

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. H. Einsele

## **Eingrenzung einer minimalen Verlustregion auf Chromosom 8p22 beim kolorektalen Karzinom**

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Achim Manfred Eller  
aus Kraisdorf

Würzburg, Dezember 2008

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. R. Melcher

Koreferent: Professor Dr. med. M. Scheurlen

Mündlicher Prüfer: Professor Dr. med. Dr. rer. nat. M. Fein

Dekan: Professor Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 09. September 2009

Der Promovend ist Arzt.

MEINEN ELTERN

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Das kolorektale Karzinom: Epidemiologie und Risikofaktoren	1
1.2 Grundlagen der Karzinogenese	1
1.2.1 Tumorsuppressorgene und Mutatorgene	2
1.2.2 Die Adenom-Karzinomsequenz nach Vogelstein	3
1.3 Loss of Heterocycosity und Two-Hit-Hypothese nach Knudson	4
1.4 Die Minimale Verlustregion (MRL) und ihre Bedeutung	7
1.5 Die Region 8p22 und ihre Rolle in kolorektalen Karzinomen	7
<b>2 Aufgabenstellung und Zielsetzung</b>	<b>8</b>
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>9</b>
3.1 Untersuchtes Patientenkollektiv	9
3.2 Material	10
3.2.1 Geräte, Software, Verbrauchsmaterial, Chemikalien, Kits	10
3.2.1.1 Geräte	10
3.2.1.2 Software	10
3.2.1.3 Verbrauchsmaterial	11
3.2.1.4 Kits/PCR-Reagenzien	11
3.2.1.5 Größenmarker	12
3.2.1.6 Reagenzien	12
3.2.1.7 Puffer und Gele	12
3.2.2 Verwendete Mikrosatellitenmarker	13
3.3 Methoden	14
3.3.1 DNA – Extraktion und Konzentrationsanpassung	14
3.3.2 PCR- Techniken	16
3.3.2.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	16
3.3.2.2 Touchdown-PCR (Td-PCR)	18
3.3.2.3 Multitplex	18
3.3.3 Agarose-Gel-Elektrophorese	19
3.3.4 Fragmentlängenanalyse am Sequencer	21
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>26</b>

4.1 Etablierung der verwendeten Mikrosatellitenmarker	26
4.1.1 D8S542	26
4.1.2 D8S549	27
4.1.3 D8S261	27
4.1.4 D8S1734	28
4.2 Etablierung der Multiplex-PCR	28
4.2.1 Plex der Marker D8S542 und D8S1734	28
4.2.2 Plex der Marker D8S549 und D8S261	29
4.3 Analyse der Patientenkollektivs	30
4.4 LOH-Analyse für 30 % Cut-Off-Wert	32
4.5 LOH-Analyse für 20 % Cut-Off-Wert	34
4.6 Einschränkung der minimalen Verlustregion	36
<b>5 Diskussion</b>	<b>38</b>
5.1 Chromosomale Region 8p22	38
5.1.1 Identifizierte minimale Verlustregion im Bereich 8p22	38
5.1.2 Kandidatengene in der Region 8p22	38
5.2 Problematik der LOH-Analytik	41
5.2.1 Definition eines allelischen Verlustes (LOH)	41
5.2.2 Entstehungsmechanismen des Heterozygotitätsverlusts	44
5.2.3 Homozygotie, MSI und Stotterbanden	45
<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>49</b>
<b>7 Literaturverzeichnis</b>	<b>50</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das kolorektale Karzinom: Epidemiologie und Risikofaktoren

Das kolorektale Karzinom stellt in den Industriestaaten der westlichen Welt eine der häufigsten malignen Tumorerkrankungen dar (Ferlay et al., 2002). In Deutschland ist es, sowohl beim männlichen als auch beim weiblichen Geschlecht, das Malignom mit der zweithöchsten Inzidenz (Loss et al., 2006). Auch in der Statistik der malignomabhängigen Mortalität liegt es an zweiter Stelle. Eine Mehrheit von ca. 95 % der kolorektalen Karzinome entsteht sporadisch, meist über Adenomvorstufen, ca. 5 % haben eine hereditäre Komponente mit vererbten Mutationen in wichtigen Genen des Zellschutzes wie z. B. dem APC-Gen bei der Familiären Adenomatosis Polyposis Coli (FAP) oder Enzymen, die für die Reparatur der DNA zuständig sind, wie beim hereditären nicht polypösen Kolonkarzinom (HNPCC). Als Risikofaktoren gelten sowohl exogene als auch endogene Faktoren. Eine besondere Bedeutung kommt dabei den exogenen Faktoren wie fettreicher, ballaststoffarmer Ernährung, sowie Nikotin- und Alkoholabusus zu (Willet et al., 1990). Es wird angenommen dass durch die lange Transitzeit des Chymus, welche durch die oben genannten Faktoren verlängert wird, der Kontakt von potentiell karzinogenen Nahrungsbestandteilen mit der Darmschleimhaut intensiviert wird. Bestärkt wird diese Vermutung durch die Erkenntnis, dass eine faserreiche Kost sowie sportliche Betätigung und die damit verbundene Beschleunigung der Transitzeit einen protektiven Einfluss nehmen (Scheppach et al., 1991).

## 1.2 Grundlagen der Karzinogenese

Die gesunde Zelle der Kolonschleimhaut befindet sich unter der Kontrolle und den Einflüssen von vielen verschiedenen Genen und Faktoren. Grundsätzlich lassen sich proliferationsfördernde Faktoren, die so genannten Proto-Onkogene und das Wachstum limitierende bzw. den Zellzyklus absichernde Gene, die so genannten Tumorsuppressorgene und Mutatorgene unterscheiden. Man nennt diese Genklassen auch „caretaker“- und „gatekeeper“-Gene (Kinzler et al., 1997). Diese Systeme befinden sich in der gesunden Zelle im Gleichgewicht.

Bis sich aus einer normalen Epithelzelle ein malignes Karzinom entwickelt, bedarf es ungefähr vier bis fünf voneinander unabhängiger essentieller Mutationen. Durch die Mutationen wird durch eine zunehmende genetische Instabilität die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten weiterer Mutationen erhöht.

### **1.2.1 Tumorsuppressorgene und Mutatorgene**

Als Tumorsuppressorgene bezeichnet man die Gene mit einer protektiven Aufgabe bezüglich der Sicherung der Integrität des Genoms. Sie sind die physiologischen Gegenspieler der so genannten Proto-Onkogene und greifen mit einer negativ regulierenden Funktion in den Zellzyklus ein. Sie veranlassen Reparaturen bei DNA- Schäden bzw. können bei großen Schäden auf der DNA-Ebene die Zelle in den programmierten Zelltod, der Apoptose, überführen.

Die genauen Aufgaben und Mechanismen dieser Gene können sehr vielseitig sein. Sie bilden z.B. „Checkpoints“ im Zellzyklus, wie der Transkriptionsfaktor p53 (Somasundaram, 2000), oder sind an der Regulation der Expression von anderen Genen beteiligt, wie dies z. B. beim APC-Gen der Fall ist (Su et al., 1993). Aber auch membranständige Adhäsionsmoleküle, wie das DCC-Gen, welches eine Rolle im Mechanismus der Apoptose-Induktion spielt (Cho and Fearon, 1995), werden zu den Tumorsuppressorgenen gezählt.

Mutatorgene werden oftmals unter der Gruppe der Tumorsuppressorgene genannt, liegt ihre Aufgabe doch in der korrekten Vervielfältigung der Erbinformation. Bei einer Alteration eines solchen Gens kommt es zum Ausfall der Reparaturmechanismen, woraus eine gesteigerte Mutationsrate resultiert. Daraus kann z. B. ein sogenannter „Mutator-Phänotyp“ beim Kolonkarzinom resultieren. Verluste von Mutatorgenen führen zu progressiver genomischer Instabilität und ziehen somit erhöhte Mutationsraten nach sich in Form von Doppelstrangbrüchen und Translokationen, was mit einer fortschreitenden Entartung der Tumorzelle assoziiert ist. Beispiele für Mutatorgene sind die Reparaturenzyme hMSH 2 und hMLH 1 die eine Rolle beim hereditären nicht polypösen Kolonkarzinom (HNPCC) spielen und bei diesem in 80 - 90 % der Fälle durch Ausfälle mit ursächlich sind.

### **1.2.2 Die Adenom-Karzinomsequenz nach Vogelstein**

Die Adenom-Karzinom-Sequenz nach Fearon und Vogelstein (1990) zeigt ein genetisches Mehrschrittmodell zur Karzinogenese des sporadischen kolorektalen Karzinoms auf (Abbildung 1). Grundlegend sind dabei Mutationen und resultierende Aktivitätsveränderungen von Schlüsselgenen, welchen eine bedeutende Rolle in der Entwicklung des kolorektalen Karzinomes vom normalen Schleimhautepithel über die verschiedenen adenomatösen Vorstufen hin zum invasiv wachsenden und zur Metastasierung befähigten Karzinom der Kolonschleimhaut zukommt. Entscheidend ist die Akkumulation von 4 - 5 genetischer Alterationen, wobei die chronologische Reihenfolge von untergeordneter Bedeutung zu sein scheint.

Die initiale Veränderung ist der Übergang der normalen Kolonmukosa in ein hyperproliferatives Epithel. Dieser erste, tumorinitiierende Schritt ist mit einer Inaktivierung, also dem Funktionsverlust des APC-Gens assoziiert. Ein ebenfalls früh in der Karzinogenese zu beobachtendes Phänomen stellt der Verlust von Methylgruppen (Hypomethylierung) an der DNA dar. Fearon postulierte 1990 eine damit verbundene Inhibition der Chromosomenkondensation, welche in einer chromosomalen Instabilität resultiert und somit eine Prädisposition zum Verlust von Tumorsuppressorgenallelen darstellt.

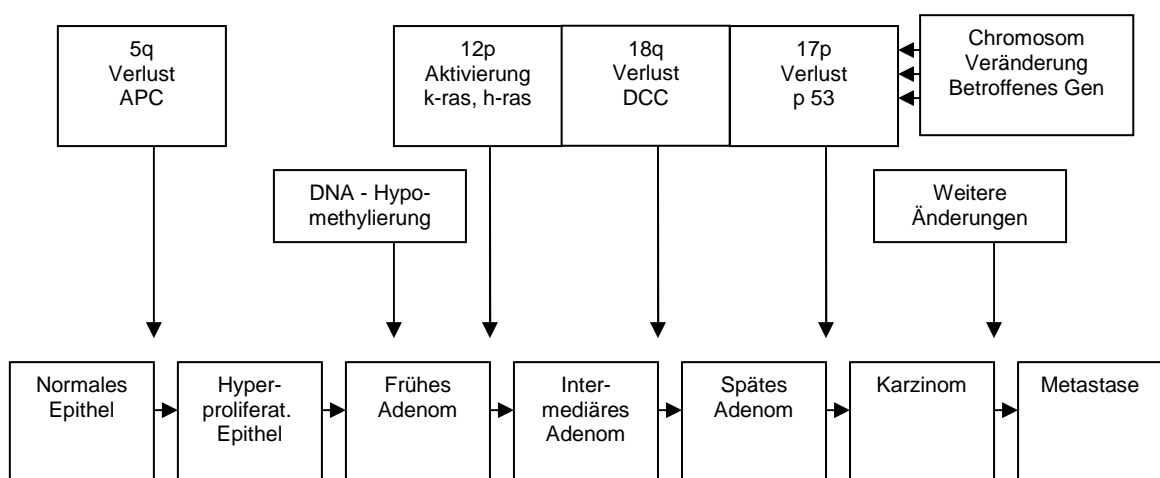
Der nächste Schritt der Tumorprogression ist eine Aktivierung des k-ras Onkogens, wodurch ein ständiger und nicht mehr steuerbarer Wachstumsreiz auf die Zelle ausgeübt wird und es zu einer Progredienz des unkontrollierten zellulären Wachstums kommt.

Spätere Ereignisse der Adenom-Karzinom-Sequenz sind der Funktionsverlust der Tumorsuppressorgene DCC (deleted in colon cancer) und dem p53. DCC-Mutationen resultieren in einer Schwächung des Zellzusammenhaltes und sind in ca. 70 % der kolorektalen Karzinome vorzufinden.

Der Ausfall des p53-Genprodukts ist mit fast 80 % die am häufigsten gefundene genetische Alteration im kolorektalen Karzinom und durch seine vielfältigen Funktionen als „Wächter des Genoms“ (Vousden et al., 2000) einer der bedeutendsten Schritte in der malignen Entartung.



Weitere genetische Veränderungen kommen durch die zunehmende genetische Instabilität der Zellen zustande. Wichtige Veränderungen sind der Verlust der Kontaktinhibition der Zellen. Durch Metalloproteinasen kommt es zu destruktiv-invasivem Wachstum in die Umgebung mit Infiltration von Lymph- und Blutgefäßen und damit gegebenem Metastasierungspotenzial. Wichtig ist auch die Expression von angiogenetischen Faktoren, welche eine Versorgung des wachsenden Tumors bzw. seiner Metastasen mit Blutgefäßen nach sich zieht.



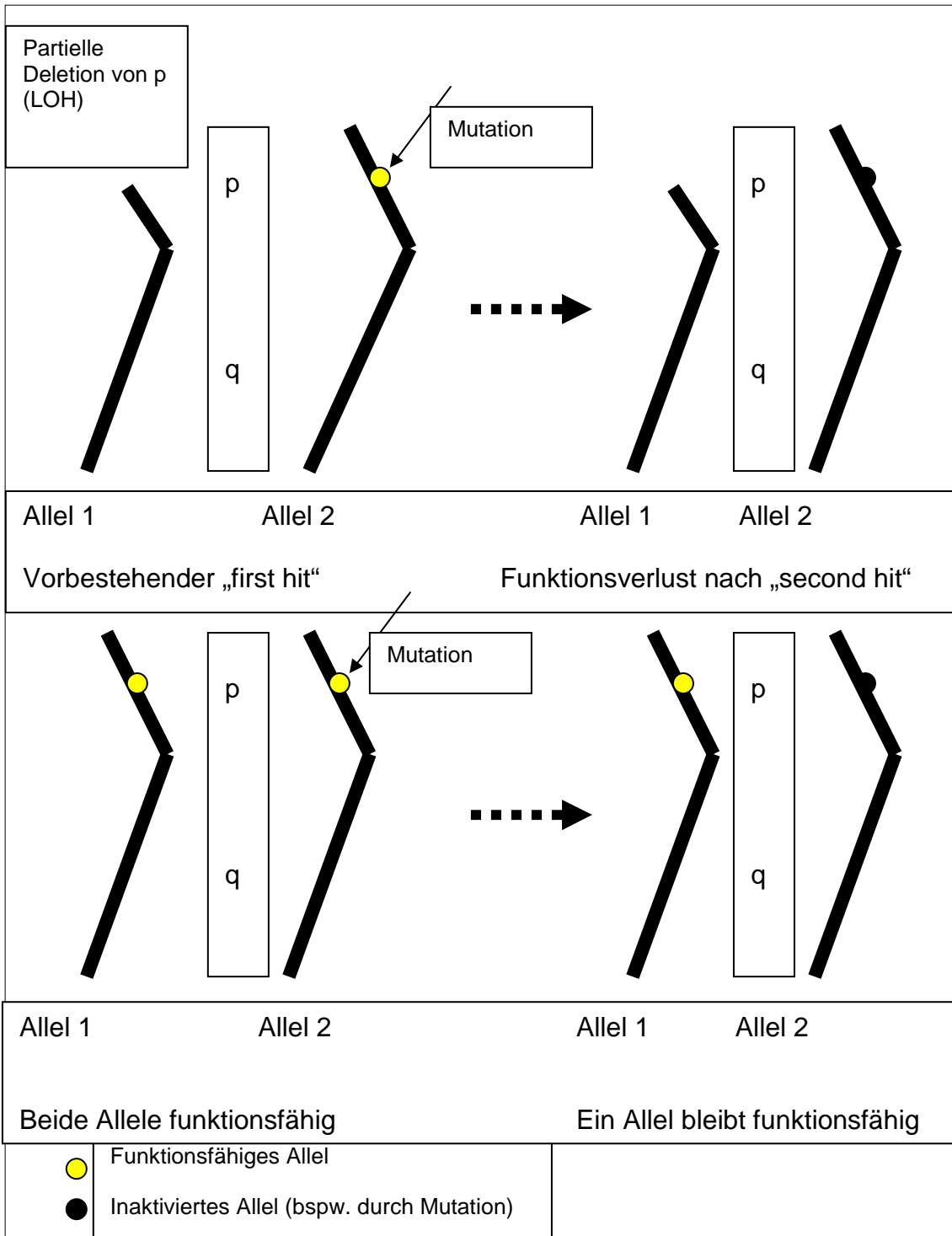
**Abbildung 1:** Adenom-Karzinom-Sequenz. Modifiziert nach Fearon und Vogelstein 1990.

### 1.3 Loss of Heterocosity und Two-Hit-Hypothese nach Knudson

“Loss of Heterocosity” (LOH) steht für den Heterozygotitätsverlust eines Locus durch den Verlust eines Allels auf einem der beiden Chromosomen. Dieser LOH tritt vor allem in Tumoren mit chromosomaler Instabilität auf, bei der es zu partiellen oder auch totalen Deletionen chromosomaler Abschnitte kommen kann. Dies spielt in der Genese von Karzinomen insofern eine Rolle, als dadurch ein „first hit“ eines Tumorsuppressorgens gesetzt werden kann, wenn dessen Locus im deletierten Bereich eines Chromosoms angesiedelt ist und durch den LOH eines der beiden Allele ausgeschaltet wird.

Knudson definierte 1971 seine „Two-Hit-Hypothese“ auf der Grundlage, dass zum völligen Funktionsverlust eines Gens beide Allele ausgeschaltet werden müssen. Der Ausfall des ersten Allels nach dem „first hit“ kann noch durch das intakte zweite Allel kompensiert werden. Wird dies allerdings ebenfalls Opfer einer Mutation oder Deletion, eines „second hit“, resultiert dies in einem Ausfall des Genprodukts (Abbildung 2).

Dieses Modell liegt den LOH-Analysen zum Auffinden potentieller Kandidaten für Tumorsuppressorgene zugrunde. Durch die Analyse von so genannten Mikrosatellitenmarkern (DNA-repeats mit 2 - 4 bp), die in der Nähe der zu untersuchenden Gene lokalisiert sind, können durch den Nachweis eines Heterozygotitätsverlustes (LOH) dieser Marker umschriebene Verlustregionen auf einem der beiden Chromosomen detektiert werden und anhand derer die in Frage kommenden Gene identifiziert werden. Für diese Analysen werden die Fragmentlängen (die für beide Allele häufig verschieden sind) von Tumorzellen und Schleimhautzellen des jeweiligen Patienten miteinander verglichen. Für deren Diskussion grundlegend ist natürlich die „Two-Hit-Hypothese“. Durch die Detektion des „first hits“ durch Deletion postuliert man den „second hit“ des zweiten Allels durch Mutation, da diese Region auf dem zweiten Chromosom nicht von einer Deletion betroffen ist. Finden sich identische LOH-Regionen signifikant häufig in einem Tumorkollektiv verschiedener Patienten, liegt dadurch die Vermutung nahe einem für die Tumorphorprogression bedeutenden Verlusts eines Gens auf der Spur zu sein, wie dies bei Tumorsuppressorgenen der Fall ist. Erstmals entdeckt wurde dieses Prinzip beim Retinoblastom-Gen (Cavenee et al., 1983). Auch Canzian et al. (1996) und Gruis et al. (1993) wiesen auf die bedeutende Rolle hin, welche die LOH-Analyse für die Detektion von Tumorsuppressorgenen hat.



**Abbildung 2:** Two-Hit-Hypothese für Tumorsuppressorgenausfall. Modifiziert nach Knudson 1971.

#### **1.4 Die Minimale Verlustregion (MRL) und ihre Bedeutung**

Als Minimale Verlustregion (Minimal Region of Loss, MRL) bezeichnet man die Region der DNA, welche bei Deletionsanalysen am häufigsten durch Verluste betroffen ist. Untersucht man bspw. mit Mikrosatellitenmarkern – wie dies in dieser Arbeit der Fall ist – einen breiteren Abschnitt der DNA und kartiert die Ausfallraten im Tumorkollektiv für die einzelnen Marker, so lässt sich der Überlappungsbereich der Ausfälle der einzelnen Tumoren als die Minimale Verlustregion definieren.

Dies ist insofern von Bedeutung als dass im Bereich der MRL das Gen/die Gene mit der größten Bedeutung als potentielle Tumorsuppressorgene vermutet werden dürfen.

Dieses Verfahren bietet auch die Möglichkeit, einen bestätigenden Hinweis auf ein Kandidatengen zu geben. Liegt die MRL im Bereich der Mikrosatellitenmarker, welche dem Kandidatengen am nächsten sind, kann dies als Bestätigung des Kandidatengens gesehen werden und bildet Grundlage für weitere Untersuchungen, wie beispielsweise einer immunhistochemischen Untersuchung oder einer Sequenzierung des Kandidatengens.

#### **1.5 Die Region 8p22 und ihre Rolle in kolorektalen Karzinomen**

Deletionsanalysen führten nicht nur zur Identifikation der Gene APC (5q22), p53(17p13) und DCC(18q21), sondern auch die Region 8p22 wurde als häufig deletierte Region beschrieben, ohne dass bisher ein Tumorsuppressorgen in dieser Region gefunden werden konnte (Levy et al., 1999; Fujiwara et al., 1993). Bei kolorektalen Karzinomen haben verschiedene Arbeitsgruppen einen LOH im Bereich 8p22 mit einem höheren Tumorstadium (Choi et al., 2002), einer fortgeschrittenen Tumorprogression (Fujiwara et al.; Chang et al., 2005), der Zunahme der Infiltrationsfähigkeit (Takanishi et al., 1997) sowie einer schlechteren Prognose bezüglich der Überlebenszeit der Patienten (Halling et al., 1999; Chang et al., 2005) korreliert.

## **2 Aufgabenstellung und Zielsetzung**

Bei kolorektalen Karzinomen konnte ein allelischer Verlust der chromosomalen Region 8p22 (Mikrosatellitenmarker D8S254) mit einer schlechteren Prognose für den Patienten assoziiert werden (Halling et al., 1999). Im Rahmen dieser Arbeit soll mittels 4 Mikrosatellitenmarkern eine Deletionsanalyse von 8p22 durchgeführt und versucht werden, die minimale Verlustregion um den Marker D8S254 zu bestätigen und weiter zu verfeinern. Dadurch wird eine Subgruppe von Karzinomen zur Verfügung stehen, bei der eine Analyse von Kandidaten-Tumorsuppressorgenen in der 8p22-Regionen möglich sein wird.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Untersuchtes Patientenkollektiv

Beim untersuchten Kollektiv handelt es sich um 48 Patienten, welche alle im Zeitraum von 1999 bis 2004 aufgrund einer Erkrankung an einem kolorektalen Karzinom am Universitätsklinikum Würzburg operiert wurden. Die Proben stammen aus dem 169 Tumor-/Schleimhautpaare umfassenden Kollektiv der Interdisziplinären Arbeitsgruppe Kolonkarzinom in Würzburg. Es standen jeweils DNA-Proben von zusammengehörigem Tumorgewebe und Normalschleimhautgewebe zur Verfügung. Bei allen Proben war sichergestellt, dass der Reinheitsgrad der Tumorgewebs-DNA ausreichend hoch war (Kontamination mit "normaler DNA" < 50 %). Von den Patienten waren 30 männlichen und 18 weiblichen Geschlechts. Das Durchschnittsalter liegt bei 65,8 Jahren.

Nummer	Sex	Alter	Stadium	G
1	W	53	1	2
2	M	65	3	2
3	W	66	3	2
4	M	72	3	2
5	M	56	2	2
6	M	60	2	2
7	M	64	3	2
8	M	77	3	2
9	M	60	4	2
10	M	74	2	3
11	M	65	1	2
12	W	78	2	2
13	W	70	2	2
14	W	69	1	2
15	M	70	2	2
16	W	-	-	1
17	M	73	1	2
18	M	75	2	3
19	M	68	3	2
20	W	66	2	2
21	M	74	2	2
22	W	64	4	2
23	W	82	2	2
24	M	64	3	2

Nummer	Sex	Alter	Stadium	G
25	W	70	2	3
26	M	60	2	2
27	M	69	2	2
28	M	72	1	2
29	W	74	4	2
30	M	55	3	3
31	M	47	3	2
32	M	72	2	2
33	W	88	2	2
34	M	71	3	3
35	W	78	2	2
36	M	64	1	2
37	M	78	2	2
38	W	68	3	2
39	M	62	2	2
40	M	66	3	3
41	W	66	4	3
42	W	55	4	3
43	M	64	2	2
44	M	72	2	3
45	W	63	4	2
46	M	78	3	3
47	W	82	4	3
48	M	70	2	2

**Tabelle 1:** Patientendaten (Sex = Geschlecht, M=Männlich, W=Weiblich, Stadium nach UICC-Einteilung, G=Grading des Tumors)

## 3.2 Material

### 3.2.1 Geräte, Software, Verbrauchsmaterial, Chemikalien, Kits

#### 3.2.1.1 Geräte

Gerät	Typ	Hersteller	Ort
Autoklav		Fedegari	Albuzzano, Italien
Elektrophoresekammer	- Mini Protein II Cell - Electrophoresis Power Suuply EPS 3500	BioRad Pharmacia	Hercules CA, USA
Gefrierschrank (-70 °C)		Liebherr	
Magnetrührer	Ikamag RCT	IKA-Labortechnik	Staufen i.Br.
Mikrowelle		Philipps	
PCR-Maschine	Thermocycler „T-Gradient“	Biometra	Göttingen
Photometer	Ultrospec 2100 pro	Amersham Biosciences	Freiburg
Pipetten (2,5; 10; 20; 100; 200; 1000µl)		Eppendorf	Hamburg
Präzisionswaage	Präzisionswaage	Sartorius	Göttingen
Sequencer	CEQ 8000 Genetic Analysis System	Beckman Coulter	Fullerton CA, USA
Thermoschüttler		GFL	Burgwedel
UV-Illuminator	TI 3 (312nm)	Biometra	Göttingen
Videodokumentations-System	Biometra Biodoc	Biometra	Göttingen
Vortex	- Vortex Genie 2  - MS2 Minishaker	Bender & Hohbein AG IKA Works Inc.	Zürich, CH  Wilmington NC, USA
Zentrifugen	- Biofuge Fresco - Microfuge	Heraeus Sigma-Aldrich	Hanau

#### 3.2.1.2 Software

Software	Hersteller
CEQ Software Version 9.0	Beckman Coulter

### 3.2.1.3 Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Firma	Herkunftsort
Aqua ad iniectabilia	Delta Select	Pfullingen
Chirurgische Einmal-Skalpelle	Braun Aesculap	Tuttlingen
Öl "Mineral Oil"	Beckman Coulter	Fullerton CA, USA
Pipettenspitzen ep T.I.P.S. 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf Biopur	Hamburg
Proben-Platte "Costar 6551"	Corning	New York NY USA
Puffer-Platte „Costar 3590“	Corning	New York NY USA
Reaktionsgefäße - 1,7 ml "Safe seal Microcentrifuge Tubes" - 1,5 ml "Micro tube 1,5ml Safety Cap"	Sörenson Bio Science Sarstedt	West Salt Lake City UT, USA Nürnbergrecht

### 3.2.1.4 Kits/PCR-Reagenzien

Kit	Inhalt	Firma	Herkunftsort
DNAeasy® Tissue Kit	ATL-Puffer (Gewebe-Lysis-Puffer) AE-Puffer (Elutionspuffer) AW1-Puffer (Waschpuffer) AW2-Puffer (Waschpuffer) AL-Puffer (Präparationspuffer) Proteinase K Dneasy Mini spin column + 2ml collection tubes	Qiagen	Hilden
Nucleotidlösung	peqGold dNTPset	Peqlab	Erlangen
Polymerase	Taq-DNA-Polymerase, recombinant	Invitrogen	Karlsruhe
PCR-Buffer		Invitrogen	Karlsruhe
Sample Loading Solution (SLS)	Sequencer-Puffer für die Probenplatte	Beckman Coulter	Fullerton CA, USA
Separation Buffer	Separations-Puffer pH 7,0 für die Pufferplatte	Beckman Coulter	Fullerton CA, USA



### 3.2.1.5 Größenmarker

Beschreibung	Artikelbezeichnung	Hersteller	Herkunftsort
DNS-Längenstandard bis 400 bp für Sequencer	Ceq DNA-Size Standard Kit 400	Beckman Coulter	Fullerton CA, USA
DNS-Längenstandard	100 bp DNA ladder	Promega	Mannheim

### 3.2.1.6 Reagenzien

Name	Hersteller	Herkunftsort
Agarose „peq GOLD Universal Agarose“	PeqLab	Erlangen
Aqua dest		
Borsäure	Merck	Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
DNTP	Promega	Mannheim
EDTA	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
EDTA 0,5M pH 8.0	Gibco BRL	Eggenstein
Ethanol 96 %	J.T.Baker	VA Deuter, Holland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
NaCl	Merck	Darmstadt
Trishydroxymethylaminomethan	Merck	Darmstadt
Tris-HCl	Merck	Darmstadt
Xylen (für DNA-Iso)		

### 3.2.1.7 Puffer und Gele

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
10 × TBE (Tris-Borat-EDTA-Puffer)	54,45 g Tris base 27,5 g Borsäure 20 mM EDTA (0,5 M) pH 8,0 ad 500 ml Aqua dest.
1 ×TBE	100 ml 10×TBE-Puffer 900 ml Aqua dest.
1,5 % Agarose-Gel	1,5 % Agarose in 1xTBE-Puffer 10 mg/ml Ethidiumbromid

### 3.2.2 Verwendete Mikrosatellitenmarker

Primer sind Oligonucleotide und spezifisch für den bei der Polymerase- Ketten-Reaktion zu amplifizierenden Abschnitt der DNA. Das Primer-Paar besteht aus forward- und reverse-Primer und flankiert jeweils auf 5'- und 3'-Strang der DNA der Mikrosatellitenmarker. Mikrosatelliten sind Basennucleotidrepeats in der DNA mit einer Länge zwischen 2 und 4 Basenpaaren (z. B. (CA)<sub>n</sub> ist ein Dinucleotidrepeat, (TAA)<sub>n</sub> ist ein Trinucleotidrepat). Da Mikrosatelliten häufig heterozygot sind, d. h. verschiedene Wiederholungszahlen für die Repeats in den beiden Allelen der beiden Chromosomen aufweisen, lassen sie sich sehr gut für die LOH-Analysen verwenden. Werden in der Schleimhautanalyse zwei verschieden lange Fragmente im PCR-Produkt nachgewiesen, ist der Mikrosatellit heterozygot. In diesem Fall kann der Verlust oder eine deutlich verminderte Amplifikation eines Allels im zugehörigen Tumor-DNA-PCR-Produkt nachgewiesen und somit ein LOH bestätigt werden. Ist ein Marker einer Schleimhautprobe homozygot, d. h. wird an beiden Allelen in der PCR gleich lange PCR-Produkte produziert, ist eine LOH-Analyse nicht möglich, da nicht über den Verlust eines Allels im Tumorgewebe entschieden werden kann.

In Tabelle 2 sind alle ursprünglich verwendeten Mikrosatellitenmarker aufgeführt und in ihren wichtigsten Eigenschaften spezifiziert.

Marker	Abschnitt auf Chromosom 8p (bp)	Primer-Sequenz	Repeat	Markierung	Size (bp)	Firma
D8S542	10.195.012 – 10.195.146	ff: 5'-AAT CAC CTA NAC TAC TGC CA rev: 5'-ATC TGA TGG GGA GTT ATG TAT TC	(CA) <sub>n</sub>	Dye 4	240	Sigma Proligo
D8S549	15.693.981 – 15.694.215	ff: 5'-AAA TGA ATC TCT GAT TAG CCA AC rev: 5'-TGA GAG CCA ACC TAT TTC TAC C	(CA) <sub>n</sub>	Dye 4	170	Sigma Proligo
D8S254	16.652.437 – 16.652.634	ff: 5'-TGC CGG ACA TAC ATT AGT GA rev: 5'-TTG TAA ACA CCA CAA GCA GG	(CA) <sub>n</sub>	Dye 4	65-75	Sigma Proligo
D8S261	17.870.470 – 17.870.849	ff: 5'-TGC CAC TGT CTT GAA AAT CC rev: 5'-TAT GGC CCA GCA ATG TGT AT	(CA) <sub>n</sub>	Dye 4	128- 144	Sigma Proligo

Marker	Abschnitt auf Chromosom 8p (bp)	Primer-Sequenz	Repeat	Markierung	Size (bp)	Firma
D8S1734	22.851.147 – 22.851.423	ff: 5'-GCT ATC CAC TTG TCC CAG A rev: 5'-AGC CCA GAA ATA AAC CCT C	(CA) <sub>n</sub>	Dye 4	98-120	Sigma Proligo

**Tabelle 2:** Spezifizierung der verwendeten Primer (ff: forward, rev: reverse)

### 3.3 Methoden

#### 3.3.1 DNA – Extraktion und Konzentrationsanpassung

Zur DNA-Gewinnung wurden tiefgefrorene Gewebeproben von Tumor und korrespondierender kolorektaler Schleimhaut herangezogen. Die Extraktion erfolgte unter Gebrauch des DNeasy-Extraktionsset der Firma Qiagen™. Dafür mussten vom jeweiligen Gewebe 4 – 5 Proben mit einem Gesamtgewicht von ungefähr 25 mg abgetrennt werden, was mit der Präzisionswaage überprüft wurde. Diese wurden in ein steriles 2 ml Eppendorf-Gefäß eingelegt, mit 1200 µl Xylol versetzt und gründlich unter Gebrauch des Vortex vermischt. Dann folgte eine 5-min-Phase in der Zentrifuge bei 13000 rpm (Umdrehungen pro Minute). Der verbleibende Überstand nach dem Zentrifugieren war zu verwerfen. Zur Entfernung des sich noch im Ansatz befindlichen Xylens wurden 1200 µl 96 %igen Ethanols beigefügt, vorsichtig vermischt und abermals für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überschuss konnte durch Abpipettieren entfernt werden. Dieser Vorgang wurde zweimal durchgeführt. Das Eppendorfgefäß wurde nun bei geöffnetem Deckel für 10 - 15 min in einen auf 37 °C temperierten Thermoschüttler gestellt, um auch das restliche Ethanol durch Verdampfung größtenteils aus dem Ansatz zu entfernen. Dem verbliebenen Sediment wurden nun 180 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinkinase K zugesetzt und nach guter Durchmischung für ca. 3 Stunden bei 55 °C zur Gewebelyse im Thermoschüttler inkubiert. Im anschließenden Schritt wurden nach 15 sec im Vortex 200 µl AL-Puffer beigefügt und der Ansatz nach nochmaliger Durchmischung für ungefähr 10 min bei 70 °C ins Wasserbad gegeben. Danach wurden 200 µl 96 %iges Ethanol beigemischt und der Ansatz in eine spezielle DNA-Säule („DNeasy Mini spin column“) überführt sowie in ein

spezielles Übergefäß („collection tube, 2 ml) verbracht. Im nächsten Schritt musste der Ansatz für 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert werden. Das Übergefäß konnte einschließlich des Filtrates verworfen werden. Die DNA-Säule dagegen wurde in ein neues 2-ml-Übergefäß gegeben, mit 500 µl AW1-Puffer versetzt und abermals für 1 min bei 8000 rpm in die Zentrifuge gegeben. Übergefäß und Filtrat waren wieder zu verwerfen – die DNA-Säule in einem neuen 2-ml-Übergefäß mit 500 µl AW2-Puffer zu vermischen. Anschließend musste der Ansatz 3 min bei 14000 rpm bis zur Trocknung der Membran in der DNA-Säule zentrifugiert werden. Auch nach diesem Schritt konnten Übergefäß und Puffer verworfen werden. Die DNA-Säule dagegen wurde in ein 1,5-ml-Eppendorf-Gefäß platziert und die Membran der Säule mit 200 µl AE-Puffer aus der Pipette benetzt. Dieser Ansatz wurde dann für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss bei 8000 rpm 1 min abzentrifugiert. Das Eppendorf-Gefäß enthielt nun die eluierte DNA. Die Eluation erfolgte mit einem zweiten Gefäß ein weiteres Mal. Resultierend erhielt man 2 DNA-Eluat, deren Konzentration nun im Photometer bestimmt werden konnte.

Die Konzentrationsbestimmung der DNA im Photometer ist aufgrund ihres spezifischen Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260 \text{ nm}$  möglich. Dabei entspricht eine  $E(260) = 1$  ungefähr 40 µg/ml DNA.

Um in allen DNA-Proben gleiche Konzentrationen zu gewährleisten, wurden diese nach photometrischer Bestimmung ihrer Konzentration mit destilliertem Wasser einer Konzentration von 10 ng/µl DNA angepasst. Gelagert wurden die DNA-Proben bei -20 °C. Bei der späteren Probenentnahme betrug die Zeit im aufgetauten Zustand jeweils nur wenige Minuten, um einer Schädigung der Probe vorzubeugen.

Auch die Primer der verschiedenen Mikrosatellitenmarker, welche in trockenem Zustand von der Firma Proligo geliefert wurden, mussten durch Beimischung von destilliertem Wasser der Arbeitskonzentration angepasst werden. Dabei wurde erst eine Grundverdünnung von 100 pmol/µl eingestellt. Da sich die Primer untereinander tlw. in ihrer idealen Arbeitskonzentration unterschieden, wurden diese später den Bedürfnissen entsprechend in gemischten

Primerlösungen (Mischung von ff- und rev- Primer, sowie der Primer untereinander aufgrund des Einsatzes in der Multiplex-PCR) für die PCR aufbereitet (vgl. 4.1.1 – 4.1.4, sowie 4.2.1 und 4.2.2).

### 3.3.2 PCR- Techniken

#### 3.3.2.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (engl. Polymerase – Chain – Reaction, kurz PCR) wurde erstmalig im Jahre 1986 durch Saiki et al. beschrieben (Saiki et al., 1986). Diese Methode der Vervielfältigung spezifischer DNA-Abschnitte ist heute in Forschung, Diagnostik, aber auch in der Forensik sehr weit verbreitet. Unter Verwendung von thermostabilen Polymerase–Enzymen, den Taq-Polymerasen, die ursprünglich in thermophilen Bakterien isländischer Geysire entdeckt wurden, können durch entsprechend lokalisierte Amplimere (Oligonukleotide mit ungefähr 18 - 25 Nukleotiden Länge), den so genannten Primern, in vitro die gewünschten DNA-Regionen spezifisch und exponentiell vervielfältigt werden. Dabei wird die Basensequenz der Primer so gewählt, dass sie sich durch die Folge der Basen an die spezifischen, gewählten DNA-Sequenzen anlagern können. Somit ist die PCR Grundvoraussetzung für die Analysen von Fragmentlängen oder auch für Sequenzierungen und damit Grundstein der in dieser Arbeit durchgeführten Fragmentlängenanalysen.

Das Grundprinzip der PCR lässt sich in drei Phasen unterteilen:

- **Melting (Denaturierung):** Durch Erhitzen des PCR-Ansatzes auf 93 °C - 95 °C lassen sich die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen der DNA-Stränge auftrennen, so dass die einzelnen Stränge voneinander isoliert werden.
- **Annealing (Anlagern der Primer):** Durch leichtes Abkühlen des Ansatzes kann die Anlagerung der Primer an ihre Bindungsstellen an der DNA erfolgen. Die dafür nötige Zieltemperatur ist für die Primer aufgrund der unterschiedlichen Basensequenzen unterschiedlich und liegt meist im Bereich von 50 °C – 70 °C.

- **Elongation (Synthese der DNA-Fragmente):** Die Zieltemperatur für diesen Schritt liegt – je nach Ansatz – bei 70 °C – 75 °C. Die hitzestabile Taq-Polymerase kann an den Primern ansetzen und komplementär zum jeweiligen DNA-Matrizenstrang die Fragmente verlängern. Für die Reaktion sind spezifische Parameter der Lösung einzuhalten, welche in fertigen Kits gekauft werden können. Unabdingbar ist die Anwesenheit der 4 Desoxynucleotidtriphosphate dATP, dCTP, dTTP und dGTP welche die „Bausteine“ der DNA-Amplifikation darstellen.

Dieser Zyklus aus Melting – Annealing – Elongation wird von so genannten PCR-Thermocyclern gesteuert und 20 – 30-mal durchlaufen.

Nachfolgend erscheint eine Zusammenstellung der für die PCR benötigten Reagenzien. Genaue Konzentrationsangaben folgen in den Beschreibungen der einzelnen Marker (vgl. 4.1.1 - 4.1.4, 4.2.1, 4.2.2).

- DNA-Probe (z. B. Tumor-DNA, bzw. Schleimhaut-DNA)
- Primer, (jeweils einen forward (ff.) und reverse (rev). Teil) evtl. mit farblicher Markierung für die Auswertung im Sequencer
- Taq-Polymerase
- PCR-Puffer, der für die zur Einhaltung des bevorzugten Arbeitsmilieus der Taq-Polymerase nötig ist
- Desoxydinucleotidtriphosphate: dATP, dGTP, dCTP, dTTP
- destilliertes Wasser
- PCR-Thermocycler,
- Arbeitsmaterialien wie Reaktionsgefäße, Pipetten, Pipettenspitzen, Einmalhandschuhe, Eisbox zur Kühlung der DNA-Proben und Primerlösungen während der Arbeitsschritte, Reaktionsgefäßhalterungen

### **3.3.2.2 Touchdown-PCR (Td-PCR):**

Die Touchdown-PCR ist ein Verfahren möglichst reine PCR-Produkte zu erhalten. Dabei werden bspw. die ersten 5 Schritte mit sinkender Annealing-Temperatur durchgeführt, bspw. beginnend bei 57 °C, dann die nächsten 5 Zyklen jeweils das Annealing um 1 °C erniedrigt, um dann für die verbleibenden Zyklen konstant zu bleiben. Dadurch soll ein möglichst spezifisches Anlagern der Primer an die Bindungsstellen gewährleistet werden, da anderenfalls desöfteren mit der Amplifikation so genannter „unspezifischer Abschnitte“ gerechnet werden muss, welche eine Art Verschmutzung der Probe darstellen und die spätere Auswertung behindern können. Die Td-PCR lässt sich an den geeigneten Thermo-Cylern programmieren.

### **3.3.2.3 Multiplex**

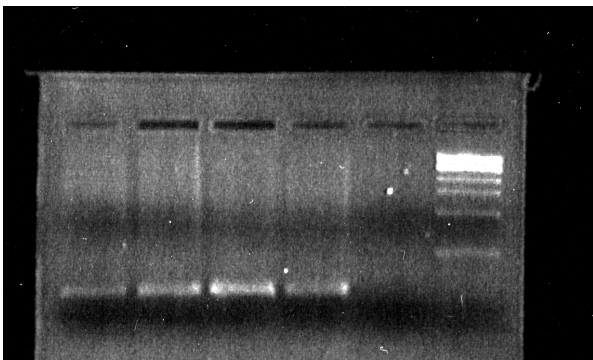
Bei der Multiplex-PCR werden mehrere Primerpaarungen (ff und rev) gleichzeitig im selben PCR-Ansatz verwendet. Dies setzt verständlicherweise voraus, dass diese in etwa die gleichen Reaktionsbedingungen benötigen. Auch ist auf die nachfolgende Unterscheidung der produzierten Fragmente zu achten. Es sind nur solche Primer sinnvoll „plexbar“, die für den Einsatz am Sequencer unterschiedliche Farbmarkierungen aufweisen, bzw. sich in den Längen der produzierten Fragmente so unterscheiden, dass diese problemlos in der Analyse zu identifizieren sind.

In der praktischen Umsetzung eines PCR-Ansatzes wird zur Kontrolle der Kontaminationsfreiheit mit Fremd-DNA immer eine so genannte Negativkontrolle mit angesetzt. Dabei wird in einen standardgerechten PCR-Ansatz Wasser anstelle der DNA-Probe gegeben. Bei Kontaminationsfreiheit sollten sich in der späteren Analyse der PCR-Produkte in diesen Proben keine Fragmente finden.

### 3.3.3 Agarose-Gel-Elektrophorese

Prinzip:

Die Agarose-Gel-Elektrophorese, ein molekularbiologisches Verfahren, welches im Rahmen dieser Arbeit zur Erfolgskontrolle der PCR eingesetzt wurde, trennt die DNA-Fragmente nach der Amplifikation in der PCR nach ihrer Größe auf. Das „Gel“ wird durch eine Kombination aus TBE-Puffer, Agarose und Ethidiumbromid hergestellt. In so genannten „Taschen“ wird die DNA nach farblicher Markierung der Aufbereitung eingebracht und eine elektrische Spannung angelegt. Die negativ geladenen DNA-Fragmente wandern dementsprechend dem Pol der Anode entgegen. Die längeren Fragmente laufen aufgrund der Interaktion mit der Gelmatrix langsamer als die kurzen Fragmente. Dadurch erfolgt eine Aufspaltung der DNA-Fragmente nach ihrer Länge. Nach genügend langer „Wanderungszeit“, meist ungefähr 45 min, ersichtlich durch die aufgrund ihrer negativen Eigenladung ebenfalls wandernden Farbwolke des loading buffers, kann die Auswertung erfolgen. Dazu wird das Gel aus der Kammer genommen und unter einem UV-Illuminator verbracht. Das Ethidiumbromid des Gels lagert sich in die DNA-Fragmente ein und es kommt zu einer Fluoreszenz unter dem UV-Licht (Abbildung 3). Zur Größenabschätzung der Fragmente wird in einer Tasche ein standardisierter Größenmarker mit definierten Fragmentlängen eingesetzt. Da Ethidiumbromid hoch karzinogen ist, ist bei der Agarose-Gel-Elektrophorese auf sauberes Arbeiten, Verwendung spezieller Handschuhe und möglichst auf Verschmutzungsfreiheit des Umfeldes peinlichst genau zu achten!



**Abbildung 3:** Agarose-Gel-Elektrophorese des PCR-Produktes des Markers D8S542. Vom linken Bildrand an sind die 4 Bahnen der PCR-Produkte zu erkennen. In Bahn 5



*zeigt sich in der Negativkontrolle aus der PCR (Wasser anstelle von DNA im PCR-Ansatz zur Überprüfung eines kontaminationsfreien Arbeitens) keine Fluoreszenz. Bahn 6 ist dem Längenstandard vorbehalten.*

### **Durchführung:**

Für die Agarose-Gel-Elektrophorese werden folgende Utensilien benötigt:

- DNA-template (PCR-Produkt)
- DNA-Längenstandard/Größenmarker
- TBE-Puffer
- Agarose-Pulver
- destilliertes Wasser
- Ethidiumbromid
- Bromphenolblau zur farblichen Markierung der DNA zur Abschätzung der Laufweite der DNA-Wolke
- Gel-Elektrophoresekammer mit Elektroden, inklusive Schlitten zum Eingießen des Gels und „Kamm“ zum Herstellen der „Taschen“
- Pipetten, Pipettenspitzen, Erlenmeyerkolben, Handschuhe, Mikrowelle, UV-Illuminator, Reaktionsgefäße, Präzisionswaage

Es wurden 0,6 g Agarose-Pulver mit 40 ml 1 x TBE-Puffer in einem Erlenmeyerkolben vermischt und kurz in einer Mikrowelle aufgekocht, bis das Gemisch klar erscheint. Nach kurzer Abkühlzeit erfolgte das Umfüllen in einen speziellen Erlenmeyerkolben, in welchem dann 1 µl Ethidiumbromid zugesetzt wurde und durch vorsichtiges Schwenken vermischt wurde. Während des weiteren Abkühlens wurde der Schlitten quer zur Laufrichtung in der Gelkammer eingesetzt, auf dichtes Abschließen der Seiten war zu achten. Nach Einsetzen des Kamms in den Schlitten zur Herstellung der Taschen wurde das Gelgemisch vorsichtig in den Schlitten gefüllt. Auf blasenfreies Gießen war zu achten. Nach ungefähr 15 min war das Gel kalt und von fester Konsistenz. Der Kamm konnte nun gezogen werden und der Schlitten um 90° längs zur Laufrichtung in der Kammer gedreht werden. Die Kammer wurde nun mit 1 x TBE-Puffer soweit geflutet, bis das Gel ungefähr 0,5 cm unter der Oberfläche

zu liegen kam und sich beide Elektroden ausreichend in der Flüssigkeit befanden.

Die DNA-Proben wurden folgendermaßen aufbereitet: 5 µl des PCR-Produktes wurden jeweils in ein 1 ml fassendes Eppendorfgefäß verbracht und mit ebenfalls 5 µl loading buffer (Bromphenolblau) versetzt. Für den Längenstandard wurde in einem eigenen Eppendorfgefäß ein Ansatz aus 2,5 µl Längenstandard, 7,5 µl destilliertem Wasser und 5 µl Bromphenolblau angesetzt.

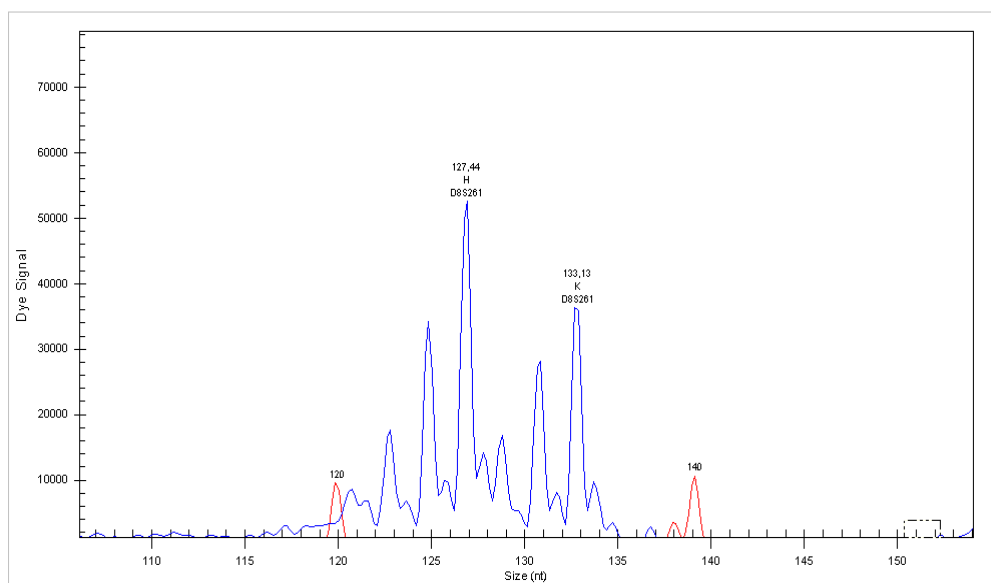
Nun wurden die einzelnen Taschen (welche den Bahnen des Laufes entsprechen) mit der jeweils vorgesehen Probe bzw. eine Bahn mit dem Längenstandardansatz zu 10 µl aus einer Pipette beschickt. Danach wurde der Deckel auf die Kammer gesetzt, die Elektroden angeschlossen und bei einer Spannung von  $U = 100V$  für ca. 40 min der Lauf gestartet. Abzuschätzen war der richtige Zeitpunkt zur Auswertung, wenn die orangene Bande der Farbmarkierung ungefähr  $\frac{3}{4}$  der Gellänge durchschritten hatte. Das Gel konnte nun aus der Kammer genommen werden und unter dem UV-Illuminator ausgewertet und fotodokumentiert werden.

#### **3.3.4 Fragmentlängenanalyse am Sequencer**

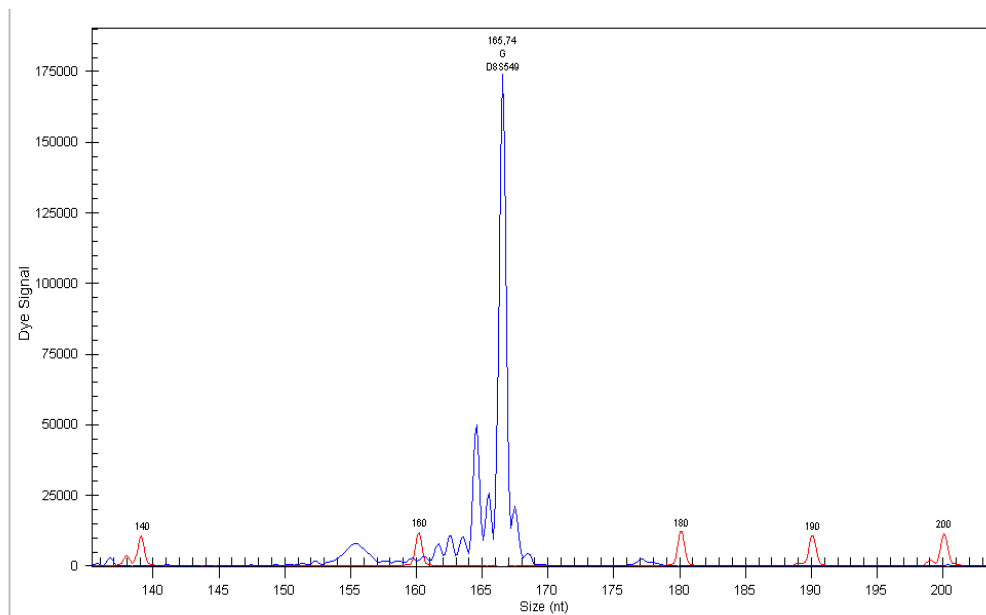
Die Analyse der Längenfragmente zur LOH-Analyse erfolgte an einem Sequenziergerät der Firma Beckman-Coulter vom Typ CEQ 8800 nebst zugehöriger Software der Version 9.0. Dieses Gerät arbeitet mit dem Prinzip der Glaskapillarelektrophorese (verwendeter Kapillardurchmesser 75 µm) mit Hilfe des elektrophoretischen und des elektroosmotischen Flusses. Der elektrophoretische Fluss basiert auf der elektrischen Anziehungskraft, welche die negativ geladenen DNA-Fragmente der Proben zum Fluß durch das Kapillarsystem des Automaten veranlasst. Dies geschieht durch eine angelegte, positive elektrische Spannung. Der elektroosmotische Fluss wirkt auf die Fragmente durch das in der Kapillare angelegte Potential, welches den gesamten Elektrolytfluss bedingt.

Die Wanderungsgeschwindigkeit bis zum Detektierlaser des Gerätes ist multifaktoriell beeinflusst, z. B. durch die Kapillarlänge, deren Durchmesser, der

Länge und Ladung der Fragmente, dem pH-Wert des Milieus sowie der angelegten Spannung. Durch Koordination der Faktoren lassen sich anhand der gemessenen Laufzeit den DNA-Fragmenten, welche anhand der dye4-Markierung der ff-Primer vom Laser erkannt werden konnten, spezifische Fragmentlängen zuordnen. Somit konnte anhand der Messpeaks entschieden werden, ob zwei verschieden lange Fragmentlängen, also zwei Allele (heterozygot) in der Schleimhaut-Probe amplifiziert wurden oder zwei gleich lange Fragmente, homozygote Allele in der Schleimhaut-Probe, vorhanden waren (Abbildungen 4, 5).

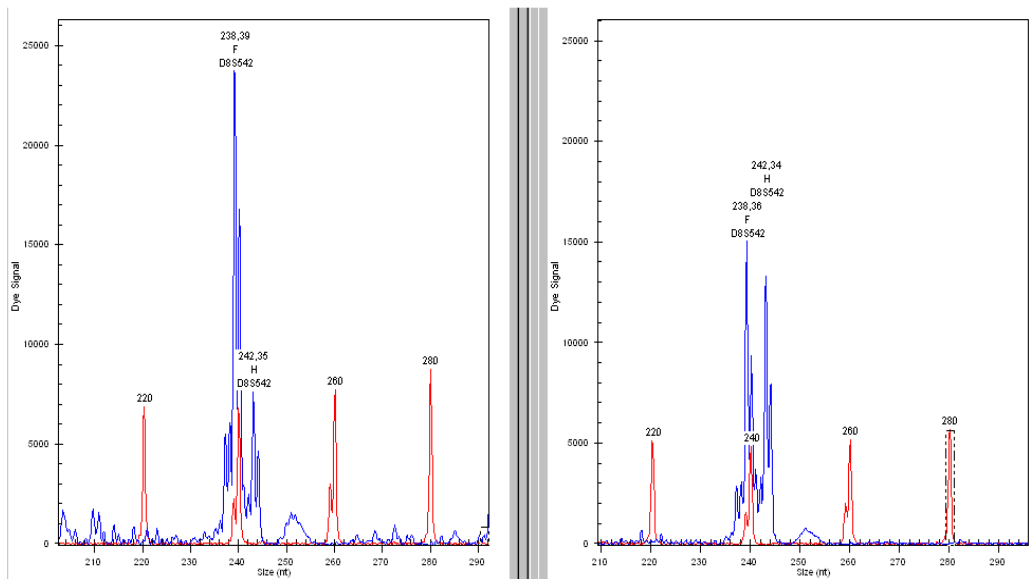


**Abbildung 4:** Heterozygote Schleimhautprobe (Untersuchung der Schleimhautprobe der Nummer 85 mit dem Marker D8S261). Die mit „H“ und „K“ bezeichneten Peaks zeigen die beiden verschieden langen Fragmente der Allele dieser Probe.

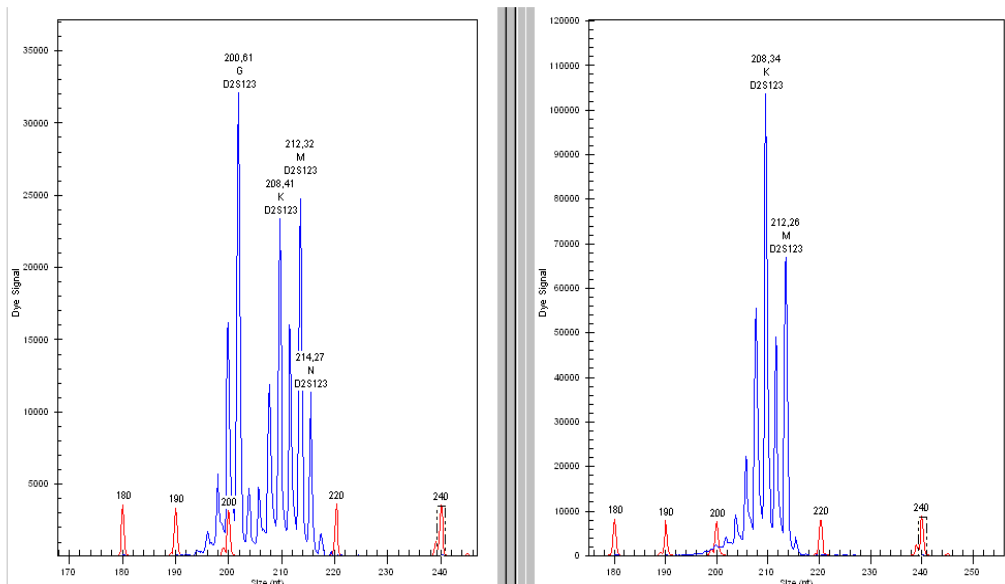


**Abbildung 5:** Homozygote Schleimhautprobe (Untersuchung der Schleimhautprobe der Nummer 85 mit dem Marker D8S549). *Der Marker ist homozygot, d. h., die produzierten Fragmente der beiden Allele weisen die gleiche Länge (bp) auf und stellen sich deshalb überlagernd als ein Peak dar. Eine Auswertung bzgl. eines LOH ist somit nicht möglich.*

Durch Vergleich mit dem Probenprofil der korrespondierenden Produkte der Tumor-DNA konnte bei einem Intensitätsverlust bzw. völligen Verlustes eines Allels über einen LOH entschieden werden (Abbildung 6). Schleimhaut-Tumoraare, die bezüglich des zu bearbeitenden Markers homozygote Allele aufwiesen, also zwei gleich lange Fragmente aufwiesen, waren nicht analysierbar. Ebenso konnten Tumorproben, welche eine MSI zeigten, nicht in die Auswertung eingehen. Da in dieser Arbeit nur mit Tumoren gearbeitet wurde, welchen bereits in anderen Markern ein eindeutiger LOH nachgewiesen wurde, traten erwartungsgemäß keine Fälle von MSI auf. Beispielhaft ist jedoch in Abbildung 7 an der Probe Nummer 15 durch den Marker D2S123 im Rahmen einer Doktorarbeit ein MSI dargestellt.



**Abbildung 6:** Beispiel eines LOH (Tumor- (links) und Schleimhaut- (rechts) Probe der Nummer 91, analysiert mit dem Marker D8S542). In der Schleimhautprobe sind die beiden heterozygoten Allele F und H zu erkennen. Im Vergleich dazu fällt bei der Tumorprobe der deutlich intensitätsgeschwächte Peak des Allels H auf (63 % Intensitätsverlust) während sich Allel F weiterhin konstant kräftig darstellt. Hier liegt ein Verlust der Heterozygotität (LOH) vor.



**Abbildung 7:** Beispiel für Mikrosatelliteninstabilität (MSI). Probe Nr. 15, Marker D2S123. Im rechten Bild ist die Schleimhautprobe, im linken die Tumorprobe dargestellt. Während sich in der Schleimhautprobe die beiden Allele K und M deutlich

*definieren lassen, kommt es in der Tumorprobe durch den Ausfall des Mismatch-Repair- (MMR-) Systems des Tumorgewebes zu einer „scheinbaren“ Darstellung multipler Allele, wodurch eine Auswertung im Rahmen der LOH-Analytik unmöglich gemacht wird. (Bild darf freundlicherweise aus der Doktorarbeit von Lisa Sauerhöfer als Beispiel übernommen werden.)*

Für den Ansatz im Sequencer waren je Probe folgende Substanzen in die vorgesehenen Probenfelder der speziellen Sequenzierplatten der Firma Beckman Coulter zu pipettieren:

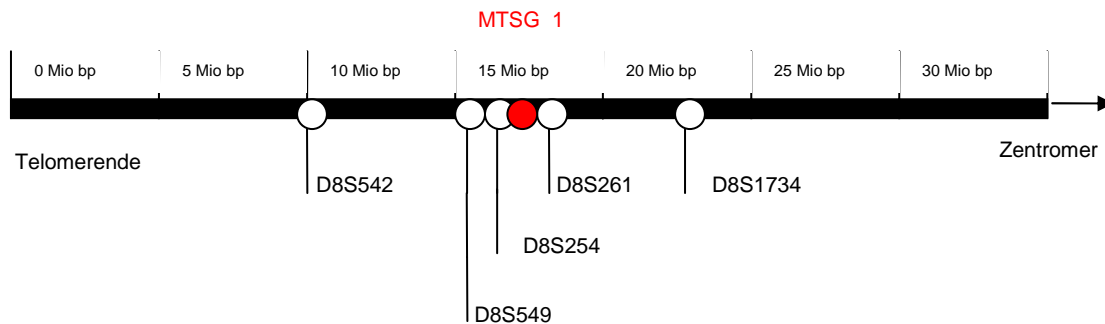
- PCR-Produkt mit 100 µl A.d auffüllen und dann jeweils 3 µl in die vorgesehenen Probenfelder pipettieren
- den Ansatz mit 30 µl destilliertem Wasser auffüllen
- 3 µl eines speziellen size standards, der ebenfalls fluoreszenzmarkiert ist, zugeben. Dieser ist für die automatische Auswertbarkeit durch die Software sehr wichtig
- 1 Tropfen Mineral Oil als Verdunstungsschutz auf jedes Probenfeld geben.

In einer zweiten Platte wurden die mit den Proben korrespondierenden Feldern zu 2/3 mit dem speziellen Sequenzierpuffer, welcher ebenfalls von der Firma Beckman Coulter hergestellt wird, gefüllt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Etablierung der verwendeten Mikrosatellitenmarker

Die verwendeten vier Marker (D8S542, D8S549, D8S261 und D8S1734) wurden so gewählt, dass diese den interessierenden Bereich um den Marker D8S254 flankierten. Eine Deletionsanalyse des Markers D8S254 wurde im Rahmen einer vorangegangenen Doktorarbeit durchgeführt (Rosler, 2007). In Abbildung 8 sind die Lokalisationen der relevanten Marker/Gene zueinander ins Verhältnis gesetzt (Abbildung 8). Die beschriebenen Marker wurden für diese Arbeit etabliert und optimiert:



**Abbildung 8:** Darstellung der Markerlokalisierungen auf 8p zueinander und zum Kandidatengen MTUS1 (MTSG 1).

#### 4.1.1 D8S542

Für den D8S542, dem Telomerende am nächsten gelegenen Marker, erwiesen sich folgende Konzentrationsparameter für die Durchführung der PCR als günstig:

- 1 µl Primer (mit je 5 pmol/µl FF und REV Primer)
- 1 µl DNA
- 23 µl MasterMix (19,8 µl A.d., 2,5 µl 10 x PCR-Puffer, 0,5 µl dNTPs, 0,2 µl HT-Polymerase)
- Touchdown PCR : Programm mit 30 Zyklen

6 Td Zyklen mit 96 °C (Melting) für 30 sec, 60 °C (Annealing) für 30 sec, 72 °C (Elongation) für 30 sec, Annealing-Temperatur pro Zyklus um 1 °C verringert (nach 6 Zyklen dann 54 °C)

Dann 22 Zyklen bei 96 °C (Melting) für 30 sec, 54 °C (Annealing) für 30 sec, 72 °C (Elongation) für 30 sec

#### **4.1.2 D8S549**

- 1 µl Primer (mit je 10 pmol/µl FF und REV Primer)
- 1 µl DNA
- 23 µl MasterMix (Ansatz siehe 4.1.1)
- Touchdown PCR : Programm mit 30 Zyklen  
6 Td Zyklen mit 96 °C (Melting) für 30 sec, 60 °C (Annealing) für 30 sec, 72 °C (Elongation) für 30 sec, Annealing-Temperatur pro Zyklus um 1 °C verringert (nach 6 Zyklen dann 54 °C)  
Dann 22 Zyklen bei 96 °C (Melting) für 30 sec, 54 °C (Annealing) für 30 sec, 72 °C (Elongation) für 30 sec

#### **4.1.3 D8S261**

- 1 µl Primer (mit je 5 pmol/µl FF und REV Primer)
- 1 µl DNA
- 23 µl MasterMix (siehe 4.1.1)
- Touchdown PCR : Programm mit 30 Zyklen  
6 Td Zyklen mit 96 °C (Melting) für 30 sec, 60 °C (Annealing) für 30 sec, 72 °C (Elongation) für 30 sec, Annealing-Temperatur pro Zyklus um 1 °C verringert (nach 6 Zyklen dann 54 °C)  
Dann 22 Zyklen bei 96 °C (Melting) für 30 sec, 54 °C (Annealing) für 30 sec, 72 °C (Elongation) für 30 sec



#### **4.1.4 D8S1734**

- 1 µl Primer (mit je 5 pmol/µl FF und REV Primer)
- 1 µl DNA
- 23 µl MasterMix (siehe 4.1.1)
- Touchdown PCR : Programm mit 30 Zyklen  
6 Td Zyklen mit 96 °C (Melting) für 30 sec, 60 °C (Annealing) für 30 sec,  
72 °C (Elongation) für 30 sec, Annealing-Temperatur pro Zyklus um 1 °C  
verringert (nach 6 Zyklen dann 54 °C)  
Dann 22 Zyklen bei 96 °C (Melting) für 30 sec, 54 °C (Annealing) für 30  
sec, 72 °C (Elongation) für 30 sec

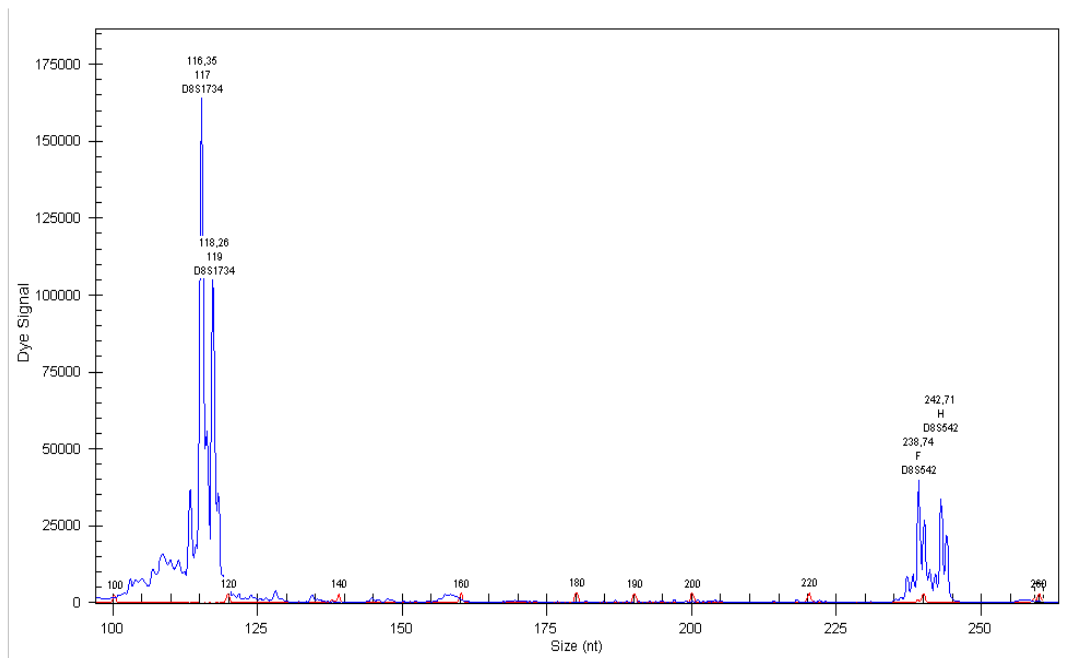
#### **4.2 Etablierung der Multiplex-PCR**

Die vergleichbaren, jeweils als ideal ermittelten PCR-Bedingungen der einzelnen Marker mit gleicher Zyklusanzahl erlaubten es, einen Versuch mit einer Multiplex-PCR zu unternehmen, also mit mehreren Primern gleichzeitig im selben Ansatz zu arbeiten.

Unter Berücksichtigung der Auswertbarkeit konnten nur diese Marker für den Plex ausgewählt werden, die sich in Bezug auf die produzierten Fragmentlängen deutlich unterschieden, da alle Marker die gleiche farbliche Fluoreszenzmarkierung mit dem Farbstoff dye4 aufwiesen.

##### **4.2.1 Plex der Marker D8S542 und D8S1734**

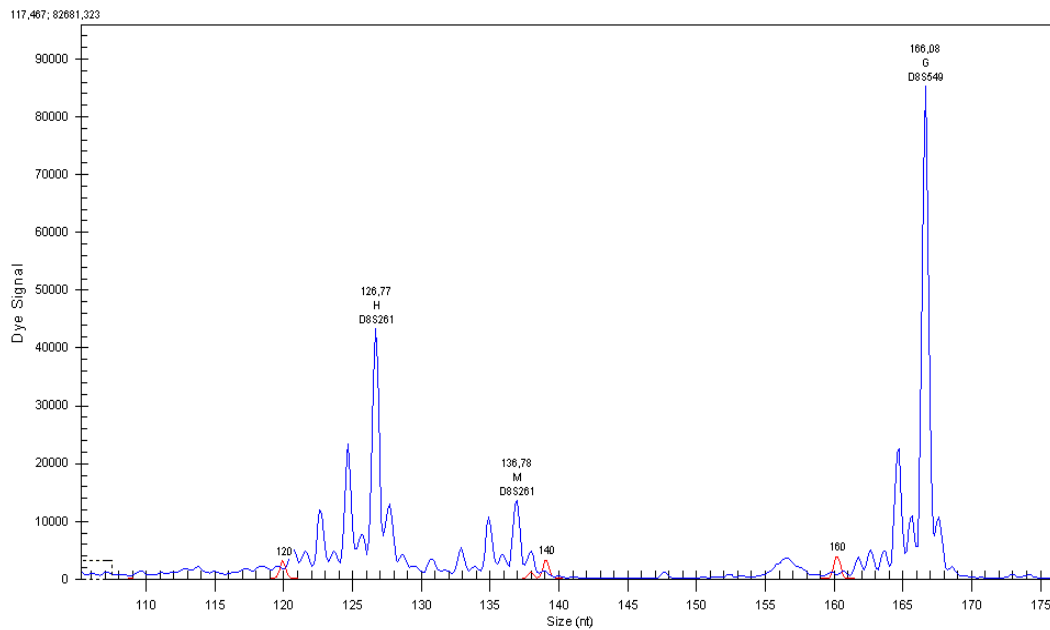
Da der Marker D8S542 eine produzierte Fragmentlänge von um die 240 bp und der D8S1734 eine von um die 116 bp aufwies, war es möglich diese beiden Primer zu kombinieren. Dazu wurden die ff. und rev. Primer beider Marker in den jeweils vorteilhaften Konzentrationen (siehe 4.1.1 und 4.1.4) in einem Ansatz vereinigt. In Abbildung 9 ist beispielhaft dargestellt wie sich das Ergebnis der Plex-PCR dieser beiden Marker in der Sequencer-Analyse darstellte. Deutlich sind jeweils die beiden Allele, sowie der Abstand der beiden Fragmentpaare zueinander ersichtlich.



**Abbildung 9:** Beispielbild (Schleimhaut der Proben-Nummer 121) für die Darstellung des Plexes der beiden Marker D8S1734 und D8S542. Das linke Peak-paar stellt die Fragmente (in diesem Fall 117 und 119) des kürzeren Markers, D8S1734 dar. Rechts im Bild, intensitätsschwächer, die Allele F und H des D8S542. Beide Marker sind in diesem Fall heterozygot.

#### 4.2.2 Plex der Marker D8S549 und D8S261

Auch diese Marker erschienen aufgrund der zu erwartenden Fragmentlängen von ungefähr 170 bp für den D8S549 sowie um die 130 für den D8S261 als für den Plex günstig. Verfahren wurde analog zum Plex der Marker D8S542 und D8S1734 (siehe 4.2.1). In der als beispielhaft beigefügten Abbildung 10 der Sequencer-Auswertung eines solchen Plexes lässt sich deutlich der Abstand der verschiedenen Fragmentpaare und der Zusammenhang zwischen Größe der Fragmente und benötigtes Laufzeit bis zur Detektion erkennen.



**Abbildung 10:** Beispielbild (Schleimhaut der Proben-Nummer 138) für die Darstellung des Plexes der beiden Marker D8S261 und D8S549. Das linke Peakpaar stellt die Fragmente (in diesem Fall H und M) des kürzeren und hier heterozygoten Markers D8S261 dar. Rechts im Bild, intensitätsschwächer, das Allel G des in diesem Fall (wie im übrigen in über 50 % der Fälle) homozygoten Markers D8S549.

### 4.3 Analyse des Patientenkollektivs

Von den in dieser Arbeit verwendeten Markern stellten sich unterschiedliche Informativitätsgrade heraus (Tabelle 3).

Marker	D8S542	D8S549	D8S254	D8S261	D8S1734
<b>Homoz./ n. i.</b>	16 (33,3 %)	26 (54,2 %)	21 (43,8 %)	10 (20,8 %)	14 (29,2 %)
<b>Inform.</b>	32 (66,7 %)	22 (45,8 %)	27 (56,2 %)	38 (79,2 %)	34 (70,8 %)

**Tabelle 3:** Auswertung der Informativität der Marker bezogen auf das untersuchte Patientenkollektiv von 48 Vergleichsproben Tumor/Schleimhaut. (Homoz.= Homozygot; n. i.= nicht informativ; Inform. = Informativ).

In Tabelle 4 sind die Ergebnisse für die Verlustanalysen der verschiedenen Marker aufgeführt. Die Angaben (in Prozent) beziehen sich auf den

gemessenen Intensitätsunterschied der beiden Allele. Da das analysierte Tumorgewebe einen Tumoranteil von mindestens 50 % hat und eine methodisch bedingte Intensitätsvariabilität von 10 – 20 % besteht, wurde ein Intensitätsverlust von mindestens 30 % als LOH definiert („Cut-off“-Wert). Zum Vergleich wurde auch ein „Cut-off“-Wert von 20 % bestimmt.

Nr.	Tumor-Nr.	D8S542	D8S549	D8S254	D8S261	D8S1734
1	3	homozygot	homozygot	LOH	17 %	homozygot
2	5	17,9 %	homozygot	OK	n.i.	17,2 %
3	8	17,4 %	18,4 %	OK	18,7 %	6,5 %
4	13	27,4 %	homozygot	LOH	34,2 %	homozygot
5	29	2,2 %	homozygot	85 %	36,6 %	n. i.
6	37	4,7 %	homozygot	33 %	11,5 %	homozygot
7	39	47,9 %	61,9 %	homozygot	6,7	58,2 %
8	51	homozygot	homozygot	72 %	Totaler Verlust	57,7 %
9	56	n. i.	Totaler Verlust	75 %	homozygot	n. i.
10	62	homozygot	homozygot	22 %	homozygot	29,7 %
11	68	2,9 %	homozygot	homozygot	2,8 %	2,5 %
12	70	homozygot	70,1 %	60 %	52,5 %	Totaler Verlust
13	71	Totaler Verlust	62,2 %	homozygot	32 %	homozygot
14	74	1,8 %	homozygot	homozygot	7,7 %	2,1 %
15	76	Totaler Verlust	homozygot	homozygot	61,8 %	Totaler Verlust
16	79	Totaler Verlust	homozygot	homozygot	6,9 %	20,6 %
17	82	45,4 %	40,5 %	53 %	47 %	41,1 %
18	85	5,5 %	homozygot	3 %	4,3 %	homozygot
19	91	62,8 %	59,6 %	30 %	Totaler Verlust	homozygot
20	95	homozygot	homozygot	4 %	4,7 %	5,5 %
21	108	homozygot	homozygot	33 %	18,4 %	homozygot
22	112	27,2 %	12,3 %	5 %	24,4 %	19,3 %
23	113	homozygot	Totaler Verlust	homozygot	Totaler Verlust	Totaler Verlust
24	114	3,2 %	homozygot	5 %	2,7 %	14,9 %
25	115	3,6 %	homozygot	homozygot	homozygot	0,4 %
26	116	homozygot	homozygot	homozygot	11,5 %	11 %
27	117	20,4 %	11,5 %	homozygot	19,7 %	31,2 %
28	119	1,6 %	9,2 %	homozygot	homozygot	homozygot
29	120	28,6 %	homozygot	homozygot	33 %	44 %
30	121	23,3 %	2 %	18 %	7,3 %	25,1 %
31	123	3,6 %	homozygot	3 %	2 %	homozygot
32	127	53 %	56,2 %	63 %	homozygot	51,8 %
33	130	homozygot	30,4 %	10 %	35,6 %	39,1 %
34	133	32,2 %	20,6 %	homozygot	23,2 %	37,9 %

Nr.	Tumor-Nr.	D8S542	D8S549	D8S254	D8S261	D8S1734
35	134	Totaler Verlust	homozygot	homozygot	Totaler Verlust	homozygot
36	136	29,3 %	homozygot	n. i.	homozygot	27,9 %
37	138	14 %	homozygot	38 %	10,4 %	5,9 %
38	146	homozygot	homozygot	homozygot	20,7 %	5 %
39	151	homozygot	homozygot	homozygot	homozygot	n. i.
40	159	1,4 %	9,2 %	9 %	homozygot	84,5 %
41	167	homozygot	34,3 %	40 %	38 %	9,7 %
42	169	homozygot	37,1 %	homozygot	44,8 %	18 %
43	170	homozygot	61,3 %	88 %	87,9 %	20,9 %
44	171	homozygot	61 %	homozygot	46,3 %	33,8 %
45	172	Totaler Verlust	Totaler Verlust	59 %	Totaler Verlust	homozygot
46	174	2,9 %	homozygot	13 %	3,5 %	13,2 %
47	175	Totaler Verlust	homozygot	n. i.	homozygot	9,8 %
48	178	8,5 %	1,1 %	n. i.	2,3 %	23,9 %

**Tabelle 4:** Ergebnisse der Verlustanalysen (Angaben (%) entsprechen den Intensitätsverlust des Signals im Sequencer im Vergleich Tumor- /Schleimhaut-DNA, n. i.= nicht informativ, totaler Verlust = völliger Verlust eines Allels in der Tumor-DNA, kompletter LOH)

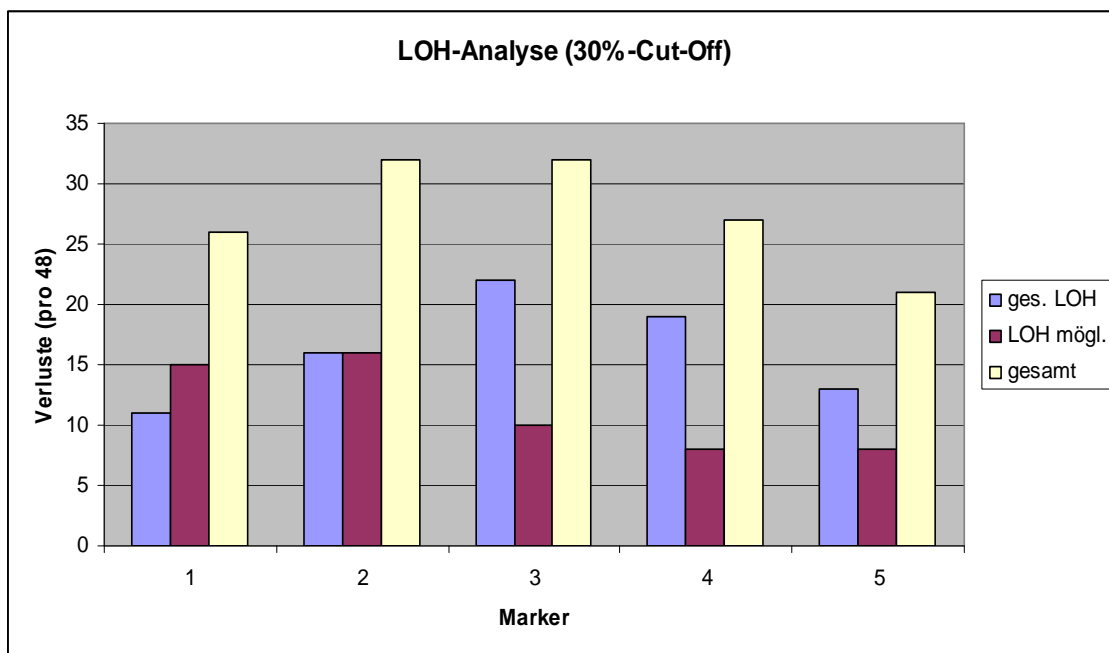
#### 4.4 LOH-Analyse für 30 %-Cut-Off-Wert

In Tabelle 5 sind die Ergebnisse für die LOH-Analyse bezüglich eines 30 %-„Cut-off“-Wertes dargestellt und im Diagramm 1 nochmals graphisch aufbereitet. Dabei lässt sich deutlich erkennen, dass die höchsten Ausfallraten im Bereich des Markers D8S254 liegen. Vor allem bei den Markern die in Richtung Zentromer lokalisiert sind (insbesondere D8S1734), nimmt die Ausfallhäufigkeit mit einer möglichen Gesamtausfallrate von 21/48 im Vergleich mit den anderen Markern deutlich ab. Dies lässt sich durch die Lage begründen, da es zu Abbrüchen ganzer Chromosomenfragmente kommen kann und somit alle peripher gelegenen Marker verloren gehen. Aber auch für die peripher gelegenen Marker lässt sich eine deutliche Abnahme der Ausfallhäufigkeit, abnehmend mit der Entfernung von der Region um den Marker D8S254, verzeichnen. Mit „möglicher Ausfall“ sind die Daten betitelt, deren Auswertbarkeit aufgrund von Homozygotität des Markers bzw. technischen Ursachen nicht möglich ist, ein LOH für diesen Bereich aber durchaus vorstellbar ist (siehe 5.3 Auswertung bei homozygoten Markern).

Nr.	Tumor-Nr.	D8S542	D8S549	D8S254	D8S261	D8S1734
1	3	homozygot	homozygot	LOH	OK (17 %)	homozygot
2	5	OK (17,9 %)	homozygot	OK	LOH / MSI	OK (17,2 %)
3	8	OK (17,4 %)	OK (18,4 %)	OK	OK (18,7 %)	OK (6,5 %)
4	13	OK (27,4 %)	homozygot	LOH	LOH (34,2 %)	homozygot
5	29	OK (2,2 %)	homozygot	LOH (85 %)	LOH (36,6 %)	MSI / LOH
6	37	OK (4,7%)	homozygot	LOH (33%)	OK (11,5%)	homozygot
7	39	LOH (47,9 %)	LOH (61,9 %)	homozygot	OK (6,7 %)	LOH (58,2 %)
8	51	homozygot	homozygot	LOH (72 %)	LOH (total)	LOH (57,7 %)
9	56	n. i.	LOH (total)	LOH (75 %)	homozygot	n. i.
10	62	homozygot	homozygot	OK (22 %)	homozygot	OK (29,7 %)
11	68	OK (2,9 %)	homozygot	homozygot	OK (2,8 %)	OK (2,5 %)
12	70	homozygot	LOH (70,1 %)	LOH (60 %)	LOH (52,5 %)	LOH (total)
13	71	LOH (total)	LOH (62,2 %)	homozygot	LOH (32 %)	homozygot
14	74	OK (1,8%)	homozygot	homozygot	OK (7,7%)	OK (2,1%)
15	76	LOH (total)	homozygot	homozygot	LOH (61,8 %)	LOH (total)
16	79	LOH (total)	homozygot	homozygot	OK (6,9 %)	OK (20,6 %)
17	82	LOH (45,4 %)	LOH (40,5 %)	LOH (53 %)	LOH (47 %)	LOH (41,1 %)
18	85	OK (5,5 %)	homozygot	OK (3 %)	OK (4,3 %)	homozygot
19	91	LOH (62,8 %)	LOH (59,6 %)	LOH (30 %)	LOH (total)	homozygot
20	95	homozygot	homozygot	OK (4 %)	OK (4,7 %)	OK (5,5 %)
21	108	homozygot	homozygot	LOH (33%)	OK (18,4 %)	homozygot
22	112	OK (27,2 %)	OK (12,3 %)	OK (5 %)	OK (24,4 %)	OK (19,3 %)
23	113	homozygot	LOH (total)	homozygot	LOH (total)	LOH (total)
24	114	OK (3,2 %)	homozygot	OK (5 %)	OK (2,7 %)	OK (14,9 %)
25	115	OK (3,6 %)	homozygot	homozygot	homozygot	OK (0,4 %)
26	116	homozygot	homozygot	homozygot	OK (11,5 %)	OK (11 %)
27	117	OK (20,4 %)	OK (11,5 %)	homozygot	OK (19,7 %)	LOH (31,2 %)
28	119	OK (1,6 %)	OK (9,2 %)	homozygot	homozygot	homozygot
29	120	OK (28,6 %)	homozygot	homozygot	LOH (33 %)	LOH (44 %)
30	121	OK (23,3 %)	OK (2 %)	OK (18 %)	OK (7,3 %)	OK (25,1 %)
31	123	OK (3,6 %)	homozygot	OK (3 %)	OK (2 %)	homozygot
32	127	LOH (53 %)	LOH (56,2 %)	LOH (63 %)	homozygot	LOH (51,8 %)
33	130	homozygot	LOH (30,4 %)	OK (10 %)	LOH (35,6 %)	LOH (39,1 %)
34	133	LOH (32,2 %)	OK (20,6 %)	homozygot	OK (23,2 %)	LOH (37,9 %)
35	134	LOH (total)	homozygot	homozygot	LOH (total)	homozygot
36	136	OK (29,3 %)	homozygot	n. i.	homozygot	OK (27,9 %)
37	138	OK (14 %)	homozygot	LOH (38 %)	OK (10,4 %)	OK (5,9 %)
38	146	homozygot	homozygot	homozygot	OK (20,7 %)	OK (5 %)
39	151	homozygot	homozygot	homozygot	homozygot	n. i.
40	159	OK (1,4 %)	OK (9,2 %)	OK (9 %)	homozygot	LOH (84,5 %)
41	167	homozygot	LOH (34,3 %)	LOH (40 %)	LOH (38 %)	OK (9,7 %)
42	169	homozygot	LOH (37,1 %)	homozygot	LOH (44,8 %)	OK (18 %)
43	170	homozygot	LOH (61,3 %)	LOH (88 %)	LOH (87,9 %)	OK (20,9 %)
44	171	homozygot	LOH (61 %)	homozygot	LOH (46,3 %)	LOH (33,8 %)
45	172	LOH (total)	LOH (total)	LOH (59 %)	LOH (total)	homozygot
46	174	OK (2,9 %)	homozygot	OK (13 %)	OK (3,5 %)	OK (13,2 %)
47	175	LOH (total)	homozygot	n. i.	homozygot	OK (9,8 %)
48	178	OK (8,5 %)	OK (1,1 %)	n. i.	OK (2,3 %)	OK (23,9 %)
	ges. LOH	11 (22,9 %)	16 (33,3 %)	22 (45,8 %)	19 (39,6 %)	13 (27,1 %)

Nr.	Tumor-Nr.	D8S542	D8S549	D8S254	D8S261	D8S1734
	LOH mögl.	15 (31,3 %)	16 (33,3 %)	10 (20,8 %)	8 (16,7 %)	8 (16,7 %)
	gesamt	26 (54,2 %)	32 (66,7 %)	32 (66,7 %)	27 (56,3 %)	21 (43,8 %)

**Tabelle 5:** Darstellung der LOH-Analyse für die verschiedenen Marker bezogen auf die jeweilige Probanden-DNA für einen 30 %Cut-Off (*n. i.=nicht informativ; LOH=Loss of Heterocytosity; LOH (total) = vollkommener Ausfall eines Allels in der Tumor-DNA; Angaben in Klammern (in %) beziehen sich auf den Intensitätsunterschied der Allele; ges. LOH = gesicherter LOH; LOH mögl. = LOH möglich; gesamt = Addition der gesicherten LOH und der möglichen LOH (entspricht maximal möglicher Ausfallrate).*



**Diagramm 1 :** Darstellung der LOH-Analysen der verschiedenen Marker für einen 30 %-Intensitäts-Grenzwert für die LOH-Definition ; *ges. LOH = gesicherter LOH ; LOH mögl.= LOH möglich, nicht bestätigt ; 1 = D8S542 ; 2 = D8S549 ; 3 = D8S254 ; 4 = D8S261 ; 5 = D8S1734)*

#### 4.5 LOH-Analyse für 20 %-Cut-Off-Wert

Die LOH-Analyse für einen 20 %-Cut-Off, welche in der Tabelle 6 und dem Diagramm 2 veranschaulicht wird, bestätigt die Ergebnisse aus der Analyse für den 30 %-Cut-Off. Wieder stellt sich der D8S254 mit in diesem Analysemodus 50 % sicherer LOH für diese Region als deutlich am häufigsten deletierter Bereich dar. Große Unterschiede durften auch nicht erwartet werden, doch

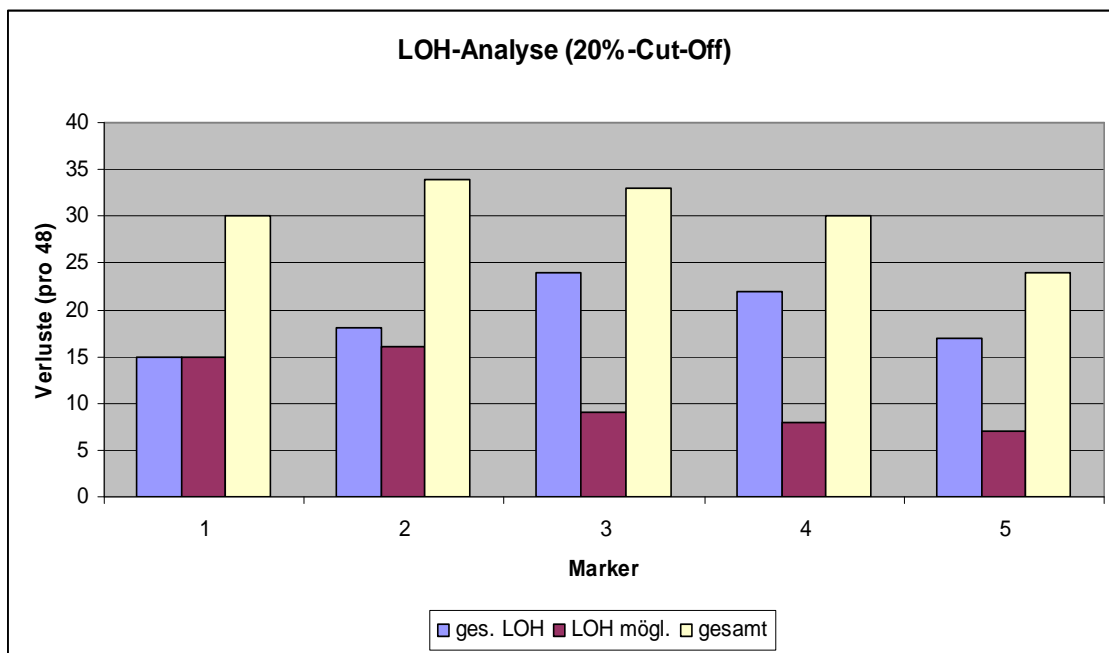
handelt es sich in dem Bereich zwischen 20 % und 30 % Intensitätsverlust um eine Art Grauzone der Analytik, die einen gewissen Streitpunkt darstellt.

Nr.	Tumor-Nr.	D8S542	D8S549	D8S254	D8S261	D8S1734
1	3	homozygot	homozygot	LOH	OK (17 %)	homozygot
2	5	OK (17,9 %)	homozygot	OK	LOH / MSI	OK (17,2 %)
3	8	OK (17,4 %)	OK (18,4 %)	OK	OK (18,7 %)	OK (6,5 %)
4	13	LOH (27,4 %)	homozygot	LOH	LOH (34,2 %)	homozygot
5	29	OK (2,2 %)	homozygot	LOH (85 %)	LOH (36,6 %)	MSI / LOH
6	37	OK (4,7 %)	homozygot	LOH (33 %)	OK (11,5 %)	homozygot
7	39	LOH (47,9 %)	LOH (61,9 %)	homozygot	OK (6,7 %)	LOH (58,2 %)
8	51	homozygot	homozygot	LOH (72 %)	LOH (total)	LOH (57,7 %)
9	56	n. i.	LOH (total)	LOH (75 %)	homozygot	n. i.
10	62	homozygot	homozygot	LOH (22 %)	homozygot	LOH (29,7 %)
11	68	OK (2,9 %)	homozygot	homozygot	OK (2,8 %)	OK (2,5 %)
12	70	homozygot	LOH (70,1 %)	LOH (60 %)	LOH (52,5 %)	LOH (total)
13	71	LOH (total)	LOH (62,2 %)	homozygot	LOH (32 %)	homozygot
14	74	OK (1,8 %)	homozygot	homozygot	OK (7,7 %)	OK (2,1 %)
15	76	LOH (total)	homozygot	homozygot	LOH (61,8 %)	LOH (total)
16	79	LOH (total)	homozygot	homozygot	OK (6,9 %)	OK (20,6 %)
17	82	LOH (45,4 %)	LOH (40,5 %)	LOH (53 %)	LOH (47 %)	LOH (41,1 %)
18	85	OK (5,5 %)	homozygot	OK (3 %)	OK (4,3 %)	homozygot
19	91	LOH (62,8%)	LOH (59,6%)	LOH (30 %)	LOH (total)	homozygot
20	95	homozygot	homozygot	OK (4 %)	OK (4,7 %)	OK (5,5 %)
21	108	homozygot	homozygot	LOH (33 %)	OK (18,4 %)	homozygot
22	112	LOH (27,2 %)	OK (12,3 %)	OK (5 %)	LOH (24,4 %)	OK (19,3 %)
23	113	homozygot	LOH (total)	homozygot	LOH (total)	LOH (total)
24	114	OK (3,2 %)	homozygot	OK (5 %)	OK (2,7 %)	OK (14,9 %)
25	115	OK (3,6 %)	homozygot	homozygot	homozygot	OK (0,4 %)
26	116	homozygot	homozygot	homozygot	OK (11,5 %)	OK (11 %)
27	117	OK (20,4 %)	OK (11,5 %)	homozygot	OK (19,7 %)	LOH (31,2 %)
28	119	OK (1,6 %)	OK (9,2 %)	homozygot	homozygot	homozygot
29	120	LOH (28,6 %)	homozygot	homozygot	LOH (33 %)	LOH (44 %)
30	121	OK (23,3 %)	OK (2 %)	OK (18 %)	OK (7,3 %)	LOH (25,1 %)
31	123	OK (3,6 %)	homozygot	OK (3 %)	OK (2 %)	homozygot
32	127	LOH (53 %)	LOH (56,2 %)	LOH (63 %)	homozygot	LOH (51,8 %)
33	130	homozygot	LOH (30,4 %)	OK (10 %)	LOH (35,6 %)	LOH (39,1 %)
34	133	LOH (32,2 %)	LOH (20,6 %)	homozygot	LOH (23,2 %)	LOH (37,9 %)
35	134	LOH (total)	homozygot	homozygot	LOH (total)	homozygot
36	136	LOH (29,3 %)	homozygot	n. i.	homozygot	LOH (27,9 %)
37	138	OK (14 %)	homozygot	LOH (38 %)	OK (10,4 %)	OK (5,9 %)
38	146	homozygot	homozygot	homozygot	LOH (20,7 %)	OK (5 %)
39	151	homozygot	homozygot	homozygot	homozygot	n. i.
40	159	OK (1,4 %)	OK (9,2 %)	OK (9 %)	homozygot	LOH (84,5 %)
41	167	homozygot	LOH (34,3 %)	LOH (40 %)	LOH (38 %)	OK (9,7 %)
42	169	homozygot	LOH (37,1 %)	homozygot	LOH (44,8 %)	OK (18 %)
43	170	homozygot	LOH (61,3 %)	LOH (88 %)	LOH (87,9 %)	OK (20,9 %)
44	171	homozygot	LOH (61 %)	homozygot	LOH (46,3 %)	LOH (33,8 %)



Nr.	Tumor-Nr.	D8S542	D8S549	D8S254	D8S261	D8S1734
45	172	LOH (total)	LOH (total)	LOH (59 %)	LOH (total)	homozygot
46	174	OK (2,9 %)	homozygot	OK (13 %)	OK (3,5 %)	OK (13,2 %)
47	175	LOH (total)	homozygot	n. i.	homozygot	OK (9,8 %)
48	178	OK (8,5 %)	OK (1,1 %)	n. i.	OK (2,3 %)	OK (23,9 %)
	ges. LOH	15 (31,3 %)	18 (37,5 %)	24 (50 %)	22 (45,8 %)	17 (35,4 %)
	LOH mögl.	15 (31,3 %)	16 (33,3 %)	9 (18,8 %)	8 (16,7 %)	7 (14,6 %)
	gesamt	30 (62,5 %)	34 (70,8 %)	33 (68,8 %)	30 (62,5 %)	24 (50 %)

**Tabelle 6:** Darstellung der LOH-Analyse für die verschiedenen Marker bezogen auf die jeweilige Probanden-DNA für einen 20 %Cut-Off (*n. i.* = nicht informativ; LOH = Loss of Heterocytosity; LOH (total) = vollkommener Ausfall eines Allels in der Tumor-DNA; Angaben in Klammern (in %) beziehen sich auf den Intensitätsunterschied der Allele; ges. LOH = gesicherter LOH; LOH mögl. = LOH möglich; gesamt = Addition der gesicherten LOH und der möglichen LOH (entspricht maximal möglicher Ausfallrate).



**Diagramm 2 :** Darstellung der LOH-Analysen der verschiedenen Marker für einen 20 %-Intensitäts-Grenzwert für die LOH-Definition ; ges. LOH = gesicherter LOH ; LOH mögl. = LOH möglich, nicht bestätigt ; 1 = D8S542 ; 2 = D8S549 ; 3 = D8S254 ; 4 = D8S261 ; 5 = D8S1734)

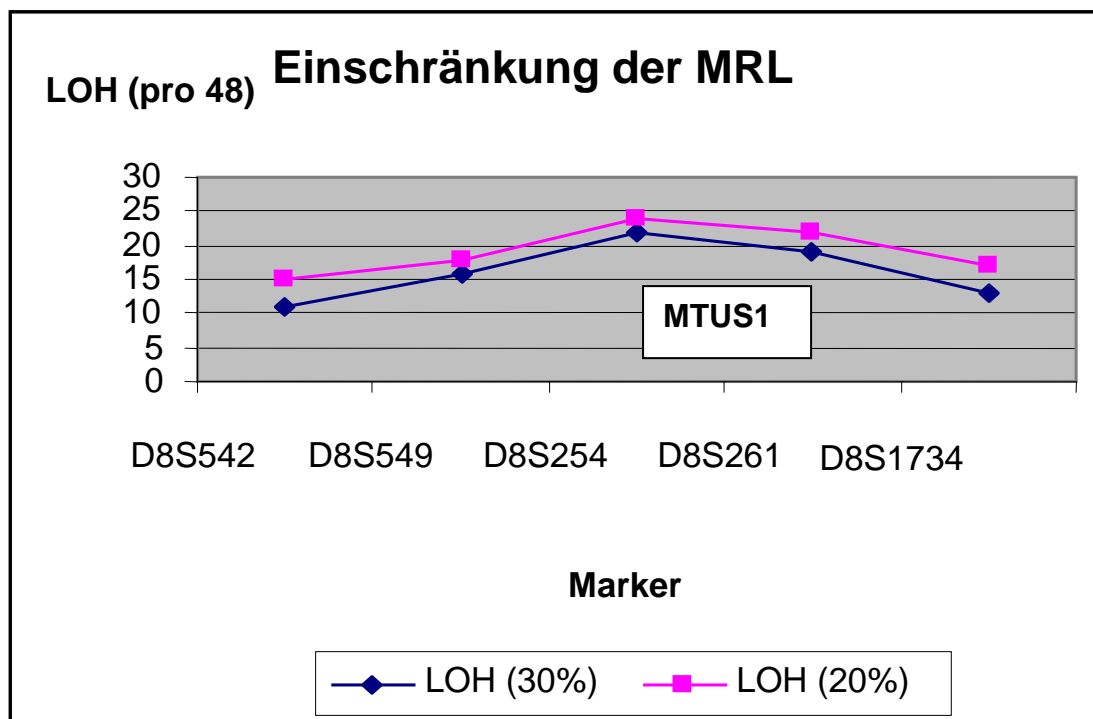
#### 4.6 Einschränkung der minimalen Verlustregion

Vergleicht man die Unterschiede für die verschiedenen eingesetzten LOH-Cut-Off Werte, so ergeben sich keine bedeutenden Änderungen in der Darstellung der Ausfallkurven. In Diagramm 3 werden die Ergebnisse beider Analysen

zusammen dargestellt. Betrachtet man isoliert die Kurven für die gesicherten Ausfälle, so lässt sich die minimale Verlustregion (MRL) relativ eindeutig für den Bereich zwischen den Markern D8S254 und D8S261 beschreiben.

Betrachtet man die mögliche Gesamtausfallrate, welche sich aus der Addition der gesicherten LOHs und der möglichen LOHs berechnet, so verschiebt sich das Bild der MRL in Richtung Telomerende und wird durch die Marker D8S549 und D8S254 flankiert. Dies ergibt sich additionsbedingt. Der Marker D8S549 hat mit einer Homozygotenfrequenz von über 30 % die höchste Rate an nicht auswertbaren Patientendaten und somit die höchste Rate an nicht beurteilbaren Daten, was in einer hohen möglichen LOH-Rate resultiert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich durch die sehr ähnlich verlaufenden Ausfallkurven der beiden gesicherten Ausfälle für beide Analysemodi die MRL auf die Region zwischen den Markern D8S254 und D8S261 beschränken lässt.



**Diagramm 3 :** Darstellung der LOH-Häufigkeit für die verschiedenen Marker bei 30%- bzw. 20%- Intensitätsunterschied als Cut-Off. Die MRL kann für die Region zwischen den Markern D8S254 und D8S261 definiert werden in welchem sich das Kandidatengen MTUS1 befindet.

## **5 Diskussion**

### **5.1 Chromosomale Region 8p22**

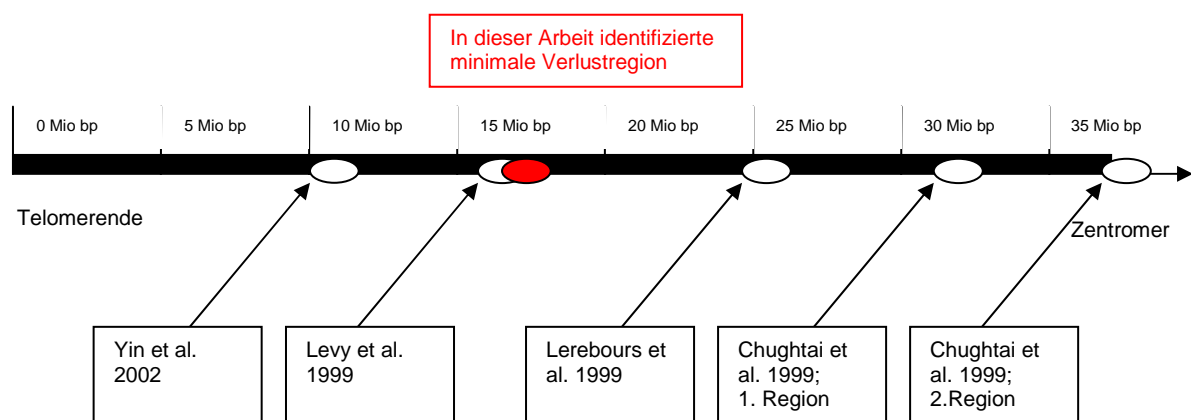
#### **5.1.1 Identifizierte minimale Verlustregion im Bereich 8p22**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Deletionsanalyse der Region 8p22 durchgeführt. Dabei wurden vier Mikrosatellitenmarker (D8S542, D8S549, D8S261 und D8S1734) gewählt, die den Marker D8S254 flankieren. Die Marker konnten erfolgreich etabliert werden und die Analyse von 48 Tumor-Schleimhautpaaren als Multiplex-PCR durchgeführt werden. Die Deletionsanalyse mit einem „Cut-off“-Wert von 30 % zeigte, dass die höchsten Ausfallraten im Bereich des Markers D8S254 liegen. Vor allem bei den Markern, die in Richtung Zentromer lokalisiert sind (insbesondere D8S1734), nimmt die Ausfallhäufigkeit mit einer möglichen Gesamtausfallrate von 21/48 im Vergleich mit den anderen Markern deutlich ab. Dies lässt sich durch die Lage begründen, da es zu Abbrüchen ganzer Chromosomenfragmente kommen kann und somit alle peripher gelegenen Marker verloren gehen. Aber auch für die peripher gelegenen Marker lässt sich eine deutliche Abnahme der Ausfallhäufigkeit, abnehmend mit der Entfernung von der Region um den Marker D8S254, verzeichnen. Die LOH-Analyse für einen 20 %-„Cut-Off“ bestätigte den Marker D8S254 als deutlich am häufigsten deletierten Bereich. Der Marker D8S261 ist der am zweithäufigsten von einer Deletion betroffene Marker (bei 30 % und 20 % „Cut-off“). Somit ist die in dieser Arbeit gefundene minimale Verlustregion der Bereich zwischen D8S254 und D8S261.

#### **5.1.2 Kandidatengene in der Region 8p22**

Yin et al. haben 2002 durch Untersuchungen an 12 Medulloblastomen eine homozygot deletierte Region zwischen den Markern D8S520 und D8S1130 beschrieben, welche am Mamma-Ca bestätigt werden konnte. Auch die Region um das NEFL-Gen, welches für ein Neurofilamentprotein kodiert, konnte als MRL bei Untersuchungen am CRC beschrieben werden (Lerebours et al., 1999). In dieser Untersuchung zeigte aber auch die Region um den D8S254

eine verstärkte Deletionsrate. Chughtai et al. dagegen stellten 1999 zwei Regionen als häufig deletiert bei kolorektalen Karzinomen vor. Die Ergebnisse wurden durch Untersuchungen an 70 CRC und 11 Kolon-Adenomen durchgeführt und zeigen die Deletionen als flankiert durch D8S87 und D8S259, sowie durch das ANK1-Gen und den Marker D8S255. Levy et al. postulierten 1999 durch Untersuchungen an Pancreas-Karzinomen die Region um das TUSC-3 Gen als den relevanten Locus. Die von anderen Gruppen identifizierten minimalen Verlustregionen sind in Abbildung 11 dargestellt.



**Abbildung 11:** Darstellung der beschriebenen MRL-Lokalisationen zueinander

Deletionen in der Region D8S254 konnten mit einer schlechteren Patientenprognose (Halling et al., 1999; Chang et al., 2005) sowie dem Zugewinn von tumoralen Eigenschaften wie Mikroinvasivität (Kelemen et al., 1994; Takanishi et al., 1997) und fortgeschrittener Tumorprogression (Yaremko et al., 1994; Chang et al., 2005) assoziiert werden. Diese Beobachtungen zogen ein verstärktes Interesse an dieser Region bezüglich der Suche nach einem dort lokalisierten Tumorsuppressorgen nach sich. Im Jahre 2003 identifizierten Seibold et al. ein Kandidatengen auf Chromosom 8p22. Es handelt sich dabei um das als MTUS 1 (oder MTSG 1 = Mitochondrial Tumor-Suppressor Gen 1) bezeichnete Gen, das sich in unmittelbarer Nähe des schon häufig in der Literatur beschriebenen Markers D8S254 befindet (ungefähr 0,9 Megabasen zentromerwärts). Das Genprodukt ist ein 436 Aminosäuren

umfassendes Precursor-Protein, welches nach Einschleusung in die Mitochondrien tumorsupprimierende Funktionen durch Eingriffe in Regulationsprozesse intramitochondrial ausüben können soll. In seiner Rolle bestätigt wurde das MTUS 1 2006 durch die Arbeitsgruppe um Pils et al. (Pils et al., 2006). Aber auch durch andere Gruppen konnten interessante Vorschläge für Kandidatengene gemacht werden. So stellten Yuan et al. 1998 das DLC 1 (DLC=Deleted in Liver-Cancer) als TSG der Region 8p22 vor. Allerdings konnte dieses Gen als von geringer Bedeutung für die Karzinogenese des CRC und ovarieller Karzinome klassifiziert werden (Wilson et al., 2000). In neueren Arbeiten werden jedoch Hinweise auf seine Bedeutung für die Karzinogenese gegeben (Peng et al., 2006; Seng et al., 2006). 2004 beschrieben Flanagan et al. das K1AA1456 als das gesuchte TSG der Region. Andere Arbeitsgruppen dagegen postulierten zuvor schon mehrere bedeutende Gene in der Region um den D8S254 (Ishii et al., 1999; Sasiadek et al., 2001; Tsai et al., 2002; Yaremko et al., 1995; Chuaqui et al., 1995; El Naggar et al., 2001).

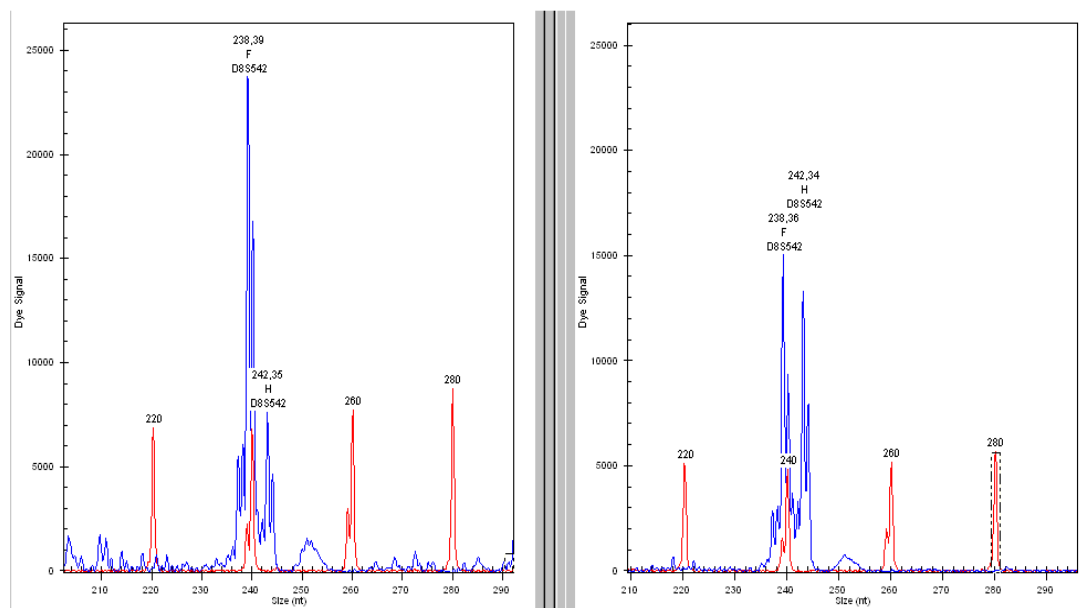
Keines dieser Gene ist bisher eindeutig als Tumorsuppressorgen bestätigt worden. Dazu müsste neben dem Deletionsnachweis auch ein Mutationsnachweis des zweiten Allels und ein Ausfall der Proteinexpression nachgewiesen werden. Teilweise war dies nicht erfolgreich, zumeist sind allerdings nicht genügend Tumoren analysiert worden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte D8S254 als häufig deletierter Marker bestätigt werden. Die flankierenden Marker waren weniger häufig deletiert. Es steht nun eine Subgruppe von kolorektalen Karzinomen zur Verfügung, bei denen weitere Genanalysen durchgeführt werden können. Dabei ist das Tumorsuppressorgen MTUS1 von besonderem Interesse, da es nur 0.9 MB vom Marker D8S254 entfernt lokalisiert ist.

## 5.2 Problematik der LOH-Analytik

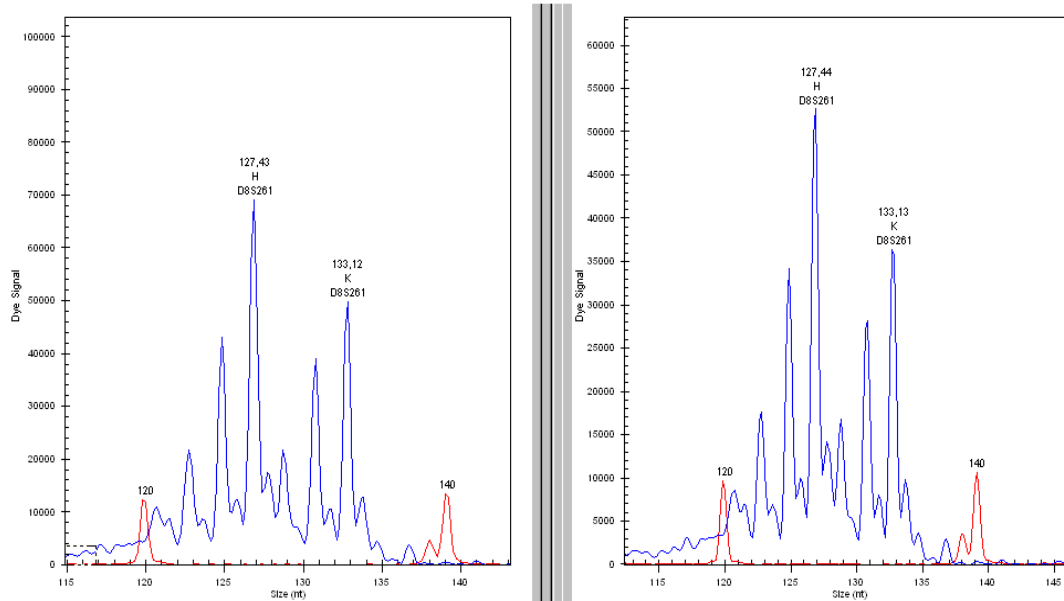
### 5.2.1 Definition eines allelischen Verlustes (LOH)

Bei einem allelischen Verlust (LOH) und reiner Tumor-DNA ist die Reduktion der Signalintensität des entsprechenden PCR-Produktes in der Tumorschleimhaut im Vergleich zur Normalschleimhaut 100 %. Ein kompletter Ausfall eines Allels ist sehr selten nachzuweisen, da dafür ein homogenes, nicht mit Normal-DNA kontaminiertes Tumorpräparat der Analyse zugrunde liegen muss. Häufig weisen die Proben aber durch Kontamination mit Normalschleimhaut, kernhaltigen Zellen des Blutes oder aufgrund der tumoralen Polyklonalität keinen kompletten Allelverlust auf. Die vorliegenden Tumorproben weisen (entsprechend den Angaben des Institutes für Pathologie/Würzburg) einen Tumoranteil von mindestens 50 % auf. In den meisten Studien wird von solch einem Anteil ausgegangen und es wird dementsprechend meist auch ein 50 %-„Cut-Off“-Wert verwendet (Ohgaki et al., 1999 ; Sunwoo et al., 1999). Andere Arbeitsgruppen dagegen halten diesen Wert für zu hoch, da neben der Kontamination mit Normalschleimhaut auch eine methodisch bedingte Intensitätsschwankung besteht. In einer Arbeit aus dem Jahr 2002 beschrieben Tomlinson et al. eine Methode zur Lösung dieses Problems. Sie berücksichtigten die durchschnittliche Reinheit der Tumorprobe (50 %), eine Fehlertoleranz von 10 % und eine methodisch bedingte Intensitätsschwankung (23 %) und definierten eine Deletion (LOH) als ein Intensitätsverlust von mindestens 40 %, während unter 23 % sicher kein LOH vorliegt. Dazwischen (23 % – 40 %) liegt ein „Graubereich“, der zum Ausschluss entsprechender Tumorproben führen muss. Bei diesen Proben liegt z.B. ein geringerer Tumoranteil vor. Die methodisch bedingte Intensitätsschwankung muss nämlich für die einzelnen PCR-Primer und für die verwendeten Sequenziergeräte jeweils neu berechnet werden. Da dies sehr umständlich ist, hat sich die Methode von Tomlinson et al. allerdings nicht durchgesetzt. Ein pragmatischer Ansatz ist die Definition des LOH als eine Reduktion der Signalintensität um 30 %. Dies wurde z. B. auch in der vorangehenden Arbeit von Rosler durchgeführt (Rosler, 2007).

Aus diesem Grund erschien ein „Cut-Off“-Wert von 30 % für die Auswertung der Daten am geeignetsten zu sein. Somit ließen sich evtl. Fehlinterpretationen durch Analysefehler, Streuung und Artefakte, die evtl. bei einem 20 %-Wert noch eine Rolle spielen können, weitgehend ausschließen. Bei einem Wert von 50 % bestünde die Möglichkeit, dass viele vorhandene LOHs nicht als solche anerkannt werden könnten aufgrund einer eventuell zu hohen Kontamination des Probengewebes. Bestätigt wird dies durch den Vergleich der Verlustraten für die verschiedenen Analysemodi (Diagramm 4 und Tabelle 7). So zeigen sich interessanterweise die Unterschiede vor allem nur in den Ausfallraten der einzelnen Marker, nicht aber in den Verhältnissen zueinander. In den Abbildungen 12 und 13 sind im Vergleich von Tumor- und Normalschleimhautgewebe jeweils die Darstellung eines LOH und eines Normalbefundes wiedergegeben.

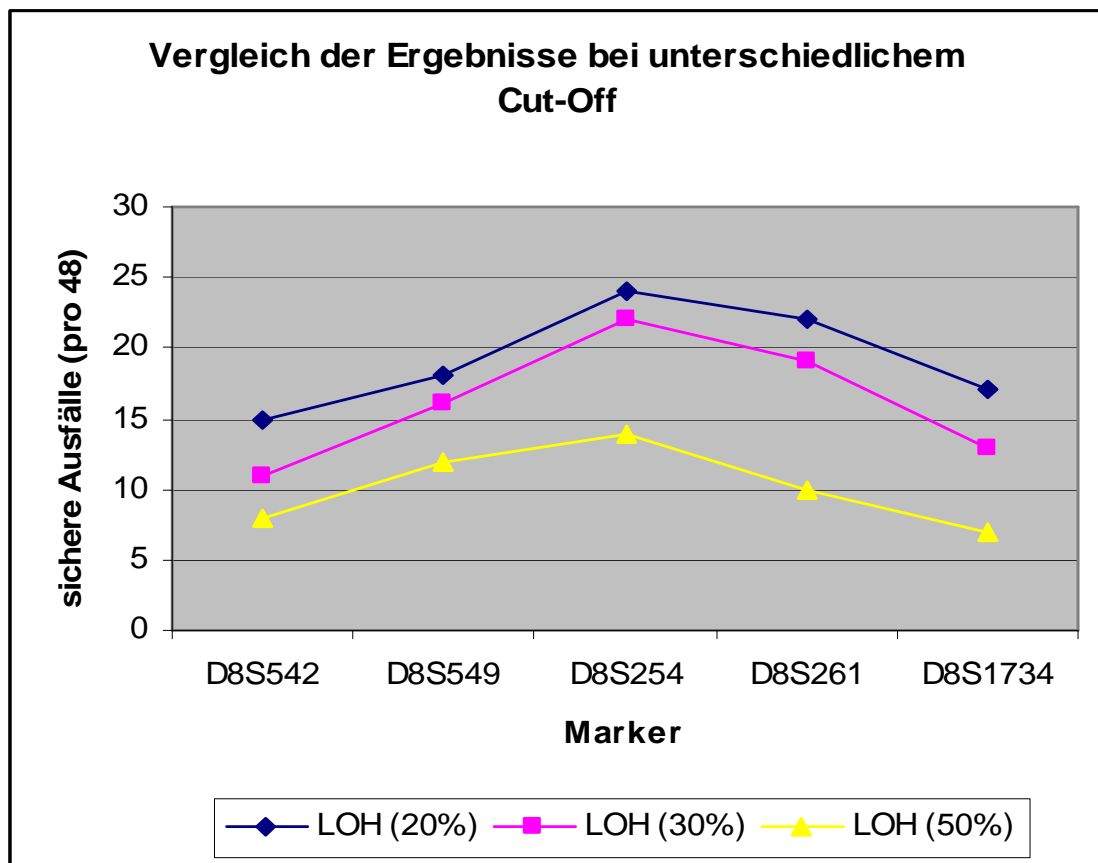


**Abbildung 12:** Beispielbild für einen LOH. (Probe 91, Marker D8S542, Tumor links, Schleimhaut rechts). Im Vergleich Tumor-/Schleimhautprobe stellt sich das Allel H deutlich (62,8 %) intensitätsgemindert dar, was – par definitionem – als LOH gewertet wird. Die Restintensität ergibt sich aufgrund von Verunreinigungen der Tumorgewebeprobe mit z. B. Leukozyten aus dem Blut oder normalen Schleimhautzellen, welche sich technisch nicht vermeiden lassen.



**Abbildung 13:** Beispielbild für ein Probe ohne Verlust eines Alleles (Probe Nummer 85, Marker D8S261, Tumor links, Schleimhaut rechts). *In beiden Proben stellen sich beide Allele H und K regelrecht dar. Es sind nur geringe Intensitätsunterschiede zwischen den Allelen zu verzeichnen, welche nach den Analyseparametern nicht als LOH gewertet werden können.*





**Diagramm 4:** Verlauf der Ausfallraten der gesicherten Ausfälle für die einzelnen Marker in den verschiedenen LOH-Analysemodi

Analyse	D8S542	D8S549	D8S254	D8S261	D8S1734
LOH (20 %)	15	18	24	22	17
LOH (30 %)	11	16	22	19	13
LOH (50 %)	8	12	14	10	7

**Tabelle 7:** Absolutzahlen für die gesicherten LOHs der einzelnen Marker in den verschiedenen LOH-Analysemodi

### 5.2.2 Entstehungsmechanismen des Heterozygotitätsverlusts

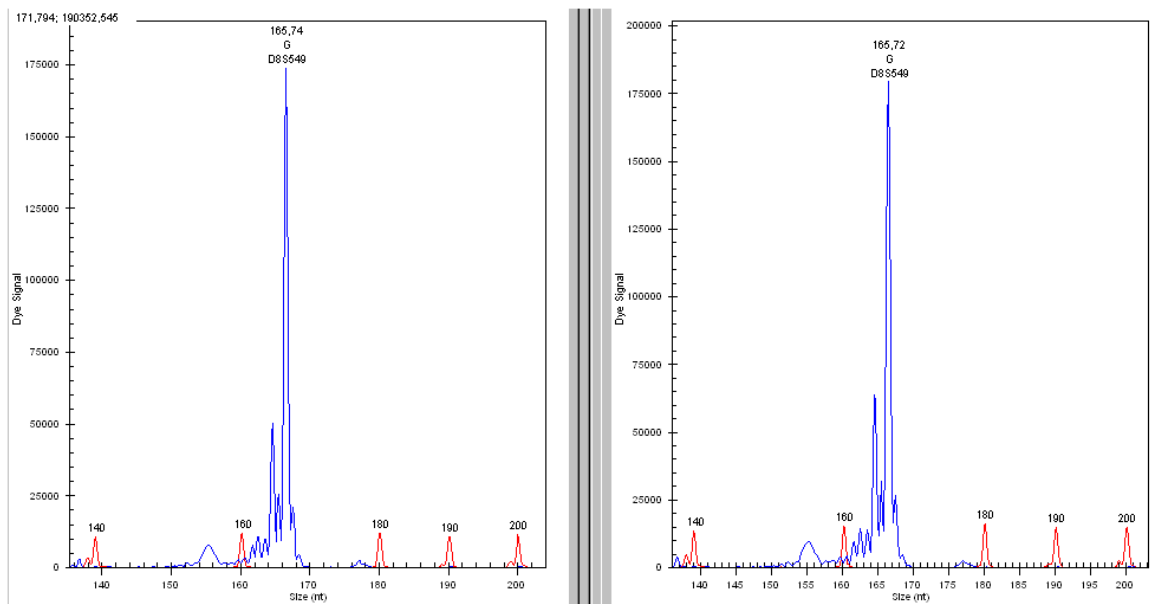
Aber auch andere Gesichtspunkte müssen in der LOH-Analytik bedacht werden. So sagt das Vorliegen eines Heterozygotitätsverlustes noch nichts über seine Genese aus. Sowohl Deletion, non-disjunction und mitotische Rekombination zweier homologer Chromosomen als auch eine Translokation und eine Genkonversion können ursächlich in Betracht gezogen werden (Cavenee et al., 1983, 1985 ; Meuth, 1990 ; Stanbridge, 1990 ; Haber, 1999). Schon 1989 wiesen sowohl Vogelstein et al. sowie Kern et al. darauf hin, dass

definierte chromosomale Verluste evtl. nur indirekte Marker einer weitaus größeren Gruppe chromosomaler Veränderungen sein können. Beide verwiesen darauf, dass es somit möglich sei, dass ein LOH einer bestimmten Region mit einer schlechteren Patientenprognose assoziiert ist, aber kein zellularbiologisch bedeutsamer Effekt zugrunde liegt und damit das Ergebnis durch die schlichte Anhäufung genetischer Veränderungen im Laufe der Tumorprogression erklärt werden könnte.

Weiterhin ist zu bedenken, da die LOH-Analytik sich ganz auf die Gültigkeit der Two-Hit-Hypothese von Knudson stützt (Knudson et al., 1971), dass durchaus auch andere Inaktivierungsmechanismen von für die Karzinogenese bedeutender Gene mit tumorsupprimierenden Eigenschaften in Betracht gezogen werden müssen. So können z. B. auch im Gen selbst gelegene Punktmutationen ursächlich sein (Fukushima et al., 2003). Aber auch die so genannten epigenetischen Mechanismen, wie die Hyper- & Hypomethylierung von für die Genregulation bedeutender Abschnitte, könnten eine Rolle spielen (Garinis et al., 2002 ; Grady et al., 2000 ; Esteller et al., 2001) sowie die Haploinsuffizienz (Fero et al., 1998 ; Ingram et al., 2000 ; Kwabi-Addo et al., 2001). Ausfallmechanismen wie diese können in der LOH-Analytik nicht erfasst werden.

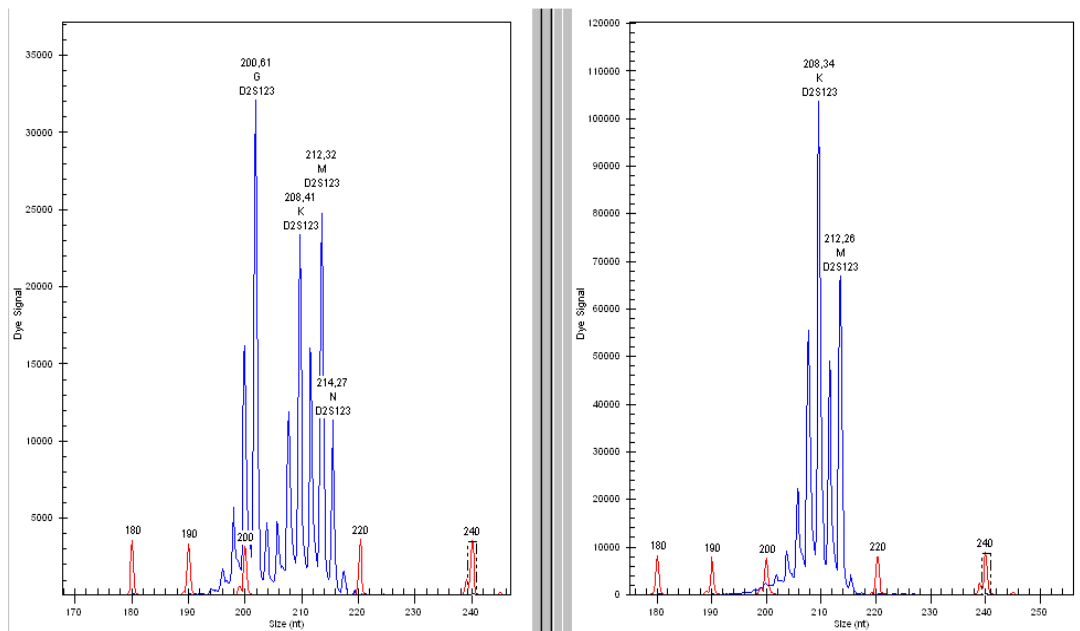
### **5.2.3 Homozygotie, MSI und Stotterbanden**

Besonderheiten bezüglich ihrer Informativität stellen in der LOH-Analytik mit Hilfe der Fragmentlängenanalyse am Sequencer Fälle homozygoter Marker sowie solche mit einer Mikrosatelliteninstabilität dar. Homozygote Marker sind nicht informativ, da durch das Vorliegen der gleichen Fragmentlängen im PCR-Produkt von beiden Allelen durch den Vergleich zum Tumorgewebe nicht auf den Verlust eines Alleles geschlossen werden kann. Sowohl im Normalschleimhautgewebe als auch im Tumorgewebe stellen sich die homozygoten Allele als nur ein Intensitätspeak dar (Abbildung 14).



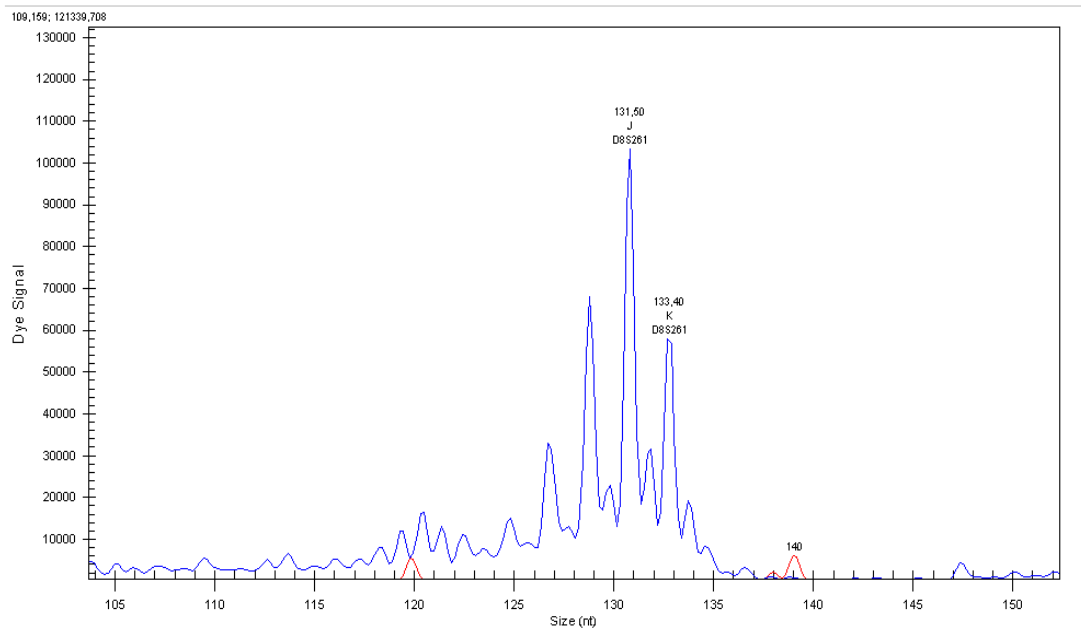
**Abbildung 14:** Beispielbild Homozygotie (Probe Nummer 85, Marker D8S549, Tumor links, Schleimhaut rechts). *In beiden Proben summieren sich die beiden jeweils gleich langen Fragmente aufeinander so, dass nur ein Allel O identifiziert werden kann. Eine Auswertung bezüglich der LOH-Kriterien ist somit unmöglich.*

Auch Fälle von Mikrosatelliteninstabilität stellen ein Problem für die Auswertbarkeit bezüglich des LOH-Status von Tumoren dar. Der Mikrosatelliteninstabilität (MSI) liegen Ausfälle genetischer Reparaturmechanismen zugrunde. Interessanterweise werden MSI-high Tumoren von vielen Autoren als prognostisch günstiger beschrieben (Ionov, 1993; Thibodeau, 1993; Bubb, 1996; Chen, 1997; Lothe, 1993). Die Folgen eines solchen Reparaturdefektes terminieren in der Längenfragmentanalyse in einer sehr polymorphen Darstellung der Marker (Abbildung 15) durch die verschiedenen Subpopulationen mit verschiedenen Repeatanzahlen der Marker. Dadurch wird eine LOH-Auswertung der betroffenen Marker unmöglich gemacht.



**Abbildung 15:** Beispielbild MSI (Probe Nr. 15, Marker D2S123, Tumor links, Schleimhaut rechts). Während sich in der Schleimhautprobe noch beide Allele K und M regelrecht darstellen, ist nach MMR-Ausfall im Tumorgewebe keine Differenzierung und Bewertung der einzelnen Allele mehr möglich. Die Beurteilbarkeit des LOH-Status ist somit nicht gegeben. (Bild darf freundlicherweise aus der Doktorarbeit von Lisa Sauerhöfer als Beispiel übernommen werden.)

Zu bedenken ist in manchen Fällen außerdem, ob das „kleinere (kürzere)“ oder das „größere (längere)“ Allel vom Ausfall betroffen sind, da das kürzere häufig höhere Intensitätspeaks aufweist aufgrund der Summation mit „Stotterbanden“ (kürzere PCR-Produkte des größeren Allels aufgrund vorzeitigen Replikationsabbruch durch die Polymerase liegen diesem Phänomen zugrunde) des längeren Allels. (Abbildung 16)



**Abbildung 16:** Beispielbild für den Summationseffekt von Allelfragmenten und Stotterbanden an der Schleimhautprobe der Nummer 133 mit dem Marker D8S261. Das längere Allel K stellt sich intensitätsschwächer dar als das kürzere Fragment des Allels J. Dieser Effekt kommt aufgrund des Summationseffektes von Stotterbanden des nur um 2 bp längeren Allels K mit dem kürzeren Allel J zustande und ist somit kein Hinweis auf eine genetische Veränderung. Im Vergleich mit den Ergebnissen für die Tumorprobe lassen sich aufgrund der dann jeweils möglichen Differenzberechnung Aussagen über einen Intensitätsverlust eines Alleles machen.

## **6 Zusammenfassung**

Ziel dieser Arbeit war es, den in der Literatur und in vorangehenden Dissertationen bei Karzinomen häufig von Deletionen betroffenen kurzen Arm von Chromosom 8 unter Verwendung von Mikrosatellitenmarker zur LOH-Analytik bezüglich der häufigsten Deletionsregion genauer zu kartieren und zu untersuchen, ob das Kandidaten-Tumorsuppressorgen MTUS 1 in diesem Bereich lokalisiert ist. Dabei wurden ausgehend vom zentral gelegenen Marker D8S254, der in der Literatur sowie in der Doktorarbeit von Eduard Rosler als prognostisch relevant eingestuft wurde und weitere Marker sowohl in Richtung Zentromer als auch in Richtung Telomer eingesetzt, um die minimale Verlustregion auf dem Chromosom 8p22 definieren zu können. Als Untersuchungskollektiv wurden 48 DNA-Probenpaare jeweils von korrespondierendem Tumor- und Normalschleimhautgewebe von hohem Reinheitsgrad herangezogen. Die Definition der minimalen Verlustregion lässt – bezogen auf die Two-Hit-Hypothese nach Knudson – Rückschlüsse auf die mögliche Beteiligung ihrer in sie eingeschlossenen Gene bezüglich ihrer putativ tumorsupprimierenden Wirkung zu.

Es wurden mit fluoreszenzmarkierten Primern in der PCR die Proben aufbereitet und an einem Sequencer der Firma Beckman-Coulter ausgewertet. Dabei stellte sich der Bereich zwischen den Markern D8S254 und D8S261 als die minimale Verlustregion heraus. Die detektierte minimale Verlustregion beinhaltet das durch Seibold et al. 2003 beschriebene Kandidaten-Tumorsuppressorgen MTUS 1 (= MTSG1). Die Ergebnisse dieser Arbeit können deshalb als weiterer Hinweis auf seine vermutete Rolle als Tumorsuppressorgen gewertet werden.

Für zukünftige Arbeiten ist eine Feinanalyse des Deletionsbereiches mit Hilfe von SNP-Arrays, immunhistochemische Methoden sowie eine Mutationsanalyse des MTUS1-Gens am Sequencer sinnvoll.

1. **Aaltonen** LA, Peltomaki P, Mecklin JP, Jarvinen H, Jass, JR, Green JS, Lynch HAT, Watson P, Tallqvist G, Juhola M. (1994) Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Cancer Research* 54 (7):1645-1648.
2. **Baker** SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, van Tuinen P, Ledbetter DH, Barker DF, Nakamura Y, White R, Vogelstein B. (1989) Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 244:217-221.
3. **Bubb** VJ, Curtis LJ, Cunningham C, Dunlop MG, Carothers AD, Morris RG, White S, Bird CC, Wyllie AH. (1996) Microsatellite instability and the role of hMSH2 in sporadic colorectal cancer. *Oncogene* 12:2641-2649.
4. **Canzian** F, Salovaara R, Hemminki A, Kristo P, Chadwick RB, Aaltonen LA, de la Chapelle A. (1996) Semiautomated Assessment of loss of Heterozygosity and replication error in tumors. *Cancer Res* 56 (14):3331-3337.
5. **Cavenee** WK, Dryja TP, Phillips RA, Benedict WF, Godbout R, Gallie BL, Murphree AL, Strong LC, White RL. (1983) Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* 305 (5937):779-784.
6. **Cavenee** WK, Hansen MF, Nordenskjold M, Kock E, Maumenee I, Squire JA, Phillips RA, Gallie BL. (1985) Genetic origin of mutations predisposing to retinoblastoma. *Science* 228 (4698):501-503.
7. **Chang** SC, Lin JK, Lin TC, Liang WY. (2005) Loss of Heterozygosity: An independent prognostic factor of colorectal cancer, *World J Gastroenterol* 11(6):778-784.
8. **Chen** WS, Chen JY, Liu JM, Lin WC, King KL, Whang-Peng J, Yang WK. (1997) Microsatellite instability in sporadic colon cancer patients with and without liver metastasis. *Int. J. of Cancer* 74:470-474.

9. **Cho** KR and Fearon ER. (1995) DCC: linking tumor suppressor genes and altered cell surface interactions in cancer. *Curr. Opin. Genet. Develop.* 5(1):72-78.
10. **Choi** SW, Lee KJ, Bae YA, Min KQ, Kwon MS; Kim KM, Rhyu MG. (2002) Genetic Classifications of Colorectal Cancer Based on Chromosomal Loss and Microsatellite Instability Predicts Survival. *Clinical Cancer Research* 8:2311-2322.
11. **Chuaqui** RF, Sanz-Ortega J, Vocke C, Linehan WM, Sanz-Esponera J, Zhuang Z, Emmert-Buck MR, Merino MJ. (1995) Loss of Heterocycosity on the short arm of chromosome 8p in male breast carcinomas. *Cancer Res.* 55:4995-4998.
12. **Chughtai** SA, Crundwell MC, Cruickshank NR, Affie E, Armstrong S, Knowles MA, Takle LA, Kuo M, Khan N, Phillips SM, Neoptolemos JP, Morton DG. (1999) Two novel regions of interstitial deletion on chromosome 8p in colorectal cancer 18-657-665.
13. **Chung** D. (2000) The genetic basis of colorectal cancer: insights into critical pathways of tumorigenesis. *Gastroenterology* 119:854-865.
14. **Cunningham** C, Dunlop MG, Bird CC, Wyllie AH. (1994) Deletion analysis of chromosome 8p in sporadic colorectal adenomas. *Br J Cancer* 70:18-20.
15. **El Naggari** AK, Mao L, Staerkel G, Coombes MM, Tucker SL, Luna MA, Clayman GL, Lippman S, Goepfert H. (2001) Genetic heterogeneity in saliva from patients with orals squamous carcinomas: implications in molecular diagnosis and screening. *J Mol Diagn* 3:164-170
16. **Esteller** M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. (2001) A Gene Hypermethylation Profile of Human Cancer. *Cancer Research* 61:3225-3229.
17. **Farrington** SM, Cunningham C, Boyle SM, Wyllie AH, Dunlop MG. (1996) Detailed physical and deletion mapping of 8p with isolation of YQC clones from tumor suppressor loci involved in colorectal cancer. *Oncogene* 12:1802-1803.



18. **Fearon** ER, Vogelstein B. (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61 (5):749-867.
19. **Fearon** ER, Cho KR; Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Thomas G, Kinzler KW, Vogelstein B. (1990) Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancer. *Science* 247:49-56.
20. **Ferlay** J, Bay F, Pisani P, Parkin DM. (2004) GLOBOCAN 2002 Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide IARC CancerBase No. 5, version 2.0 IARC Press, Lyon.
21. **Fero** ML, Randel E, Gurley KE, Roberts JM, Kemp CJ. (1998) The murine gene p27Kip1 is haplo-insufficient for tumor suppression. *Nature* 396:177-180.
22. **Flanagan** JM, Healey S, Young J, Whitehall V, Trott DA, Newbold RF, Chenevix-Trench G. (2004) Mapping of a Candidate Colorectal Cancer Tumor-Suppressor Gene to a 900-Kilobase Region on the short arm of chromosome 8. *Genes, Chromosomes Cancer* 40:247-260.
23. **Fujiwara** J, Emi M, Ohata H, Kato Y, Nakajima T, Mori T, Nakamura Y. (1993) Evidence for the presence of two tumor suppressor genes on chromosome 8p for colorectal carcinomas. *Cancer Res* 53(5):1172-1174.
24. **Fujiwara** J, Ohata H, Emi M, Okui K, Koyama K, Tsuchiya E, Nakajima E, Nonden M, Mori T, Kurimasa A, Oshimura M, Nakamura Y. (1994) A 3Mb physical map of the chromosome region 8p21.3-p22, including a 600-kb region commonly deleted in human hepatocellular carcinomas, colorectal cancer and non-small cell lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 10:7-14.
25. **Fukushima** T, Mashiko M, Takita K, Otake T, Endo Y, Sekikawa K, Takenoshita S. (2003) Mutational analysis of TGF-beta type II receptor, Smad2, Smad3, Smad4, Smad6 and Smad7 genes in colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 22:315-320,
26. **Gao** X, Honn KV; Grignon D, Sakr W, Chen YQ. (1993) Frequent loss of expression and loss of Heterozygosity of the putative tumor suppressor gene DCC in prostatic carcinomas. *Cancer Res.* 53:2723-2727.

27. **Garinis** GA, Menounos PG, Spanakis NE, Papadopoulous K, Karavitis G, Parassi I, Christeli E, Patrinos GP, Manolis EN, Peros G. (2002) Hypermethylation associated transcriptional silencing of E-cadherin in primary sporadic colorectal carcinomas. *J Pathol* 198(4):442-449.
28. **Grady** W, Rajput A, Myeroff L, Liu D, Kwon KH, Willis J, Markowitz S. (1998) Mutation of the type II transforming growth factor-beta receptor is coincident with the transformation of human colon adenomas to malignant carcinomas. *Cancer Res* 58:3101-3104.
29. **Groden** J, Joslyn G, Samowitz W, Jones D, Bhattacharyya N, Spirio L, Thliveris A, Robertson M, Egan S, Meuth M, White R. (1995) Response of colon cancer cell lines to the introduction of APC, a colon-specific tumor suppressor gene. *Cancer Res* 55:1531-1539.
30. **Gruis** NA, Abeln ECA, Bardoel AFJ, Devilee P, Frants RR, Cornelisse CJ. (1993) PCR-based microsatellite polymorphism in the detection of loss of Heterocycosity in fresh and archival tumor tissue. *Br J Cancer* 68(2):308-313.
31. **Gustafson** C, Wilson PJ, Lukesis R, Baker E, Woollatt E, Annab L, Hawke L, Barret JC, Chenevix-Trench G. (1996) Functional evidence for a colorectal cancer tumor-suppressor gene at chromosome 8p22-23 by monochromosome transfer. *Cancer Res* 56:5238-5245.
32. **Haber** JE. (1999) DNA recombination: the replication connection. *Trends Biochem Sci* 24(7):271-275.
33. **Haggman** MJ, Wonjo KJ, Pearsall CP, Macoska JA. (1997) Allelic loss of 8p sequences in prostatic intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Urology* 50:643.647.
34. **Halling** KC, French AJ, McDonnell SK, Burgart LJ, Schaid DJ, Peterson BJ, Moon-Tasson L, Mahoney MR, Sargent DJ, O'Connell MJ, Witzig TE, Farr Jr. GH, Goldberg RH, Thibodeau SN. (1999) Microsatellite Instability and 8p Allelic Imbalance in stage B2 and C Colorectal Cancers. *J Nat Cancer Inst* 91(15):1295-1303.
35. **Hartwell** L. (1992) Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. *Cell* 7(14):543-546.

36. **Ilyas** M, Straub J, Tomlinson IP, Bodmer WF (1999) Genetic pathways in colorectal and other cancers. *Eur J Cancer* 35(3):335-351.
37. **Ingram** D, Yang FC, Travers JB, Wenning MJ, Hiatt K, Nes S, Hood A, Shannon K, Williams DA, Clapp DW. (2000) Genetic and biochemical evidence that haploinsufficiency of the Nfl tumorsuppressor gene modulates melanocyte and mast cell fates in vivo. *J Exp Med* 191:181-188.
38. **Ionov** Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. (1993) Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences is a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 363(6429):558-561.
39. **Ishii** H, Baffa R, Numata SI, Murakumo Y, Rattan S, Inoue H, Mori M, Fidanza V, Alder H, Croce CM. (1999) The FEZ1 gene at chromosome 8p22 encodes a leucine-zipper protein, and its expression is altered in multiple human tumors. *Proc Nat Acad Sci USA* 96:3928-3933.
40. **Jenkins** R, Takahashi S, DeLacey K, Bergstralh E, Lieber M. (1998) Prognostic significance of allelic imbalance of chromosome arms 7q, 8p, 16q and 18q in stage T3N0M0 prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 21:131-143.
41. **Johns** LE, Houlston RS. (2001) A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk. *Am J Gastroenterol* 96(10):2992-3003.
42. **Kagan** J, Stein J, Babaian RJ, Joe YS, Pisters LL, Glassman AB, von Eschenbach AC, Troncoso P. (1995) Homocygous deletions at 8p22 and 8p21 in prostate cancer implicate these regions as the sites for candidate tumor-suppressor genes. *Oncogene* 11:2121-2126.
43. **Kelemen** PR, Yaremko ML, Kim AH, Montag A, Michelassi F, Westbrook CA. (1994) Loss of Heterocygosity in 8p is associated with microinvasion in colorectal carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 11(3):195-198.
44. **Kern** SE, Fearon ER, Tersmette KW, Enterline JP, Leppert M, Nakamura Y, White R, Vogelstein B, Hamilton SR. (1989) Clinical and pathological accosciations with allelic loss in colorectal carinoma. *J Am Med Assoc* 261:3099-3109.

45. **Kinzler** KW, Vogelstein B. (1997) Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 386:761, 763.
46. **Knudson** AG. (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 68:820-823.
47. **Kronborg** O, Fenger C, Olsen J, Jorgensen OD, Sondergaard O. (1996) Randomised study of screening for colorectal cancer with faecal-occult-blood test. *Lancet* 384(9040):1467-1471.
48. **Kwabi-Addo** B, Giri D, Schmidt K, Podsypanina K, Parsons R, Greenberg N, Ittmann M. (2001) Haploinsufficiency of the Pten tumor-suppressor gene promotes prostate cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:11563-11568.
49. **Lerebours** F, Olschwang S, Thuille B, Schmitz A, Fouchet P, Buecher B, Martinet N, Galateau F, Thomas G. (1999) Fine deletion mapping of chromosome 8p in non-small-cell lung carcinoma. *Int J Cancer* 81:854-858.
50. **Leslie** A, Carey FA, Pratt NR, Steele RJ. (2002) The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br J Surg* 89:845-860.
51. **Levy** A, Dang UC, Bookstein R. (1999) High-density screen of human tumor cell lines for HDs of loci on chromosome arm 8p. *Genes Chromosomes Cancer* 24:42-47.
52. **Loeb** LA. (1991) Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res* 51(12):3075-3079.
53. **Loss** J, Eichhorn C, Nagel E. (2006) The effects of promotion colorectal cancer screening on screening utilisation; evaluation of the German Campaign "Aktiv gegen Darmkrebs" (Action against Colorectal Cancer). *Gastroentero.* 44(11):1127-1134.
54. **Lothe** RA, Peltomaki P, Meling GI, Aaltonen LA, Nystrom-Lahti M, Pylkkanen L, Heimdal K, Anderson TI, Moller P, Rognum TO. (1993) Genomic instability in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables and family history. *Cancer Res* 53:5849-5852.

55. **Lynch** HT, de la Chapelle A. (2003) Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 348 (10):919-932.
56. **Marra** G, Boland CR. (1995) Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: the syndrome, the genes and historical perspectives. *J Natl Cancer Inst.* 87(15):1114-1125.
57. **Melcher** R, Koehler S, Steinlein C, Schmid M, Mueller CR, Luehrs H, Menzel T, Scheppach W, Moerk H, Scheurlen M, Koehrlé J, Al-Taie O. (2002) Spectral karyotype analysis of colon cancer cell lines of the tumor suppressor and mutator pathway. *Cytogenetic Genome Res* 98:22-28.
58. **Melcher** R, Steinlein C, Feichtinger W, Mueller CR, Menzel T, Luehrs H, Scheppach W, Schmid M. (2000) Spectral karyotyping of the human colon cancer cell lines SW480 and SW620. *Cytogenet Cell Genet* 88:145-152.
59. **Meuth** M. (1990) The structure of mutation in mammalian cells. *Biochem Biophys Acta.* 1032(1):1-17.
60. **Miyaki** M, Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, Enomoto M, Igari T, Tanaka K, Muraoka M, Takahashi H, Amada Y, Fukayama M. (1994) Characteristics of somatic mutation of the adenomatous polyposis coli gene in colorectal tumors. *Cancer Res* 54:3011-3020.
61. **Niederacher** D, Beckmann M. (1998) Bedeutung der LOH Analyse für die Identifizierung von Tumorgenen. *Medgen* 10:256-258.
62. **Nishisho** I, Nakamura Y, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, Horii A, Koyama K, Utsunomiya J, Baba S, Hedge P. (1991) Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* 253:665-669.
63. **Ohgaki** K, Iida A, Ogawa O, Kubota Y, Akimoto M, Emi M. (1999) Localisation of tumor suppressor gene associated distant metastasis of urinary bladder cancer to a 1-Mb interval on 8p22. *Genes Chromosomes Cancer* 25:1-5.
64. **Parkin** M, Bray F, Ferlay J, Pisani P. (2005) Global Cancer Statistics 2002. *CA Cancer J Clin* 55(2):74-108.
65. **Peng** D, Ren CP, Yi HM, Zhou L, Yang XY, Li H, Yao KT. (2006) Genetic and epigenetic alterations of DLC-1, a candidate tumor suppressor gene

- in nasopharyngeal carcinoma. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 38(5):349-355.
66. **Pils** D, Horak P, Gleiss A, Sax C, Fajani G, Moebus VJ, Zielinski C, Reinthaller A, Zeilling R, Krainer M. (2005) Five genes from chromosomal and 8p22 are significantly down-regulated in ovarian carcinoma: N33 and EFA6R have a potential impact on overall survival. *Cancer* 104(11):2417-2429.
67. **Rosler** E. (2007) Allelische Verlustanalyse der chromosomalen Regionen 8p22 und 18q21.1 bei kolorektalen Karzinomen. URN: urn:nbn:de:bvb:20-opus-29361; URL: <http://www.opus-bayern.de/univuerzburg/volltexte/2008/2936/>
68. **Saiki** RK, Bugawan TL, Horhn GT, Mullis KB, Erlich Ha. (1986) Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA\_DQ alpha DANN with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 324(6093):163-166.
69. **Sasiadek** M, Sembalska-Kozłowska A, Smigiel R, Krecicki T, Blin N, Mirghomizadeh F. (2001) Microsatellite and chromosome instability in squamous cell laryngeal carcinoma. *Int J Oncol* 19:401-405.
70. **Scheppach** W. (1991) Bedeutung von Ballaststoffen für die Entstehung und Therapie gastroenterologischer Erkrankungen. *Akt Ernähr* 16:143-145.
71. **Scholnick** SB, Haughey BH, Sunwoo JB, el-Mofty SK, Baty JD, Piccirillo JF, Zequeira MR. (1996) Chromosome 8 allelic loss and the outcome of patients with squamous cell carcinoma of the supraglottic larynx. *J Natl Cancer Inst* 88:1676-1682.
72. **Schullerus** D, Herbers J, Chudek J, Kanamaru H, Kovacs G. (1997) Loss of heterozygosity at chromosomes 8p, 9p and 14q is associated with stage and grade of nonpapillary renal cell carcinomas. *J Pathol* 183:151-155.
73. **Seibold** S, Rudroff C, Weber M, Galle J, Wanner C, Marx M. (2003) Identification of a new tumor suppressor gene located at chromosome 8p21.3-22. *Faseb Journal* 17(9):1180-1182.

74. **Seitz S**, Rohde K, Bender E, Nothnagel A, Pidde H, Ullrich OM, El Zehairy A, Haensch W, Jandrig B, Kolble K, Schlag PM, Scherneck S. (1997) Deletion mapping and linkage analysis provide strong indication for the involvement of the human chromosome region 8p12-p22 in breast carcinogenesis. *Br J Cancer* 76:983-991.
75. **Seng TJ**, Cour JS, Li H, Cui Y, Goh HK, Wong ML, Srivastava G, Sidransky D, Califona J, Steenbergen RD, Rha SY, Tan J, Hsieh Ws, Ambinder RF, Lin X, Chan AT, Tao Q. (2006) The major 8p22 tumor suppressor gene *DLC1* is frequently silenced by methylation in both endemic and sporadic nasopharyngeal, esophageal and cervical carcinoma and inhibits tumor cell colony formation. *Oncogene* (Epub ahead of print).
76. **Shih IM**, Zhou W, Goodman SN, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. (2001) Evidence that genetic instability occurs at an early stage of colorectal cancer. *N Engl J Med* 335:1727-1732.
77. **Somasundaram K**. (2000) Tumor suppressor p53: regulation and function. *Front Biosci* 5:424-437.
78. **Stanbridge EJ**. (1990) Human tumor suppressor genes. *Annu Rev Genet* 24:615-657.
79. **Su L**, Vogelstein B, Kinzler KW. (1993) Association of the APC tumor suppressor proteins with catenins. *Science* 262:1734-1737.
80. **Sunwoo JB**, Holt MS, Radford DM, Deeker C, Scholnick SB. (1996) Evidence for multiple tumor suppressor genes on chromosome arm 8p in supraglottic laryngeal cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 16:164-169.
81. **Takanishi DM Jr**, Kim SY, Kelemen PR, Yaremko ML, Kim AH, Ramesar JE, Horrigan SK, Montag A, Michelassi F, Westbrook CA. (1997) Chromosome 8 Losses in Colorectal Carcinoma: Localization and Correlation with invasive disease. *Mol Diagn* 2(1):3-10.
82. **Thigalingam S**, Lengauer C, Leach FS, Schutte M, Hahn SA, Overhauser J, Willson JKV, Markowitz S, Hamilton SR, Kern SE, Kinzler KW, Vogelstein B. (1996) Evaluation of candidate tumor suppressor

- genes on chromosome 18 in colorectal cancers. *Nat Genet* 13(3):343-346.
83. **Thibodeau** SN, Bren G, Schaid D. (1993) Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 260(5109):816-819.
84. **Tomlinson** IP, Lambros MB, Royslance RR. Loss of heterozygosity analysis: practically and conceptually flawed? *Genes Chromosomes Cancer*. 2002 Aug;34(4):349-53
85. **Tsai** MH, Yang YC, Chen KH, Jiang JK, Chou SJ, Chiang TC, Jan HS, Lou MA. (2002) RER and LOH association with sporadic colorectal cancer in Taiwanese patients. *Hepatogastroenterology* 49(45):672-677.
86. **van der Bosch** K, Bekcer I, Savelyeva L, Bruderlein S, Schlag P, Schwam M. (1992) Deletions in the short arm of chromosome 8 are present in up to 90% of human colorectal cancer cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* 5:91-95.
87. **Vocke** CD, Pozzatti RO, Bostwick DG, Florence CD, Jemings SB, STrup SE, Duray PH, Liotta LA, Emmert-Buck MR, Linehan WM. (1996) Analysis of 99 microdissected prostate carcinomas reveals a high frequency of allelic loss on chromosome 8p12-21. *Cancer Res* 56:2411-2116.
88. **Vogelstein** B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AMM, Bos JL. (1988) Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319:525-532.
89. **Vogelstein** B, Fearon ER, Kern SE, Hamilton SR, Preisinger AC, Nakamura Y, White R. (1989) Allelotype of colorectal carcinomas. *Science* 244(4901):207-211.
90. **Vousden** KH. (2000) p53:death star. *Cell* 103(5):691-694.
91. **Willet** WC, Stampfer MJ; Colditz GA, Rosner BA, Speizer FE. (1990) Relation of meat, fat and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. *N Engl J Med* 329(24):1664-1672.
92. **Wilson** PJ, McGline E, Marsh A, Evans T, Arnold J, Wright K, Biden K, Young J, Wainwright B, Wicking C, Chenevix-Trench G. (2000)



- Sequence variants of DLC1 in colorectal and ovarian tumors. *Human Mutation* 15:156-165.
93. **Wright** K, Wilson PJ, Kerr J, Do K, Hurst T, Khoo SK, Ward B, Chenevix-Trench G. (1998) Frequent loss of Heterozygosity and three critical regions on the short arm of chromosome 8 in ovarian adenocarcinomas. *Oncogene* 17:1185-1188.
94. **Wu** CL, Roz L, Sloan P, Read AP, Holland S, Porter S, Scully C, Speight PM, Thakker N. (1997) Deletion mapping defines three discrete areas of allelic imbalance on chromosome 8p in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 20:347-353.
95. **Yaremko** ML, Kutza C, Lyzak J, Mick R, Recant WM, Westbrook CA. (1996) Loss of heterozygosity of the short arm of chromosome 8 is associated with invasive behaviour in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 16:189-195.
96. **Yaremko** ML, Recant WM, Westbrook CA. (1995) Loss of Heterozygosity from the short arm of chromosome 8p is an early event in breast cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 13:186-191.
97. **Yin** XL, Pang JC, Ng HK. (2002) Identification of a region of monozygous deletion on 8p22-23.1 in medulloblastoma. *Oncogene* 21(9):1461-1468.
98. **Yuan** BZ, Miller MJ, Keck CL, Zimonjic DB, Thorgeirsson SS, Popescu NC. (1998) Cloning, characterization and chromosomal localization of a gene frequently deleted in human liver cancer (DLC-1) homologous to rat RhoGAP. *Cancer Res.* 58:2196-2199.

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. M. Scheurlen sowie meinem Betreuer und Leiter des gastroenterologischen Labors, Herrn PD Dr. R. Melcher, für die Möglichkeit danken, unter ihrer Leitung dieses Thema bearbeiten und in ihrem Labor die dafür notwendigen Untersuchungen durchführen zu können.

Herrn Prof. Dr. M. Scheurlen danke ich weiterhin für die Übernahme des Koreferats.

Auch möchte ich Herrn Prof. Dr. W. Scheppach danken, unter dessen Leitung ich die Bearbeitung meines Themas begonnen habe.

Herrn Professor Dr. Dr. M. Fein danke ich für die Übernahme des zweiten Prüfungsfaches in der mündlichen Prüfung. Frau Dr. S. Herterich möchte ich sehr für die Unterstützung und Anregungen bei der Durchführung der Längenfragmentanalysen an den Sequenzierautomaten danken.

Herrn Dr. E. Rosler danke ich für seine Hilfsbereitschaft bei technischen Fragen sowie der freundlichen Erlaubnis, die in seiner Arbeit ermittelten Daten für den Marker D8S254 in meiner Auswertung verwenden zu dürfen.

Für die geduldige Betreuung und Anregung im praktischen und schriftlichen Teil dieser Arbeit gilt besonderer Dank meinem Betreuer und Doktorvater Herrn PD Dr. R. Melcher.

Dem Team des Gastro-Labors, Gerda Dusel, Elisabeth Kelber, Donata Kuhn und vor allem Kerstin Backhaus, gilt mein aufrichtiger Dank für die technische und moralische Unterstützung im Verlauf dieser Arbeit.