

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. Hermann Einsele**

**Retrospektive Analyse allelischer Verluste der Marker D2S123 und D5S346
bei kolorektalen Karzinomen zur Korrelation mit der Patientenprognose**

Inaugural-Dissertation

**zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von
Simon Schindler
aus Fulda**

Würzburg, Januar 2011

Referent: PD Dr. med. R. Melcher
Koreferent: Prof. Dr. med. M. Scheurlen
Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:
26.10.2011

Der Promovend ist Arzt

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	Das kolorektale Karzinom	1
1.2	Allgemeine Prinzipien der Tumorgenese und ihre Bedeutung für die Kolonkarzinogenese.....	2
1.2.1	Onkogene.....	3
1.2.2	Tumorsuppressorgene.....	4
1.2.3	Mutatorgene.....	5
1.2.4	Das DNA-Mismatch-Reparatursystem (MMR).....	5
1.2.5	Adenom-Karzinom-Sequenz.....	6
1.2.6	Erweiterung der Adenom-Karzinom-Sequenz.....	6
1.3	Molekulargenetische Analyseverfahren.....	8
1.3.1	Mikrosatelliten als genetische Marker.....	8
1.3.2	Chromosomale- und Mikrosatelliteninstabilität.....	8
1.3.3	LOH-Analyse zur Identifikation der Lokalisation von TS-Genen.....	8
1.4	Zielsetzungen der Arbeit.....	10
2	Material und Methoden.....	11
2.1	Materialien.....	11
2.1.1	Geräte.....	11
2.1.2	Chemikalien.....	12
2.1.3	Kommerzielle Kits.....	13
2.1.4	Primer.....	14
2.1.5	Standardlösungen.....	14
2.2	Methoden.....	16
2.2.1	DNA-Isolation.....	16
2.2.2	Photometrie.....	16
2.2.3	PCR-Amplifizierung.....	17
2.2.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	17
2.2.5	Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	18

2.2.6	LOH-Analyse.....	19
2.2.7	Retrospektive Mikrosattelitenanalyse der Marker D2S123 und D5S346	20
2.2.8	Korrelation der LOH-Daten mit der Patientenprognose.....	21
3	Ergebnisse.....	22
3.1	Retrospektive LOH-Analyse des Markers D2S123.....	22
3.1.1	Patientenkollektiv zur Analyse des Markers D2S123.....	22
3.1.2	Korrelation eines LOH des Markers D2S123 mit dem Patientenüber- leben.....	22
3.2	Retrospektive LOH-Analyse des Markers D5S346.....	24
3.2.1	Patientenkollektiv zur Analyse eines LOH des Markers D5S346.....	24
3.2.2	Korrelation eines LOH des Markers D5S346 mit dem Patientenüber- leben.....	25
3.3	Etablierung der LOH-Analyse der Marker D2S123 und D5S346 auf Dem LI-COR-Sequenzier.....	27
3.4	Auswertung der LOH-Ergebnisse der Marker D2S123 und D5S346.....	29
4	Diskussion.....	31
4.1	Retrospektive Mikrosattelitenanalyse der Marker D2S123 und D5S346	31
4.2	Korrelation des LOH D2S123 mit klinischen Verlaufsparemtern.....	31
4.3	Korrelation des LOH D5S346 mit klinischen Verlaufsparemtern.....	32
4.4	Etablierung der LOH-Analyse der Marker D2S123 und D5S346 auf Dem LI-COR-Sequenzier.....	33
4.5	LOH-Analyse der Marker D2S123 und D5S346 - Ausblick.....	33
4.6	Kandidatengene in der chromosomalen Region 5q21.3 bis 5q23.1.....	33
4.7	Kandidatengene in der chromosomalen Region 2p16.1-21.....	34
5	Zusammenfassung.....	38
6	Abkürzungsverzeichnis.....	39
7	Literaturverzeichnis.....	40

1. Einleitung

1.1 Das kolorektale Karzinom

Die Inzidenz des kolorektalen Karzinoms ist weltweit starken geographischen Schwankungen unterlegen und beträgt in Mitteleuropa 25 bis 30 Fälle pro 100000 Einwohnern bei steigender Tendenz. Damit ist das kolorektale Karzinom bei Männern nach dem Bronchialkarzinom und bei Frauen nach dem Mammakarzinom das jeweils zweithäufigste Karzinom (Ihde und Longo, 1998). Histologisch imponieren 70% der kolorektalen Karzinome als Adenokarzinome, 20% als verschleimende Karzinome, die sich je zur Hälfte in intrazellulär verschleimende (Siegelringzell-) und extrazellulär verschleimende (Gallert-) Karzinome aufteilen sowie 10% als undifferenzierte Karzinome. Seltener Manifestationsformen stellen das Adenoakanthom und das Plattenepithelkarzinom dar. Die Grenze zwischen Kolonkarzinom und Rektumkarzinom liegt 16 cm zwischen aboralem Tumorrand und der Anokutanlinie in der Messung mit dem starren Rektoskop. Beim kolorektalen Karzinom handelt es sich um ein auf dem Boden von Epitheldysplasien entstehendes Karzinom des Dickdarms, das zu 60% im Rektum, zu 20% im Sigma, zu 10% im Zökum und Colon ascendens und zu 10% im übrigen Kolon lokalisiert ist. Als Risikofaktoren für die Entstehung kolorektaler Karzinome gelten langjähriger Nikotin- und Alkoholabusus, Lebensalter über 45 Jahre, kolorektale Karzinome und Adenome in der Familienanamnese, chronisch entzündliche Darmerkrankungen (Morbus Crohn, Colitis ulcerosa), Ureterosigmoideostomie als Harnableitung nach Zystektomie sowie Infektionen mit *Schistosoma mansoni* und *Schistosoma japonicum* (Krankheitsbild der Darmbilharziose). Ernährungsfaktoren und genetische Faktoren spielen eine weitere wichtige ätiologische Rolle. Prädisponierende Ernährungsfaktoren sind Adipositas sowie fettreiche, fleischreiche und ballaststoffarme Kost (Scheppach et al., 2000). Familiäre Formen sind die Familiäre Adenomatöse Polyposis (FAP) und das Hereditäre Nichtpolypöse Kolonkarzinom-Syndrom (HNPCC oder Lynch-Syndrom). In beiden Fällen handelt es sich um autosomal-dominant vererbte Erkrankungen. Pathogenetisch führt das Kolonkarzinom durch zirkuläres Wachstum zu einer Lumenverengung und infolge der resultierenden Stenose zu Obstipation, Blutungen und paradoxer Diarrhoe. Die Wachstumsgeschwindigkeit kolorektaler Karzinome ist eher langsam. Die Tumorverdopplungszeit liegt zwischen vier Monaten und drei Jahren. Typisch für das kolorektale Karzinom ist eine sowohl lymphogene als auch hämatogene Metastasierung. Die lymphogene Metastasierung erfolgt über eine unipolare Metastasenstraße entlang der Mesenterialarterien. Die hämatogene Metastasierung erfolgt über den venösen

Abfluß via Pfortader in die Leber bzw. (distales Rektumkarzinom) über die untere Hohlvene in die Lunge. 90% der kolorektalen Karzinome können operativ angegangen werden, wobei man sich einiger durch den Verlauf der Hauptstammgefäße vorgegebener standardisierter En-bloc-Resektionsverfahren bedient (Geisbe und Durst, 1996). Eine postoperative adjuvante Chemotherapie mit 5-Fluoruracil und Folinsäure verbessert nachweislich die 5-Jahres-Überlebensrate sowohl beim Kolon- als auch beim Rektumkarzinom. Prognostisch kann eine gesamte 5-Jahres-Überlebensrate von 45% subsummiert werden (Hermanek et al, 1994). In den Stadien T₁₋₂ (UICC 1) beträgt die 5-JÜL etwa 80%, in den Stadien T₃₋₄ (UICC 2) noch 60-70%, beim Vorliegen von Lymphknotenmetastasen (UICC 3) nur noch 30-40% und schließlich beim Vorliegen von Fernmetastasen (UICC 4) 5-20%.

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

Tab. 1 Stadieneinteilung des Kolonkarzinoms

Die Prognose des Rektumkarzinoms verschlechtert sich proportional, je distaler es lokalisiert ist. Letztendlich überlebt etwa jeder dritte betroffene Patient das Kolonkarzinom (Nöthiger und Birrer, 1994). Bei 2-4% der Patienten kann ein synchrones Zweitkarzinom in anderer Lokalisation nachgewiesen werden, weshalb die totale Koloskopie als diagnostisches Mittel der Wahl obligatorisch ist (Riecken 1994).

1.2 Allgemeine Prinzipien der Tumorgenese und ihre Bedeutung für die Kolonkarzinogenese

Malignome entstehen auf der Basis natürlicher Selektion somatischer Zellen (Ames, 1990) und stellen möglicherweise das normale Endstadium eines jeden vielzelligen Organismus dar. Im Laufe der Evolution haben sich auf verschiedenen Ebenen des Zellzyklus

Kontrollmechanismen entwickelt, die der Entstehung malignen Wachstums entgegenwirken. Gehen mehrere natürliche Kontrollmechanismen, wie z.B. Apoptose (programmierter Zelltod) verloren, entsteht ein Tumor. Die Krebszelle hat einen Weg entwickelt, die entsprechenden Schutzmechanismen zu umgehen. Armitage und Doll vermuteten bereits 1954, dass etwa 6 – 7 Mutationen zur Entstehung eines invasiven Karzinoms erforderlich sind. Mutationen, die der Zellproliferation förderlich sind und somit eine Vergrößerung der Zielzellpopulation bewirken, und Mutationen, die die Stabilität des Genoms beeinträchtigen, erhöhen die Wahrscheinlichkeit einer solchen Entwicklung. Onkogene, Tumorsuppressorgene und Mutatorgene konnten als in Tumoren besonders häufig mutierte Gene identifiziert werden. Mutationen können zur Aktivierung von Onkogenen und Inaktivierung von Tumorsuppressorgen führen (Bishop, 1991). Onkogene sind mutierte Protoonkogene, die die Zellproliferation aktiv fördern. Tumorsuppressorgene dagegen bewirken eine Hemmung der Zellproliferation. Mutatorgene erhalten die Integrität des Genoms und die Zuverlässigkeit des Informationstransfers. Funktionslosigkeit führt zu Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgen.

1.2.1 Onkogene

Aminosäureverkürzungen oder –substitutionen an Protoonkogenen aktivieren diese zu Onkogenen. Proto-Onkogene haben als nicht mutierte Gene positiv regulatorische Wirkung auf die physiologische Zellvermehrung. Durch multifaktorielle Einflüsse können Proto-Onkogene im Laufe ihres Lebens zu Onkogenen mutieren. In seltenen Fällen sind sie bereits in der Keimbahn mutiert. Der Phänotyp der Zelle kann bereits durch ein einziges mutiertes Allel beeinträchtigt werden. Doolittle und Mitarbeiter haben 1983 die Abhängigkeit des v-sis-Onkogens vom Plättchenwachstumsfaktor B (PDGFB) bewiesen und begründeten damit das Verständnis der Funktionsfähigkeit von Onkogenen. Neben der Überexpression von Wachstumsfaktoren (z.B. SIS) als Auslöser zellulärer Hyperproliferation fand man vier weitere Ansatzpunkte zellulärer Funktionsstörungen, die zu Krebs führen können: Zelloberflächenrezeptoren (z.B. ERBB oder FMS), Bestandteile des intrazellulären Signalübermittlungssystems (z.B. RAS), Transkriptionsfaktoren und DNA-bindende Kernproteine (z.B. MYC) sowie Faktoren, die den Fortgang des Zellzyklus steuern (Kamb, 1995). Die Aktivierung von Protoonkogenen kann auf vielfältige Weise erfolgen und sowohl qualitativer als auch quantitativer Art sein. Amplifikationen, Punktmutationen, Translokationen (Rabbits 1994) und Transpositionen sind Beispiele für Mechanismen, die Protoonkogene zu Onkogenen aktivieren können.

1.2.2 Tumorsuppressorgene

Tumorsuppressorgene sind Gegenspieler der Onkogene und können bei mutationsbedingtem Funktionsverlust ebenfalls zur Tumorgenese und Tumorprogression beitragen. Nur bei Inaktivierung beider Allele eines Tumorsuppressorgens kommt es zur Veränderung im Verhalten der Zelle. Knudson und Mitarbeiter entwickelten 1971 anhand von Untersuchungen an Retinoblastomen, einem seltenen malignen Netzhauttumor des Kinder- und Jugendalters (Inzidenz: 1:20000), das sogenannte „Two-Hit-Modell“. Demnach sind zur Entstehung einer Tumorzelle zwei aufeinanderfolgende „Hits“ (= Mutationen) erforderlich. Cavanee und Mitarbeiter bestätigten 1983 die Knudson-Hypothese und postulierten mehrere Mechanismen für Knudsons „zweiten Treffer“. Punktmutation, Nondisjunction, mitotische Rekombination und Deletion wurden als für den Verlust der verbleibenden funktionellen Kopie eines Tumorsuppressorgens verantwortlich vorgeschlagen. Tumorsuppressorgene können z.B. als negative Zellzyklus-Regulatoren (RB1, p53) oder als Adhäsionsmoleküle (APC, DCC) fungieren. Während der „first hit“ bei hereditären Karzinomen, wie FAP und HNPCC, bereits in einer vererbaren Keimbahnmutation liegt, müssen bei der Entstehung sporadischer Karzinome beide Wildtypallele im Rahmen der Entwicklung und Ausdifferenzierung somatischer Zellen mutieren. Zum Ausfall der Genfunktion und der damit verbundenen Induktion des Entartungsprozesses ist jeweils die Mutation der zweiten Kopie erforderlich (= „second hit“). Durch komparative LOH-Analysen von Tumor und Normalgewebe kann man diesen Verlust des letzten intakten Wildtypallels nachweisen (Niederacher et al, 1998).

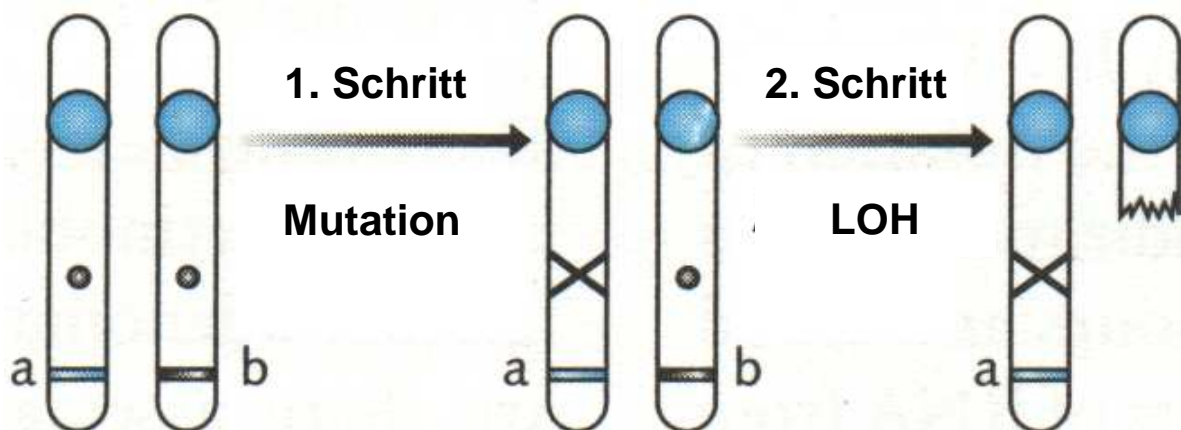


Abb. 1 Knudsons Hypothese der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. Häufig deletierte Regionen in kolorektalen Karzinomen können TS-Gene beinhalten.

Entsprechend der Knudson-Hypothese erfolgt die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen in zwei Schritten („Hits“). Zuerst wird ein Allel des Gens durch Mutation und anschließend das zweite Allel durch eine Deletion inaktiviert. Häufig deletierte Regionen in Malignomen enthalten demnach mit hoher Wahrscheinlichkeit ein oder mehrere Tumorsuppressorgene.

1.2.3 Mutatorgene

Die dritte Gruppe in diesem Rahmen relevanter Gene, die Mutatorgene, bieten normalerweise einen gewissen Schutz der Integrität der genetischen Information. Sie sind wie die Tumorsuppressorgene für Mutationen rezessiv und bedürfen zum Funktionsverlust ebenfalls Knudsons „Two-Hit-Mechanismus“. Durch Mutationen von Mutatorgenen kann es zu Störungen in der Replikation oder Reparatur der DNA kommen. Der durch die Mutationen von Onkogenen, Tumorsuppressorgenen und Mutatorgenen entstehende Zielzellklon ist ursächlich für ein erhöhtes Mutationsaufkommen in dieser Zellpopulation und fördert somit die Tumorprogression.

1.2.4 Das DNA-Mismatch-Reparatursystem (MMR)

Basenfehlpaarungen im menschlichen Genom, wie sie durch spontane Desaminierung oder Fehler der DNA-Polymerase bei der Replikation entstehen, können sich als Mutationen manifestieren, sofern sie nicht durch das DNA-Mismatch-Reparatursystem erkannt und eliminiert werden. Ebenso können DNA-Veränderungen durch chemische Noxen, wie Basenfehlpaarungen an alkylierten DNA-Basen, mittels Erkennung, Bindung und Exzision durch das MMR behoben werden. Mehrere Mismatch-Reparaturgene (hMSH2, hMSH3, hMSH6, hMLH1, hPMS2) sowie eine Reihe von Proteinen (RPA, PCNA, RFC, Exonuclease 1, Endonuclease FEN1) sind hierbei beteiligt (Seyffert et al., 2002). Mutationen in den MMR-Genen prädisponieren zum Hereditären Nichtpolypösen Kolonkarzinom-Syndrom (HNPCC). 60% der Patienten weisen eine Mutation des hMSH2-Gens, 30% eine Mutation des hMLH1-Gens auf. Die bei diesen Patienten häufig auftretenden Zweittumoren sprechen für eine global integrative Funktion des MMR im menschlichen Genom. Wiederholte Reparaturversuche durch das MMR führen durch DNA-Strangbrüche zum Zelltod. Kommt es nun z.B. durch eine hMSH2-Mutation zum Funktionsverlust des MMR, kann eine Fehlpaarung nicht korrigiert werden, so dass sich eine progressive Genmutation entwickeln kann (keine Apoptose der mutierten Zelle).

1.2.5 Adenom-Karzinom-Sequenz

Das sporadische kolorektale Karzinom entwickelt sich aus primär benignen epithelialen Neoplasmen des Gastrointestinaltrakts, sog. Adenomen. Man unterscheidet hierbei frühe (Größe < 1 cm), intermediäre (Größe > 1 cm ohne nachweisbare Karzinomherde) und späte Adenome (Größe > 1 cm mit nachweisbaren Karzinomherden). Fearon und Vogelstein haben 1990 eine Abfolge der schrittweisen Entstehung von Dickdarmkrebs vorgelegt, bei der jede einzelne Entwicklungsstufe einen Wachstumsvorteil für die Zelle darstellt. Am Beginn dieser sog. „Vogelstein-Sequenz“ steht eine Mutation des APC-Gens am Genlocus 5q21, die zur Entwicklung adenomatöser Polypen im gesamten Dickdarm führt (Kinzler et al, 1991). Weitere Untersuchungen haben ergeben, dass die meisten intermediären und späten Adenome im Gegensatz zu den frühen Entwicklungsstufen Mutationen des KRAS-Onkogens aufweisen. KRAS-Mutationen scheinen also an der Entwicklung vom frühen zum intermediären Adenom beteiligt zu sein (Forrester et al 1987). Bei der Weiterentwicklung vom intermediären zum späten Adenom erfolgt ein Verlust der Heterozygotie (loss of heterozygosity, LOH) im Bereich der chromosomalen Region 18q (Fearon et al. 1990). Das Gen, das dadurch inaktiviert wird ist noch nicht sicher identifiziert. Mutationen und nachfolgende Deletionen des p53-Tumorsuppressorgens am Genlocus 17p scheinen schließlich für die Entwicklung vom späten Adenom zum invasiven Karzinom verantwortlich zu sein (Baker et al 1989). Alternativ zu der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen wie APC, DCC und p53 durch Mutationen und Deletionen kann die Kolonkarzinogenese auch maßgeblich durch eine Erhöhung der Gesamtmutationsrate von Mutatorgenen wie MSH2 oder MLH1 beeinflusst werden (Perrin 2001, Plaschke 2002). Je mehr verschiedene genetische Alterationen in einem Tumor auftreten, desto aggressiver ist sein klinisches Erscheinungsbild (Hamelin 1994, Jen 1994).

1.2.6 Erweiterung der Adenom-Karzinom-Sequenz

Nachdem in den Untersuchungen der molekularen Adenom-Karzinom-Sequenz beim kolorektalen Karzinom durch Vogelstein und Mitarbeiter den häufig deletierten Regionen 5q, 17p und 18q die Tumorsuppressorgene APC, p53 und DCC zugeordnet werden konnten, wurden in den folgenden Jahren für die Region 18q zwei weitere Kandidatengene vorgeschlagen (Smad2 und DPC4; Eppert et al., 1996, Hahn et al., 1996). Die Bedeutung der einzelnen Gene ist noch nicht vollständig geklärt. In den folgenden Jahren konnten durch die Entdeckung neuer informativer Marker die Regionen 1p32-36, 2p21-16.3, 3p23, 4p14-16, 8p21-22, 11q22-23, 14q32 22q13 als ebenfalls häufig deletierte Regionen beim kolorektalen

Karzinom identifiziert werden und somit eine Erweiterung der molekularen Adenom-Karzinom-Sequenz nach Vogelstein postuliert werden (Praml et al., 1995, Bisgaard et al., 2001, Iniesta et al., 2000, Arribas et al., 1999, Gustafson et al., 1996, Tomlinson und Bodmer, 1996, Young et al., 1993, Yana et al., 1995). Während allelische Verluste der Regionen 8p, 14q32 und 22q eher beim fortgeschrittenen Karzinom beobachtet werden, können Verluste auf 11q22-32 den früheren Stadien des Karzinoms und auf 1p35 bereits der Entwicklung des Adenoms zugeordnet werden (Cunningham et al., 1994, Young et al., 1993, Young et al., 1995, Lee et al., 2000, Lothe et al., 1995). Nach intensiven Untersuchungen der neu identifizierten Regionen wurden einige Kandidatengene vorgeschlagen, die sich allerdings nicht als für die Kolonkarzinogenese relevante Tumorsuppressorgene erwiesen. Das Wiederherstellen der chromosomalen Regionen 1p34-36 und 8p12-pter konnte jedoch spezifische Eigenschaften von Tumorzellen (z.B. Invasivität) supprimieren und gab somit indirekte Hinweise auf das Vorhandensein tumorrelevanter Gene in den entsprechenden Regionen (Tanaka et al., 1993, Tanaka et al., 1996, Gustafson et al., 1996).

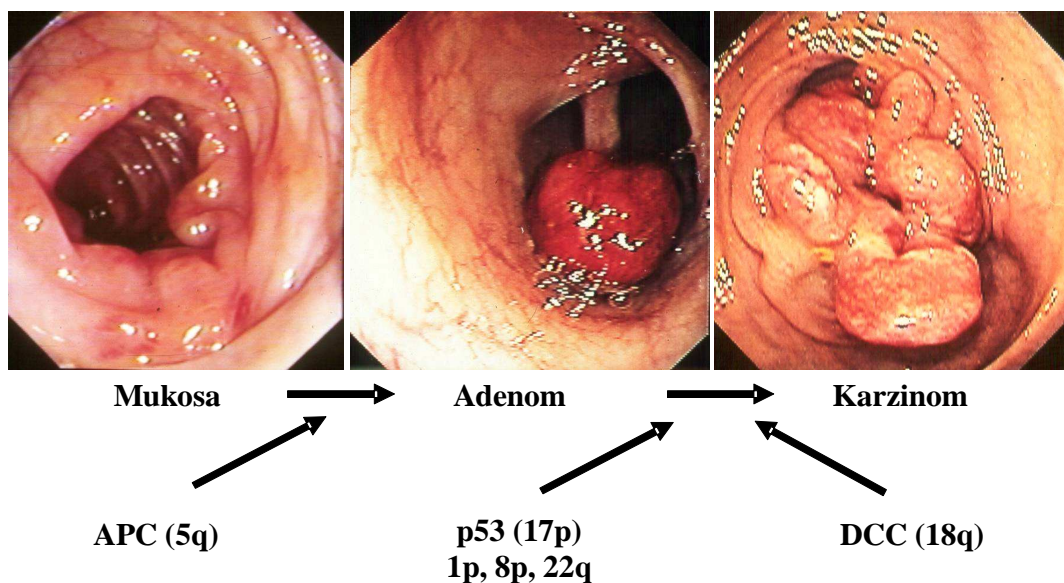


Abb.2 Adenom-Karzinom-Sequenz. Deletierte chromosomale Regionen und (potentielle) Tumorsuppressorgene (s. Text)

1.3 Molekulargenetische Analyseverfahren

1.3.1 Mikrosatelliten als genetische Marker

Unter Mikrosatelliten oder short tandem repeats (STRP) versteht man kurze DNA-Sequenzen, die aus tandemartig wiederholten Basenfolgen bestehen, eine Länge von weniger als 60 bp aufweisen und in großer Anzahl über das gesamte menschliche Genom verstreut sind (Weber und Wong 1993). Bei den einzelnen Sequenzmotiven von Mikrosatelliten handelt es sich um Di-, Tri- und Tetranukleotide von variabler Basenzusammensetzung. Besonders häufig ist die Form $(CA)_n$, (Hamada und Kakunaga, 1982). Die Tatsache, dass die Anzahl der repeat-Einheiten individuell stark variiert, kann man sich in der Verwendung von Mikrosatelliten als genetische Marker zunutze machen (Litt und Luty, 1982; Tautz und Renz, 1984). Zur spezifischen Vervielfältigung der entsprechenden DNA-Sequenz bedient man sich zweier Oligonukleotid-Primer und der enzymatischen Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis und Faloona, 1987). Informativ ist die Mikrosatellitenanalyse, wenn die Anzahl der Wiederholungen auf beiden Chromosomen unterschiedlich sind (Heterozygotie).

1.3.2 Chromosomale- und Mikrosatelliteninstabilität

Unter dem Begriff chromosomale Instabilität („chromosomal instability“; CIN) unterscheidet man auffällige Aberrationen des Karyotyps (Monosomien, Trisomien, Deletionen, Translokationen, Chromosomenfusionen etc.). Unter Mikrosatelliteninstabilität versteht man Längenvariationen von Mikrosatelliten im Tumor, die ein indirekter Hinweis auf einen Funktionsverlust von Reparaturenzymen darstellen (Seyffert et al., 2002). Beim Hereditären Nichtpolypösen Kolonkarzinom-Syndrom (HNPCC), einer autosomal-dominant vererbten Erkrankung, tritt Mikrosatelliteninstabilität zwischen Tumor und gesundem Gewebe als Zeichen für eine fehlerhafte Replikation der DNA auf. Beim HNPCC beobachtet man dieses Phänomen in etwa 92% der Fälle, bei sporadischen Tumoren tritt es zu etwa 15% auf (Kullmann et al, 1996). Interessanterweise sind Tumoren mit einer chromosomalen Instabilität meist mikrosatellitenstabil und Tumoren mit einer Mikrosatelliteninstabilität sind chromosomal stabil (Melcher et al., 2002).

1.3.3 LOH-Analyse zur Identifikation der Lokalisationen von TS-Genen

Die Position von Tumorsuppressorgenen kann mit Hilfe eines Tests auf Verlust der Heterozygotie (LOH = „loss of heterozygosity“) identifiziert werden. Cavenee und

Mitarbeiter haben 1983 gezeigt, dass es sich bei dem ersten Mutationsereignis in der Regel um eine Punktmutation handelt. Nondisjunction, mitotische Rekombination und Deletion wurden desweiteren als mögliche Mechanismen für die zweite Mutation vorgeschlagen. In allen drei Fällen geht ein Allel jedes Markers in der Nähe des Tumorsuppressorgens verloren, es kommt also zu einem Verlust der Heterozygotie (LOH). Der Verlust beider Allele ist auch in Tumorzellen sehr selten. Durch komparative Analysen von Tumorproben mit Normalgewebe desselben Individuums auf Marker, die über das ganze Genom verteilt liegen, kann die Position von Tumorsuppressorgenen identifiziert werden. Das APC-Gen weist einen tumorspezifischen LOH am Genlocus 5q21 beim kolorektalen Karzinom auf. Das p53-Gen am Genlocus 17p ist ein Beispiel für einen tumorunspezifischen LOH und kann in vielen verschiedenen Tumoren nachgewiesen werden. Bei Homozygotie der konstitutionellen DNA (also der DNA des Normalgewebes) für einen bestimmten Marker kann die LOH-Analyse keine Informationen über einen Allelverlust im Tumorgewebe liefern. Um einen möglichst großen Anteil informativer Proben zu erhalten, verwendet man in der Praxis polymorphe Mikrosatelliten als genetische Marker bei der LOH-Analyse. Pathologische Tumorproben enthalten neben der Tumor-DNA in der Regel einen gewissen Anteil der DNA des beigemengten Normalgewebes, weswegen die Auswertung von LOH-Analysen quantitativ anhand der Bandenintensitäten erfolgen muss. Eine Reduktion der Signalintensität um mindestens 30% wird hierbei als LOH gewertet.

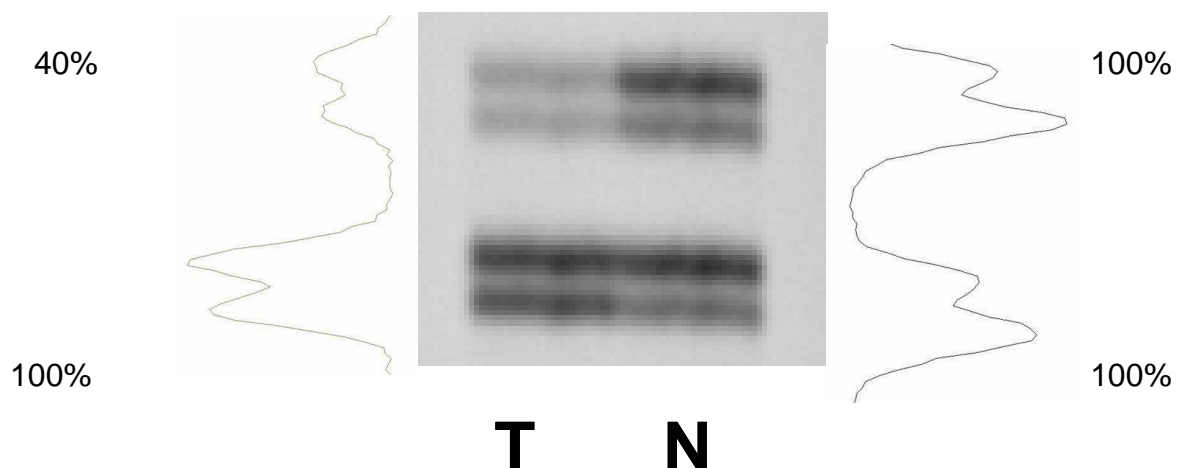


Abb.3 Signalintensität bei der LOH-Analyse

1.4 Zielsetzungen der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, die prognostische Relevanz von allelischen Verlusten der chromosomalen Bereiche 2p16.1-3 und 5q22.2 beim kolorektalen Karzinom zu untersuchen. Genutzt werden dazu die in diesen chromosomalen Abschnitten lokalisierten Mikrosatellitenmarker D2S123 und D5S346. Untersucht werden kolorektale Karzinome, die von 2000-2004 von der interdisziplinären Forschungsgruppe Kolonkarzinom Würzburg gesammelt worden sind. Für alle Karzinome stehen die klinischen Verlaufsparemeter aus dem Tumorzentrum Würzburg zur Verfügung. Analysiert werden Daten, die mittels eines ABI-Sequencers im Institut für Pathologie erhoben worden sind. Die Marker D2S123 und D5S346 sind Teil der Markerpanels zur Untersuchung der Mikrosatelliteninstabilität. Die Optimierung der Marker sind deshalb nicht unter dem Aspekt der Deletionsanalyse erfolgt. Im Rahmen dieser Arbeit soll untersucht werden, ob die Daten auch für eine retrospektive LOH-Analyse geeignet sind und ob eine signifikante Korrelation zwischen allelischen Verlusten der Marker D2S123 und D5S346 mit dem Patientenüberleben hergestellt werden kann.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Li-COR DNA-Sequencer model 4000	Li-COR, Lincoln, Nebraska, USA MWG-Biotech (Gesellschaft für angewandte Bio-technologie mbH)
PC Pentium 90 MHz, 24 MB Ram	Peacock GmbH & Co. KG, Soest, Westfalen, Deutschland
Operating System OS2 Warp Version 3	IBM Corporation, United Kingdom Limited, Portsmouth, England
Iomega Zip 100	Iomega International S.A., Geneva, Switzerland
Li-COR Base ImagIR™ Image Analysis Model 4000&4000L DNS	Li-COR, Lincoln, Nebraska, USA
Quick SeqencIR v.2.10	Li-COR, Lincoln, Nebraska, USA
Prism 4 for Windows	GraphPad Software, Inc., USA
GeneAmp ^R PCR-System 9700 PE Applied Biosystems	Perkin Elmer, Norwalk, USA
Biofuge fresco	Kendro Laboratory Products Heraeus, Osterode, Deutschland
Biometra BioDoc, Videodokumentationssystem	Biometra GmbH, Goettingen, Germany
Biometra TI3, Transilluminator	Biometra GmbH, Goettingen, Germany
Biometra Video Graphic Printer UP-890CE	Kaiser Fototechnik GmbH & Co. KG, 74722 Biometra GmbH, Goettingen, Germany
Eismaschine „AF-10“	Scotsman Ice Systems Vernon Hills, IL, USA
Feinwaage AB204	Mettler, Toledo, Schweiz
Gefrierschränke: -Bosch Automatik GS 368 (-18°C) -Liebherr Premium (-20°C) -Forma Scientific (-80°C),	Robert Bosch GmbH, 70839 Gerlingen-Schillerhöhe, Germany Liebherr-Hausgeräte Ochsenhausen GmbH, Ochsenhausen, Germany Klein, Medizin & Labortechnik Würzburg, Germany
GeneAmp [®] PCR System 9700	PE Applied Biosystems; Perkin Elmer, Norwalk, USA

Kaiser RLR, Kameraarm	Kaiser Fototechnik GmbH & Co. KG, 74722 Buchen, Germany
Kaiser RS1, Repröstander	Kaiser Fototechnik GmbH & Co. KG, 74722 Buchen, Germany
Laborabzug	Köttermann GmbH & Co KG, D-31311 Uetze/Hänigsen
Li-COR DNA-Sequencer model 4000	Li-COR, Lincoln, Nebraska, USA; MWG-Biotech (Gesellschaft für angewandte Biotechnologie mbH)
LI-COR 9840-161, Geltaschenkamm (3mm x 4mm x 0,25mm (BxHxT))	Li-COR, Lincoln, Nebraska, USA; MWG-Biotech (Gesellschaft für angewandte Biotechnologie mbH)
MicroCentrifuge Model SD Speed 6000 RAM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Pharmacia Biotech Ultraspec 3000 Spectrophotometer	Biochrom Ltd. Cambridge CB4 0FJ, England
Schüttelmaschine Model K550GE	Scientific Industries Inc., Bohemia, NY 11716, USA
Ultra-Turrax (bis 24'000 U/Min)	IKA-Werke GmbH & Co, D79219 Staufen, Deutschland
Wasserbad „GFL 1083“	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, D30938 Burgwedel

2.1.2 Chemikalien

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

	Deutschland
H ₂ O, aqua ad iniectabilia	Delta Select, Pfullingen
5mM NaOH	Merck, Darmstadt, Deutschland
Saccharose	Roth, Karlsruhe
SequaGel complete	National Diagnostics, Atlanta, Georgia, USA
SequaGel-6 ultra pure	National Diagnostics, Atlanta, Georgia, USA
Size Standard IRDye 800	Licor, Lincoln, USA
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylenecyanole FF	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

2.1.3 Kommerzielle Kits

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

2.1.4 Primer

Primer, oligo, 5' IRD 800 modifiziert	
D2S123	MWG Biotech, Ebersberg
D5S346	

2.1.5 Standardlösungen

Ethidiumbromid	5 mg/ml, in dest. H ₂ O gelöst
Loading-Buffer	95% Formamid [v/v] 5mM NaOH 0.1% [w/v] Bromphenolblau 3',3'',5',5''-Tetrabromophenolsulfonephthalein 0.1% [w/v] Xylenecyanole FF 4,5% H ₂ O, aqua ad iniectabilia
Probenpuffer L IV	0,25% (w/v) Bromphenolblau 40% (w/v) Saccharose, in dest. H ₂ O gelöst
5x TBE-Puffer	54 g Trisbase 27,5 g Borsäure 20 ml 0,5M EDTA pH 8,0
10 x TBS	99,3g NaCl 12,1g Tris pH 7,4
10 x TBE	109g Tris 0,9M 55g Borsäure 0,9M 40ml EDTA, pH 8,0
PBS	NaCl 0,9% 10 mM Natriumphosphat- puffer pH 7,4
dNTP-Mix	10µl dATP 10µl dCTP 10µl dGTP 10µl dTTP 760µl aqua dest

27,5-PCR-Puffer	27,5µl MgCl 160µl dNTP 100µl 10xPCR-Puffer 622,5µl aqua dest
-----------------	---

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Isolation

Zur Isolation der DNA aus den präparierten Tumorproben wird eine Modifikation des Isolations-Kits der Firma Roche Molecular Biochemicals für Nukleinsäuren verwendet. Um suffiziente Nukleinsäurekonzentrationen zu erhalten, benötigt man zwischen 25 und 50 mg Probenmaterial von Tumorprobe und korrespondierendem Normalgewebe. Zu Beginn der Isolation erwärmt man den Elutionspuffer im Wasserbad auf 70°C. Das mit einem Skalpell in möglichst kleine Stücke zerschnittene Probenmaterial wird in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und mit 200 µl Lösungspuffer und 40 µl Proteinase K versetzt. Nach gründlichem Durchmischen werden die Gefäße im Wasserbad bei 55°C für mindestens eine Stunde inkubiert. Zur vollständigen Lösung des Materials kann die Gabe von 40 µl Proteinase K ein bis zweimal wiederholt werden und die Inkubationszeit auf mehrere Stunden verlängert werden, wobei die Proben etwa im 20-Minuten-Takt mittels Vortexer gemischt werden sollten. Die nun im gelösten Proben werden mit 200 µl Bindepuffer versetzt und für 10 Minuten bei 72°C inkubiert. Nach der Beimengung von 100 µl Isopropanol und gründlichem Durchmischen werden die Proben mit einer 1 ml-Pipettenspitze aufgezogen und in speziell hierfür entwickelte Filtersysteme der Firma Roche überführt. Die Proben werden in einer Standard-Tischzentrifuge bei 8000 rpm für 1 Minute zentrifugiert und der Durchfluss anschließend verworfen. Das Filter-Cap wird auf ein neues Reservoir aufgesetzt und die darin befindlichen Proben mit 500 µl Inhibitor-Removal-Puffer versetzt. Nach erneuter Zentrifugation unter den oben genannten Bedingungen versetzt man die Proben mit 500 µl Waschpuffer und zentrifugiert wiederum. Dieser Schritt wird anschließend ein zweites Mal durchgeführt. Um die verbliebenen Reste des Waschpuffers aus dem Isolat zu entfernen, zentrifugiert man die Gefäße nun für 10 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit (14000 rpm) und verwirft den Durchfluss. Zur Portionierung der Isolate zentrifugiert man jeweils 2 Elutionen a 100 µl vorgewärmten Elutionspuffer durch das Filtersystem und lagert die Durchflüsse im Gefrierschrank bei -18°C. Die Auffanggefäße enthalten nun die eluierte DNA, deren Reinheitsgrad man mit Hilfe eines Photometers spektrometrisch bestimmt.

2.2.2 Photometrie

Zur Kontrolle des Reinheitsgrades und der Konzentration der Nukleinsäuren im Isolat erfolgt eine photometrische Quantifizierung. Hierbei kommt das GeneQuant-Photometer der Firma Pharmacia unter Einsatz einer 5 µl-Präzisionsküvette zur Anwendung. Je 5 µl der in TBE-

Puffer oder H₂O gelösten DNA-Isolate werden nach Bestimmung des Nullwertes luftblasenfrei in die Küvette pipettiert und simultan bei 260 und 280 nm gemessen. Bei entsprechender Programmierung liefert das Gerät automatisch folgende Ergebnisse: die OD₂₆₀, die OD₂₈₀, die Nukleinsäuren-Konzentration und den Reinheitsfaktor der DNA. Dabei entspricht eine OD₂₆₀ von 1 ca 50 Mikrogramm/ml doppelsträngiger DNA, 40 Mikrogramm/ml RNA oder 37 Mikrogramm/ml einzelsträngiger DNA. Aus dem Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ ergibt sich die Reinheit der DNA bzw. der RNA. Bei reiner DNA-Lösung liegt die Ratio bei 1,8. Liegt der gemessene Wert darüber, so ist dies als Hinweis auf eine mögliche Verunreinigung durch RNA zu werten. Liegt der gemessene Wert darunter, so ist dies ein Indiz für eine eventuelle Proteinkontamination und/oder für das Vorhandensein von organischen Lösungsmitteln. Auf reine RNA-Lösung weist ein Extinktionsverhältnis von 2,0 hin.

2.2.3 PCR-Amplifizierung

Nach der photometrischen Messung der DNA-Konzentration und des Reinheitsgrades der Nukleinsäuren erfolgt die Amplifizierung der gewünschten Regionen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion. Für 22 PCR-Reaktionen wird zunächst ein Master-Mix, bestehend aus 5,5 µl Taq-Polymerase und 500,5 µl 27,5-PCR-Puffer hergestellt, mittels Vortexer durchmischt und anschließend auf Eis gelagert. Für einen Ansatz versetzt man 1 µl DNA-Lösung mit 0,5 µl fluoreszenzmarkiertem forward-Primer, 0,5 µl reverse-Primer und 23 µl Master-Mix, um auf eine Zielkonzentration von 25 µl pro PCR-Ansatz zu gelangen. Die Reaktions-caps werden wiederum gut durchmischt und bis zum Beginn der Reaktion auf Eis gelagert. Alle zum Einsatz kommenden Primer werden mit einem IRD-80-Fluoreszenzmedium markiert unter denselben PCR-Bedingungen amplifiziert. Vor jeder PCR erfolgt eine Inkubation der Proben für 5 Minuten bei 95°C. Es folgen insgesamt 30 PCR-Zyklen unter folgenden Reaktionsbedingungen: die Denaturierung erfolgt für 45 Sekunden bei 95°C. Es folgt der Wiederanlagerungsschritt (Annealing) für 45 Sekunden bei 55°C, gefolgt von der Elongation für weitere 45 Sekunden bei 72°C. Nach Beendigung der 30 Zyklen werden die Proben noch einmal 7 Minuten bei 72°C inkubiert.

2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Um den Erfolg der Polymerase-Kettenreaktion zu überprüfen, werden die PCR-Produkte mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und analysiert. Zur Präparation der Proben versetzt man je 5 µl jeder PCR-Probe mit 1 µl Ladepuffer (Bromphenolblau). Zur Herstellung

des hierfür gebräuchlichen 2%igen Agarose-Gels löst man 0,6 g Agarose in 30 ml 1 x TBE-Puffer und erhitzt die Lösung im Mikrowellenherd für etwa 2 Minuten. Die gelöste Agarose wird nach dem Abkühlen auf handwarme Temperatur mit 1 µl Ethidiumbromid versetzt, in einen Träger gegossen und der Kamm für die Probestaschen eingesetzt. Nach Erstarren des Gels auf einer horizontalen Fläche entfernt man den Kamm, trägt die auf einer Mikrotiterplatte mit Probenpuffer versetzten Proben auf und trennt sie auf dem mit 1 x TBE-Puffer übergossenen Agarose-Gel für etwa 30 Minuten bei 150 V. Die DNA-Banden lassen sich aufgrund der Interaktion von Ethidiumbromid mit UV-Licht (312 nm) visualisieren. 2.2.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

2.2.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Screening-Analyse der zu untersuchenden chromosomalen Regionen erfolgt die Auftrennung der PCR-Produkte auf einem hochauflösenden Polyacrylamidgel mit Hilfe einer Sequenzier-Maschine der Firma LiCor. Zum Einbringen des PAA-Gels in den Sequencer ist zunächst die Montage einer speziell hierfür entwickelten Apparatur der Firma LiCor erforderlich. Die vordere und hintere Glasplatte der Apparatur, zwischen denen später das 0,35 mm dünne PAA-Gel eingegossen wird, werden mit H₂O, 70%iger Ethanollösung und schließlich 100% Ethanol gründlich gereinigt und dekontaminiert. Es folgt eine zweimalige Vorbehandlung mit Silan unter einer Einwirkungszeit von jeweils 5 Minuten unter dem Abzug. Anschließend werden zwei randständige, 0,35 mm dicke Spacer zwischen den Glasplatten placiert und die Apparatur mit Hilfe zweier zugehöriger Träger arretiert. Zur Herstellung des Polyacrylamidgels mischt man 48 ml Sequa-Gel 6% mit 12 ml Sequa-Gel Komplettpuffer und versetzt das Gemisch mit 170 µl APS. Die Gellösung wird gut durchgemischt und sofort vorsichtig und gleichmäßig am oberen Ende der Apparatur zwischen die beiden Glasplatten gegossen, wobei die Entstehung von Luftblasen unbedingt vermieden werden muss. Anschließend plaziert man zügig den Kamm für die Probestaschen. Für die Gel-Polymerisationszeit von 60 Minuten werden die Glasplatten mit Hilfe spezieller Klammern fest aneinandergedrückt. Zur Vorbereitung der aufzutrennenden Proben versetzt man je 4 µl PCR-Produkt mit 4 µl PAA-Puffer (Bromphenolblau) und vermischt diese auf einer Mikrotiterplatte. Anschließend werden die auf der Mikrotiterplatte befindlichen Proben mit Hilfe einer elektrischen Heizplatte für 3 Minuten bei 100°C denaturiert. Nachdem das PAA-Gel in der Apparatur vollständig polymerisiert ist, entfernt man die Klammern und säubert die Glasplatten erneut mit 70%iger Ethanollösung. Eventuell beim Gießen entstandene Gelrückstände auf der Oberfläche der Glasplatten müssen ebenfalls sorgfältig

entfernt werden. Der Kamm für die Probestaschen wird zunächst gezogen. Nach dem Einbringen der Apparatur in den Sequencer und dem Auffüllen der hierfür vorgesehenen Tanks mit 1 x TBE-Puffer werden die Taschen mit einer Perfusorspritze von eventuellen Rückständen freigespült und der Kamm für die Probestaschen erneut in das Gel eingebracht. Es folgt nun die Beladung der Probestaschen mit den denaturierten bromphenolblau-gefärbten PCR-Produkten sowie das Auftragen eines 100 bp-DNA-Markers. Hierbei wird jeweils die DNA eines Tumors unmittelbar neben seinem korrespondierenden Normalgewebe in die Probestaschen aufgetragen. Bei entsprechender Programmierung visualisiert die computergesteuerte Sequenziermaschine nach etwa 6 Stunden eine vollständige Auftrennung der Tumorproben und ihres korrespondierenden Normalgewebes auf dem Computerbildschirm, so dass die Positionen etwaiger LOHs in den entsprechenden chromosomalen Regionen analysiert werden können.

2.2.6 LOH-Analyse

Ein auf diese Weise entstandenes Sequenziergel kann nun am Computerbildschirm analysiert werden, indem man die Signalintensität der einzelnen Allele von Tumor- und Normalgewebe miteinander vergleicht. Mit Hilfe des aufgetragenen 100 bp-DNA-Markers lässt sich die Lokalisation der zu analysierenden chromosomalen Regionen leicht identifizieren. Die jeweils in benachbarten Probestaschen aufgetragenen PCR-Produkte von Tumor-DNA und korrespondierendem Normalgewebe weisen auf dem Sequenziergel ein typisches Bandenmuster auf. Heterozygote Proben treten durch je zwei Bandenmuster in Tumor- und Normalgewebe an der für die jeweilige chromosomale Region charakteristischen Stelle des Sequenziergels in Erscheinung. Eine Abschwächung der Signalintensität um mehr als 30% in einem der beiden Allele der Tumor-DNA wird als Verlust der Heterozygosizität (LOH) gewertet.

2.2.7 Retrospektive Mikrosatellitenanalyse der Marker D2S123 und D5S346

Eine Amplifikation der Marker D2S123 und D5S346 erfolgte im Institut für Pathologie der Universität Würzburg im Rahmen der Mikrosatelliteninstabilitätsanalyse von insgesamt 188 Tumor/Normalschleimhautpaaren, die zwischen den Jahren 1999 und 2004 gesammelt worden waren. Die Sammlung erfolgte im Rahmen eines interdisziplinären vom IZKF geförderten Projektes (B16) an dem die Medizinische Klinik, das Institut für Pathologie, die Chirurgische Klinik und das Institut für Humangenetik beteiligt waren. Nach mikroskopischer Beurteilung und Definition des zu analysierenden Areals wurde der entsprechende Paraffinblock zugeschnitten und die DNA extrahiert. Die Amplifikation von D2S123/D5S346 erfolgte als Multiplex-PCR mittels AmpliTaq-Gold (Applied Biosystems) bei 58°C für 20 Zyklen. Die Analyse erfolgte mittels eines automatischen Sequencers (ABI310). Die Auswertbarkeit der MSI-Analyse wurde überwiegend durch eine qualitative Änderung der Bandenstruktur bestimmt. Dabei wird eine Größenverschiebung der Allele oder das Auftreten zusätzlicher Allele untersucht. Die LOH-Analyse wird dagegen quantitativ ausgeführt und benötigt damit noch strengere Auswertungskriterien. Als auswertbar für die LOH-Analyse wurden die Tumore definiert, für die mindestens zwei Amplifikationen durchgeführt worden sind. Beide Ergebnisse dürfen keine Artefakte aufweisen. Gemessen wurde die Signalintensität der Banden (s. Abb. 4). Im Rahmen der PCR der Mikrosatellitenregionen treten als Amplifikationsnebenprodukte sogenannte Schatten- (oder Stotter-) banden auf. Diese werden dadurch verursacht, dass die Polymerase repetitive Sequenzen nicht immer fehlerfrei ablesen kann. Diese Schattenbanden bilden eine leiterförmige, aufsteigende Bandenstruktur. Ausgewertet werden dabei die Banden mit der höchsten Intensität (s. Abb. 4). Da die Auswertbarkeit der Produkte bei niedriger Signalintensität aufgrund steigender Anfälligkeiten für artefizielle Veränderungen abnimmt, wurde für die Auswertung eine Intensität der auszuwertenden Banden von mindestens 500 Einheiten gefordert. Informativ waren die Mikrosatellitenanalysen, wenn bei der Untersuchung die Anzahl der Wiederholungssequenzen des Mikrosatelliten auf den beiden Chromosomen des Normalgewebes unterschiedlich waren. Dies zeigte sich anhand zweier auswertbarer Signale (N1/N2 in Abb. 4). Nur dann kann eine Deletion in Form des Verlustes eines der beiden Signale festgestellt werden (Verlust von Allel 2 im Tumor, s. Abb. 4). Da die absoluten Intensitäten der Banden sich deutlich unterscheiden können und für den Allelverlust der relative Intensitätsverlust entscheidend ist, wurden die Allele N1/N2 und T1/T2 miteinander über die Formel $(N1/N2)/(T1/T2)$ in Beziehung gesetzt. Die Grenze für einen Allelverlust wurde ab einem Intensitätsverlust $\geq 30\%$ definiert.

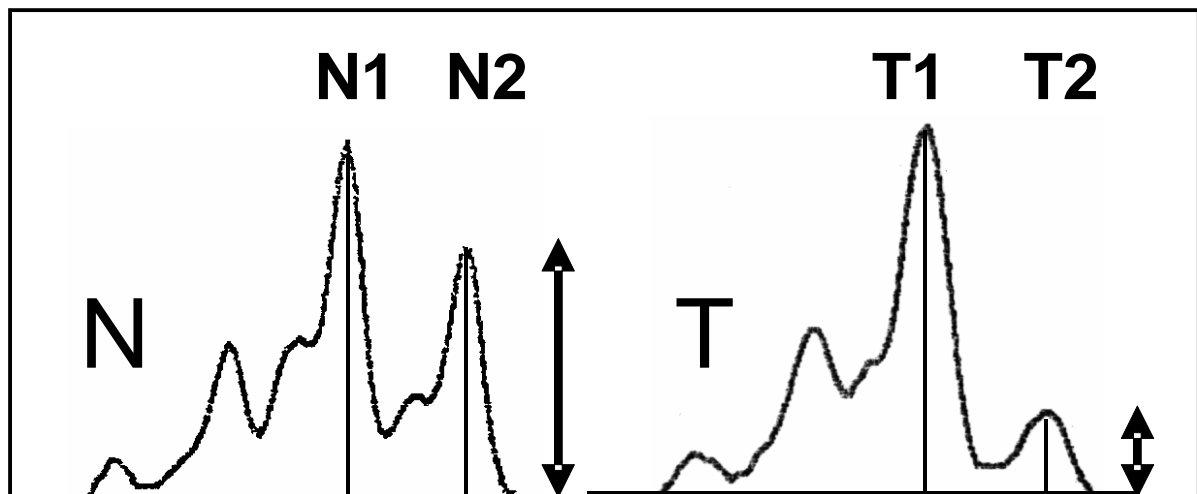


Abb. 4 Auswertung der Allelanalyse im automatischen Sequencer. Im linken Teil des Bildes ist das Bandenmuster nach PCR-Amplifikation des Markers D2S123 aus Normalschleimhaut-DNA (N) dargestellt. Das PCR-Fragment wurde dazu auf einem PAGE-Gel aufgetrennt und durch ein automatisches Sequenziergerät analysiert. Die beiden höchsten Banden entsprechen beiden Allelen (N1/N2). Die kleineren Banden stellen sogenannte „Schatten-“ oder „Stotterbanden“ dar, die bei der PCR von repetitiven Sequenzen durch Fehler der DNA-Polymerase entstehen. Im rechten Teil des Bildes ist das Bandenmuster nach PCR-Amplifikation des Markers D2S123 aus der korrespondierenden Tumor-DNA dargestellt. Es besteht ein deutlicher Intensitätsverlust des Allels 2.

2.2.8 Korrelation der LOH-Daten mit der Patientenprognose

Die uns aus dem Institut für Pathologie vorliegenden Daten der Tumor/Schleimhautpaare wurden zunächst nach Auswertbarkeit und anschließend auf das Vorliegen einer Deletion (LOH) in den Markern D2S123 und D5S346 überprüft (s. 2.2.7). In Zusammenarbeit mit der Chirurgischen Klinik und dem Tumorzentrum wurden die Verlaufparameter aller Patienten, von denen Tumor/Normalschleimhaut vorlag erfasst. Die Daten lagen in einer Access-Datenbank vor. Der Erhebungszeitraum der Daten, die für diese Studie genutzt wurden lag von 01'1999 – 08'2006. Die Patientenverlaufsdaten wurden mit den experimentellen Daten abgeglichen und verknüpft. Dazu wurde Access (Microsoft) verwendet. Anschließend wurden die Patienten in zwei Gruppen (D2S123, D5S346) unterteilt. Die Gruppen wurden auf durchschnittliches Alter, durchschnittlichen Beobachtungszeitraum, Verteilung der UICC-Stadien und tumorbedingten Tod untersucht.

3. Ergebnisse

3.1 Retrospektive LOH-Analyse des Markers D2S123

Es lagen Mikrosatellitenanalysen der Tumoren und von Kolonnormalschleimhaut von 119 Fällen vor. Dabei konnten 25 Fälle nicht nach den oben beschriebenen Kriterien ausgewertet werden. Das entspricht einer Auswertbarkeit von 80%. 5 Fälle mussten ausgeschlossen werden, da es sich um Adenome (3x), eine FAP (1x) oder ein neuroendokrines Karzinom (1x) handelte. Die verbleibenden 89 Fälle wurden mit der Datenbank aus dem Tumorzentrum verglichen. Bei 81/89 Fällen lagen die Daten vor (91%). Von den 81 auswertbaren Fällen waren 57 informativ (70%). Anschließend wurde ein Abgleich mit den vom Institut für Pathologie erhobenen Mikrosatelliteninstabilitätsanalysen durchgeführt. Es mussten sieben Patienten mit mikrosatelliteninstabilem Karzinom (2x MSI-high, 5xMSI-low) ausgeschlossen werden. Bei zwei Patienten war der Mikrosatellitenstatus nicht erhoben worden, so dass diese ebenfalls ausgeschlossen wurden und noch 47 von den anfangs 119 untersuchten Patienten in der Studie verblieben (40%; s. Tabelle 1)

3.1.1 Patientenkollektiv zur Analyse des Markers D2S123

Die untersuchten Patienten waren im Durchschnitt 68 Jahre alt. Das Geschlechterverhältnis war 25 Männer : 22 Frauen. Der Beobachtungszeitraum der Patienten betrug im Mittel 35 Monate. Bei 8/47 Patienten lag ein UICC-Stadium I, bei 20/47 ein UICC-Stadium II, bei 13/47 ein UICC-Stadium III und bei 5/47 ein UICC-Stadium IV vor. Ein tumorbedingter Tod trat bei 10/47 Patienten ein.

3.1.2 Korrelation eines LOH des Markers D2S123 mit dem Patientenüberleben

Von den 47 Patienten wiesen sechs einen LOH des Markers D2S123 auf (13%). Drei dieser sechs Patienten verstarben innerhalb des Beobachtungszeitraumes (50%). Dagegen verstarben nur 7/41 Patienten ohne LOH (17%). In Abbildung 5 ist eine Kaplan-Meier-Analyse der Patienten mit einem LOH-positiven Tumor vs. LOH-negativen Tumor dargestellt. Der Unterschied zwischen LOH-positiv und LOH-negativ war statistisch nicht signifikant ($p=0,0832$).

Nr.	Alter	Geschlecht	Allele	LOH	Stadium	Zeit (Monate)	TDeath
1	60	M	2	0	2	22,9979	0
2	57	M	2	0	1	54,5708	0
3	32	M	2	0	3	22,6037	0
4	62	M	2	0	1	59,9918	0
5	74	M	2	0	2	24,5092	0
6	64	M	2	0	3	27,8275	0
7	83	M	2	0	2	60,3203	0
8	60	W	2	0	2	32,0657	0
9	74	M	2	0	2	26,0205	0
10	63	W	2	0	2	25,0349	0
11	72	M	2	0	2	72,1478	0
12	84	W	2	0	3	45,0431	0
13	62	M	2	0	2	34,4641	0
14	82	W	2	0	2	57,9548	0
15	68	W	2	0	3	53,9466	0
16	64	M	2	0	2	56,9692	0
17	70	M	2	0	2	1,7084	0
18	79	W	2	0	1	31,1458	0
19	73	W	2	0	2	62,4887	0
20	72	M	2	0	1	11,9918	0
21	70	M	2	0	2	32,9856	0
22	39	W	2	0	3	37,0267	0
23	69	W	2	0	1	38,3737	0
24	71	M	2	0	1	57,2977	0
25	66	W	2	0	2	45,5688	0
26	65	M	2	0	3	48,4928	0
27	31	W	2	0	3	43,1704	0
28	86	W	2	0	1	34,0698	0
29	89	W	2	0	2	5,0924	0
30	76	W	2	0	2	23,0965	0
31	49	W	2	0	2	49,0513	0
32	68	M	2	0	3	39,885	0
33	76	M	2	0	4	43,9918	0
34	73	W	2	0	3	2,9897	0
35	71	M	2	0	4	18,3655	1
36	63	W	2	0	4	14,0287	1
37	77	M	2	0	3	50,7598	1
38	79	W	2	0	4	12,1889	1
39	78	W	2	0	2	35,7454	1
40	62	M	2	0	2	16,9528	1
41	63	W	2	0	4	19,9425	1
42	73	M	2	1	1	39,885	0
43	71	M	2	1	3	50,0041	0
44	67	W	2	1	3	40,1478	0
45	51	M	2	1	4	7,3265	1
46	90	W	2	1	3	1,9713	1
47	64	M	2	1	2	59,9918	1

Tab. 1 Klinische Verlaufparameter der Patienten mit auswertbarem Marker D2S123

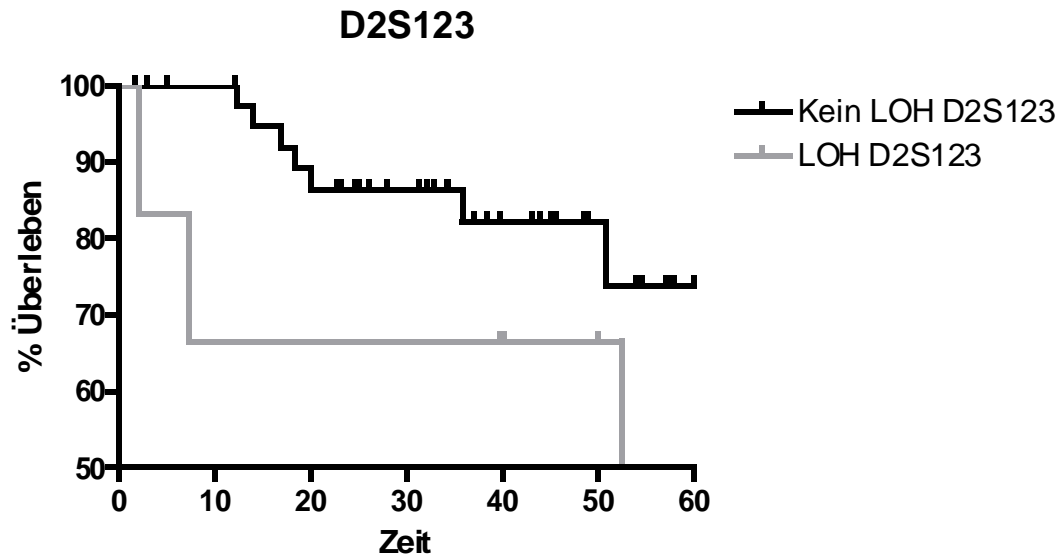


Abb. 5 Kaplan-Meier-Analyse des Markers D2S123

3.2 Retrospektive LOH-Analyse des Markers D5S346

Es lagen Mikrosatellitenanalysen der Tumoren und von Kolonnormalschleimhaut von 134 Fällen vor. Dabei konnten 26 Fälle nicht nach den oben beschriebenen Kriterien ausgewertet werden. Das entspricht einer Auswertbarkeit von 81%. 7 Fälle mussten ausgeschlossen werden, da es sich um Adenome (5x), eine FAP (1x) oder ein neuroendokrines Karzinom (1x) handelte. Die verbleibenden 101 Fälle wurden mit der Datenbank aus dem Tumorzentrum verglichen.

Bei 88/101 Fällen lagen die Daten vor (87%). Von den 88 auswertbaren Fällen waren 70 informativ (80%). Anschließend wurde ein Abgleich mit den vom Institut für Pathologie erhobenen Mikrosatelliteninstabilitätsanalysen durchgeführt. Es mussten 11 Patienten mit mikrosatelliteninstabilem Karzinom (6x MSI-high, 5x MSI-low) ausgeschlossen werden. Bei zwei Patienten war der Mikrosatellitenstatus nicht erhoben worden, so dass diese ebenfalls ausgeschlossen wurden und noch 57 von den anfangs 134 untersuchten Patienten in der Studie verblieben (42,5%).

3.2.1 Patientenkollektiv zur Analyse eines LOH des Markers D5S346

Die untersuchten Patienten waren im Durchschnitt 68 Jahre alt. Das Geschlechterverhältnis war 34 Männer : 23 Frauen. Der Beobachtungszeitraum der Patienten betrug im Mittel 32 Monate. Bei 9/ 57 Patienten lag ein UICC-Stadium I, bei 23/ 57 ein UICC-Stadium II, bei 17/

57 ein UICC-Stadium III und bei 7/ 57 ein UICC-Stadium IV vor. Ein tumorbedingter Tod trat bei 17/ 57 Patienten ein.

3.2.2 Korrelation eines LOH des Markers D5S346 mit dem Patientenüberleben

Von den 57 Patienten wiesen 25 einen LOH des Markers D5S346 auf (44%). Zehn dieser 25 Patienten verstarben innerhalb des Beobachtungszeitraumes (40%). Dagegen verstarben 7/32 Patienten ohne LOH (22%). In Abbildung 6 ist eine Kaplan-Meier-Analyse der Patienten mit einem LOH-positiven Tumor vs. LOH-negativen Tumor dargestellt. Der Unterschied zwischen LOH-positiv und LOH-negativ war statistisch nicht signifikant ($p=0,1365$).

Nr.	Alter	Geschlecht	Allele	LOH	Stadium	Zeit (Monate)	TDeath
1	52	W	2	0	4	11,9918	1
2	74	M	2	0	1	49,0185	0
3	70	M	2	0	2	32,9856	0
4	78	W	2	0	2	35,7454	1
5	84	W	2	0	3	45,0431	0
6	72	M	2	0	1	69,5524	0
7	76	W	2	0	2	23,0965	0
8	82	W	2	0	2	57,9548	0
9	74	M	2	0	2	26,0205	0
10	71	M	2	0	1	57,2977	0
11	62	M	2	0	2	16,9528	1
12	60	M	2	0	2	22,9979	0
13	64	M	2	0	3	27,8275	0
14	60	M	2	0	3	84,5667	0
15	87	W	2	0	1	58,0205	0
16	63	M	2	0	3	19,9754	0
17	82	W	2	0	4	7,2936	1
18	31	W	2	0	3	43,1704	0
19	76	M	2	0	4	43,9918	0
20	32	M	2	0	3	22,6037	0
21	55	W	2	0	4	1,1499	1
22	70	M	2	0	2	1,7084	0
23	77	M	2	0	3	42,5462	1
24	83	M	2	0	2	60,3203	0
25	62	M	2	0	1	59,9918	0
26	63	W	2	0	4	19,9425	1
27	49	W	2	0	2	49,0513	0
28	65	M	2	0	3	48,4928	0
29	73	W	2	0	2	62,4887	0
30	55	M	2	0	3	61,963	0
31	52	M	2	0	2	41,0349	0
32	73	W	2	0	3	2,9897	0
33	89	W	2	1	2	5,0924	0
34	69	W	2	1	1	38,3737	0
35	66	W	2	1	2	36,0082	0
36	80	M	2	1	2	40,7721	0
37	64	M	2	1	2	59,9918	1
38	66	W	2	1	2	45,5688	0

39	90	W	2	1	3	1,9713	1
40	63	M	2	1	2	52,8953	0
41	71	M	2	1	4	18,3655	1
42	75	M	2	1	2	42,1848	0
43	51	M	2	1	4	7,3265	1
44	80	W	2	1	1	55,9836	0
45	61	M	2	1	3	50,9569	0
46	90	W	2	1	3	1,9713	1
47	67	W	2	1	3	11,8604	1
48	53	W	2	1	1	53,9466	0
49	71	M	2	1	3	50,0041	0
50	78	M	2	1	3	44,9774	1
51	57	M	2	1	1	54,5708	0
52	72	M	2	1	2	16,3285	1
53	74	M	2	1	2	24,5092	0
54	72	M	2	1	2	72,1478	0
55	63	W	2	1	4	14,0287	1
56	62	M	2	1	2	34,4641	0
57	72	M	2	1	3	18,9897	1

Tab. 2 Klinische Verlaufparameter der Patienten mit auswertbarem Marker D5S346

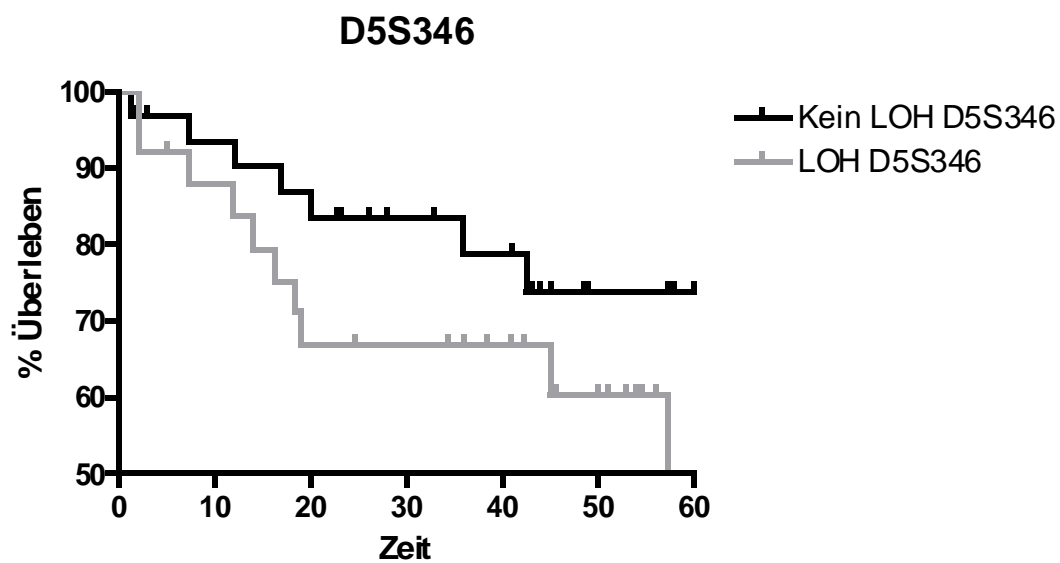


Abb. 6 Kaplan-Meier-Analyse des Markers D5S346

3.3 Etablierung der LOH-Analyse der Marker D2S123 und D5S346 auf dem LI-COR-Sequenzier

Zunächst wurde die DNA von vier Tumorproben mit korrespondierender Normalschleimhaut extrahiert (2.2.1), dann die Konzentration gemessen (2.2.2) und die Proben auf 100ng/μl verdünnt. 1μl der Proben wurde mittels einer PCR-Reaktion (2.2.3) amplifiziert. Dazu kamen jeweils die Marker D2S123 und D5S346 zum Einsatz. Der Erfolg der Amplifikation wurde mittels einer Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert (2.2.4) und anschließend 4μl im Polyacrylamidgel des LI-COR-Sequenziers aufgetrennt (2.2.5) und durch den UV-Laserscanner visualisiert. Die Laufparameter sind in Tabelle 3 dargestellt. Die Abbildungen 7 und 8 zeigen die erfolgreiche Auftrennung der Marker D2S123 (Tumor/Normalschleimhaut Nr. 72, 73, 74, 75) und D5S346 (Tumor/ Normalschleimhaut Nr. 72, 73, 75).

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

Tab. 3 Parameter für die Auftrennung der Marker D2S123 und D5S346

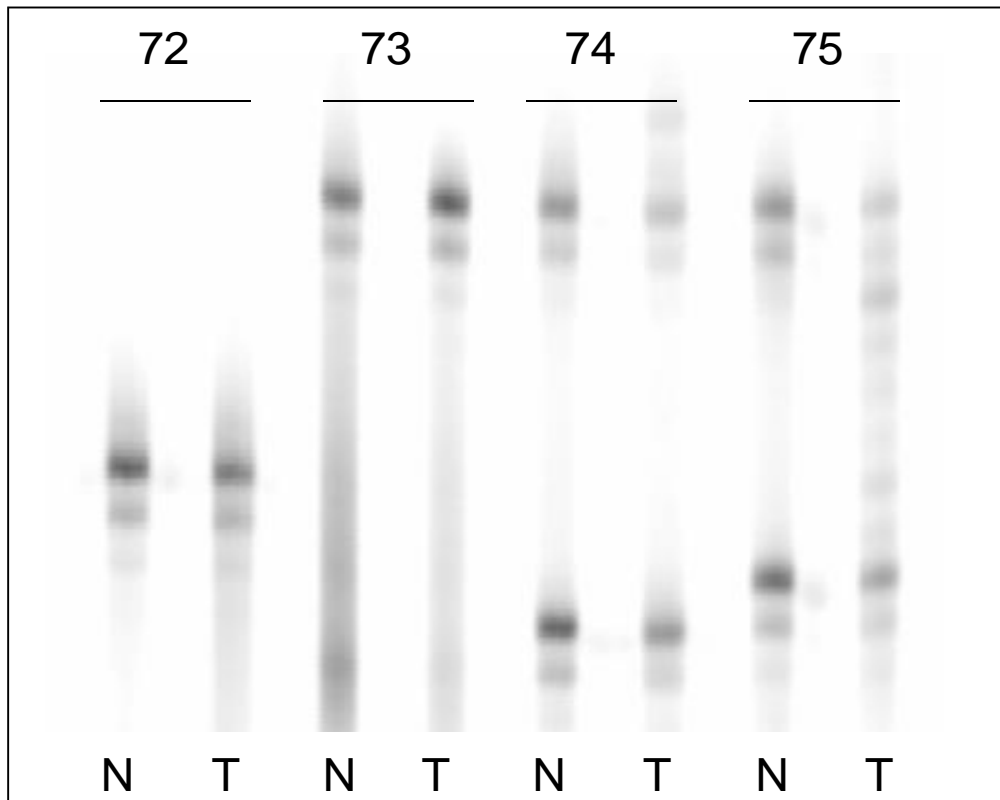


Abb. 7 Fragmentlängenanalyse des Markers D2S123 auf dem Licor-Sequencer

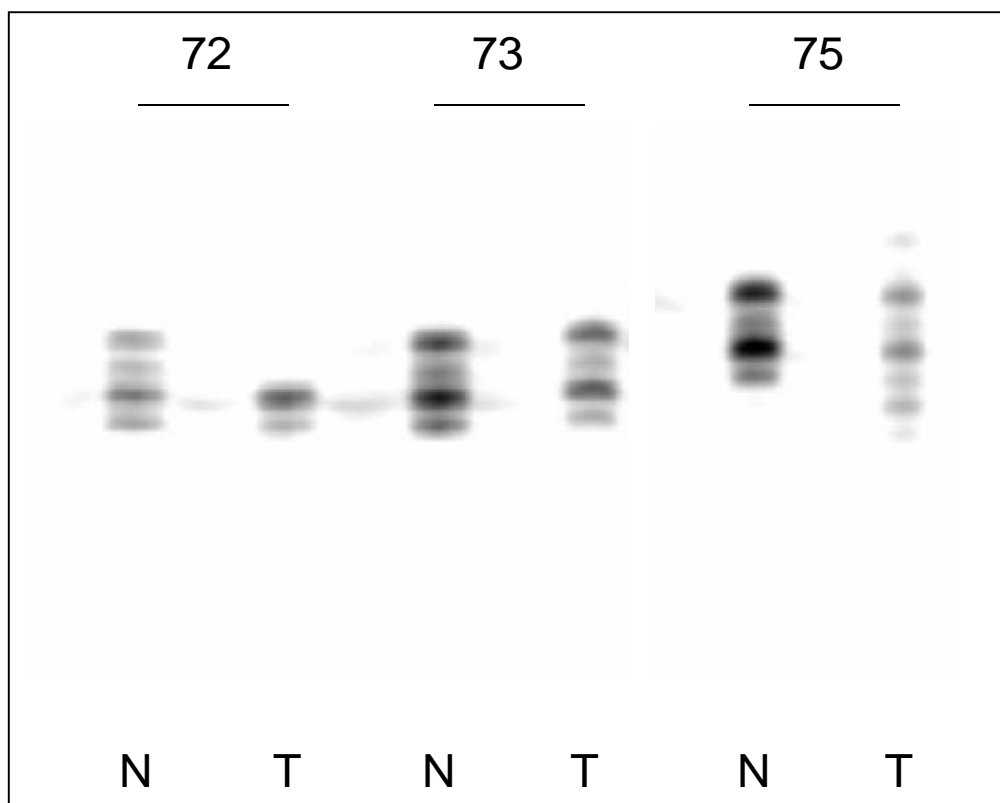


Abb. 8 Fragmentlängenanalyse des Markers D5S123 auf dem Licor-Sequencer

3.4 Auswertung der LOH-Ergebnisse der Marker D2S123 und D5S346

In Abbildung 9 sind am Beispiel des Markers D5S346 (Tumor/ Normalschleimhaut Nr. 72) die verschiedenen Schritte der Ergebnis-Auswertung dargestellt. Die Auswertung erfolgt mit dem Programm LabImage 2.7.1 (Kapelan). Die auf dem Gel-Bild sichtbaren Banden werden durch einen Kasten markiert und die Mitte der Bande durch eine senkrechte Markierung festgelegt (s. Abb 9b). Der Verlauf der Signalintensitäten im Kasten entlang der senkrechten Markierung sind in Abb. 9c dargestellt. Die resultierenden Integrale werden im Excel-Format ausgegeben. Durch den Vergleich der Quotienten $N1/N2:T1/T2$ kann ein Vergleich der Allelintensitäten des Tumors und der Normalschleimhaut erfolgen. Als Grenze für einen Verlust der Heterozygotität (LOH) wurde eine Reduktion der Signalintensität um 30% definiert. In der Tabelle 4 sind die Ergebnisse der Marker D2S123/ D5S346 der Tumor/ Schleimhautpaare 72, 73, 74 und 75 dargestellt.

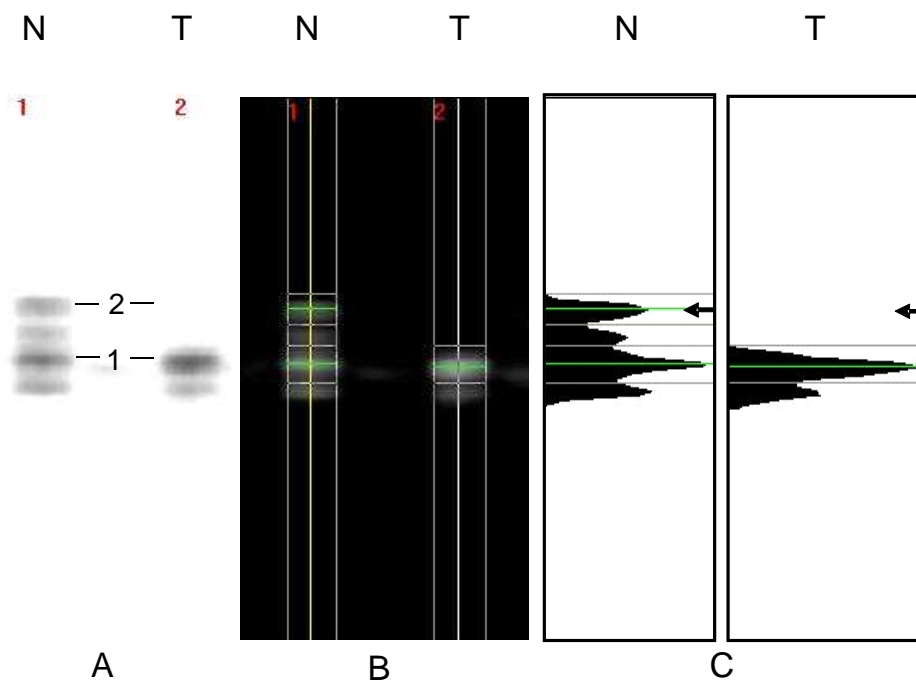


Abb.9 Auswertung der LOH-Ergebnisse der Marker D2S123 und D5S346

<i>D2S123</i>										
Nr	E-Nr.	N-1	N-2	T-1	T-2	Q (N)	Q(T)	Q(N)/Q(T)	LOH	Allele
72	E28444/02	46002		40031		1.00	1.00	1.00	0	1
73	E28320/02	35616		38753		1.00	1.00	1.00	0	1
74	E25973/02	28469	40247	16458	31849	0.71	0.52	0.73	0	2
75	E01633/03	29612	38248	11945	22069	0.77	0.54	0.70	1	2
<i>D5S346</i>										
Nr	E-Nr.	N-1	N-2	T-1	T-2	Q (N)	Q(T)	Q(N)/Q(T)	LOH	Allele
72	E28444/02	26723	53657	660	59513	0.50	0.01	0.02	1	2
73	E28320/02	70100	101079	54608	58637	0.69	0.93	0.74	0	2
75	E01633/03	82271	110621	28136	35686	0.74	0.79	0.94	0	2

Tab. 4 Quantifizierung der Intensitäten der Marker D2S123 und D5S346 und LOH
-Analyse

4. Diskussion

4.1 Retrospektive Mikrosatellitenanalyse der Marker D2S123 und D5S346

Bei der hier vorgestellten Studie handelt es sich um retrospektiv ausgewertete Deletionsanalysen der Mikrosatellitenanalysen der Marker D2S123 und D5S346. Die beiden Marker wurden im Rahmen der Mikrosatellitenanalyse des Institutes für Pathologie analysiert. Bei der durchgeführten Studie war eine hohe Ausschlussquote sowohl bei dem untersuchten Marker D2S123 als auch D5S346 zu beobachten. Ausgeschlossen wurden die Tumore, von denen nicht mindestens zwei Analysen durchgeführt worden sind, bei denen die Signale nur schwach vorhanden (<500 Einheiten), bzw. mit Artefakten überlagert waren (ca. 20%), die aufgrund einer Homozygotie der Marker nicht für die LOH-Analyse auswertbar waren (ca. 20%) oder bei denen keine Verlaufspare vorlagen. Nur 40,3%, bzw. 42,5% der initial analysierten Mikrosatellitenanalyse (D2S123/ D5S346) konnten weiter analysiert werden. Obwohl die Daten für die Mikrosatelliteninstabilitätsanalyse gut geeignet waren, trifft dies auf die LOH-Analyse nur eingeschränkt zu. Ein Grund dafür ist, dass bei Mikrosatelliteninstabilitätsanalysen insbesondere auf das Auftreten von zusätzlichen Allelen im Tumor oder eine Größenveränderung der Allele geachtet werden muss. Es handelt sich dabei überwiegend um eine qualitative Analyse. Im Gegensatz dazu ist die LOH-Analyse eine quantitative Analyse. Eine quantitative Analyse erfordert reproduzierbare Amplifikationsprodukte von sehr guter Intensität. Für eine kombinierte Analyse von MSI und LOH müssen daher bereits initial entsprechende Versuchbedingungen gewählt werden. In einer ähnlichen Studie von 2003 untersuchten Goel et al. alle in der Mikrosatelliteninstabilitätsanalyse verwendeten Marker (D2S123, D5S346, D17S250, D3S1029, D17S261, D18S64, D18S69, D18S474, BAT25, BAT26, MYCL1; Boland et al., 1998) auf das Auftreten von allelischen Verlusten. Sie fanden nur in 22% einen LOH in D5S346 und in nur 10% einen LOH in D2S123. Es wurden allerdings nur Patienten im Stadium II und III (n=209) untersucht. Leider wurden die Kriterien zur LOH- und MSI-Analyse in diesem Artikel nicht näher aufgeführt.

4.2 Korrelation des LOH D2S123 mit klinischen Verlaufsparemetern

Nach dem Ausschluss der nicht auswertbaren Tumoren konnten noch 47 Tumoren und deren korrespondierende Normalschleimhaut weiter analysiert werden. Ein LOH wurde bei 13% nachgewiesen und war nicht signifikant mit einer schlechteren Patientenprognose verknüpft, obwohl ein deutlicher Trend zu einer schlechteren Prognose bei LOH D2S123 vorlag

($p=0,0832$). Bisgaard et al. führten 2001 eine ähnliche Untersuchung an 67 Tumoren durch. Dabei fanden sie in 21% der Fälle einen LOH des Markers D2S123. Die Autoren zeigten eine signifikante Korrelation des Markers D2S123 mit der Patientenprognose. In einer Studie von 2003 analysierten Goel et al. 209 Tumoren auf das Vorliegen von allelischen Verlusten in mehreren Markern, unter anderem auch D2S123. Die LOH-Häufigkeit war in D2S123 mit 10% vergleichbar mit unseren Ergebnissen. Eine Korrelation mit dem Patientenüberleben erfolgte jedoch leider nicht.

4.3 Korrelation des LOH D5S346 mit klinischen Verlaufsparemtern

Nach dem Ausschluss der nicht auswertbaren Tumoren konnten noch 57 Tumoren und deren korrespondierende Normalschleimhaut weiter analysiert werden. Ein LOH wurde in 44% der Fälle detektiert und war nicht mit einer schlechteren Patientenprognose korreliert, obwohl auch bei einem LOH D5S346 ein Trend zum schlechteren Überleben zu beobachten war ($p=0,1365$). Kern et al. untersuchten bereits 1989, ob eine prognostische Korrelation zwischen allelischen Verlusten der Chromosomen 5q, 17p und 18q besteht und konnten in ihrer Untersuchung lediglich eine signifikante Beziehung zwischen den LOHs 17p und 18q mit dem Auftreten von Fernmetastasen aufdecken. Der LOH 5q erwies sich als prognostisch unbedeutend (Kern et al., 1989). Gerdes und Mitarbeiter untersuchten 1994 63 kolorektale Tumoren in Bezug auf LOHs der Chromosomen 1p, 5q, 17p und 18q, wobei sich eine signifikante Korrelation von Verlusten auf 1p und 17p mit einer niedrigeren Überlebensrate nachweisen ließ. Auch hier erwies sich der LOH 5q als prognostisch uninteressant. De Filippo und Mitarbeiter korrelierten den LOH 5q 2002 mit mehreren klinisch-pathologischen Parametern wie Alter, Geschlecht, Tumorlokalisierung und histologischer Differenzierung und konnten ebenfalls keine signifikanten Beziehungen aufdecken (De Filippo et al., 2002). Bisgaards Publikation aus dem Jahr 2001 berichtet explizit über den Bezug von allelischen Verlusten der Chromosomen 2p und 5q mit der 5-Jahres-Überlebensrate der betroffenen Patienten. Während er dem LOH 5q ebenfalls keine prognostische Relevanz einräumt, belegen die von ihm erhobenen Daten eine Reduktion der 5-Jahres-Überlebensrate um 37% bei allelischen Verlusten des Chromosoms 2p und identifizieren den LOH 2p als einen unabhängigen Prognosefaktor beim kolorektalen Karzinom.

4.4 Etablierung der LOH-Analyse der Marker D2S123 und D5S346 auf dem LI-COR-Sequencer

Obwohl ein Teil der retrospektiv gewonnenen Daten auswertbar war, musste ein Großteil der Tumoren ausgeschlossen werden (4.1). Um die Effizienz der Methode zu verbessern wurde eine Mikrosatellitenanalyse der Marker D2S123 und D5S346 mittels des automatischen Sequenziergerätes LiCOR 4000 etabliert und optimiert. Es kann nun zukünftig eine Mikrosatellitenanalyse in der eigenen Abteilung mit für die LOH-Analyse optimierten Parametern erfolgen.

4.5 LOH-Analyse D2S123 und D5S346 - Ausblick

Sowohl bei einem LOH D2S123, als auch bei D5S346 konnte ein nicht signifikanter Trend zum schlechteren Überleben gezeigt werden. Dabei konnten nur relativ wenige (n=47, bzw. n=57) Tumoren analysiert werden. Da 20% der Tumoren ausgeschlossen werden mussten, weil entweder keine Doppelwerte vorlagen, oder die Signalintensität zu gering war, bzw. Artefakte vorlagen, ist eine Analyse dieser Tumoren auf dem LI-COR Sequencer sinnvoll. Dies gilt auch für die Tumoren, bei denen keine MSI-Daten vorlagen. Da insgesamt 180 Tumore in der Tumorbank vorliegen, kann bei einer durchschnittlichen Heterozygotenfrequenz von 80% die Anzahl der analysierbaren Tumoren auf ca. 144 gesteigert werden. Da der Nachbeobachtungszeitraum mit aktuell durchschnittlich 36 Monaten noch relativ kurz ist, sollte eine entsprechende Analyse in 1-2 Jahren erfolgen.

4.6 Kandidatengene in der chromosomalen Region 5q21.3-5q23.1

Nach der Knudson-Hypothese folgt der Punktmutation des ersten Allels eine Deletion des zweiten Allels. Dieser allelische Verlust ist der entscheidende Schritt zur Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens. In dieser Arbeit konnte in 44% der Fälle ein allelischer Verlust des Markers D5S346 gefunden werden. Dieser Marker ist im chromosomalen Bereich 5q22.2 (chr5:112241523-112241647) lokalisiert und liegt nur 31.689bp vom APC-Gen (chr5:112.101.483-112.209.834) entfernt (s. Abb. 10). Eine Deletion von D5S346 ist folglich mit hoher Wahrscheinlichkeit mit einer Inaktivierung des APC-Tumorsuppressorgens verknüpft.

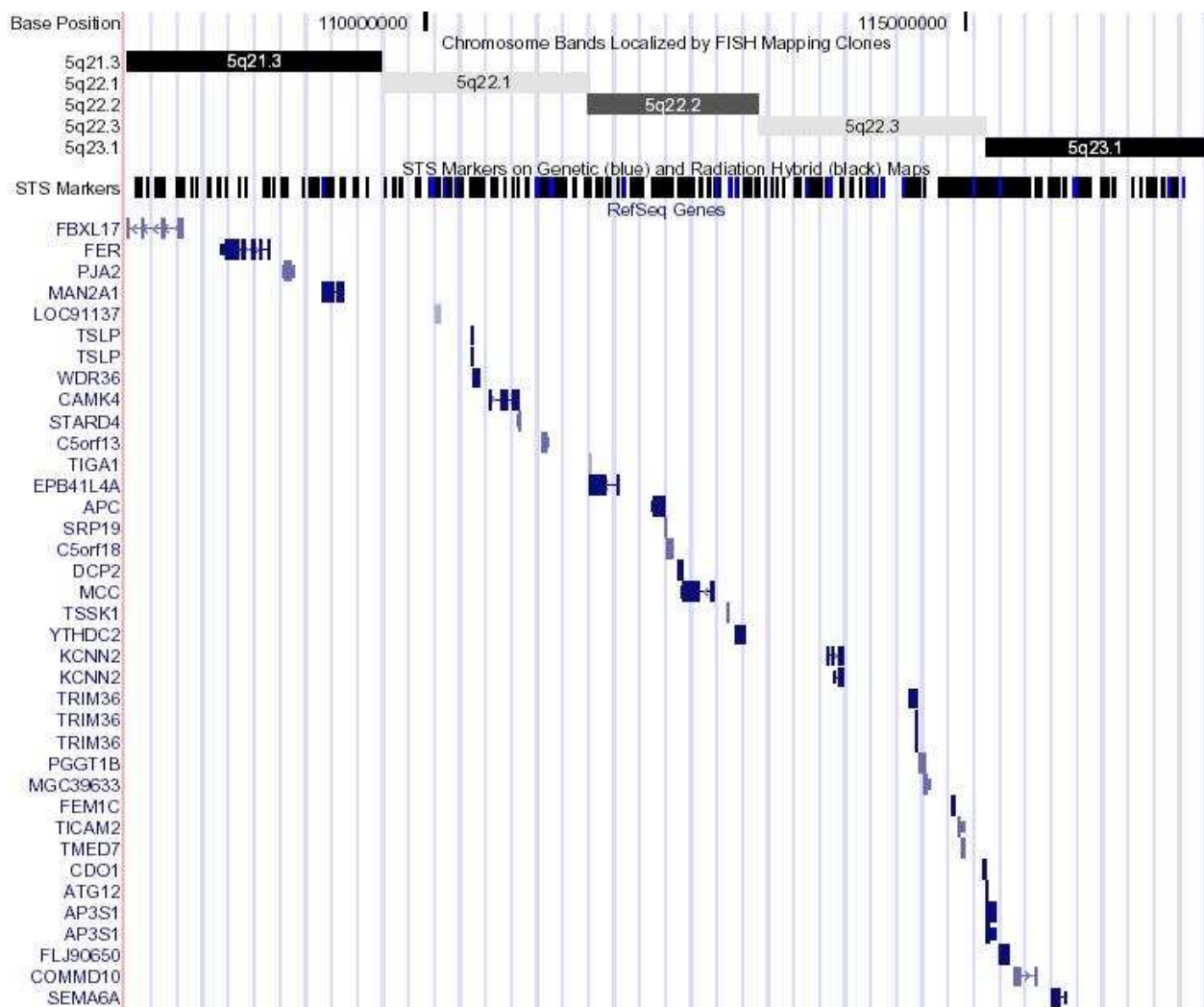


Abb.10 Gene der chromosomalen Region chr5: 107241523-117241523 (5q21.3-5q23.1; 10.000.000bp). Der Marker D5S346 ist zentral in dieser Region lokalisiert (chr5: 112.241.523) und liegt nur 31.689bp vom APC-Gen (chr5:112.101.483-112.209.834) entfernt.

4.7 Kandidatengene in der chromosomalen Region 2p16.1-21

Bei 13% der auswertbaren Tumoren konnte ein LOH des Markers D2S123 gezeigt werden. Der Marker ist im chromosomalen Bereich 2p16.3 lokalisiert (chr2:51200029-51200308) und im Gegensatz zu D5S346 ist in dieser Region bisher kein für das Kolonkarzinom signifikantes Tumorsuppressorgen lokalisiert. In der Abbildung 11 und 12 sowie in der Tabelle 5 ist die Umgebung des Markers D2S123 mit möglichen Kandidatengenen dargestellt. Einige in Frage kommende Gene werden im folgenden Abschnitt diskutiert. In weiteren Studien könnte eine Mutationssuche in diesen Genen durchgeführt werden, um dadurch evtl. ein neues für die Kolonkarzinogenese signifikantes Tumorsuppressorgen identifizieren zu können.

Das Genprodukt des Gens EPAS-1 spielt eine Rolle bei der Adaptation von Tumoren auf Gewebehypoxie durch Stimulation der VEGF-vermittelten Angiogenese. Durch EPAS-1 und andere Faktoren wird eine Größenzunahme des Tumors über 1-2mm erst möglich. Bei hepatozellulären Karzinomen (HCC) konnte erwartungsgemäß eine Überexpression von EPAS1 vor allem bei den Tumoren gezeigt werden, bei denen bereits eine Infiltration der Tumorkapsel oder eine Invasion der Vena portae stattgefunden hat (Bangoura et al., 2004). TACSTD1 (tumor-associated calcium signal transducer 1, auch als Ep-CAM bezeichnet) wird in größeren Mengen im normalen Kolonepithel exprimiert. Ein Verlust der Expression von TACSTD1 konnte bei Patienten mit Magenkarzinom mit einer signifikanten Prognoseverschlechterung assoziiert werden (Songun et al., 2005). Eine entsprechende Studie beim Kolonkarzinom wurde bisher nicht durchgeführt. Das Genprodukt von ASB3 (SOCS box 3) vermittelt die Ubiquitierung und damit die Degradation von Tumor Necrosis Faktor Rezeptor II (TNFR2) (Chung et al., 2005). Es konnte gezeigt werden, dass TNFR2 in Tumoren heraufreguliert ist und eine Rolle bei der Karzinogenese und Metastasierung spielen könnte (Carpentier et al., 2004). Als Gegenspieler zu TNF2 ist ASB3 damit ein interessanter Kandidat für ein Tumorsuppressorgen. Entsprechende Untersuchungen wurden bislang nicht durchgeführt. PSME4 (auch: PA200) bindet an und aktiviert 20-S Proteasomen. Proteasomen sind zuständig für die Degradation von Proteinen im Rahmen der Regulation von zellulären Prozessen. In einem Übersichtsartikel von 2005 diskutieren Rechsteiner und Hill die biochemischen und funktionellen Eigenschaften von PSME4. Eine klare Rolle bei der Kolonkarzinogenese konnte bisher nicht gezeigt werden. RTN4 ist potentiell Tumorsuppressorgen im hepatozellulären Karzinom (Lu et al., 2004). EFEMP1 wird auch als Fibulin-3 bezeichnet. In einem Übersichtsartikel von 2005 diskutieren Gallagher et al. die Rolle der Fibuline bei der Krebsentstehung. Im Gegensatz zu Fibulin-1, -4 und -5 konnte eine Bedeutung von Fibulin-3 auf die Krebsentstehung bisher nicht geklärt werden, es gibt jedoch Hinweise auf eine komplexe Rolle im Rahmen der Karzinogenese.



Abb.11 Schematische Darstellung der chromosomalen Region 2p21-2p16.3

<i>Gen</i>	<i>Lokalisation (Chr.2)</i>	<i>Funktion</i>
PRKCE	45790694-46326779	protein kinase C epsilon
EPAS1	46436214-46525486	endothelial PAS domain protein 1
ATP6V1E2	46650639-46658747	ATPase H⁺ transporting lysosomal 31kDa V1
PIGF	46720067-46755855	phosphatidylinositol glycan class F isoform 1
CRIPT	46755959-46763834	postsynaptic protein CRIPT
SOCS5	46837750-46901578	suppressor of cytokine signaling 5
MCFD2	47040668-47054600	multiple coagulation factor deficiency 2
TTC7A	47079964-47212932	tetratricopeptide repeat domain 7A
FLJ40172	47267238-47294077	hypothetical protein LOC285051
CALM2	47298956-47315301	calmodulin 2
TACSTD1	47508118-47525808	tumor-associated calcium signal transducer 1
MSH2	47541914-47622011	mutS homolog 2
MSH6	47921937-47945743	mutS homolog 6
LOC129285	48579559-48654173	smooth muscle myosin heavy chain 11 isoform
FLJ46838	48668173-48670707	hypothetical protein LOC440865
SBLF	48719414-48737684	stoned B-like factor
ALF	48756599-48818397	TFIIA-alpha/beta-like factor isoform 1
LHCGR	48825620-48894468	luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor
ASB3	53808769-53925730	ankyrin repeat and SOCS box-containing protein 3
C2orf30	53925868-53957584	chromosome 2 open reading frame 30
PSME4	54003222-54109501	proteasome (prosome macropain) activator
SPTBN1	54665158-54807513	spectrin beta non-erythrocytic 1 isoform 1
RTN4	55110980-55149121	reticulon 4 isoform C
RPS27A	55371475-55374396	ubiquitin and ribosomal protein S27a precursor
KIAA1387	55687166-55756400	hypothetical protein LOC57223
EFEMP1	56004749-56060856	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix

Tab. 5 Gene der chromosomalen Region chr2: 46200029-56200029 (2p16.1-p21). Der Marker D2S123 ist zentral in dieser Region lokalisiert (chr2: 51.200.029)

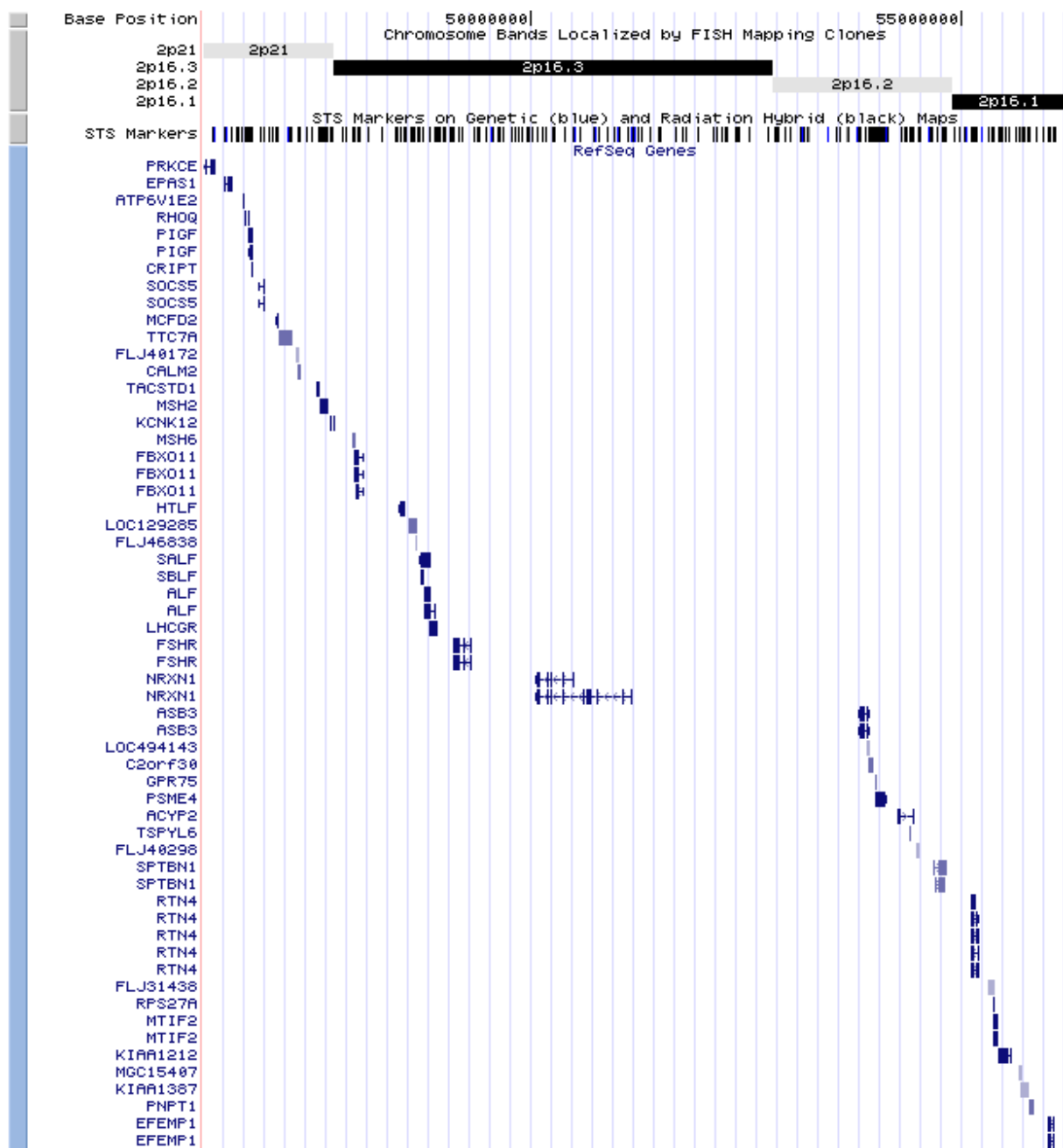


Abb.12 Gene der chromosomalen Region chr2: 46200029-56200029 (2p16.1-p21). Der Marker D2S123 ist zentral in dieser Region lokalisiert (chr2: 51.200.029)

5. Zusammenfassung

Ein allelischer Verlust (LOH – „loss of heterozygosity“) des Markers D2S123 ist in einem Artikel von Bisgaard et al., 2001 als unabhängiger Prognosefaktor für das kolorektale Karzinom beschrieben worden. Im Rahmen der Mikrosatelliteninstabilitätsanalyse an 188 kolorektalen Karzinomen wurden auch die Marker D2S123 und D5S346 amplifiziert. Diese Untersuchungen wurden im Rahmen einer interdisziplinären Kooperation im Institut für Pathologie durchgeführt. Die zur Verfügung stehenden erhobenen Daten (n=119 bei D2S123 und n=134 bei D5S346) wurden in dieser Doktorarbeit retrospektiv auf das Vorliegen eines allelischen Verlustes der Marker D2S123 und D5S346 analysiert. Zunächst zeigte sich eine grundsätzliche Eignung der Daten zur LOH-Analyse, wobei jedoch 20% der Fälle ausgeschlossen werden mussten, um eine optimale Quantifizierung gewährleisten zu können. Nach Ausschluss der nichtinformativen Fälle und der mikrosatellitenstabilen Tumoren verblieben noch n=47 (D2S123) und n=57 (D5S346) zur weiteren Analyse. Es konnte bei 13% (D2S123) und bei 44% (D5S346) der Tumoren ein allelischer Verlust nachgewiesen werden. In beiden Fällen konnte ein nicht signifikanter Trend zu einer schlechteren Patientenprognose festgestellt werden. Da die Daten aus der Mikrosatelliteninstabilitätsanalyse nur bedingt für eine LOH-Analyse geeignet waren, wurden für weitere Studien die notwendigen Methoden zur LOH-Analyse an einem im Gastrolabor zur Verfügung stehenden automatischen Sequenziergerätes (LICOR 4000) erfolgreich etabliert. Es kann nun eine größere Anzahl an Tumoren auf allelische Verluste in den Markern D2S123 und D5S346 untersucht werden. Allelische Verluste sind indirekte Hinweise auf Tumorsuppressorgene, die in den entsprechenden chromosomalen Abschnitten lokalisiert sein können. Der Marker D5S346 ist in unmittelbarer Nachbarschaft des APC-Tumorsuppressorgens lokalisiert (5q22.2). Ein Tumorsuppressorgen das sich in der Nähe des Markers D2S123 befindet ist bisher nicht bekannt. Die identifizierten Tumoren mit einem LOH in D2S123 können zur Suche nach einem Tumorsuppressorgen im chromosomalen Abschnitt 2p16.3 verwendet werden.

6. Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxidsulfat
bp	Basenpaare
C	Celsius
CIN	Chromosomale Instabilität
DCC	Deleted in Colon Cancer
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis
Fünf-JÜL	Fünf-Jahres-Überlebensrate
g	Gramm
HCl	Salzsäure
HNPCC	Hereditäres Nichtpolypöses Kolonkarzinomsyndrom
LOH	Loss of heterozygosity (Verlust der Heterozygosizität)
MB	Megabyte
MHz	Megahertz
ml	Milliliter
mM	Millimol
MMR	Mismatch-Repair-System
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSI-H	hochfrequent mikrosatelliteninstabil (high)
MSI-L	niedurfrequent mikrosatelliteninstabil (low)
MSI-N	mikrosatellitenstabil (MSI-negativ)
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
nM	Nanomol
nm	Nanometer
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PDGFB	Plättchenwachstumsfaktor B
RER	Replication Error Phenotype
RNA	Ribonukleinsäure
RPM	Rounds Per Minute (Umdrehungen pro Minute)
STRP	Short Tandem Repeat
TBE	Tris Borat Ethylendiamintetraessigsäure
TBS	Tris Buffered Saline
TIS	Tumor in situ
TNM	Tumor Node Metastasis
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
TSG	Tumorsuppressorgen
UICC	Union international contre le cancer
UV	Ultraviolett

7. Literaturverzeichnis

Ames BN, Gold LS (1990) Too many rodent carcinogens: mitogenesis increases mutagenesis. *Science*, 249: 970-971

Arribas R, Risques RA, Gonzalez-Garcia I, Masramon L, Aiza G, Ribas M, Capella G, Peinado MA (1999) Tracking recurrent qualitative genomic alterations in colorectal cancer: allelic losses in chromosome 4 correlate with tumor aggressiveness. *Lab Invest*, 2: 111-122

Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM et al. (1989) Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science*, 244: 217-221

Bangoura G, Yang LY, Huang GW, Wang W. (2004) Expression of HIF-2alpha/EPAS1 in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 10:525-30

Bisgaard ML, Jager AC, Dalgaard P, Sondergaard JO, Rehfeld JF, Nielsen FC (2001) Allelic loss of chromosome 2p21-16.3 is associated with reduced survival in sporadic colorectal cancer. In: *Scand. Journal of Gastroenterology*, 36(4): 405-409

Bishop JM. Molecular themes in oncogenesis. *Cell*, 64: 235-248

Cavenee WK, Dryja TP, Phillips RA, Benedict WF, Godbout R, Gallie BL, Murphee AL, Strong LC, White RL (1983) Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. In: *Nature*, 305: 779-784

Chung AS, Guan YJ, Yuan ZL, Albina JE, Chin YE (2005) Ankyrin repeat and SOCS box 3 (ASB3) mediates ubiquitination and degradation of tumor necrosis factor receptor II *Mol Cell Biol*. 25:4716-26

Cunningham C, Dunlop MG, Bird CC, Wyllie AH (1994) Deletion analysis of chromosome 8p in sporadic colorectal adenomas. *British Journal of Cancer*, 70/1: 18-20

de Manzoni G, Tomezzoli A, di Leo A, Moore PS, Talamini G, Scarpa A (2001) Clinical significance of mutator phenotype and chromosome 17p and 18q allelic loss in gastric cancer. *British Journal of Surgery*, 88(3): 419-425

Doolittle R, Hunkapiller M, Hood LE, Devare SG, Robbins KC, Aaronson SA, Antoniades HN (1983) Simian sarcoma virus onc gene, v-sis, is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor. In: *Science*, 221: 275-277

Eppert K and 12 others (1996) MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGF- β -regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. In: *Cell*, 86, 543-552

Fearon ER, Cho KR, Nigro JM et al. (1990) Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science*, 247: 49-56

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

Forrester K, Almoguera C, Han K, Grizzle WE, Perucho M (1987) Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis. *Nature*, 327: 298-303

Gallagher WM, Currid CA, Whelan LC. (2005) Fibulins and cancer: friend or foe? *Trends Mol Med*. 11:336-40

Gallagher WM, Currid CA, Whelan LC. (2005) Fibulins and cancer: friend or foe? *Trends Mol Med* 11:336-40

Geisbe, H. and Durst, J. (1996) *Kolorektale Karzinome und Präkanzerosen*. Chirurgische Operationslehre. Stuttgart, New York, Schattauer: 596-599

Gerdes H, Chen Q, Elahi AH, Sircar A, Goldberg E, Winawer D et al (1995) Recurrent deletions involving chromosomes 1, 5, 17, and 18 in colorectal carcinoma: possible role in biological and clinical behavior of tumors. *Anticancer Research*, 15: 13-24

Goel A, Arnold CN, Niedzwiecki D, Chang DK, Ricciardiello L, Carethers JM, Dowell JM, Wasserman L, Compton C, Mayer RJ, Bertagnolli MM, Boland CR (2003) Characterization of sporadic colon cancer by patterns of genomic instability. *Cancer Research*, 63(7): 1608-1614

Gustafson CE, Wilson PJ, Lukeis R, Baker E, Woollatt E, Annab L, Hawke L, Barratt JC, Chenevix-Trench G (1996) Functional evidence of a colorectal cancer tumor suppressor gene at chromosome 8p22-23 by monochromosome transfer. *Cancer Res.*, 56: 5238-5245

Hahn SA, Schutte M, Hoque ATMS, Moskaluk CA, Da Costa LT, Rozenblum E, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE (1996) DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. In: *Science*, 271, 350-353

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

Iniesta P, Massa MJ, Gonzalez-Quevedo R, de Juan C, Moran A, Sanchez-Pernaute A, Cerdan J, Torres A, Balibrea JL, Benito M (2000) Loss of heterozygosity at 3p23 is correlated with poor survival in patients with colorectal carcinoma. *Cancer*, 89(6): 1220-1227

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

Kamb A (1995) Cell-cycle regulators and cancer. In: *Trends Genet.*, 11: 136-140

Kern SE, Fearon ER, Tersmette KW, Enterline JP, Leppert M, Nakamura Y, White R, Vogelstein B, Hamilton SR (1989) Clinical and pathological associations with allelic loss in colorectal carcinoma. *JAMA*, 261(21): 3099-3103

Kinzler K, Nilbert M, Su L et al. (1991) Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science*, 253: 661-665

Knudson AG (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. In: Proc. Natl. Acad. Sci USA, 68: 820-823

Lanza G, Matteuzzi M, Gafa R, Orvieto E, Maestri I, Santini A, del Senno L (1998) Chromosome 18q allelic loss and prognosis in stage II and III colon cancer. International Journal of Cancer, 79(4): 390-395

Lee AS, Seo YC, Chang A, Tohari S, Eu KW, Seow-Choen F, McGee JO (2000) Detailed deletion mapping at chromosome 11q23 in colorectal carcinoma. British Journal of Cancer, 83(6): 750-755

Litt M, Luty JA (1982) A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. Am J Hum Genet., 44: 397-401

Lothe RA, Andersen SN, Hofstad B, Meling GI, Peltomaki P, Heim S, Brogger A, Vatn M, Rognum TO, Borresen AL (1995) Mapping of a target region of allelic loss to a 0,5-cM interval on chromosome 22q13 in human colorectal cancer. Gastroenterology, 117/4: 831-837

Lu DD, Zhang XR, Cao XR. (2004) Expression of TN4 gene and its role in human hepatocarcinogenesis from Qidong, a liver cancer risk area. Chin Med J (Engl) 117:440-4

Melcher R., Köhler S., Steinlein C., Müller C.R., Schmid M., Luehrs H., Menzel T., Scheppach W., Moerk H., Scheurlen M., Köhrle J., Al-Taie O. (2002) Spectral karyotype analysis of colon cancer cell lines of the tumor suppressor and mutator pathway Cytogenet Genome Res 98, 22-8.

Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol., 155: 335-350

Niederacher D, Beckmann MW (1998) Bedeutung der LOH-Analyse für die Identifizierung von Tumorgenen. Medgen; 10: 256-258

Nöthiger, F. und Birrer, S. (1994). Kolon, Rektum und Anus. Chirurgie. R. Berchtold, H. Hamelmann, H.-J. Peiper, O. Trentz. München, Wien, Baltimore, Urban u. Schwarzenberg: 553-569

Perrin J. et al. (2001) MSH2 and MLH1 immunodetection and the prognosis of colon cancer. Int. J. Oncology; 19(5): 891-895

Plaschke J. et al (2002) Involvement of hMSH6 in the development of hereditary and sporadic colorectal cancer. Int. J. Cancer: 97, 643-648

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

Rabbitts TH (1994) Chromosomal translocations in human cancer. In: Nature, 372: 143-149
Rechsteiner M, Hill CP (2005) Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. Trends Cell Biol. 15:27-33

Rechsteiner M, Hill CP. (2005) Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. Trends Cell Biol. 15:27-33

Riecken E.O. (1994) Tumoren des Dünn- und Dickdarms. Innere Medizin. M. Classen, V. Diehl, K. Kochsiek. München, Wien, Baltimore, Urban u. Schwarzenberg: 621-627

Scheppach W, Melcher R, Lührs H, Menzel T (2000) Primärprävention des sporadischen kolorektalen Karzinoms durch Ernährungsmodifikation und Medikamente? Internist (Berl). 41:868-75

Seyffert W (Hrsg.) Lehrbuch der Genetik. Gustav-Fischer-Verlag, 24.4 Mismatch-Reparatur, 26.6.4.3 Genomische Instabilität, 568-569 u. 694-695

Songun I, Litvinov SV, van de Velde CJ, Pals ST, Hermans J, van Krieken JH. (2005) Loss of Ep-CAM (CO17-1A) expression predicts survival in patients with gastric cancer. *Br J Cancer* 92:1767-72

Tanaka K, Kikuchi-Yanoshita R, Muraoka M, Konishi M, Oshimura M, Myaki M (1996) Suppression of tumorigenicity and invasiveness of colon carcinoma cells by introduction of normal chromosome 8p12-pter. *Oncogene*, 12(2): 405-410

Tautz D, Renz M (1984) Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res.*, 12: 4127-4138

Tomlinson IP, Bodmer WF (1996) Chromosome 11q in sporadic colorectal carcinoma: patterns of allele loss and their significance for tumorigenesis. *J. of Clin. Path.*, 5: 386-390

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

Vogelstein B, Fearon ER, Kern SE, Hamilton SR, Preisinger AC, Nakamura Y, White R (1989) Allelotype of colorectal carcinomas. *Science*, 244(4901): 207-211

Yana I, Kurahashi H, Nakamori S, Kameyama M, Nakamura T, Takami M, Mori T, Takai S, Nishisho I (1995) Frequent loss of heterozygosity at telomeric loci in 22q in sporadic colorectal cancers. *Int. J. of Cancer*, 60: 174-177

Young J, Leggett B, Ward M, Thomas L, Buttenshaw R, Searle J, Chenevix-Trench G (1993) Frequent loss of heterozygosity on chromosome 14 occurs in advanced colorectal carcinomas. *Oncogene*, 8: 671-675

Danksagung

Ich bin allen zu tiefstem Dank verpflichtet, die in vielfältiger Weise zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Besonderer Dank an

Herrn PD Dr. med. R. Melcher für die Übernahme der Doktorvaterschaft und die geduldige Betreuung.

Herrn Prof. Dr. med. M. Scheurlen für die Übernahme des Koreferats.

Herrn Prof. Dr. W. Scheppach, der mir initial das Thema der Doktorarbeit überließ und mir die Möglichkeit gab, in seinem Labor meine Promotionsarbeit durchzuführen.

Alle Mitarbeiter des Gastlabors der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg für die fachkundige Unterstützung während des experimentellen Teils der Doktorarbeit.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Simon Schindler

Geburtstag: 11.03.1976

Geburtsort: Fulda

Adresse: Friedenstraße 5a, 97072 Würzburg

Familienstand: ledig

Schulbildung

1982-1986 Johannes-Hack-Schule Petersberg (Grundschule)

1986-1995 Rabanus-Maurus-Schule (Domgymnasium) Fulda

06/1995 Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

1995-1996 Städtisches Klinikum Fulda

Studium

05/1997-11/2003 Studium der Humanmedizin an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

03/1999 Ärztliche Vorprüfung

03/2000 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

09/2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

10/2002-10/2003 Praktisches Jahr

- Neurochirurgie: Neurochirurgische Universitätsklinik Würzburg
- Innere Medizin: Medizinische Klinik des LKS Juliusspital Würzburg

- Chirurgie: Chirurgische Klinik am Kantonsspital Schaffhausen, Schweiz

11/2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Berufliche Tätigkeit

04/2004-07/2007 Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Neurochirurgischen Universitätsklinik
Würzburg

08/2007-09/2010 Assistenzarzt der Neurologischen Klinik am Leopoldina-Krankenhaus der
Stadt Schweinfurt

10/2010-09/2011 Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Universitätsklinik und Poliklinik für
Psychiatrie, Psychosomatische Medizin und Psychotherapie der Universität Würzburg

Ab 10/2011 Oberarzt der Neurologischen Klinik am Caritas-Krankenhaus Bad Mergentheim

Würzburg, Oktober 2011