
	D18S851	
Kombination mit 6 Markern		
	HYTM1	
	G21S9511	
	NEFL	
	D8S136	
	D18S474	
	D18S851	

Tab. 9. Übersicht getesteter Mikrosatellitenmarker-Kombinationen

Primer	Fragmentlänge	Primer Sequenz
HYTM1	170	TGGCGAGACTCCATCAAAG CCTTTTAAGCTGCAACAATTTC
D1S228	117-129	AACTGCAACATTGAAATGGC GGGACCATAGTTCTTGGTGA
G21S9511	197	TGTGAATTATATGAAGAGAT TATGTAATATGTCTGTGGTG
D3S100	202-224	GTCTGGTGGCCTGTGAACTATAG GGACTGCTTGCTGTTGAGTG
D3S1312	215-225	TGGGTTCTGCCTCCAA GGCTCCCCAGGGTAAG
D3S647	102	TGTGTATTCCTTCTGATATTGGACA TTGCATGTAGAATTCAGTCCAAGG
D4S2397	134	CATGCACACCAAAAACAAGAA GCAACAAACCTGCACATTCT
D8S136	71-89	GCCCAAAGAGGAGAATAAAA CTGTTTCCACACCGAAGC
D8S1771	226	TTTACAAGAACCACCTGCC GATATAAAACATGACTTTGCTACCC
NEFL	137-147	GCAGTAGTGCCGCAGTTTCA TGCAATTCATCTTCCTTTCT
D17S1303	237	CTCTCCAAGGCTCACTCAA TGGTCTTTTTCCATTCCAAA
D18S474	124	TGGGGTGTTTACCAGCATC TGGCTTTC AATGTCAGAAGG
D18S61	157-183	ATTTCTAAGAGGACTCCCAA ATATTTTGAAACTCAGGAGCAT
D18S58	144-160	GCTCCCGGCTGGTTTT GCAGGAAATCGCAGGAACTT
D18S851	254	CTGTCCTCTAGGCTCATTTAGC TTATGAAGCAGTGATGCCAA

Tab. 10. Fragmentlänge und Sequenz der verwendeten Primer

3.1.2. Primer Einzelaustestung

Alle Primer werden vor dem Einsatz bei Multiplex-PCR Reaktionen in Einzelreaktionen auf ihre Funktionstüchtigkeit hin getestet. Voraussetzung für die Kombinationsfähigkeit verschiedener Primer in einer gemeinsamen PCR sind die identischen PCR-Bedingungen, vor allem hinsichtlich der verschiedenen Temperaturen und Zeiten der einzelnen Reaktionsschritte sowie der eingesetzten Mengen der Primer, Enzyme und DNA-Matrizen. Als DNA-Vorlage dient Kontroll-DNA der humanen Kolonkarzinom-Zelllinien SW480 und SW620. Teilweise werden die Primer gleichzeitig mit Schleimhaut-und/oder Tumor-DNA aus der Gewebekbank getestet. Die Primer werden als funktionstüchtig angesehen, wenn sie in der Gelelektrophorese-Untersuchung regelmäßige und klar abgrenzbare Banden erzeugen. Bis auf wenige Ausnahmen waren die meisten Primer im Einzeltest positiv, keine Ergebnisse dagegen lieferten die Primer D3S1300 und D8S1771.

Positiv		
D1S228	G21S9511	D17S1303
HYTM1	D4S2397	D18S474
D3S100	D6S136	D18S58
D3S1312	D8S136	D18S61
D3S647	NEFL	D18S851
Negativ		
D3S1300	D8S1771	

Tab. 11. Primer-Einzeltestung

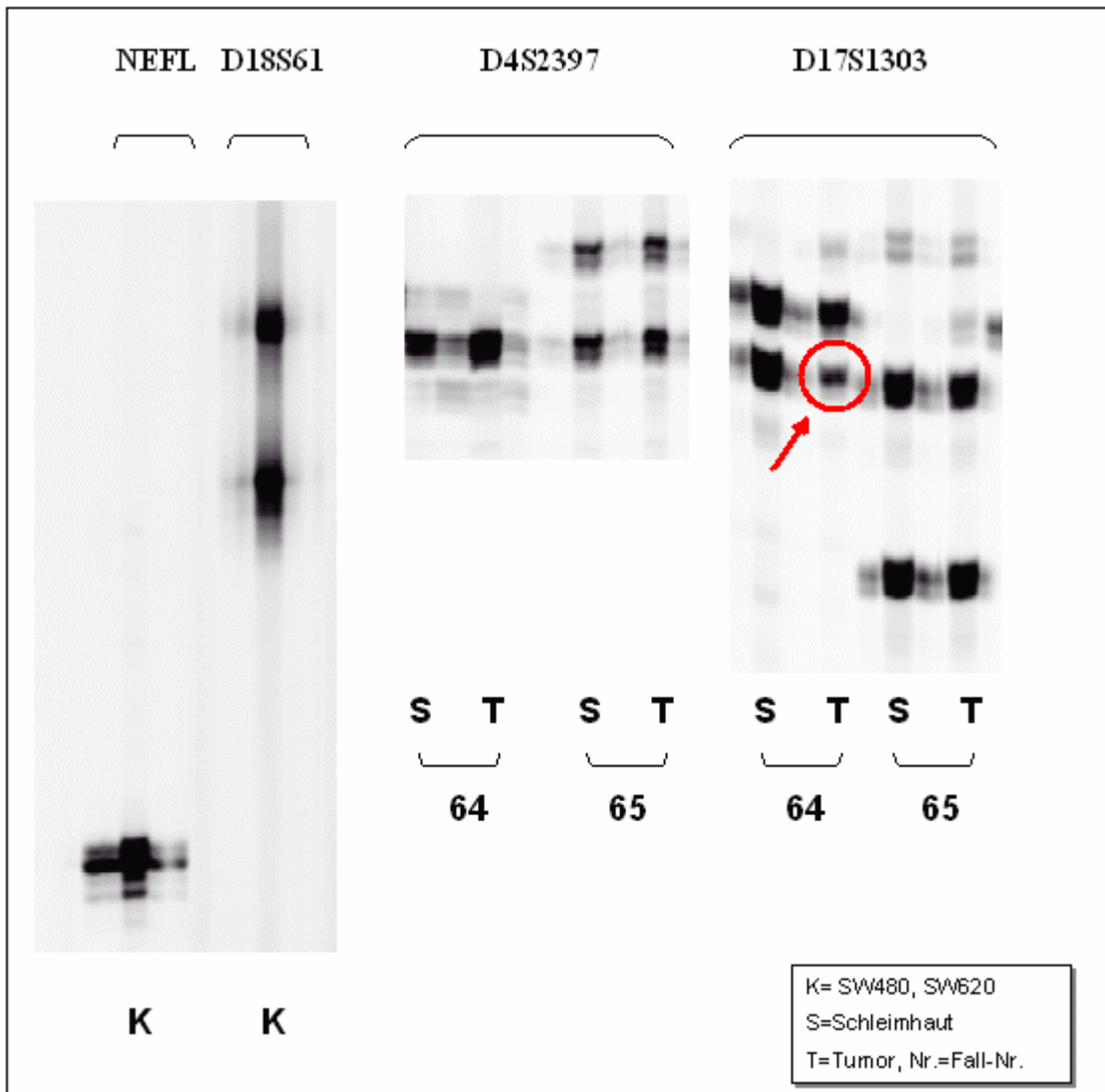


Abb. 7. Beispiel: Mono-PCRs, LOH auf Chromosom 17

3.1.3. Duplex-PCR

Um eine Duplex-PCR zu etablieren werden jeweils zwei Primer so gewählt, dass die replizierten DNA-Fragmente eine ausreichende Längendifferenz zueinander aufweisen (siehe Tabelle 4). Somit wird gewährleistet, dass keine Interferenzen bei der Sequenzierung entstehen, die Banden voneinander klar abgrenzbar sind und den verschiedenen Primern zugeordnet werden können.

Die erforderliche Längendifferenz beträgt dabei mindestens 30bp.

pos. Kombinationen			
D18S61	NEFL	D18S61	NEFL
D8S136	D8S136	NEFL	D18S474
neg. Kombinationen			
D18S474	G21S9511	D18S851	G21S9511
D6S136	D8S136	D8S136	D18S61
D18S851	G21S9511	D18S851	G21S9511
NEFL	D18S474	G21S9511	NEFL

Tab. 12. getestete Duplex-PCR Kombinationen

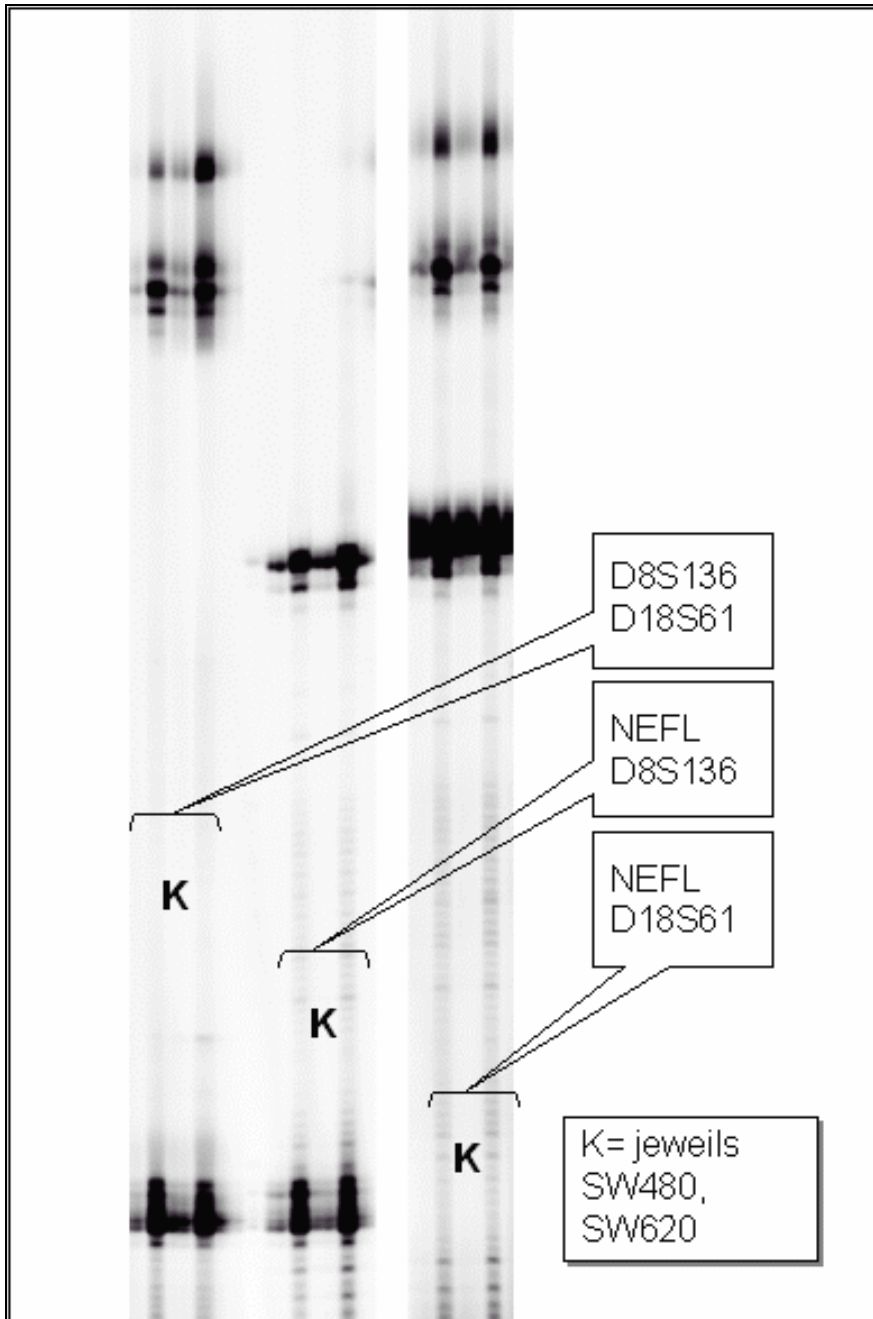


Abb. 8. Beispiel: Duplex-PCRs

3.1.4. Triplex-PCR

Bei der Suche nach Dreifach-Kombinationen geht man analog zur Etablierung der Duplex-PCRs vor. Erfolgreich getestete Duplex-PCR Kombinationen werden mit einem dritten Primer kombiniert. Obwohl eine Vielzahl an möglichen Primer-Kombinationen getestet wurde, sowie auch Modifikationen der PCR-Zyklen durchgeführt wurden (z.B.

Veränderung der Annealing-Temperatur), konnten nur zwei mögliche Kombinationen für eine Triplex PCR gefunden werden. Hauptkomplika­tionen bei der Etablierung von Triplex-Reaktionen waren die Schmierbandenentstehung sowie Bandenverluste einzelner Marker.

Als erste Kombinations-Möglichkeit (Multiplex I) wurde die Primer- Kombination D17S1303, HYTM-1 und D4S2397 etabliert. Mit dieser wurde ein Großteil der Reihenuntersuchungen durchgeführt. Als weitere mögliche Triplex-Reaktion wurde die Kombination D3S100, NEFL und D18S61 gefunden (Multiplex II).

Positive Triplex-PCR Kombinationen		
HYTM-1	D3S100	
D4S2397	D18S61	
D17S1303	NEFL	
Negative Triplex-PCR Kombinationen		
G21S9511	D3S100	G21S9511
D8S136	NEFL	D8S136
D18S61	D18S61	D18S474
D3S647	D3S100	D3S100
NEFL	D8S136	NEFL
D18S61	D18S61	D18S474
D3S100	HYTM1	G21S9511
D8S136	NEFL	NEFL
D18S474	D18S61	D18S61
G21S9511	NEFL	
NEFL	D18S474	
D18S474	D18S61	

Tab. 13. getestete Triplex-PCR Kombinationen

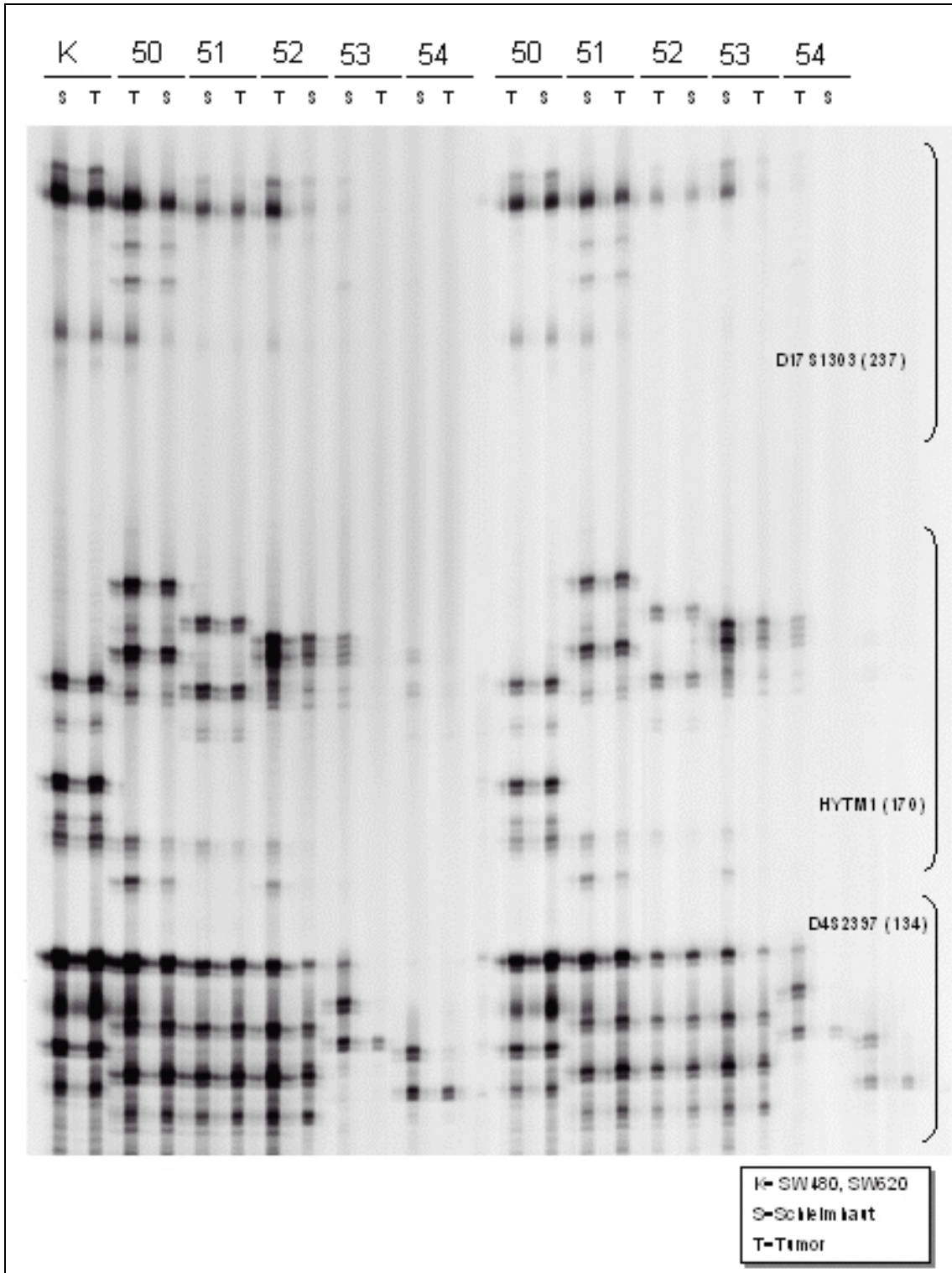


Abb. 9. Beispiel: Multiplex I

3.1.5. Quadruplex-, Quintuplex-, und Sexaplex-PCR

Versuche, vierfach-, fünffach- und sechsfach-Kombinationen zu etablieren, blieben aufgrund der hohen Schmierbanden-Bildung sowie wegen einer hohen Ausfallsquote von ganzen Primerregionen meist relativ erfolglos. Bei diesen Multiplex-Reaktionen ist die Ausfallswahrscheinlichkeit eines oder mehrerer Marker so hoch, dass die Vorteile der Multiplex-Reaktion, vor allem die der Zeit- und Materialersparnis, dadurch zunichte gemacht werden. Als einzige erfolgreiche Quadruplex-PCRs ließen sich die Kombinationen D1S228, HYTM1, D4S2397, D17S1303 und D3S647, HYTM1, D4S2397, D17S1303 finden. Da die maximale Anzahl an regelmäßig auswertbaren Mikrosatellitenmarkern pro Reaktion und Gel sich aber auf maximal 3 Primer beschränkt, wurde der Einsatz von Multiplex-Reaktionen mit mehr als 3 Primern verworfen.

Positiv getestete Quadruplex-PCR Kombinationen		
D1S228		D3S647
HYTM1		HYTM1
D4S2397		D4S2397
D17S1303		D17S1303
Negativ getestete Quadruplex-PCR Kombinationen		
HYTM1	HYTM1	HYTM1
D3S100	G21S9511	G21S9511
D8S136	D8S136	D8S136
D18S474	D18S851	D18S474
G21S9511	D3S100	HYTM-1
D8S136	NEFL	D1S228
NEFL	D18S474	D4S2397
D18S851	D18S61	D17S1303
	HYTM-1	
	D3S647	
	D4S2397	
	D17S1303	

Negativ getestete Quintuplex-PCR Kombinationen
G21S9511
D8S136
D18S474
D18S851
D18S61
Negativ getestete Sexaplex-PCR Kombinationen
HYTM1
G21S9511
NEFL
D8S136
D18S474
D18S851

Tab. 14. getestete Quadrupel-, Quintuplex- und Sexaplex- Kombinationen

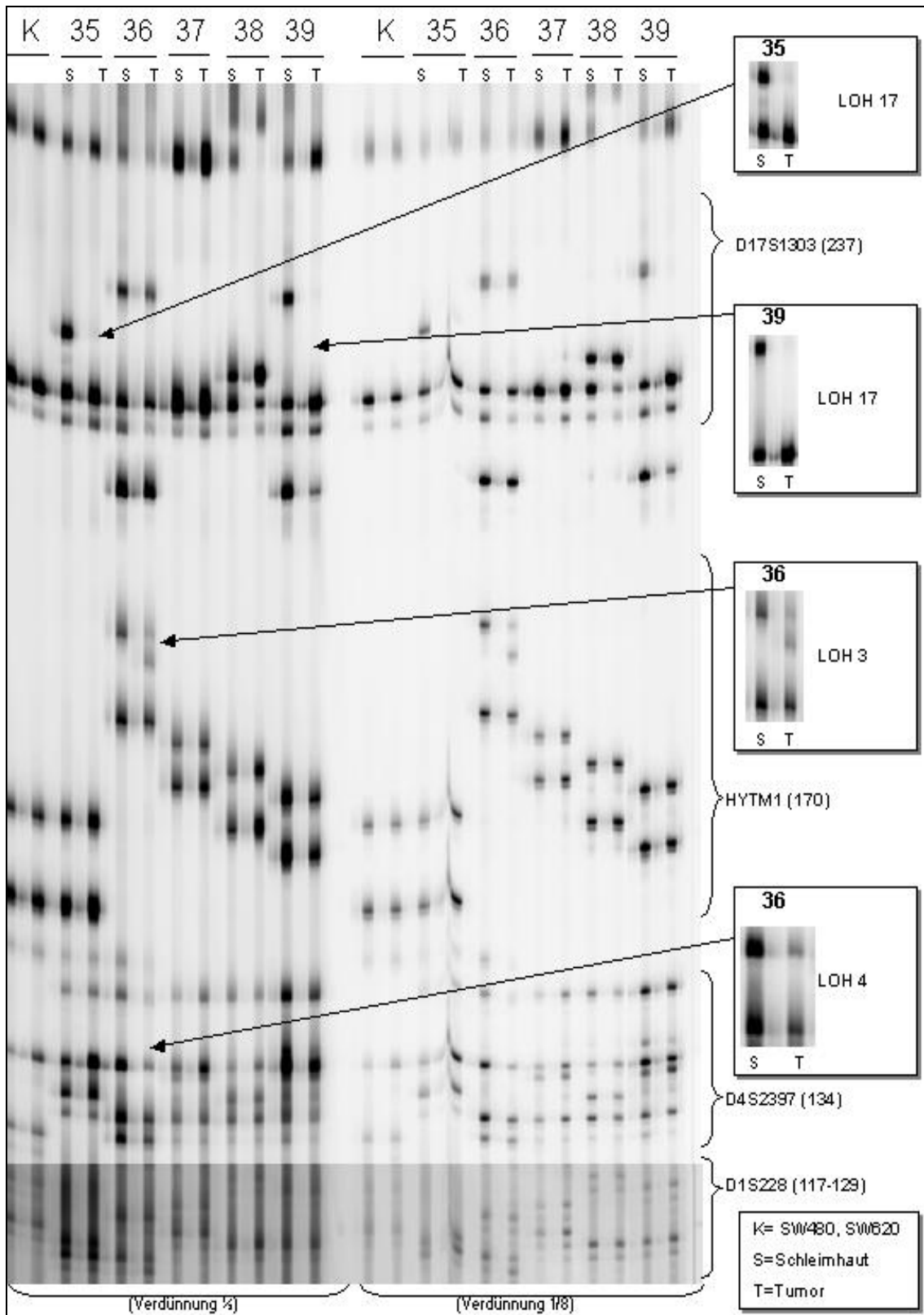


Abb. 10. Beispiel eines Gels (Quadruplex D17S1303, HY-TM1, D4S2397, D1S228)

3.1.6. Multiplex I und II

Die Primer der Multiplex I (D17S1303, D4S2397, HY-TM1) und II (D18S61, NEFL, D3S100) besitzen folgende Sequenzen und Längen:

Marker	Sequenz	Frag- menten -Länge (bp)	Position	Zitierung
HY-TM1	TGGCGAGACTCCATCAAAG CCTTTTAAGCTGCAACAATTTC	170	1p32	Ogunbiyi et al. 1997
D17S1303	CTCTCCAAGGCTCACTCAA TGGTCTTTTTCCATTCCAAA	237	17p12	Bläker et al. 1999
D4S2397	CATGCACACCAAACAAGAA GCAACAAACCTGCACATTCT	134	4p15.2	Arribas et al. 1999
D3S100	GTCTGGTGGCCTGTGAACTATAG GGACTGCTTGCTGTTGAGTG	236	3p24.2	Iniesta et al. 2000
D18S61	ATTTCTAAGAGGACTCCCAA ACTATATTTTGAAACTCAGGAGCAT	157- 183	18q 22.2	Barrett et al. 2002 Lanza et al. 1998
NEFL	GCAGTAGTGCCGCAGTTTCA TGCAATTCATCTTCCTTTCT	137- 147	8p21	Lerebours et al. 1999 Chaffanet et al. 1996 Rogaev et al. 1992

Tab. 15. Primer der Multiplex I und II

3.2. Molekulargenetische Schleimhaut- und Tumoruntersuchung

3.2.1. Voraussetzungen der Untersuchung auf LOH

Tumor- und Schleimhautproben von 48 Patienten wurden jeweils mit den Mikrosatellitenmarkern HY-TM1, D4S2397 und D17S1303 untersucht. Voraussetzung für die Detektion eines LOH ist, dass die Schleimhautprobe heterozygot ist, d.h. dass aufgrund der Differenzen in den Sequenzen und/oder der Länge der Mikrosatelliten beider Allele jeweils eine eigene Bande in der Gelelektrophorese erscheint. Schleimhautproben, die homozygot bezüglich eines Mikrosatelliten-Markers sind und somit nur eine Bande aufweisen, lassen sich daher hinsichtlich eines LOH nicht auswerten.

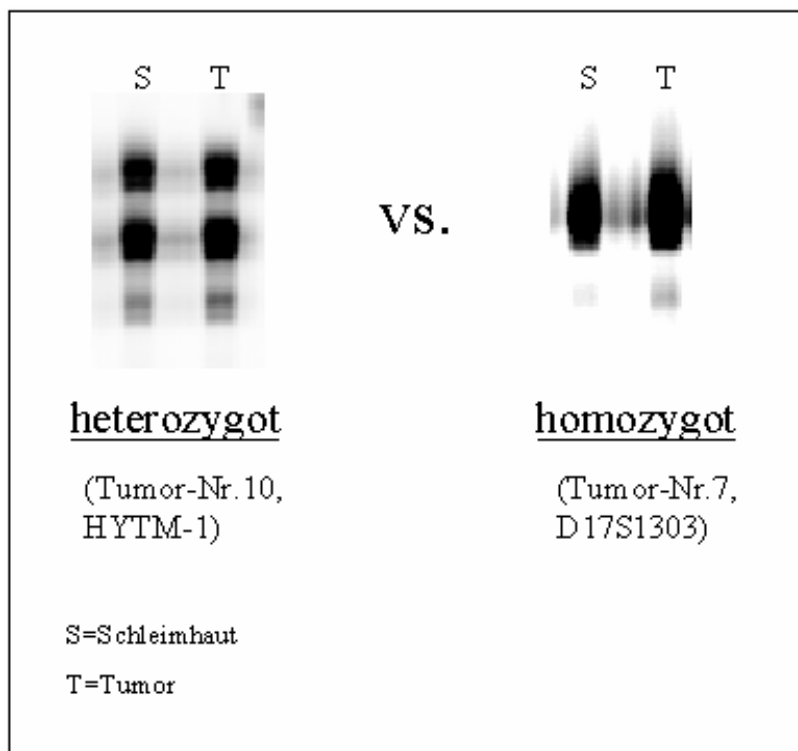


Abb. 11. Vergleich der Bandenerscheinungen von heterozygoten und homozygoten Allelen

3.2.2. Molekulargenetische Untersuchung mittels Mono- und Multiplex PCR

Etwa 60% der untersuchten Fälle wurden zunächst mit Hilfe von Multiplex-PCR Kombinationen untersucht, wobei vorwiegend die Multiplex I- Reaktion (D17S1303, HY-TM1 und D4S2397) angewendet wurde, aber auch die Quadruplex-Reaktionen D17S1303, D4S2397, HY-TM1, D1S228 und D17S1303, D4S2397, HY-TM1, D3S647 zum Einsatz kamen. In die Statistiken und Auswertungen gingen nur die Ergebnisse der Mikrosatellitenmarker D17S1303, HY-TM1 und D4S2397 ein.

Die restlichen Fälle wurden anschließend als Monoplex-Reaktionen untersucht.

3.2.3. Heterozygoten-und LOH-Ergebnisse

Bei der Untersuchung konnte bei 36 (78,3 %) Tumoren mindestens 1 LOH gefunden werden, bei 13 (28,3 %) waren mindestens 2 LOH vorhanden. Es wurden 4 Tumoren mit 3 LOH gefunden (8,7 %).

38 (82,61 %) der 46 untersuchten Schleimhautproben waren heterozygot hinsichtlich des Markers D17S1303, bei 24 Tumoren (63,16 % der Heterozygoten) konnte ein LOH nachgewiesen werden. Für den Marker HY-TM1 konnte eine Heterozygotität bei 40 (86,96 %) Schleimhautproben gefunden werden, davon wiesen 10 Tumoren (25 % der Heterozygoten) einen LOH auf. Hinsichtlich des Markers D4S2397 wurde eine Heterozygotität bei 39 Schleimhautproben (84,78 %) nachgewiesen, LOH wurden bei 19 Tumoren (48,72 % der Heterozygoten) identifiziert.

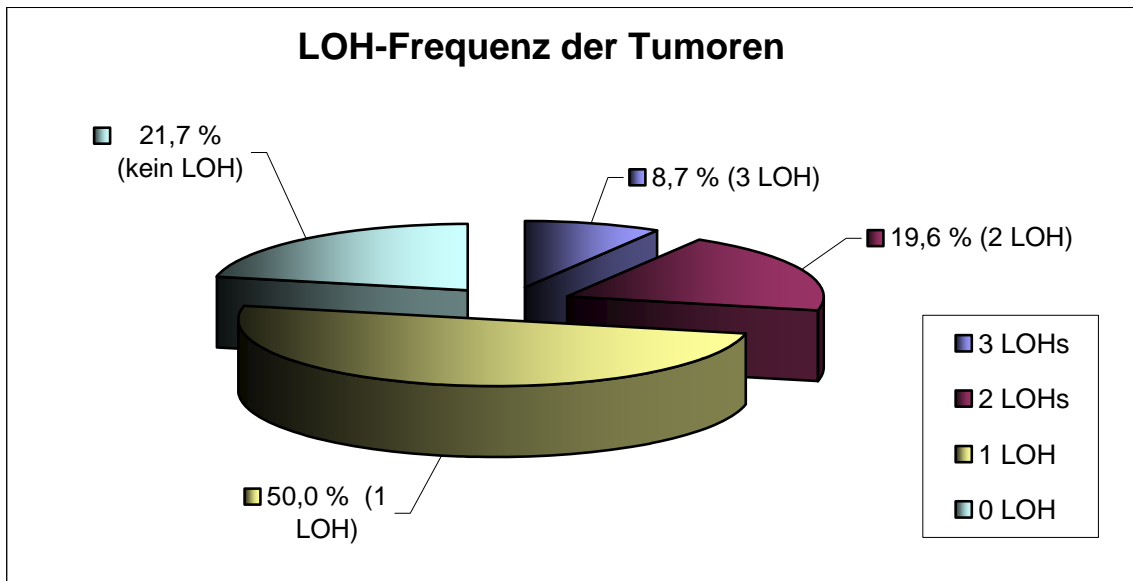


Abb. 12. LOH-Häufigkeit

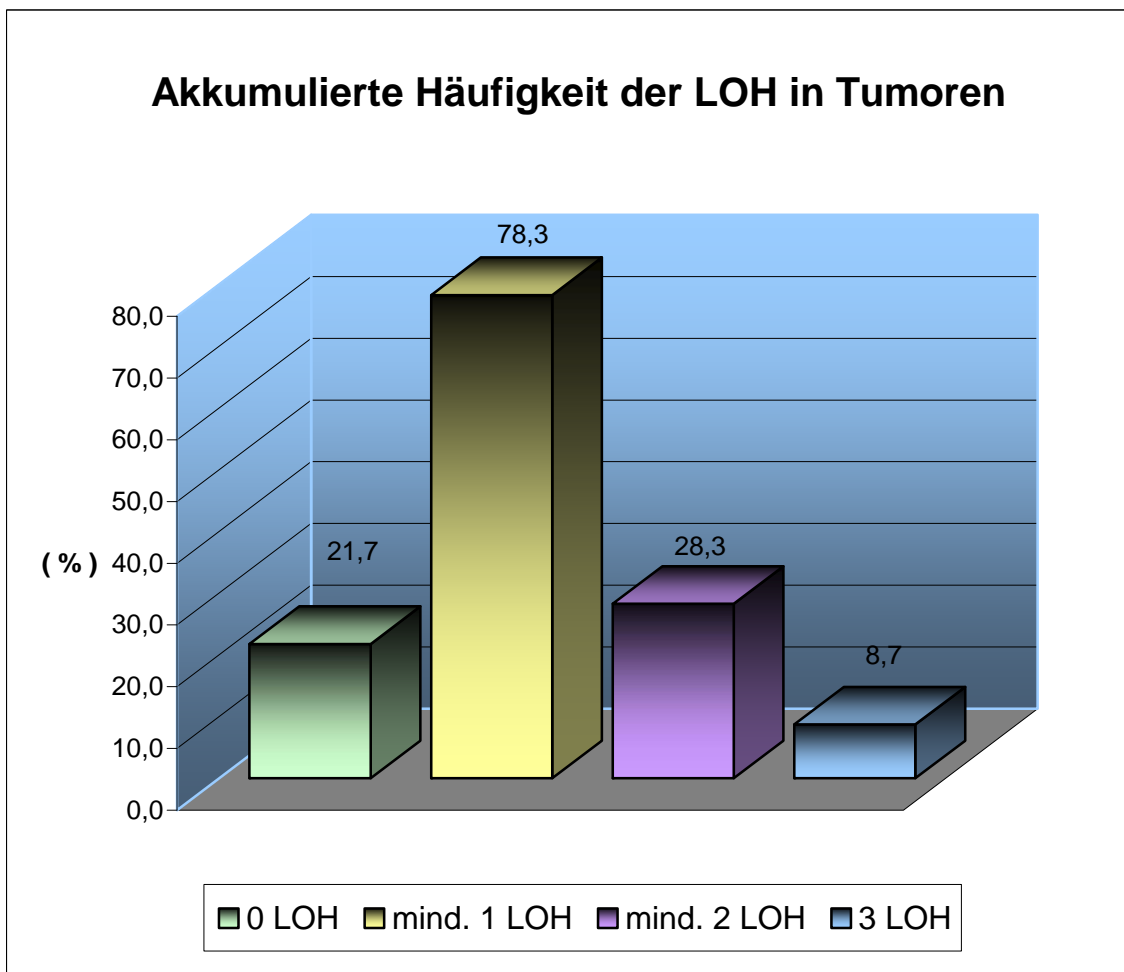


Abb. 13. Akkumulierte Häufigkeit der LOH in Tumoren

LOH-Anzahl	Häufigkeit	(%)
3	4	8,7
2	9	19,6
1	23	50,0
0	10	21,7
≥ 1	36	78,3
≥ 2	13	28,3

Tab. 16. Anzahl der LOH in den einzelnen Tumoren

Mikrosatelliten-Marker	Heterozygoten-Häufigkeit	(%)	LOH-Anzahl	(%)
D17S1303	38	82,61	24	63,16
D4S2397	39	84,78	19	48,72
HY-TM1	40	86,96	10	25,00

Tab. 17. Tabelle der Häufigkeiten der Heterozygotität und Anzahl der LOH für die Mikrosatelliten-Marker D17S1303, D4S2397 und HY-TM1

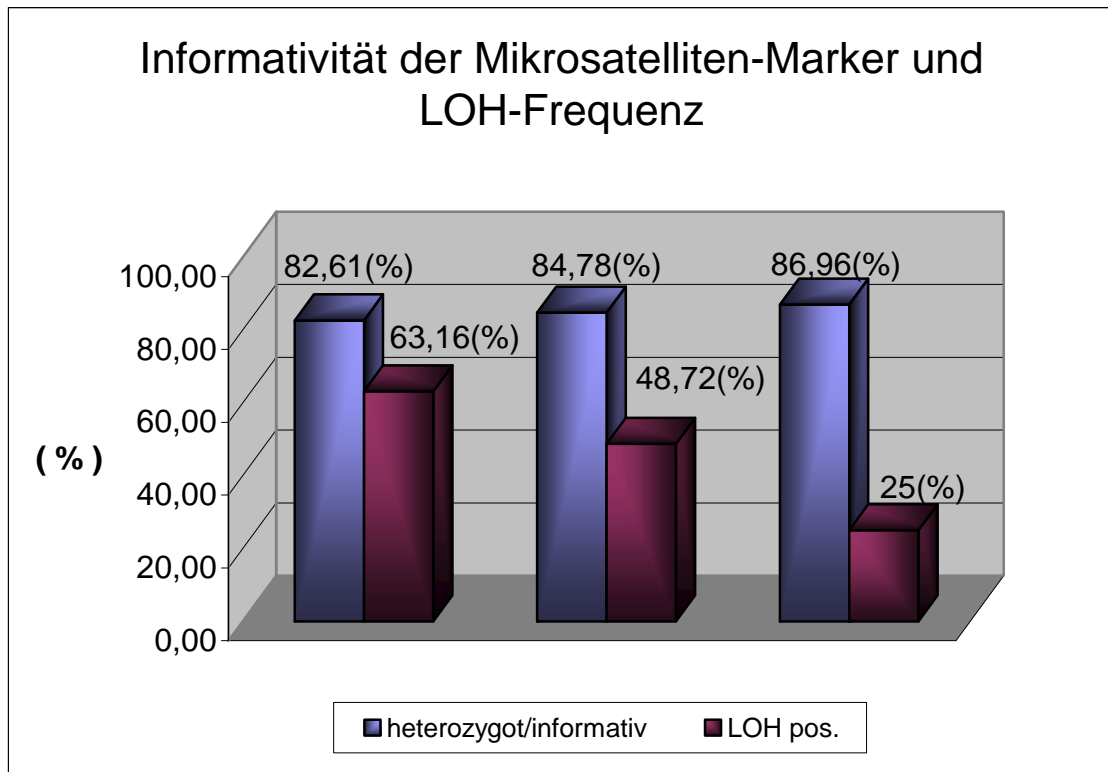


Abb. 14. Informativität bzw. Heterozygoten-Häufigkeit; LOH-Frequenz der Mikrosatelliten-Marker D17S1303, D4S2397 und HY-TM1

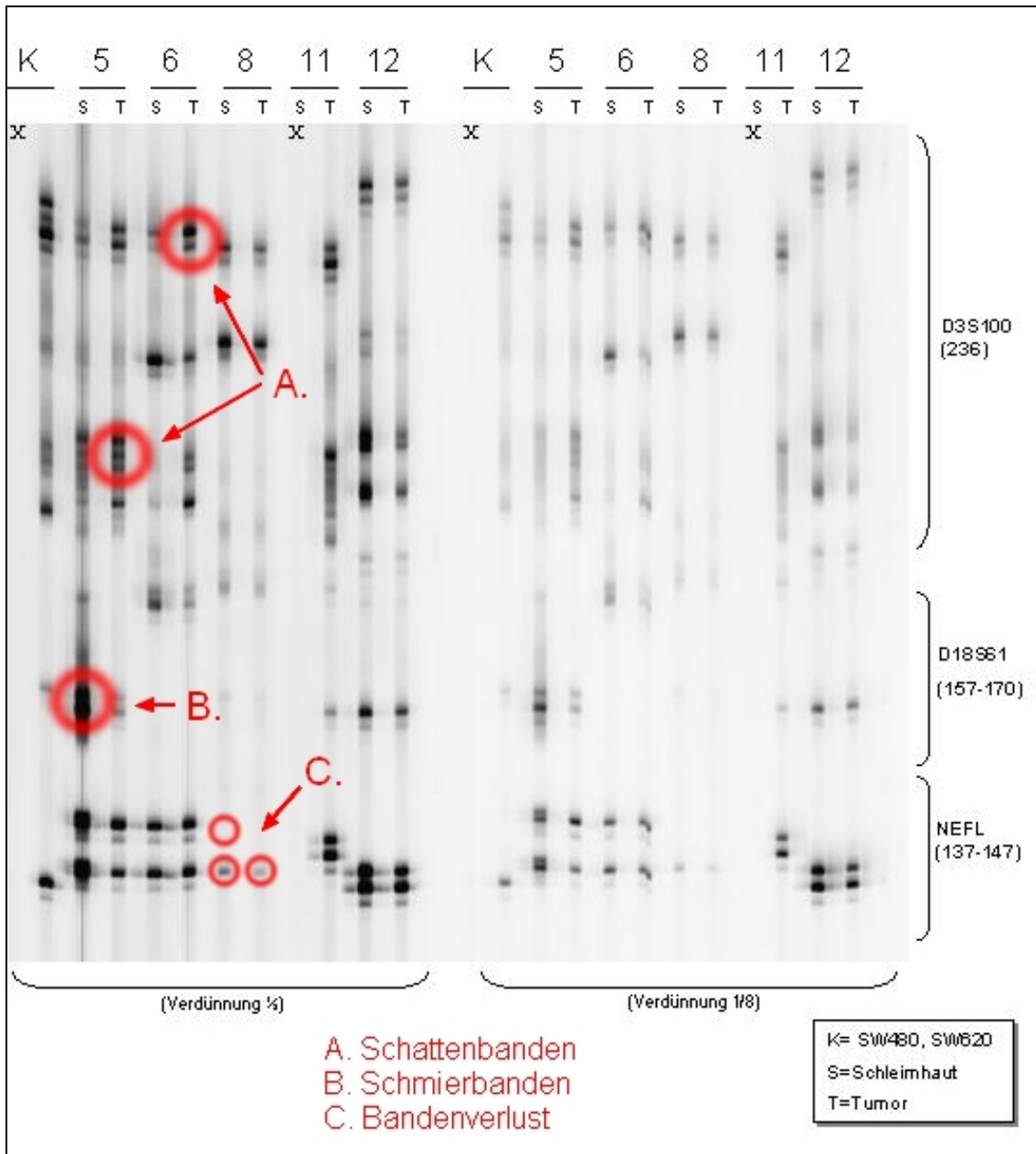


Abb. 15. Gel einer Elektrophorese mit der Multiplex-II-Reaktion;
 Aus der graphischen Darstellung des Gels werden die Komplikationen
 von Multiplex-Reaktionen ersichtlich: Schattenbandenbildung,
 Schmierbandenbildung und Bandenverlust

3.3. UICC-Stadien der analysierten Tumoren

Die analysierten Tumoren verteilen sich im Rahmen des Staging folgendermaßen auf die verschiedenen Stadien entsprechend dem UICC-System:

Stadium	Häufigkeit	(%)
UICC 4	9	19,57
UICC 3	13	28,26
UICC 2	15	32,61
UICC 1	9	19,57

Tab. 18. Verteilung der untersuchten Tumoren auf die UICC-Stadien

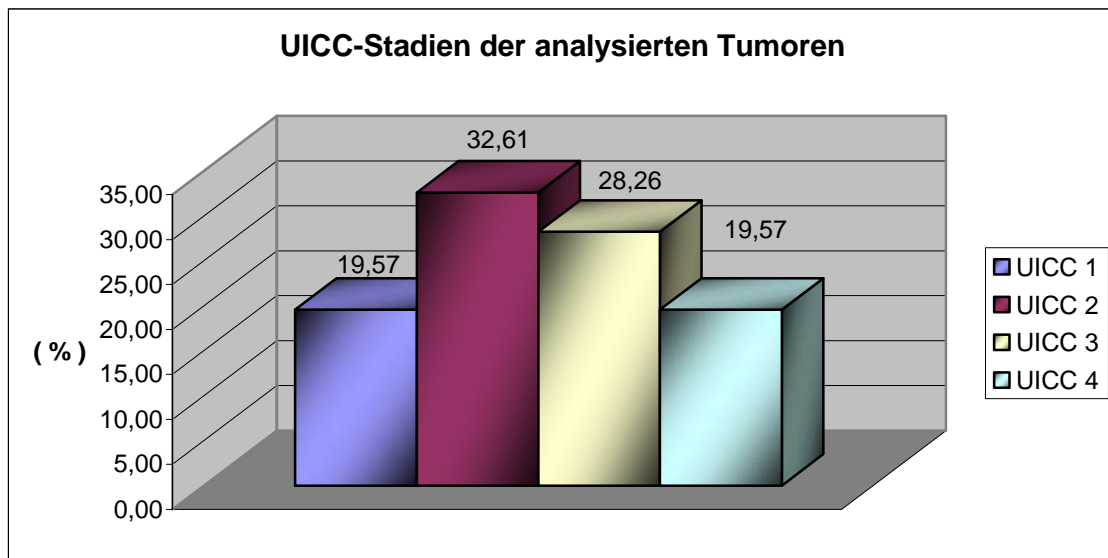


Abb. 16. Stadienverteilung der Tumoren

3.4. Beobachtungszeiträume, Überlebenszeiten und LOH-Häufigkeiten

Bei den 46 untersuchten Fällen konnte der klinische Verlauf bis zu einem maximalen Beobachtungszeitraum von 69 Monaten beobachtet werden. Die durchschnittliche

Beobachtungszeit betrug 39,6 Monate. Dabei wiesen die letalen Fälle eine durchschnittliche Überlebenszeit von 20,2 Monate, und die der zensierten Fälle 50 Monate auf. Der Median des Beobachtungszeitraums aller Fälle betrug 45,82 Monate, bezüglich der letalen Fälle 12,1 Monate und der zensierten Fälle 50,8 Monate.

Von den untersuchten Fällen verstarben 16 Patienten (34,78 %) innerhalb des Beobachtungszeitraums, wobei drei Fälle 3 LOH und ein Fall 2 LOH aufwies. Bei 10 der verstorbenen Patienten konnte 1 LOH identifiziert werden. 10 Patienten wiesen keinen LOH auf, von diesen starben 2 Patienten (20 %). Von den 30 zensierten Fällen wiesen 1 Fall 3 LOH auf, 8 Fälle 2 LOH und 13 Fälle 1 LOH auf. Bei 8 Fällen konnte kein LOH identifiziert werden.

3.5. Korrelation der LOH-Untersuchungsergebnisse mit Patientendaten

Von den 24 Patienten mit einem LOH auf Chromosom 17 (D17S1303) verstarben 8 Patienten (33,33 %). Allerdings erlagen auch 8 der verbliebenen 22 Patienten (36,36 %), die keinen LOH auf dem Marker D17S1303 besaßen, den Folgen des kolorektalen Karzinoms. 9 der 19 Patienten (47,37 %), welche LOH-positiv auf Chromosom 4 (D4S2397) waren, überlebten nicht den Beobachtungszeitraum. Dagegen verstarben nur 7 der 27 Patienten ohne LOH auf Chromosom 4 (25,93 %). Hinsichtlich des Markers HY-TM1 lag die Todesrate bei 4 von 10 LOH-positiven Patienten (40 %), von den 36 LOH-negativen Patienten verstarben nur 12 Patienten (33,33 %).

3.6. Überlebenszeitanalyse mittels der Kaplan-Meier Methode

Dank der Zusammenarbeit mit der Chirurgischen Abteilung der Universitätsklinik und dem interdisziplinären Tumorzentrum der Universität Würzburg konnten die gefundenen genomischen Alterationen zum großen Teil mit dem klinischen Verlauf der Patienten korreliert werden. Für die Überlebenszeitanalysen wurde die Kaplan-Meier Methode verwendet, bei der die Ereignisse (Tod) die Beobachtungsintervalle definieren, ohne dass die Beobachtungsintervalle vordefiniert werden müssen (Ziegler et al. 2002). Stattdessen wird ein neues Zeitintervall dadurch definiert, dass ein Patient verstirbt. Da

nicht von allen Patienten Verlaufsdaten bis zur maximalen Beobachtungszeit vorliegen, werden diese Fälle in den Kaplan-Meier Berechnungen entsprechend als so genannte „zensierte Fälle“ mitberücksichtigt. Bei diesen Fällen („zensierte Beobachtung“) ist der Patient in der Beobachtung verloren gegangen („lost to follow-up“), und am Ende des Beobachtungszeitraums ist das Ereignis (Tod) nicht eingetreten.

3.7. Kaplan-Meier Überlebenskurven

Mit Hilfe des Statistik-Programms GraphPad Prism 4 konnten aufgrund der vorliegenden Daten die unten stehenden Kaplan-Meier Überlebenskurven generiert werden. Dabei wurde das Überleben verschiedener Patientengruppen mit unterschiedlicher LOH-Anzahl oder verschiedenen LOH-Kombinationen untereinander verglichen. Ein Wert von $p \leq 0,05$ wird als ein statistisch signifikanter Unterschied betrachtet.

Folgende Grafiken zeigen die Überlebensprognose in Abhängigkeit von dem Vorliegen eines LOH auf den einzelnen Mikrosatellitenmarkern. Die schwarzen Markierungen auf den Kurven geben den Zeitpunkt des Ausscheidens zensierter Fälle an.

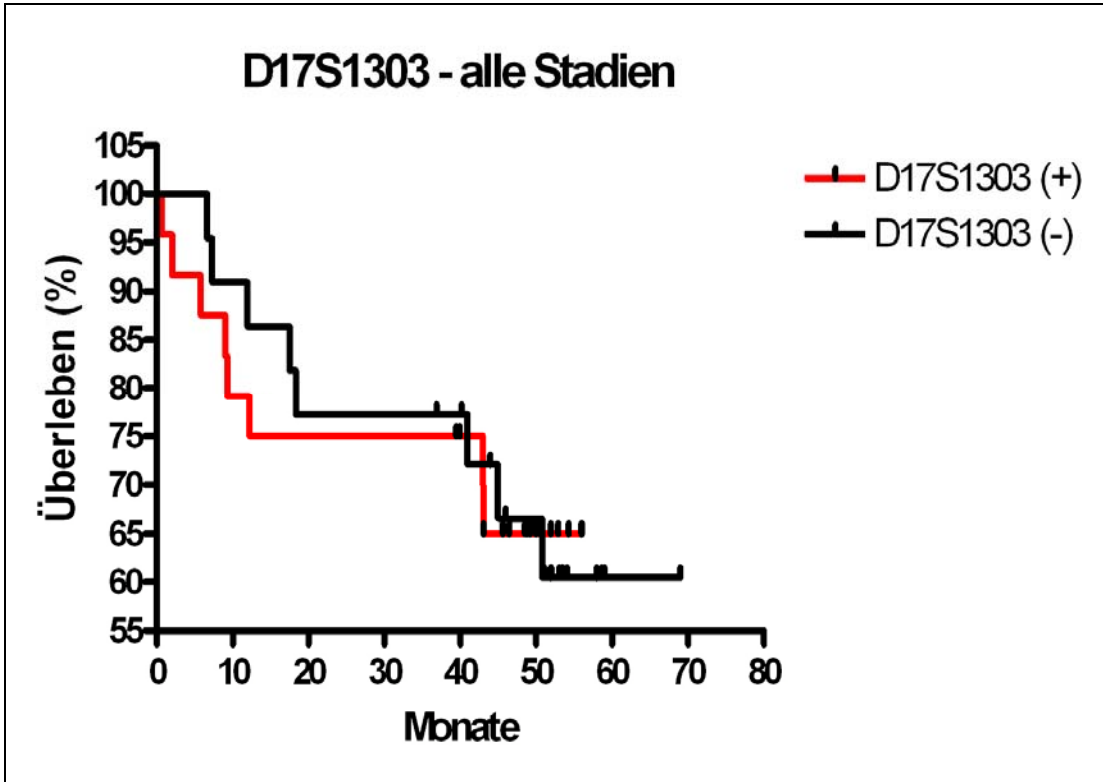


Abb. 17. Prognose D17S1303 pos. vs. neg. ($p=0,92$)

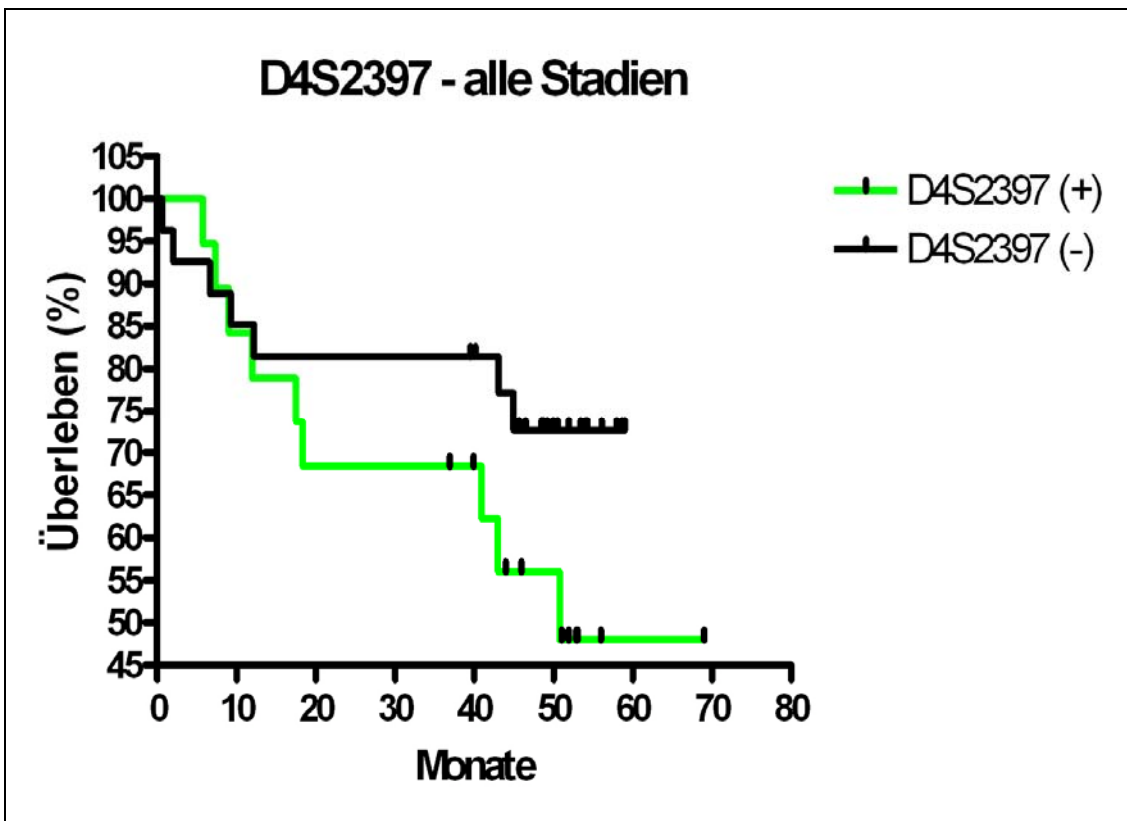


Abb. 18. Prognose D4S2397 pos. vs. neg. ($p=0,16$)

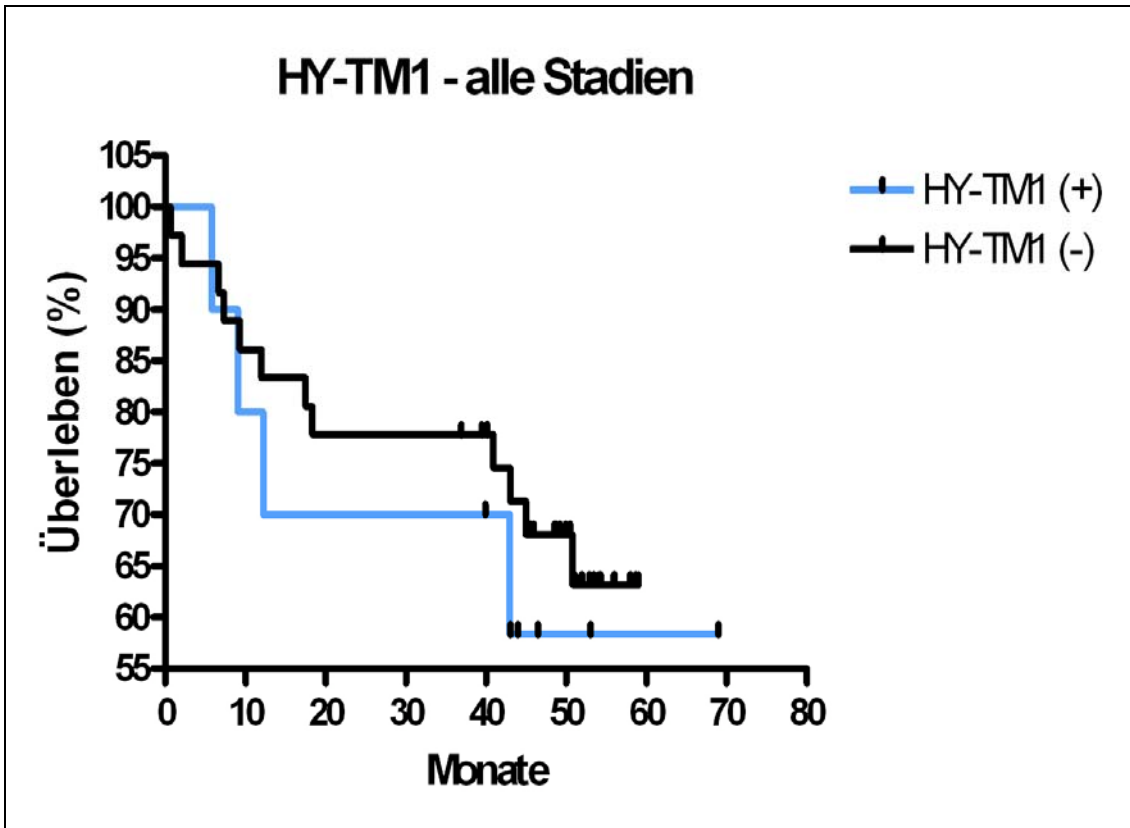


Abb. 19. Prognose HY-TM1 pos. vs. neg. ($p=0,58$)

Die Überlebenszeitkurven für die jeweiligen Gruppen mit vorliegendem LOH zeigen im Vergleich mit den Patientengruppen ohne LOH großenteils erheblich schlechtere Überlebensprognosen. Besonders bei einem LOH auf dem Marker D4S2397 ist die Überlebenswahrscheinlichkeit deutlich reduziert, wobei mit $p=0,16$ der Unterschied zwischen den beiden Gruppen zwar nicht, aber zumindest annähernd signifikant ist (Abb.18). Bei LOH auf den Markern HY-TM1 ($p=0,58$) (Abb.19) und D17S1303 ($p=0,92$) (Abb.17) ist der Unterschied zwischen den verglichenen Gruppen geringer, vor allem bzgl. des Markers D17S1303. Man muss allerdings die geringe Fallzahl beachten, die sicherlich für dieses Ergebnis mitverantwortlich ist.

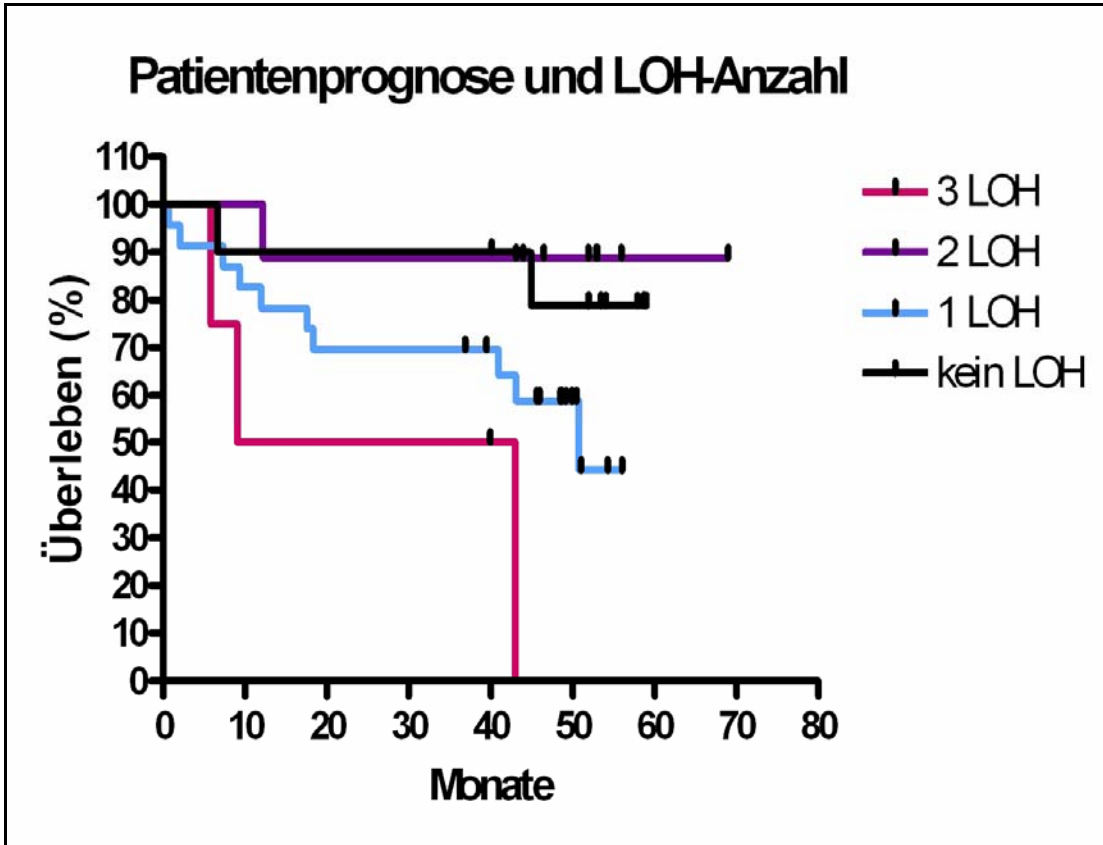


Abb. 20. Überlebenszeiten (Kaplan-Meier Methode) variieren signifikant voneinander in Abhängigkeit von der LOH-Anzahl ($p= 0,0189$)

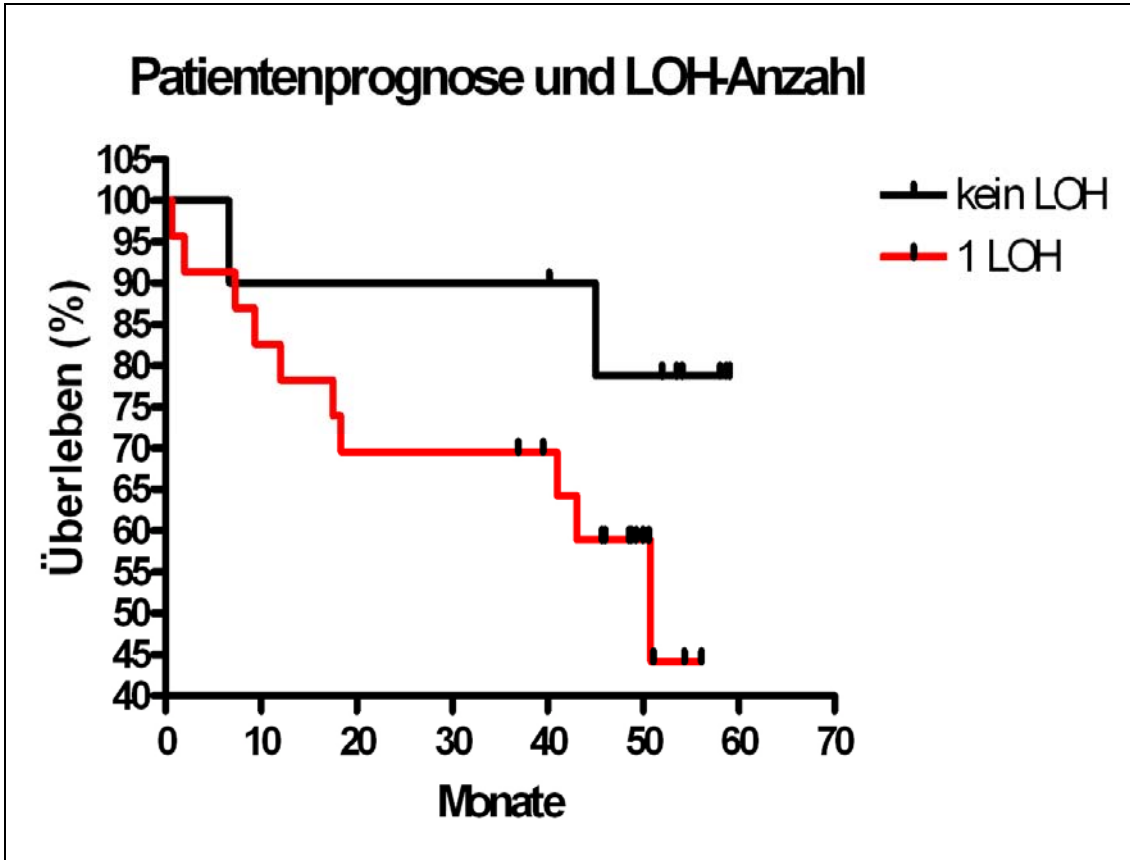


Abb. 21. Prognose 1 LOH vs. kein LOH (p=0,14)

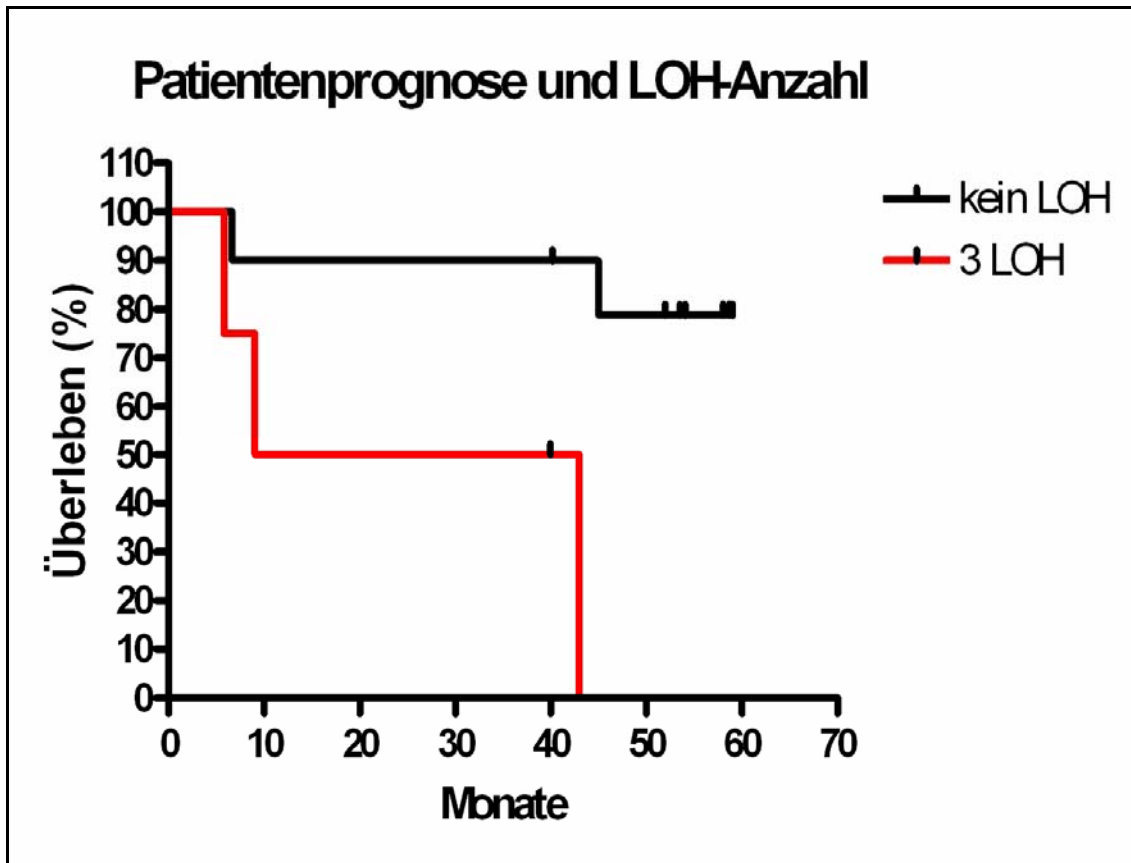


Abb. 22. Prognose 3 LOHs vs. kein LOH ($p=0,0094$)

Abb. 20 zeigt die Überlebenskurven entsprechend der Kaplan-Meier Methode für die jeweiligen Patientengruppen mit verschiedener LOH-Anzahl. Es ist ein deutlicher Trend zur geringeren Überlebenszeit mit Zunahme der LOH-Anzahl zu erkennen, wobei sich die Kurven signifikant unterscheiden ($p \leq 0,0189$). Auch ist die Überlebensprognose erheblich verschlechtert bei Patienten mit einem LOH im Vergleich mit Patienten ohne LOH in den untersuchten Regionen ($p=0,14$). Allerdings ist aus Abb.20 ersichtlich, dass etwa ab dem 45. Monat eine bessere Prognose für Patienten mit 2 vorhandenen LOH als für Patienten ohne LOH besteht. Besonders hier muss auf die geringe Fallzahl verwiesen werden.

Die Korrelation der Überlebensdaten aller Patienten mit exakt einem gefundenen LOH (Abb.21) zeigt einen signifikanten Trend ($p=0,14$), wogegen die Korrelation von 3 LOH mit dem Überleben (Abb.22) signifikant in Zusammenhang steht ($p=0,0094$).

Mit den in dieser Arbeit vorgestellten Screening-Methoden der Mikrosatelliten-Marker wurden weitere Tumoren innerhalb des Gastroenterologischen Labors gescreent, so dass insgesamt von 100 Patienten sowohl die Ergebnisse für die Mikrosatellitenanalyse der Marker D17S1303, D4S2397 und HY-TM1 als auch die klinischen Verlaufsdaten vorliegen. Die folgende Diskussion bezieht sich daher auf diese 100 Fälle, um eine höhere statistische Relevanz zu erreichen.

3.8. Ergebnisse bei erweiterter Fallzahl (n=100)

3.8.1. Heterozygoten-und LOH-Ergebnisse (n=100)

Bei den 100 untersuchten Fällen wurden bei 7 Tumoren 3 LOH gefunden (7%). 19 weitere Tumoren wiesen bei zwei der drei untersuchten Mikrosatellitenmarkern einen LOH auf (19%), und 50 Tumoren einen LOH bei genau einem Marker (50%). Bei 24 Tumoren konnte kein LOH gefunden werden.

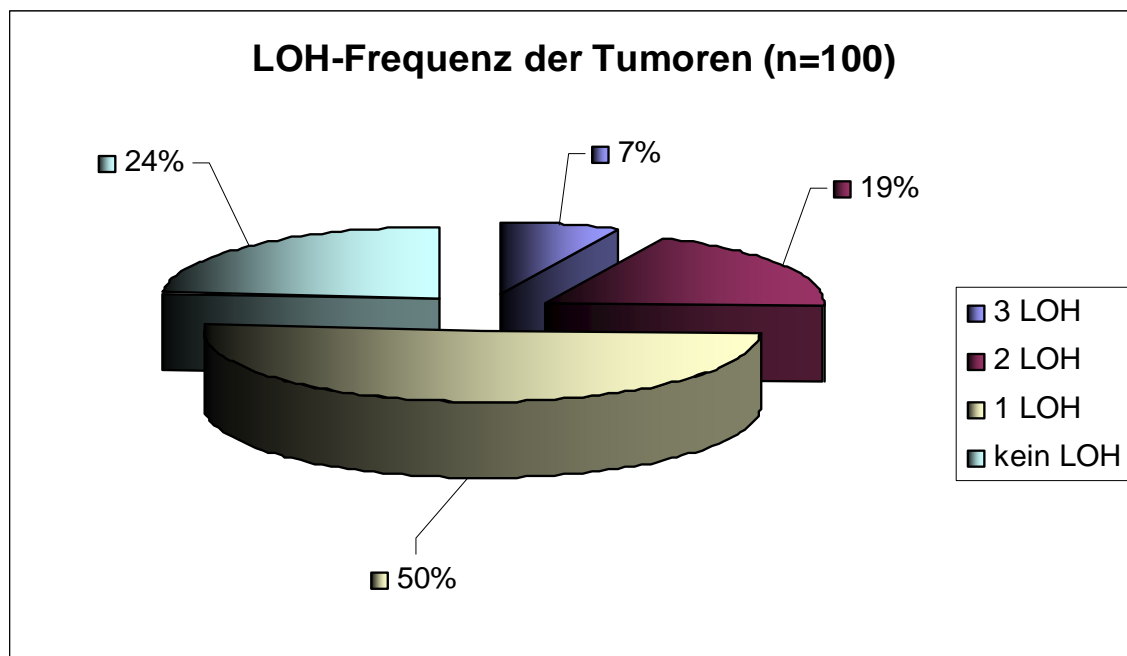


Abb. 23. LOH Häufigkeit (n=100)

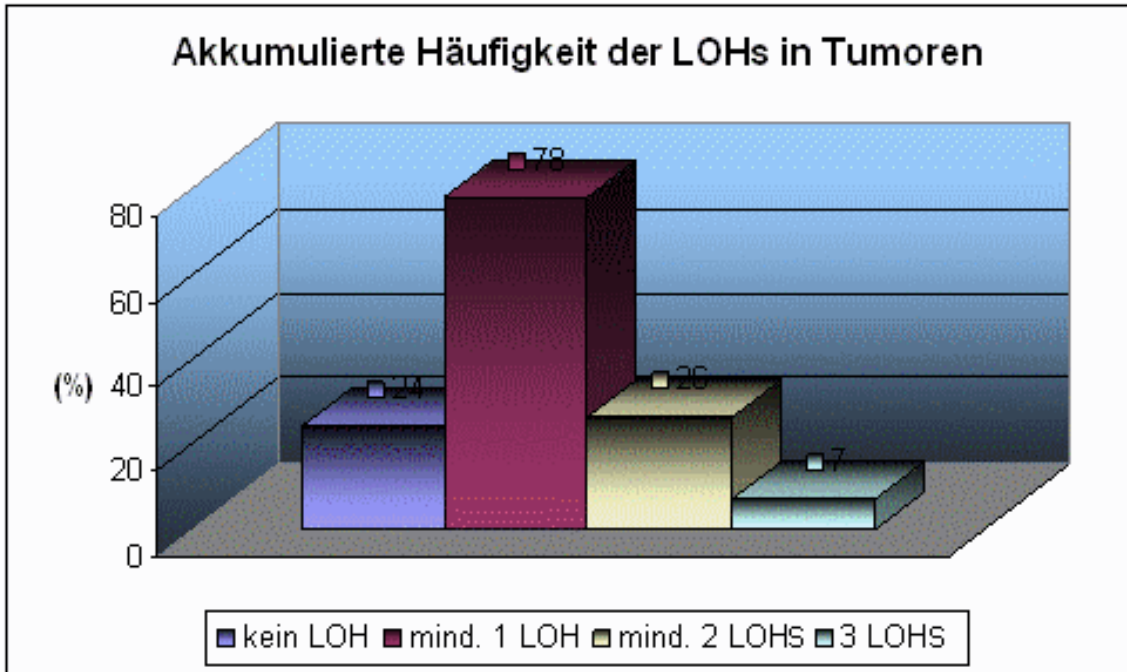


Abb. 24. Akkumulierte Häufigkeit der LOH in Tumoren (n=100)

LOH-Anzahl	Häufigkeit	(%)
3 LOH	7	7
2 LOH	19	19
1 LOH	52	52
kein LOH	24	24
mind. 1 LOH	78	78
mind. 2 LOH	26	26

Tab. 19. Anzahl der LOH in den einzelnen Tumoren (n=100)

79 (79%) der 100 untersuchten Schleimhautproben waren heterozygot und somit informativ bzgl. des Mikrosatellitenmarkers D17S1303, 56 Tumoren (70,9 % der Heterozygoten) waren LOH positiv. Für den Marker D4S2397 konnte eine Heterozygotenhäufigkeit von 83 % (83 Tumoren) gefunden werden, davon wiesen 30 Tumoren (36,1 % der Heterozygoten) einen LOH auf. Bei 85 der Schleimhautproben

wurde eine Heterozygotie für den Marker HY-TM1 gefunden, von denen 25 Tumoren (29,4 % der Heterozygoten) einen LOH aufwiesen.

Mikrosatelliten-Marker	Heterozygoten-Häufigkeit	(%)	LOH-Anzahl	(%)
D17S1303	79	79	56	70,9
D4S2397	83	83	30	36,1
HY-TM1	85	85	25	29,4

Tab. 20. Häufigkeiten der Heterozygotie und LOH-Anzahl für die Mikrosatelliten-Marker D17S1303, D4S2397 und HY-TM1 (n=100)

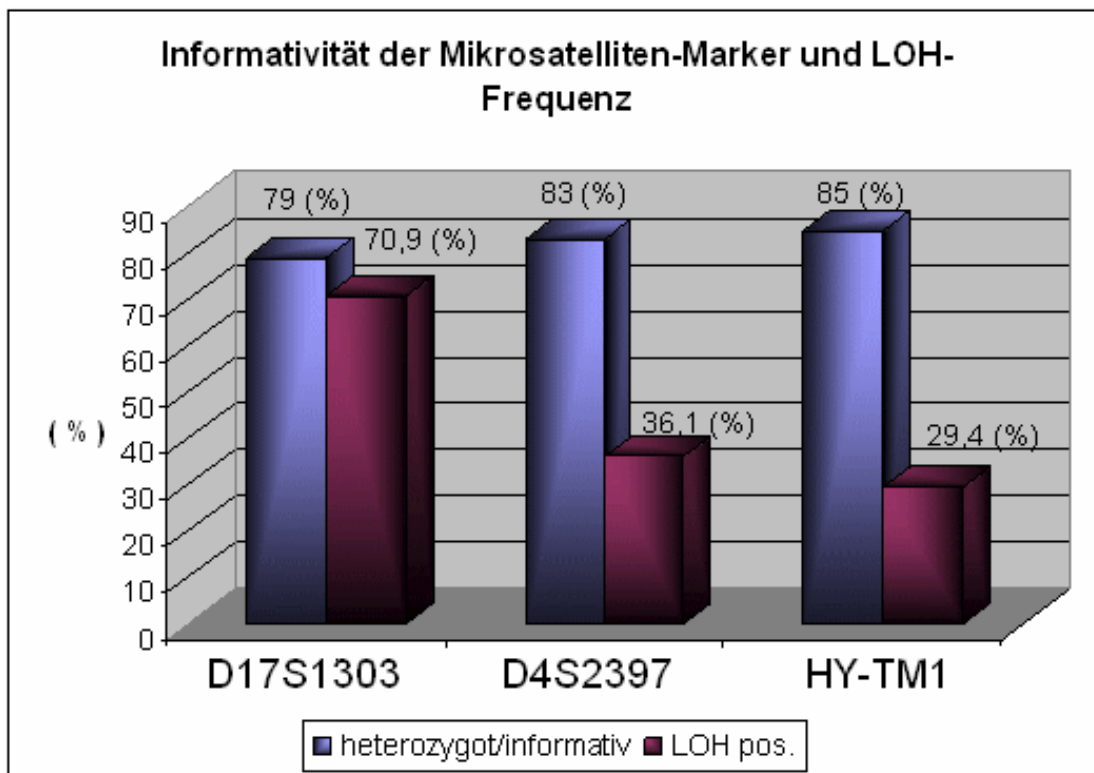


Abb. 25. Informativität bzw. Heterozygoten-Häufigkeit; LOH-Frequenz der Mikrosatelliten-Marker D17S1303, D4S2397 und HY-TM1 (n=100)

3.8.2. UICC-Stadien der analysierten Tumoren (n=100)

Von den 100 untersuchten Tumoren befanden sich 20 Tumoren im UICC 4 Stadium, 28 Tumoren waren im UICC 3 Stadium, 40 im UICC 2 Stadium und 14 im UICC 1 Stadium.

Stadium	Häufigkeit	(%)
UICC 4	20	20
UICC 3	28	28
UICC 2	40	40
UICC 1	14	14

Tab. 21. Verteilung der untersuchten Tumoren auf die UICC-Stadien (n=100)

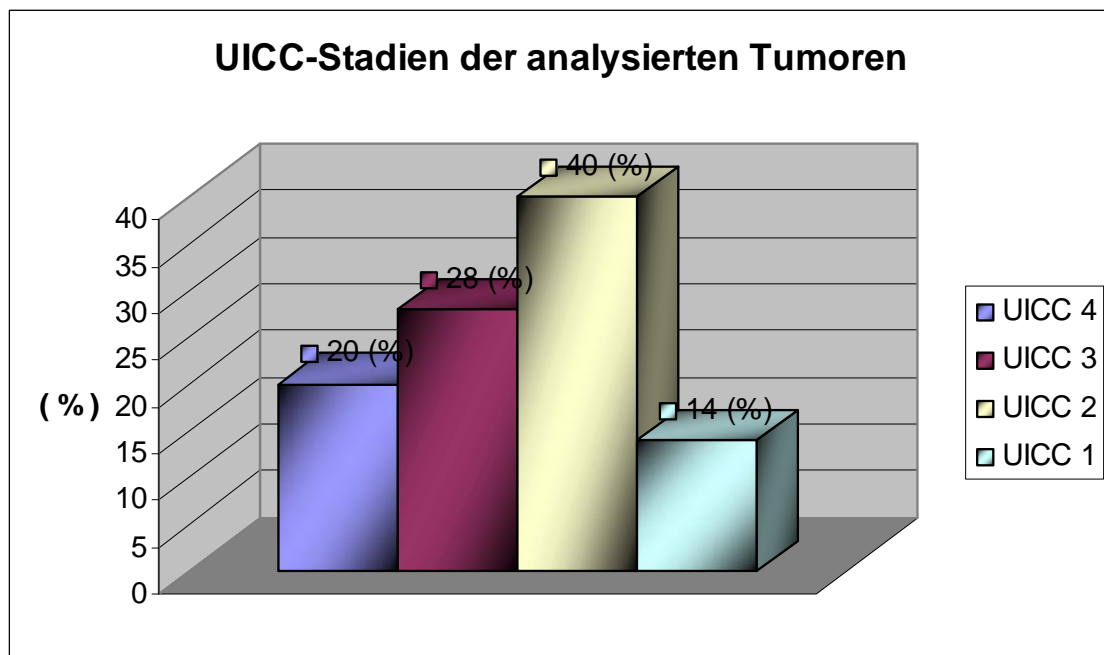


Abb. 26. Stadienverteilung der Tumoren (n=100)

3.8.3. Beobachtungszeiträume, Überlebenszeiten und LOH-Häufigkeiten (n=100)

Die maximale klinische Beobachtungszeit der 100 untersuchten Fälle betrug 89 Monate. Die durchschnittliche Beobachtungszeit lag bei 31,9 Monaten, im Gegensatz zu den 39,6 Monaten der voruntersuchten 50 Fälle. Bei der Untersuchung mit der Fallzahl n=100 wiesen die letalen Fälle eine durchschnittliche Überlebenszeit von 16,9 Monaten auf, welche 3,3 Monate kürzer war als bei dem ersten Kollektiv (n=50). Die zensierten Fälle konnten eine durchschnittliche Überlebenszeit von 40,5 Monaten aufweisen (im Gegensatz zu 50 Monaten bei n=50).

Der Median aller beobachteten Fälle beträgt 34,8 Monate, bzgl. der letalen Fälle 12,2 Monate und 41 Monate für die zensierten Fälle.

Von den untersuchten Fällen verstarben 37 (36,27 %) Patienten im untersuchten Zeitraum. Bei 4 (10,81%) der verstorbenen Patienten konnten 3 LOH gefunden werden, bei 8 (21,62 %) Patienten lagen 2 LOH und bei 17 (45,95 %) Patienten 1 LOH vor. Die verbleibenden 8 (21,62 %) verstorbenen Patienten wiesen keinen LOH in den untersuchten Regionen auf. Im Gegensatz dazu waren unter den 65 (63,73 %) zensierten Patienten nur bei 3 (4,62 %) Patienten 3 LOH zu finden. Bei 11 (16,92 %) Patienten wurden 2 LOH und bei 35 (53,85 %) Patienten 1 LOH identifiziert. 16 (24,62 %) zensierte Patienten waren LOH-negativ bezüglich aller untersuchten Regionen.

	total	(%)	3 LOH	(%)	2 LOH	(%)
Letale Fälle:	37	36,27	4	10,81	8	21,62
zensierte Fälle:	65	63,73	3	4,62	11	16,92

	1 LOH	(%)	kein LOH	(%)
Letale Fälle:	17	45,95	8	21,62
zensierte Fälle:	35	53,85	16	24,62

Tab. 22. LOH-Häufigkeiten

3.8.4. Korrelation der LOH-Untersuchungsergebnisse mit Patientendaten (n=100)

Patienten mit einem LOH auf dem Marker D17S1303 verstarben zu 35,7% (20 Fälle von 56 positiv getesteten). Im Kollektiv der negativ getesteten Patienten verstarben etwa gleich viele Patienten, nämlich 37% (17 von 46 Patienten). Ein LOH auf dem Mikrosatellitenmarker D4S2397 war dagegen häufiger mit einem letalen Ausgang vergesellschaftet, 46,7% der positiv getesteten Patienten verstarben im Gegensatz zu 32% der Patienten ohne LOH. Auch bei dem HY-TM1 Marker konnte eine etwas höhere Letalität gefunden werden. Hierbei verstarben 44% der Patienten mit LOH, wogegen nur 33,8% der LOH-negativen Patienten verstarben.

	D17 pos	(%)	D17neg	(%)
Letal	20	35,71	17	36,96
Zensiert	36	64,29	29	63,04
Gesamt	56		46	

	D4 pos	(%)	D4 neg	(%)
Letal	14	46,67	23	31,94
Zensiert	16	53,33	49	68,06
Gesamt	30		72	

	Hytm1 pos	(%)	Hytm1 neg	(%)
letal	11	44,00	26	33,77
Zensiert	14	56,00	51	66,23
Gesamt	25		77	

Tab. 23. Letalität in Abhängigkeit von LOH

3.8.5. Kaplan-Meier Überlebenszeitanalyse (n=100)

Die Ergebnisse der LOH-Untersuchung wurden mit den Patientenverläufen korreliert. Hierbei konnte teilweise eine deutlich verschlechterte Prognose für Patienten mit einzelnen oder mehrfachen LOH gefunden werden. So wies vor allem ein vorliegender LOH auf dem Marker D4S2397 (Abb.26) auf eine reduzierte Lebenserwartung hin ($p=0,2$). Eine ähnlich schlechte Prognose wurde bei einem LOH auf dem HY-TM1 Marker (Abb. 27) beobachtet ($p=0,25$), lediglich ein LOH auf D17S1303 (Abb. 25) wies keine deutliche Einschränkung der Lebenserwartung auf ($p=0,77$).

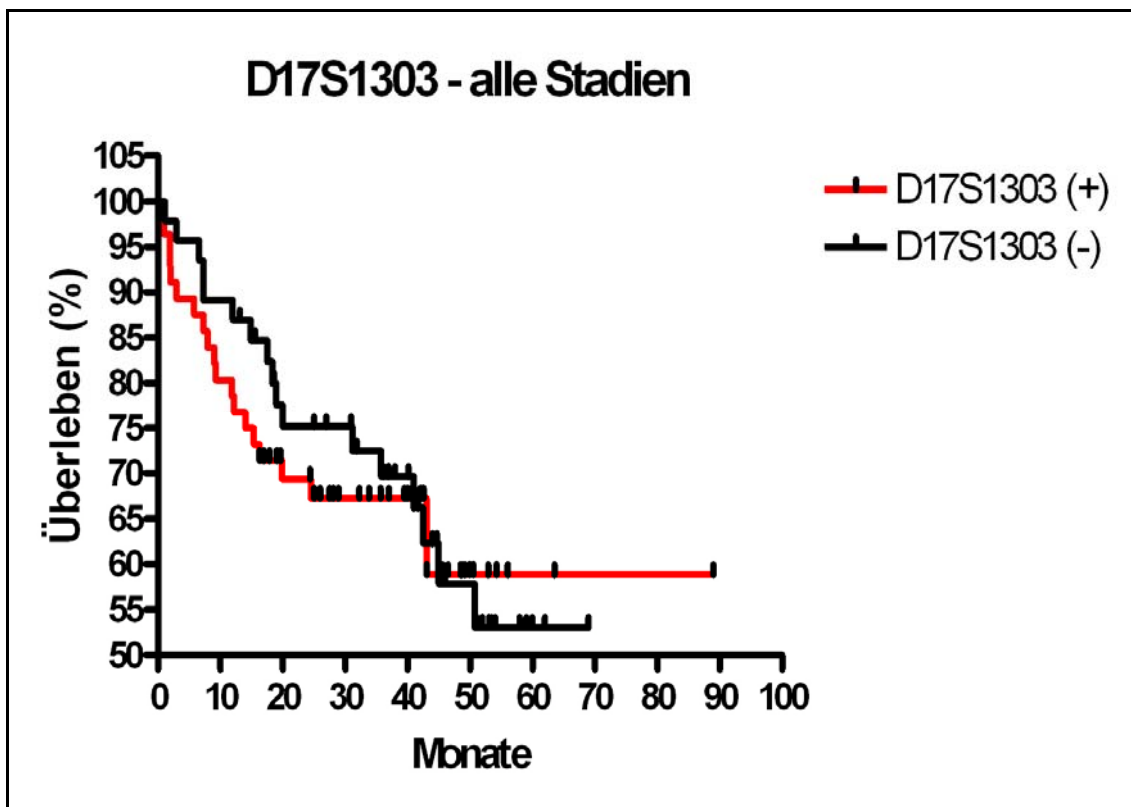


Abb. 27. Prognose D17S1303 pos. vs. neg. ($p = 0,77$)

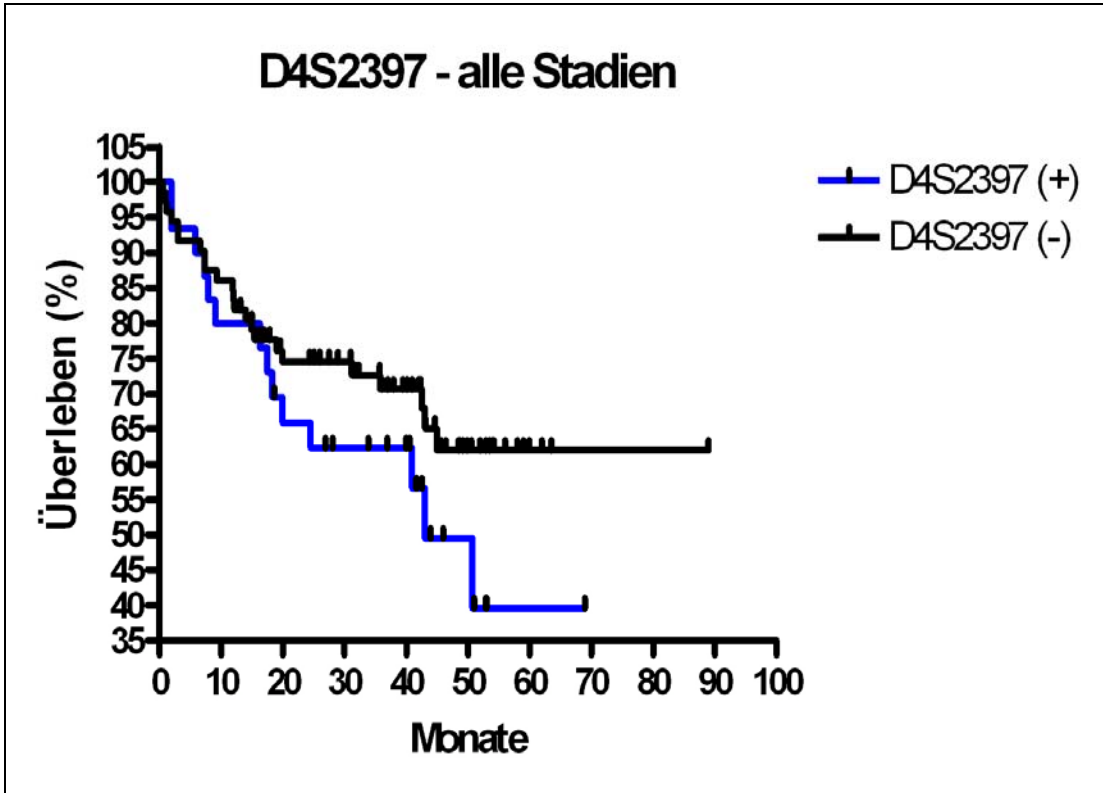


Abb. 28. Prognose D4S2397 pos. vs. neg. ($p = 0,2$)

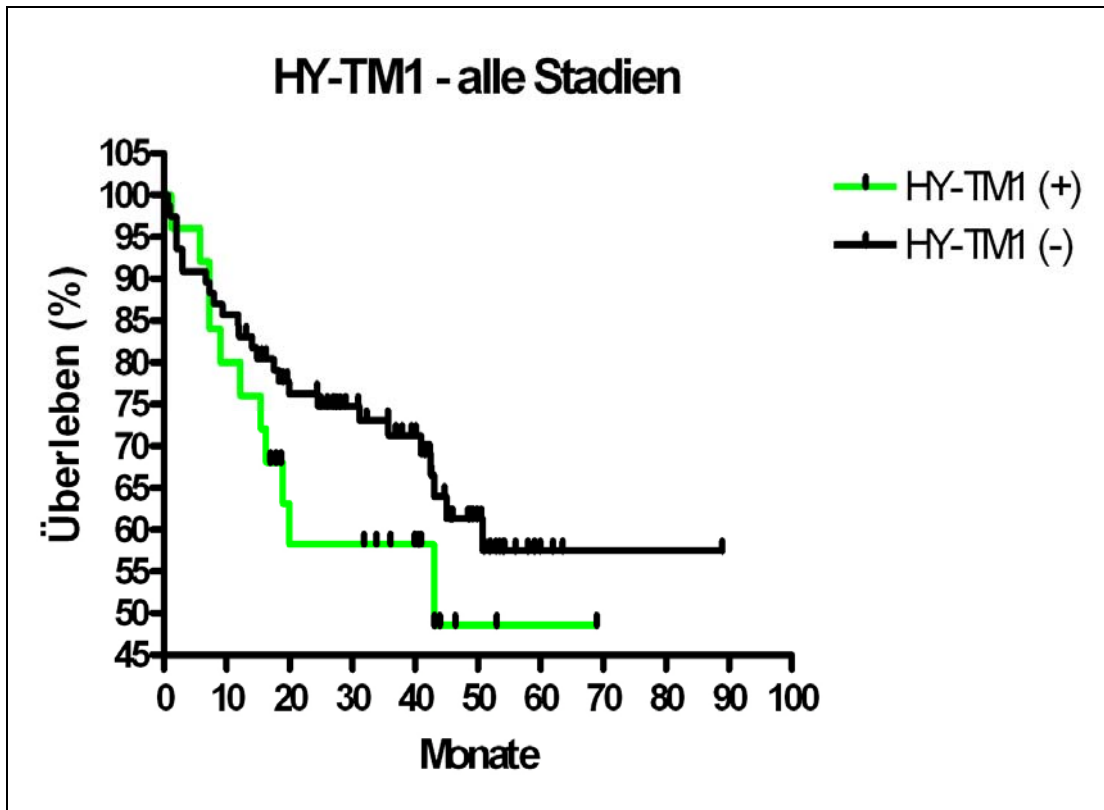


Abb. 29. Prognose HY-TM1 pos. vs. neg. ($p=0,25$)

Die Überlebenszeitkurven für die Patientengruppen mit unterschiedlicher Anzahl an LOH zeigen ebenfalls eine variierende Abhängigkeit der Überlebenswahrscheinlichkeit von den gefundenen LOH, vorwiegend mit Tendenz zur schlechteren Prognose hinsichtlich des Überlebens. So konnten bei dem Vergleich der klinischen Daten von Patienten mit 1 LOH mit Patienten ohne LOH (Abb. 28) keine großen Unterschiede bezüglich des Überlebens gefunden werden ($p=0,77$). Im Gegensatz dazu wies der Vergleich von Patienten mit 2 LOH gegenüber Patienten ohne LOH (Abb.29) auf eine reduzierte Überlebenserwartung hin ($p=0,37$). Eine weitere deutliche Reduktion der Prognose wurde bei Patienten mit 3 LOH (Abb.30) gefunden ($p=0,12$). Der hochsignifikante Unterschied zwischen den Patientengruppen mit 3, 2, 1 und keinem LOH (Abb.30), der bei der vorangehenden Untersuchung mit $n=50$ gefunden wurde, konnte bei der erweiterten Fallzahl von $n=100$ nicht bestätigt werden ($p=0,45$).

Eine signifikant schlechtere Prognose wurde bei Patienten mit einer Kombination von LOH auf den Markern D17S1303 und D4S2397 (Abb.32) gefunden ($p=0,0367$). Bei

gleichzeitigem Auftreten von LOH auf den Markern D17S1303 und HY-TM1 (Abb.33) lag ebenfalls eine verminderte Überlebenswahrscheinlichkeit vor, wenn auch nicht signifikant ($p=0,15$).

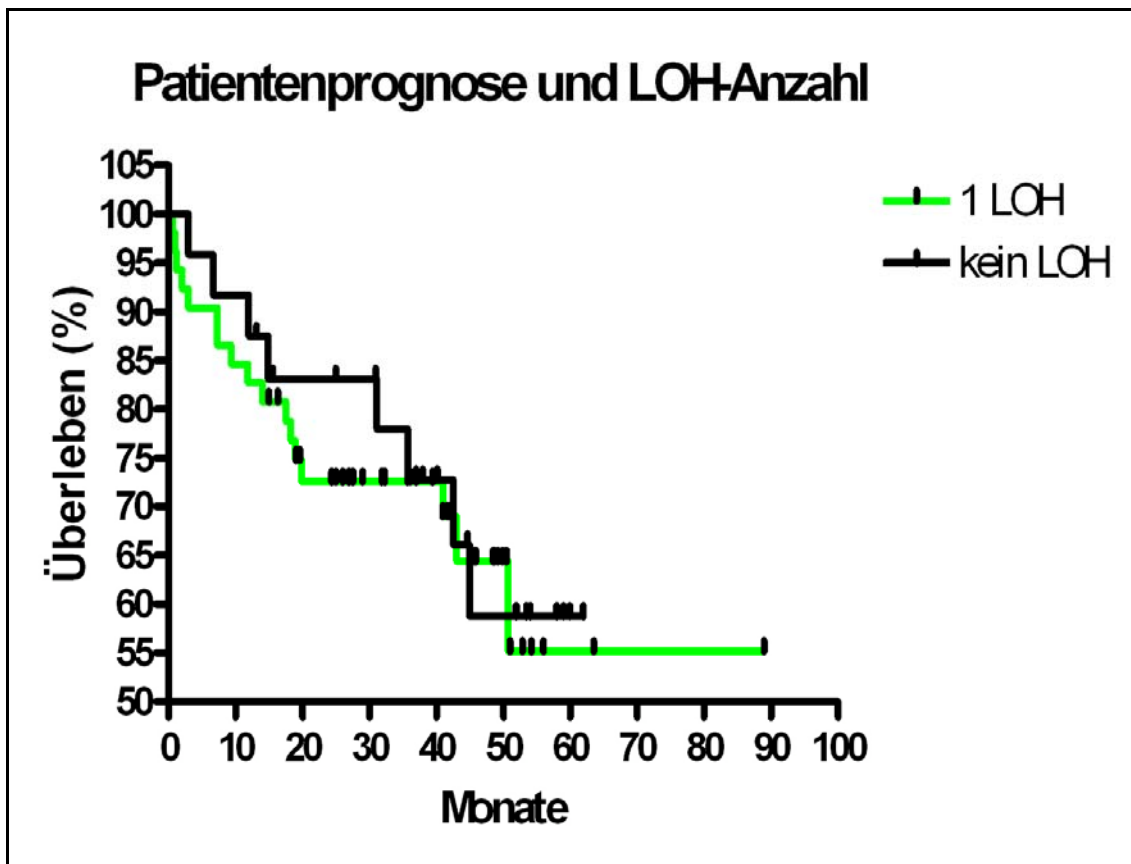


Abb. 30. Prognose 1 LOH vs. kein LOH ($p = 0,77$)

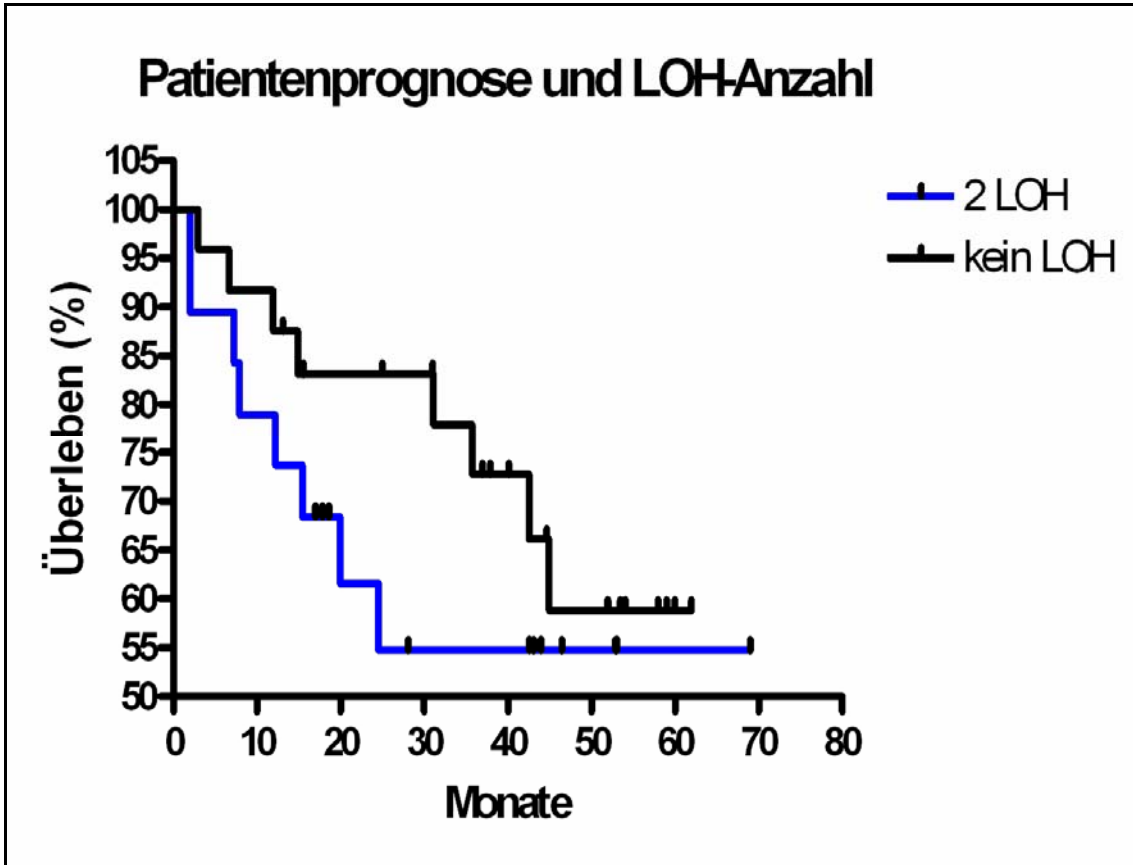


Abb. 31. Prognose 2 LOH vs. kein LOH ($p = 0,37$)

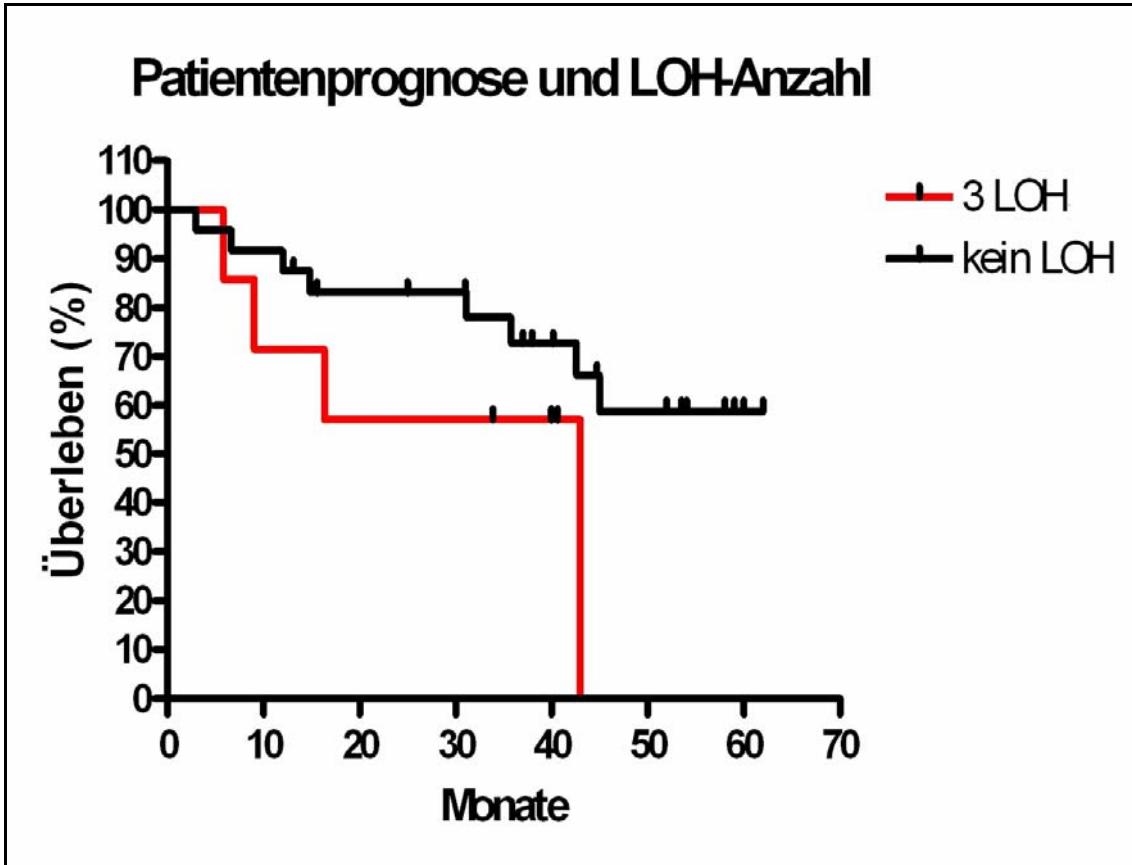


Abb. 32. Prognose 3 LOH vs. kein LOH ($p = 0,12$)

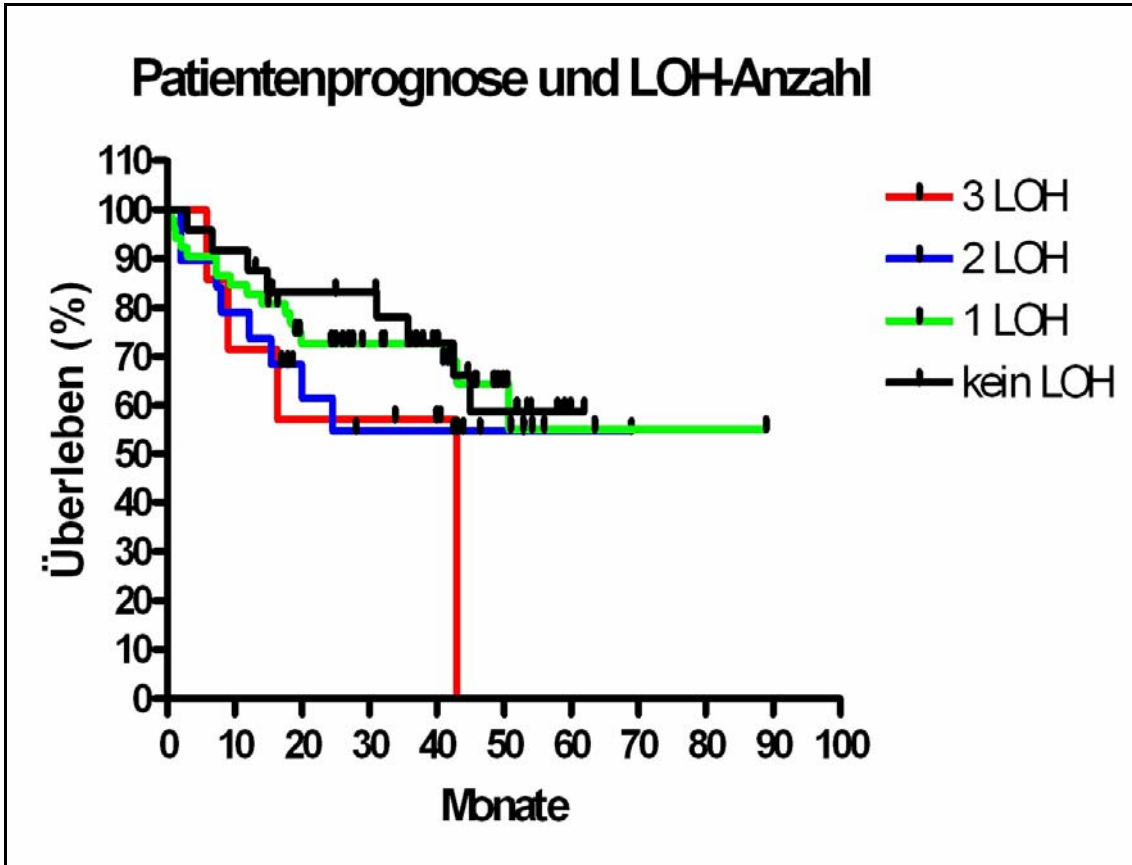


Abb. 33. Prognose in Abhängigkeit von der LOH-Anzahl (p=0,45)

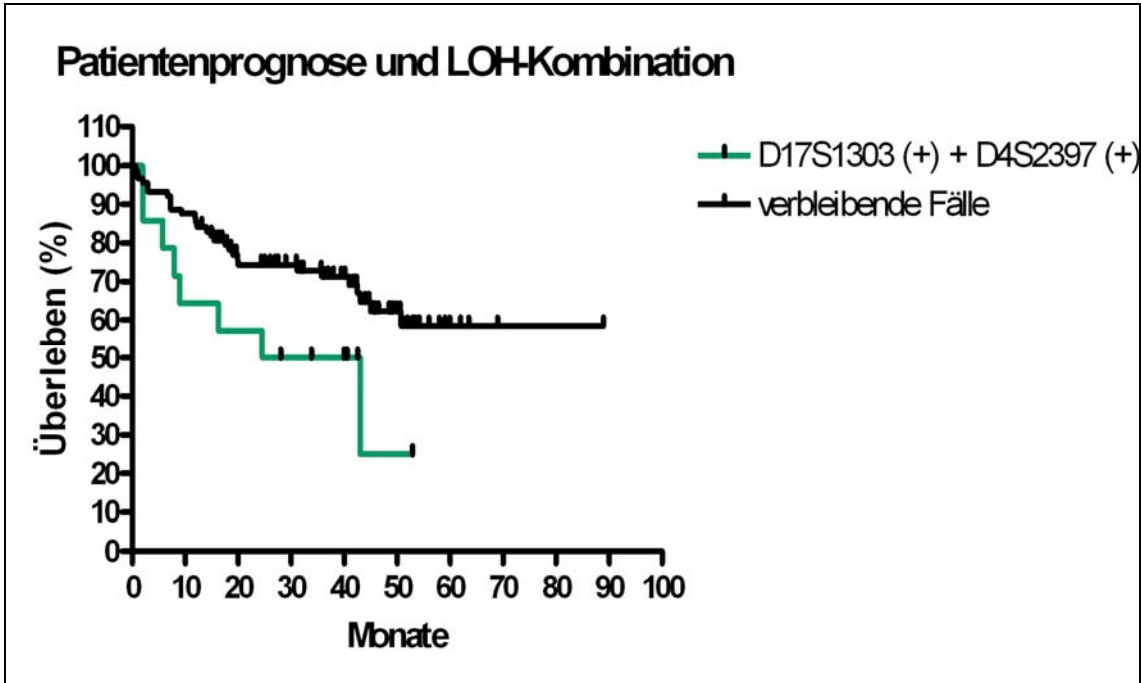


Abb. 34. Prognose bei gleichzeitigem Vorkommen von einem LOH auf dem Marker D17S1303 und D4S2397 vs. verbleibende Fälle ($p = 0,0367$)

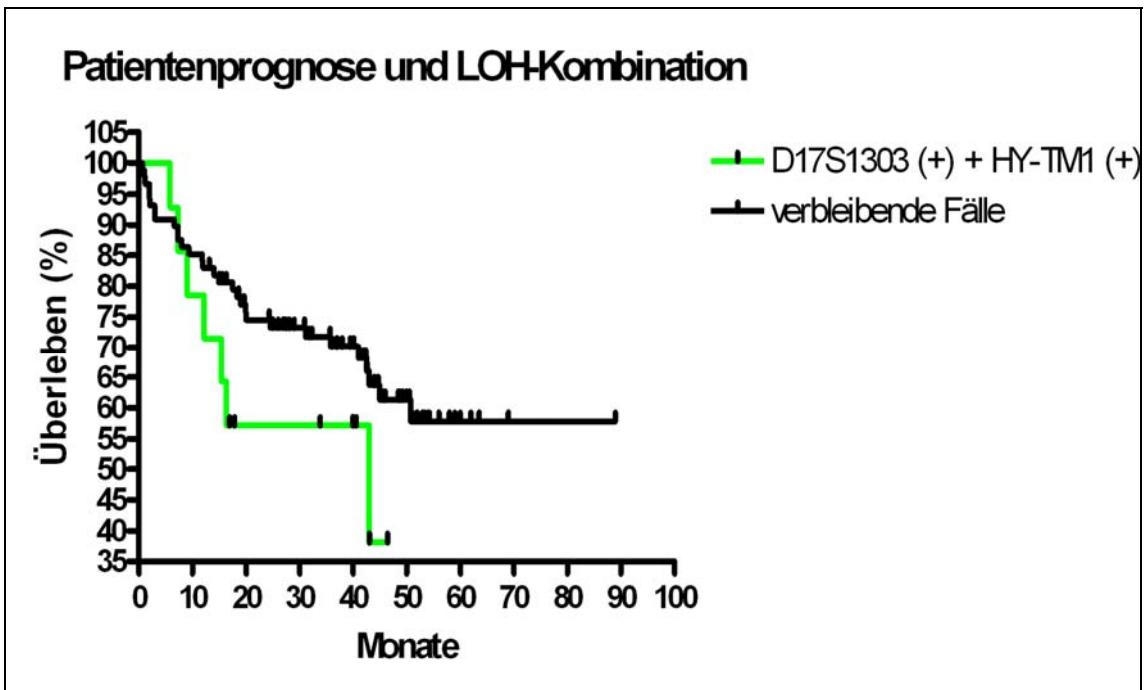


Abb. 35. Prognose bei gleichzeitigem Vorkommen von einem LOH auf dem Marker D17S1303 und HY-TM1 vs. verbleibende Fälle ($p = 0,15$)

4. Diskussion

4.1. Allelische Verluste der Region 1p32

In dieser Arbeit wurden Verluste in der Region 1p32 mit Hilfe des HY-TM1 Markers untersucht. Ein LOH wurde dabei mit einer Häufigkeit von 29,4 % (25 von 85 informativen Tumoren) gefunden. Di Vinci et al. (1998) beschreibt in ihren Untersuchungen eine Häufigkeit von 38 % für 1p36.3 (D1Z2 Marker) Deletionen. Mit einer höheren Frequenz von 42 % aller untersuchten Karzinome weisen bei Leister et al. (1990) Tumore allelische Verluste in der Region 1p35 auf. Praml et al. (1995) konnte unter Einsatz von 33 Mikrosatellitenmarkern sogar in 84 % der untersuchten Fälle 1p-Deletionen ausfindig machen. Auch Bravard et al. (1991) beschreibt höhere Frequenzen für allelische Verluste auf Chromosom 1p32 (UMP-K-Gen). Olagunju et al. (1997) dagegen beschreibt mit 27 % eine geringere Häufigkeit für Verluste auf 1p32 bzw. 1p36, obwohl er signifikante Assoziationen zwischen den allelischen Verlusten der einzelnen Primer D1S211 (1p32), HY-TM1 (1p32) und D1S228 (1p36) und einer verschlechterten Überlebenswahrscheinlichkeit fand. Auch die Autoren Vogelstein et al. (1987), Couturier-Turpin et al. (1992) und Longy et al. (1993) berichten über niedrige Chromosom 1p- Verluste. Es muss daher diskutiert werden, worauf diese unterschiedlichen Häufigkeiten zurückzuführen sind. Mögliche Ursachen können beispielsweise technische Einschränkungen der zytogenetischen Methoden in frühen Studien sein. Auch variieren die Kriterien zur Definition eines Loss of Heterozygosity, allelische Verluste werden ab unterschiedlichen Quantitäten als LOH betrachtet, wodurch die LOH-Rate zwischen den Autoren schwanken kann (siehe Kap. 4.3.5).

4.2. Klinische Korrelation von allelischen Verlusten auf Chromosom 1p

Patienten mit einem Verlust auf Chromosom 1p verstarben in dem Beobachtungszeitraum mit höherer Wahrscheinlichkeit als Patienten ohne LOH auf dem Mikrosatellitenmarker HY-TM1. Es liegt mit einer Letalitätsrate von 44 % zwar kein signifikanter Unterschied zu LOH-negativen Patienten vor (35,1 %), allerdings weist der niedrige Wert von $p=0,25$ auf einen Trend zum schlechteren Überleben hin. Andere Studien können teilweise eine signifikante Korrelation nachweisen. Olagunju et al.

(1997) wies eine signifikante Assoziation mit einem schlechteren Überleben ($p < 0,05$) nach. Dabei konnte ein signifikant kürzeres krankheitsfreies Intervall und ein kürzeres Überleben bei LOH auf den Mikrosatellitenmarkern D1S211 (1p32), HY-TM1 (1p32) und D1S228 (1p36) nachgewiesen werden. HY-TM1 wurde als prognostischer Indikator, unabhängig von anderen Markern wie D1S228 dargestellt. Arai et al. (1998) kann dagegen keine Beziehung zwischen 1p34-36-Deletionen und Lymphknoten-Metastasen finden. Er betrachtet dies als ein Indiz dafür, dass 1p-Verluste nicht notwendigerweise für die Aquisition von metastatischem Potential benötigt werden. Dieses Ergebnis widerspricht somit den Ergebnissen von anderen Studien, welche 1p-Verluste als Beitrag zur Progression des kolorektalen Karzinoms betrachten (Thorstensen et al. 1996, Young et al. 1993, Yana et al. 1995).

4.3. Allelische Verluste der Region 4p15.2 und klinische Korrelation

In der Literatur wurde bereits gezeigt, dass individuelle chromosomale Verluste von 4p (D4S1609, D4S174, D4S230, D4S391, D4S2946) mit einer frühen Manifestation des kolorektalen Karzinoms korrelieren (Choi et al. 2002). Mittels des Mikrosatelliten-Markers D4S2397 konnten in dieser Arbeit 4p-Verluste in 36,1 % der informativen Fälle als LOH gefunden werden, wobei diese mit einer erhöhten Mortalität (46,67 %) vergesellschaftet sind. Die Mortalitätsrate für Patienten ohne LOH auf D4S2397 beträgt dagegen 32,9 %. Sehr ähnliche Ergebnisse wurden bereits in vorausgehenden Studien gefunden. So beschreibt Arribas et al. (1999) in seinen Studien eine LOH-Häufigkeit von 35 % aller informativen Fälle für D4S2397. Dabei weist er eine Korrelation mit einem schlechteren Krankheitsverlauf nach. Der LOH scheint ein Indikator sowohl für ein kürzeres symptomfreies Überleben („disease-free survival“) ($p = 0,027$) zu sein, als auch für eine erhöhte Aggressivität des Tumors, welche unabhängig vom p53-Status ist. In dieser Arbeit konnte eine reduzierte Lebenserwartung bei vorliegendem LOH auf Chromosom 4p15.2 ($p = 0,2$) gezeigt werden. Zwar gilt dieser p-Wert nicht als signifikante Korrelation, dennoch ist der Zusammenhang bereits deutlich zu erkennen. Es bleibt abzuwarten, ob mit zunehmender Beobachtungszeit ein signifikanter Unterschied zu eruieren ist. Ein solcher ergab sich allerdings beim Vergleich des

Überlebens von Patienten mit der Kombination eines LOH auf D4S2397 zusammen mit einem LOH auf D17S1303 ($p=0,037$). Dies kann als weitere Bestätigung dafür angesehen werden, dass die kolorektale Karzinogenese durch multiple genetische Alterationen verursacht und verstärkt wird (Shibata et al. 2001, Xiong et al. 2001, Goel et al. 2001). Auch Choi et al. (2002) beschreibt multiple chromosomale Verluste als einen die Progression eines Tumors im frühen Stadium beschleunigenden Faktor. Tumore mit geringgradigen („low-level“) chromosomalen Verlusten verbleiben dagegen für eine längere Periode in frühen Tumor-Stadien.

4.4. Allelische Verluste der Region 17p12 und klinische Korrelation

In dieser Arbeit konnten Verluste (LOH) auf Chromosom 17p12 mit Hilfe des Mikrosatellitenmarkers D17S1303 in 70,9 % der informativen Fälle gefunden werden. Patienten mit einem LOH verstarben im Beobachtungszeitraum ungefähr ebenso häufig (35,7%) wie Patienten ohne LOH (37 %). Auch konnte keine Korrelation von einem LOH auf Chromosom 17p mit einer schlechteren Patientenprognose gezeigt werden ($p=0,77$). Allerdings konnte, wie oben bereits erwähnt wurde, eine signifikant schlechtere Patientenprognose bei Vorliegen von einem LOH auf 4p zusammen mit einem LOH auf 17p gezeigt werden ($p=0,037$), und zusätzlich eine reduzierte Lebenserwartung bei einem gemeinsamen Vorliegen eines LOH auf 17p und 1p ($p=0,15$). Relativ hohe LOH-Frequenzen auf 17p (D17S520, TP53, p53VNTR, D17S1176) wurden auch von Watanabe et al. (2001) mit einer LOH-Häufigkeit von 51 % beschrieben. In dieser Studie konnte bei der Analyse von 121 Patientendaten ebenfalls kein Aussagewert der LOH- Identifikation bezüglich der Voraussage des Krankheitsverlaufs gefunden werden. Ferner konnte in dieser Studie auch keine Korrelation zwischen der Überlebenszeit nach einer durchgeführten Therapie mit einem festgelegten Regime und der Präsenz von bestimmten molekularen Markern gefunden werden. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen weist Ajay et al. (2003) für LOH auf 17p nur eine Häufigkeit von 21 % für den Marker D17S261 nach, und eine Gesamthäufigkeit für 17p-Verluste von 11 % für alle untersuchten Tumoren. Ferner waren LOH signifikant mit MSI-L Tumoren im Vergleich mit MSI-H Tumoren

assoziiert. MSI-H Tumoren zeigen einen weniger aggressiven klinischen Verlauf (Boland et al. 1998). Dies wurde in der Studie von Ajay et al. (2003) durch ein signifikant verlängertes („disease free survival“) manifestations-freies Überleben und Gesamt-Überleben für die Subgruppe von Patienten mit Tumoren im Stadium II und MSI-H verdeutlicht.

Allelische Verluste von Chromosom 17p und Alterationen des dort vorliegenden Tumorsuppressorgens p53 konnten als prognostische Marker identifiziert werden (McLeod et al. 1999, Gryfe et al. 2000, Pirollo et al. 2000, Soussi et al. 2000, North et al. 2000, Smith et al. 2000, el-Deiry et al. 1998, Bunz et al. 1999, Chu et al. 1999, Nita et al. 1998). Ferner konnte gezeigt werden, dass Verluste von 17p (D17S1358, D17S122, D17S796, D17S1566, TP53) mit einer lymphatischen Invasion des Tumors korrelieren (Choi et al. 2002).

Es konnte eine Assoziation der Überlebenswahrscheinlichkeit mit der Lokalisation im rechtsseitigen bzw. linksseitigen Kolon gezeigt werden, wobei rechtsseitige, proximale Malignome zur Mikrosatelliteninstabilität (MSI-H) tendieren (Lothe et al. 1993, Thibodeau et al. 1993, Kim et al. 1994, Aaltonen et al. 1998, Thibodeau et al. 1998) und eher chromosomenstabil sind. Diese weisen eine bessere Überlebenswahrscheinlichkeit sowie ein geringer aggressives Wachstum auf (Shih-Ching Chang et al. 2006, Gafa et al. 2000). Linksseitige Karzinome sind dagegen eher mikrosatellitenstabil und chromosomal instabil.

Diep et al. (2003) weist in seiner Studie eine signifikante Korrelation zwischen 17p13-Verlusten (D17S30, pBHP53) und einer kürzeren Überlebenszeit nach ($p=0,021$). Interessanterweise kann auch in dieser Studie eine deutlichere Verschlechterung der Prognose für ein gleichzeitiges Auftreten von 17p- und 18q-Verlusten gefunden werden. Offensichtlich können also auch weitere Autoren bei gleichzeitigem Auftreten von LOH auf verschiedenen Lokalisationen schlechtere Lebenserwartungen bzw. verminderte Überlebensprognosen finden.

4.5. Ursachen divergierender Studienergebnisse und Bedeutung der chromosomalen Verlustanalyse

Als mögliche Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse hinsichtlich der prädiktiven Aussage von LOH- Funden muss man die noch vergleichsweise geringe Probenanzahl sowie die noch nicht allgemein standardisierten molekularbiologischen Methoden annehmen. Durch unterschiedliche Definition eines LOH können theoretisch bei gleichen Gewebeproben unterschiedliche LOH- Frequenzen angenommen werden, je nach dem, ab welchem Intensitätsverlust in der Untersuchung ein LOH postuliert wird. So wurde bei Arribas et al. (1999) und in dieser Arbeit ein LOH ab einem Intensitätsverlust von mindestens 30 % definiert, wogegen Watanabe et al. (2001) mindestens eine Reduktion von 50 % fordert. Choi et al. (2002) nimmt einen Grenzwert von 1.55 als Tumor-Normalgewebe-Ratio zur Diskrimination zwischen LOH und Wild-Typ Heterozygotität an (entspricht einer Intensitätsabnahme auf mind. 64,5 %), Ogunbiyi et al. (1997) einen Intensitätsunterschied mit einem Faktor von 3 (entspricht 66,6 %). Weitere Autoren erwähnen nur eine signifikante Reduktion der Intensität (Bauer et al. 2001). Tomlinson et al. (2002) beschreibt ferner variierende Messmethoden als Ursache für ungenaue LOH-Ergebnisse, wie Messungen von allelischen Höchstwertflächen (allellic peak area) im Gegensatz zur einfachen Messung der Spitzenwerte von LOH zur Detektierung eines allelischen Verlustes. Er weist auch auf die Problematik der Kontamination von Tumorproben mit Normalzellen hin, welche die Identifizierung von reinen allelischen Verlusten verhindern. Weitere Probleme stellen die genetische Heterogenität wie die häufige Aneuploidie, Polyploidie (Tirkkonen et al. 1998, Forozan et al. 2000) und komplexe Karyotypen von Tumoren dar, welche mit der two-hit Hypothese (Knudson et al. 1996) interferieren (Dutrillaux et al 1991).

Dass höhere LOH-Raten allerdings nicht alleinig auf einen niedriger geforderten Intensitätsverlust im LOH-Screening zurück zu führen sind, lässt sich durch den Vergleich von verschiedenen Studien belegen. Als Beispiel seien zwei Studien aufgeführt, welche beide einen LOH erst ab einem Intensitätsverlust von 50% definieren. Dabei kann Ajay et al. (2003) allelische Verluste für 17p nur in 21 % der untersuchten Fälle vorfinden, wogegen Watanabe et al. (2001) für diese Region bei bis zu 51 % der Fälle LOH vorfindet. Die Ursachen für derart variierende Ergebnisse

dürften sicherlich auch auf die Anzahl, Dichte und Kombination von Mikrosatellitenmarkern zurückzuführen sein. So verwendet Ajay et al. die beiden Marker D17S250 und D17S261, wogegen Watanabe et al. die Marker D17S520, TP53, p53VNTR, D17S1176 einsetzt.

Ein weiterer Faktor mit Einfluss auf die Ergebnisse könnten unterschiedliche Maßstäbe für die Auswahl von Tumorgewebeproben sein. Nicht alle Veröffentlichungen geben Auskunft über die Qualität der verwendeten Proben, manche weisen nur darauf hin, dass jeder mögliche Aufwand betrieben wurde, um eine Kontamination der Tumorproben mit Normalgewebe zu vermeiden. In manchen Untersuchungen werden mindestens 50 % Tumorzell-Gehalt für Tumorproben gefordert, in anderen mindestens 65 % oder sogar 70 %. (Ajay et al. 2003, Barratt et al. 2002, Arribas et al. 1999, Ogunbiyi et al. 1997, Choi et al. 2002). In dieser Arbeit wurden Tumorproben mit mindestens 50 % Tumorgehalt verwendet.

Eine Vereinheitlichung von Qualitätskriterien bei LOH-Untersuchungen sollte zur Validitätssicherung und Vergleichbarkeit durchgeführt werden.

Aktuelle klinische Algorithmen weisen Patienten adjuvante Chemotherapien im Stadium UICC 3 zu. Klinische Entscheidungen würden aber sehr davon profitieren, wenn zusätzliche prognostische Marker verfügbar wären, mit denen z.B. Untergruppen von Patienten identifiziert werden könnten, die besonders von bestimmten Chemotherapie-Regimes profitieren würden (Barratt et al. 2002). Die post-operative adjuvante Chemotherapie verbessert das Therapie-Ergebnis von Kolon-Karzinomen im Stadium III und ist daher weitgehend als Standardtherapie akzeptiert (Galanis et al. 2000, Macdonald JS 1999). Bei vielen Patienten mit kolorektalen Karzinomen im Stadium II geht man ebenfalls von einem erhöhten Risiko eines Tumor-Rezidivs nach Therapie aus, allerdings erhalten diese keine adjuvante Therapien, da der Vorteil unsicher ist. Aus diesem Grund sind zuverlässige Marker, welche Aussagen hinsichtlich des Nutzens einer solchen adjuvanten Chemotherapie machen können, dringend erforderlich (Galanis et al. 2000, O'Connell et al. 1992, Chung DC 1998).

5. Zusammenfassung

Die Karzinomentstehung im Kolon lässt sich entsprechend der Adenom-Karzinom-Sequenz u.a. auf die Inaktivierung von Tumorsuppressorgen zurückführen. LOH in verschiedenen chromosomalen Bereichen wie 1p32-36, 2p21-16, 3p23, 4p14-16, 8p21-22, 11q22-23, 14q32, 17p13, 18q12.3 22q13 konnten bereits mit einer signifikant schlechteren Patientenprognose korreliert werden, LOH in 17p13 und 18q12.3 außerdem mit einem schlechteren Ansprechen einer Chemotherapie (5-FU).

In dieser Arbeit wurden Multiplex-PCR Reaktionen zur Untersuchung von DNA-Proben etabliert. Anschließend wurden 100 Tumoren, welche im Rahmen eines Projekts der „Interdisziplinären Forschergruppe Kolonkarzinom Würzburg“ asserviert worden sind, in den chromosomalen Regionen 1p32-36, 4p14-16 und 17p12 auf allelische Deletionen untersucht und diese mit der Patientenprognose korreliert.

Dabei wiesen ein LOH auf dem Marker D4S2397 ($p=0,2$) und ein LOH auf dem Marker HY-TM1 ($p=0,25$) auf eine reduzierte Lebenserwartung hin, wenn auch nicht signifikant. Lediglich ein LOH auf dem Marker D17S1303 war nicht mit einer Einschränkung der Lebenserwartung korreliert ($p=0,77$).

Es konnte ein signifikant schlechteres Überleben bei einem gleichzeitigen Vorliegen von LOH auf den Regionen 4p15.2 (D4S2397) und 17p12 (D17S1303) gefunden werden ($p=0,0367$). Ferner konnte ein Trend zur schlechteren Prognose bei einem gleichzeitigen Auftreten von LOH in den Regionen 17p12 (D17S1303) und 1p32 (HY-TM1) gezeigt werden ($p=0,15$). Um klinisch nutzbare Untersuchungsverfahren zur Prognosebestimmung bei Patienten mit Kolonkarzinom entwickeln zu können, werden noch weitere molekulargenetische Folgestudien nötig sein.

6. Quellen

Literatur:

Aaltonen LA, Salovaara R, Kristo P, Canzian F, Hemminki A, Peltomaki P et al. (1998) Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J Med*; 338:1481–7.

Alberts DS, Martinez ME, Roe DJ, Guillen-Rodriguez JM, Marshall JR, Van Leeuwen JB, Reid ME, Ritenbaugh C, Vargas PA, Bhattacharyya AB, Earnest DL, Sampliner RE, and the Phoenix Colon Cancer Prevention Physicians' Network. Lack of effect of a high fiber cereal supplement on the recurrence of colorectal adenomas. *N Engl J Med* 342 (2000) 1156-1162.

Arai T, Akiyama Y, Yamamura A et al. (1998) Allelotype analysis of early colorectal cancers with lymph node metastasis. *Int J Cancer*; 79:418-23.

Arribas R, Ribas M, Risques RA, Masramon L, Tortola S, Marcuello E, Aiza G, Miro R, Capella G, Peinado MA (1999) Prospective Assessment of Allelic Losses at 4p14-16 in Colorectal Cancer: Two Mutational Patterns and a Locus Associated with Poorer Survival. *Clinical Cancer Research*; Vol.5, 3454-3459.

Barratt PL, Seymour MT, Stenning SP, Georgiades I, Walker C, Birbeck K, Quirke P, and UKCCCR AXIS trial collaborators (2002) DNA markers predicting benefit from adjuvant fluorouracil in patients with colon cancer: a molecular study. *THE LANCET*, Vol 360; 360:1381-91.

Bauer A, Savelyeva L, Claas A, Praml C, Berthold F, Schwab M (2001) Smallest region of Overlapping Deletion in 1p36 in Human Neuroblastoma: A 1 Mbp Cosmid and PAC Contig. *Genes. Chromosomes & Cancer*, 31:228-239.

Bingham SA, Day NE, Luben R, Ferrari P, Slimani N, Norat T, Clavel-Chapelon F, Kesse E, Nieters A, Boeing H, Tjonneland A, Overvad K, Martinez C, Dorronsoro M, Gonzalez CA, Key TJ, Trichopoulou A, Naska A, Vineis P, Tumino R, Krogh V, Bueno-de-Mesquita HB, Peeters PH, Berglund G, Hallmans G, Lund E, Skeie G, Kaaks R, Riboli E. European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet* 361 (2003) 1496-1501.

Boland CR, Tibodeau SN, Hamilton SR et al. (1998) A National Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res*; 58: 5248-57.

Bravard A, Luccioni C, Muleris M, Lefrancois D, Dutrillaux B (1991) Relationships between UMPK and PGD activities and deletions of chromosome 1p in colorectal cancers. *Cancer Genet Cytogenet*; 56:45-56.

Bunz F, Hwang PM, Torrance C, et al. (1999) Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *J Clin Invest*; 104:263-9.

Carethers JM, Hawn MT, Greenson JK, Hitchcock CL, Boland CR (1998) Prognostic significance of allelic loss at chromosome 18q21 for stage II colorectal cancer. *Gastroenterology*; 114:1188-95.

Cavenee WK, Dryja TP, Phillips RA, Benedict WF, Godbout R, Gallie BL, Murphree AL, Strong LC, White RL (1983) *Nature* 305, 779-784.

Chang SC, Lin JK, Yang SH, Wang HS, Fen-Yau Li A, Chi CW (2006) Relationship between genetic alterations and prognosis in sporadic colorectal cancer. *Int. J. Cancer*: 118, 1721–1727.

Chao A, Connell CJ, Jacobs EJ, McCullough ML, Patel AV, Calle EE, Cokkinides VE, Thun MJ Amount, type, and timing of recreational physical activity in relation to colon and rectal cancer in older adults: the Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13 (2004) 2187-2195.

Choi SW, Lee KJ, Bae YA, Min KO, Kwon MS, Kim KM, Rhyu MG (2002) Genetic Classification of Colorectal Cancer Based on Chromosomal Loss and Microsatellite Instability Predicts Survival. *Clinical Cancer Research*; Vol. 8. 2311-2322.

Chu E, Copur SM, Ju J, et al. (1999) Thymidylate synthase protein and p53 mRNA form an in vivo ribonucleoprotein complex. *Mol Cell Biol*; 19:1582-94.

Chung DC (1998) Molecular prognostic markers and colorectal cancer: the search goes on. *Gastroenterology*; 114:1330-2.

Chung DC (2000) The genetic basis of colorectal cancer: insights into critical pathways of tumorigenesis. *Gastroenterology*; 119:854-65.

Couturier-Turpin MH, Esnous C, Louvel A, Poirier Y, Couturier D (1992) Cytogenetic research on structural changes and their significance. *Hum Genet*; 88:431-438.

Cross AJ, Pollock JRA, Bingham SA. Haem, not protein or inorganic iron, is responsible for endogenous intestinal N-nitrosation arising from red meat. *Cancer Res* 63 (2003) 2358-2360

Di Vinci A, Infusini E, Peveri C, Sciutto A, Geido E, Risio M, Rossini FP, Giaretti W (1998) Correlation between 1p deletions and aneusomy in human colorectal adenomas. *Int. J. Cancer*: 75, 45-50.

Diep CD, Thorstensen L, Meling GI, Skovlund E, Rognum TO, Loth el-Deiry WS (1998) The p53 pathway and cancer therapy. *Cancer J*; 11:229-36.

Donnelly ET, Bardwell H, Thomas GA, Williams ED, Hoper M, Crowe P, McCluggage WG, Stevenson M, Phillips DH, Hewer A, Osborne MR, Campbell FC. Modulation of N-methyl-N-nitrosurea-induced crypt restricted immunopositivity in mouse colon by a non-genotoxic diet-related chemical. *Carcinogenesis* 25 (2004) 847-855.

Dutrillaux B, Gerbault-Seureau M, Remvikos Y, Zafrani B, Prieur M (1991) Breast cancer genetic evolution: I. Data from cytogenetics and DNA content. *Breast Cancer Res Treat*; 193:245–255.

Eppert K, Scherer SW, Ozcelik H, Pirone R, Attisano L (1996) MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGF-beta-regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. *Cell*; 86:543-552.

Fearon ER, Vogelstein B (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*; 61:759-767.

Forozan F, Mahlamaki EH, Monni O, Chen Y, Veldman R, Jiang Y, Gooden GC, Ethier SP, Kallioniemi A, Kallioniemi OP (2000) Comparative genomic hybridization analysis of 38 breast cancer cell lines: a basis for interpreting complementary DNA microarray data. *Cancer Res*; 60:4519–4525.

Fuchs CS, Giovannucci EL, Colditz GA, Hunter DJ, Stampfer MJ, Rosner B, Speizer FE, Willett WC. Dietary fiber and the risk of colorectal cancer and adenoma in women. *N Engl J Med* 340 (1999) 169-176.

Fujiwara T, Stolker JM, Watanabe T, et al. (1999) Accumulated clonal genetic alterations in familial and sporadic colorectal carcinomas with widespread instability in microsatellite sequences. *Am J Pathol.* 153:1063-78.

Gafa R, Maestri I, Matteuzzi M, Santini A, Ferretti S, Cavazzini L, Lanza G (2000) Sporadic Colorectal Adenocarcinomas with High-Frequency Microsatellite Instability,

Pathobiologic Features, hMLH1 and hMSH2 Expression, and Clinical Outcome. *Cancer*; 89(10):2025-37.

Galanis E, Alberts SR, O'Connell MJ (2000) New adjuvant therapy for colon cancer: justified hope or commercial hype. *Surg Oncol Clin North Am*; 9:813-23.

Giovannucci E, Ascherio A, Rimm EB, Colditz G, Stampfer M, Willett WC (1995) Physical activity, obesity, and risk for colon cancer and adenoma in men. *Ann Intern Med*; 122:327-334.

Giovannucci E, Martinez ME (1996) Tobacco, colorectal cancer, and adenomas: a review of the evidence. *J Natl Cancer Inst*; 88:1717-1730.

Goel A, Arnold CN, Boland CR (2001) Multistep progression of colorectal cancer in the setting of microsatellite instability: new details and novel insights. *Gastroenterology*, 121: 1497-1502.

Goh HS, Yao J, Smith DR (1995) p53 point mutations and survival in colorectal cancer patients. *Cancer Res*; 55:5217-5221.

Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, Aronson MD, Holowaty EJ, Bull SB, Redston M, Gallinger S (2000) Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med*; 342(2):69-77.

Hamelin R, Laurent-Puig P, Olschwang S (1994) Association of p53 mutations in short survival in colorectal cancer. *Gastroenterology*; 106:42-48.

Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P (1997) TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*; 390:465-471.

Herman JG, Umar A, Polyak K, et al. (1998) Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*; 95:6870-5.

Hesketh R (1997) *The Oncogene and Tumor Suppressor Gene FactsBook*, Second ed., Academic Press, London

Jen J, Kim H, Piantadosi S, Liu ZF, Levitt RC, Sistonen P, Kinzler KW, Vogelstein B, Hamilton SR (1994) Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer, *N. Engl. J. Med*; 331: 213-221.

Jiricny J, Nystrom-Lahti M (2000) Mismatch repair defects in cancer. *Curr Opin Genet Dev*; 10:157-61.

Joslyn G, Carlson M, Thliveris A, Albertsen H, Gelbert L et al. (1991) Identification of deletion mutations and three new genes at the familial polyposis locus. *Cell* 66(3), 601-613.

Kane MF, Loda M, Gaida GM, et al. (1997) Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res*; 57:808-11.

Kern SE, Fearon ER, Tersmette KWF, Enterline JP, Leppert M (1989) Clinical and pathological associations with allelic loss in colorectal carcinoma. *JAMA*; 261:3099-3103.

Kim H, Jen J, Vogelstein B, Hamilton SR (1994) Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am J Pathol*; 145:148–56.

Kinzler KW, Nilbert MC, Vogelstein B (1991) *Science* 251, 1366-1370.

Kinzler KW, Vogelstein B (1996) Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, 87: 159-170.

Kitamura K, Taniguchi H, Yamaguchi T, Sawai K, Takahashi T (1997) Clinical outcome of surgical treatment for invasive early colorectal cancer in Japan. *Hepato-Gastroenterology*; 44, 108-115.

Knudson AG (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68, 820-823.

Knudson AG (1996) Hereditary cancer: two hits revisited. *J Cancer Res Clin Oncol*; 1223:135–140.

Lanza G, Matteuzzi M, Gafa R, et al. (1998) Chromosome 18q allelic loss and prognosis in stage II and III colon cancer. *Int J Cancer*; 79: 390-5.

Laurent-Puig P, Blons H, Cugnenc PH (1999) Sequence of molecular genetic events in colorectal tumorigenesis. *Eur J Cancer Prev*; 8: Suppl 1: S39-S47.

Laurent-Puig P, Olschwang S, Delattre O, Remvikos Y, Asselain B, Melot T, Validire P, Muleris M, Girodet J, Salmon RJ, Thomas G (1992) Survival and acquired genetic alterations in colorectal cancer. *Gastroenterology*, 102: 1136-1141.

Leister I, Weith A, Bruderlein S, Cziepluch C, Kangwanpong D, Schlag P, Schwab M (1990) Human colorectal cancer: high frequency of deletions at chromosome 1p35. *Cancer Res*. 50(22):7232-5.

- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1998) Genetic instabilities in human cancers. *Nature*; 396:643-9.
- Longy M, Saura R, Dumas F, Leseve JF, Taine L, Goussot JF, Couzigou P (1993) Chromosome analysis of adenomatous polyps of the colon: possible existence of two differently evolving cytogenetic groups. *Cancer Genet Cytogenet*; 67:7-13.
- Lothe RA, Peltomäki P, Meling GI, Aaltonen LA, Nyström-Lahti M, Pylkkänen L, et al. (1993) Genomic instability in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables and family history. *Cancer Res*; 53:5849-52.
- Lowe SW, Bodis S, McClatchey A (1994) p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science*; 266:807-810.
- Macdonald JS (1999) Adjuvant therapy of colon cancer. *CA Cancer J Clin*; 49:202-19.
- McLeod HL, Murray GI (1999) Tumour markers of prognosis in colorectal cancer. *Br J Cancer*; 79:191-203.
- Melcher R, Koehler S, Steinlein C, Schmid M, Mueller CR, Luehrs H, Menzel T, Scheppach W, Moerk H, Scheurlen M, Koehle J, Al-Taie O (2002) Spectral karyotype analysis of colon cancer cell lines of the tumor suppressor and mutator pathway. *Cytogenet Genome Res.*; 98(1):22-8.
- Murthy SK, DiFrancesco LM, Ogilvie RT, Demetrick DJ (2002) Loss of heterozygosity associated with uniparental disomy in breast carcinoma. *Mod Pathol.*; 15(12):1241-50.
- Nita ME, Nagawa H, Tominaga O, et al. (1998) 5-Fluorouracil induces apoptosis in human colon cancer cell lines with modulation of Bcl-2 family proteins. *Br J Cancer*; 78:986-92.
- Norat T, Bingham S, Ferrari P, Slimani N, Jenab M, Mazuir M, Overvad K, Olsen A, Tjønneland A, Clavel F, Boutron-Ruault MC, Kesse E, Boeing H, Bergmann MM, Nieters A, Linseisen J, Trichopoulou A, Trichopoulos D, Tountas Y, Berrino F, Palli D, Panico S, Tumino R, Vineis P, Bueno-de-Mesquita HB, Peeters PH, Engeset D, Lund E, Skeie G, Ardanaz E, Gonzalez C, Navarro C, Quiros JR, Sanchez MJ, Berglund G, Mattisson I, Hallmans G, Palmqvist R, Day NE, Khaw KT, Key TJ, San Joaquin M, Hemon B, Saracci R, Kaaks R, Riboli E. Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into cancer and nutrition. *J Natl Cancer Inst* 97 (2005) 906-916.
- North S, Hainaut P (2000) p53 and cell-cycle control: a finger in every pie.

Pathol Biol (Paris); 48:255-70.

O'Connell MJ, Schaid DJ, Ganju V, Cunningham J, Kovach JS, Thibodeau SN (1992) Current status of adjuvant chemotherapy for colorectal cancer: can molecular markers play a role in predicting prognosis? *Cancer*; 70: Suppl:1732-9.

Ogunbiyi OA, Goodfellow PJ, Herfarth K, et al. (1998) Confirmation that chromosome 18q allelic loss in colon cancer is a prognostic indicator. *J Clin Oncol*; 16:427-33.

Pedersen A, Johansen C, Gronbaek M. Relations between amount and type of alcohol and colon and rectal cancer in a Danish population based cohort study. *Gut* 52 (2003) 861-867.

Pirollo KF, Bouker KB, Chang EH (2000) Does p53 status influence tumor response to anticancer therapies? *Anticancer Drugs*; 11:419-32.

Praml C, Finke LH, Herfarth C, Schlag P, Schwab M, Amler L (1995) Deletion mapping defines different regions in 1p34.2-pter that may harbor genetic information related to human colorectal cancer. *Oncogene*; 5;1(7):1357-62.

Pricolo VE, Finkelstein SD, Hansen K (1997) Mutated p53 gene is an independent adverse predictor of survival in colon carcinoma. *Arch Surg*; 132:371-374.

Prolla TA (1998) DNA mismatch repair and cancer. *Curr Opin Cell Biol*; 10:311-6.

Schatzkin A, Lanza E, Corle D, Lance P, Iber F, Caan B, Shike M, Weissfeld J, Burt R, Cooper MR, Kikendall JW, Cahill J, and the Polyp Prevention Trial Study Group. Lack of effect of a low-fat, high-fiber diet on the recurrence of colorectal adenomas. *N Engl J Med* 342 (2000) 1149-1155.

Shibata D, Aaltonen LA (2001) Genetic predisposition and somatic diversification in tumor development and progression. *Adv. Cancer Res.*, 80:83-114.

Simanowski UA, Homann N, Knuhl M, Arce L, Waldherr R, Conradt C, Bosch FX, Seitz HK. Increased rectal cell proliferation following alcohol abuse. *Gut* 49 (2001) 418-422.

Smith DM, Gao G, Zhang X, Wang G, Dou QP (2000) Regulation of tumor cell apoptotic sensitivity during the cell cycle. *Int J Mol Med*; 6:503-7.

Soussi T (2000) The p53 tumor suppressor gene: from molecular biology to clinical investigation. *Ann N Y Acad Sci*; 910:121-37.

- Stanbridge EJ, Cavenee WK (1989) Heritable cancer and tumor suppressor genes: a tentative connection. R.A. Weinberg (ed.), *Oncogenes and the Molecular Origins of Cancer*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory; pp. 281-306.
- Thibodeau SN, Bren G, Schaid D (1993) Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science*; 260:816–9.
- Thibodeau SN, French AJ, Cunningham JM, Tester D, Bugart LJ, Roche PC, et al. (1998) Microsatellite instability in colorectal cancer: different mutator phenotypes and the principal involvement of hMLH1. *Cancer Res*; 58:1713–8.
- Tirkkonen M, Tanner M, Karhu R, Kallioniemi A, Isola J, Kallioniemi OP (1998) Molecular cytogenetics of primary breast cancer by CGH. *Genes Chromosomes Cancer*; 213:177–184.
- Toft NJ, Arends MJ (1998) DNA mismatch repair and colorectal cancer. *J. Pathol.*; 185:123-129.
- Tomlinson IPM, Lambros MBK, Roylance RR (2002) Loss of Heterozygosity Analysis: Practically and Conceptually Flawed? *Genes, Chromosomes & Cancer*; 34:349–353.
- Vogelstein B, Fearon E, Kern SE, Hamilton SR, Preisinger AC, Nakamura Y, White R (1987) Allelotype of colorectal carcinomas. *Science*; 244:193-197.
- Watanabe T, Wu TT, Cataland PJ, Ueki T, Satriano R, Haller DG, Benson AB, Hamilton SR (2001) Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med*; Vol. 344, No.16.
- Xiong Z, Wu AH, Bender CM, Tsao JL, Blake C, Shibata D, Jones PA, Yu MC, Ross RK, Laird PW (2001) Mismatch repair deficiency and CpG island hypermethylation in sporadic colon adenocarcinomas. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 10:799-803.
- Ziegler A, Lange S, Bender R (2002) Überlebenszeitanalyse: Eigenschaften und Kaplan-Meier Methode. *Dtsch Med Wochenschr*; 127:T 14-T 16.

Internet:

GraphPad:

<http://www.graphpad.com>

Kaplan-Meier Statistik:

http://www.cancerguide.org/stats_home.html

[http://www.graphpad.com/Kaplan Meier Survival Analysis using Prism.htm](http://www.graphpad.com/Kaplan%20Meier%20Survival%20Analysis%20using%20Prism.htm)

http://www.graphpad.com/prism/tutorials/survival/survival_analysis.htm

<http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/apr/section1/apr131.htm>

LabImage:

<http://www.labimage.net/index.html>

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med. W. Scheppach für die Möglichkeit danken, dieses Thema bearbeiten und die Untersuchungen in seinem Labor durchführen zu dürfen.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Stephan Timm danke ich für die Übernahme des Koreferats. Für die geduldige Betreuung und Anregungen sowohl im praktischen als auch schriftlichen Teil dieser Dissertation danke ich meinen Betreuern, Drs. med. Ralph Melcher, Theodor Kudlich und Frank Weiler.

Dem Team des Gastrolabors – Kerstin Backhaus, Gerda Dusel, Elisabeth Kelber und Donata Kuhn - gilt mein Dank für technische und moralische Unterstützung im Verlauf der Arbeit.

Curriculum vitae

Name: Constantin Wei-te Caspar Reiter
Geburtsdatum: 25.10.1979
Geburtsort: München
Staatsbürgerschaft: deutsch
Familienstand: ledig
Konfession: römisch-katholisch

Schulbildung

1986 – 1990 Eichendorff-Grundschule, Gerbrunn
01/1988 – 09/1988 Emerson Primary School, Berkeley, California, U.S.A.
1990 – 1999 Siebold-Gymnasium Würzburg
1999 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst

07/1999 - 04/2000: Stabsdienst, Volkach

Studium

05/2000 – 11/2006 Medizinstudium an der Julius-Maximilians Universität
Würzburg
03/2002 Ärztliche Vorprüfung
03/2003 1. Staatsexamen
09/2005 2. Staatsexamen
10/2005 – 09/2006 Praktisches Jahr an der Juliusmaximilians-Universität in den
Fächern Augenheilkunde, Chirurgie, Innere Medizin und an
der University of Rochester Medical School, NY, USA im
Fach Innere Medizin
11/2006 3. Staatsexamen

Beruflicher Werdegang:

Seit 12/2006 Assistenzarzt der Augenklinik der Universität Würzburg

Würzburg, den 15.10.2007

Constantin Reiter