

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

Direktor: Professor Dr. med. H. Einsele

**Prognostische Signifikanz allelischer Verluste der
chromosomalen Bereiche 2p16.3 und 5q22.2 beim
kolorektalen Karzinom**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Elisabeth Sauerhöfer

aus Würzburg

Würzburg, Dezember 2008

Referent: Professor Dr. Michael Scheurlen

Koreferent: Priv.- Doz. Dr. Bertram Illert

Dekan: Professor Dr. med. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung : 12.10.2009

Die Promovendin ist Ärztin

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Das kolorektale Karzinom	1
1.2	Grundlagen der Karzinomentstehung	2
1.2.1	<i>Onkogene und Protoonkogene</i>	3
1.2.2	<i>Tumorsupressorgene, p53 und APC</i>	4
1.2.3	<i>Mismatch- repair- Gene und Mutatorgene, wichtige Gene in der Karzinogenese</i>	5
1.3	Adenom- Karzinom- Sequenz	6
1.4	Genetische Instabilität	7
1.5	Loss of Heterocygosity (und Two- Hit- Hypothese nach Knudson)	8
2	Aufgabenstellung und Ziel: Prognostische Relevanz allelischer Verlust in den Regionen 2p16.3 und 5q22.2	10
3	Material und Methoden	11
3.1	Untersuchtes Patientenkollektiv	11
3.2	Material	13
3.2.1	<i>Geräte und Software</i>	13
3.2.2	<i>Kits/ PCR- Reagenzien</i>	14
3.2.3	<i>Größenmarker</i>	14
3.2.4	<i>Chemikalien</i>	15
3.2.5	<i>Puffer und Gele</i>	15
3.2.6	<i>Verwendete Primer</i>	15

3.3	Methoden	17
3.3.1	<i>DNA- Isolation</i>	17
3.3.2	<i>Konzentrationsbestimmung der DNA</i>	18
3.3.3	<i>PCR und Touchdown- PCR</i>	18
3.3.4	<i>Agarose- Gelelektrophorese</i>	22
3.3.5	<i>Fragmentlängenanalyse</i>	24
3.3.6	<i>Auswertung</i>	26
3.3.7	<i>Kaplan- Meier- Analysen</i>	27
3.3.8	<i>Korrelation mit den histopathologischen Daten</i>	28
4	Ergebnisse	29
4.1	Etablierung der PCR- Methode für die Marker D2S123 und D5S346 und deren Informationsgehalt	29
4.2	Analyse des Patientenkollektivs	30
4.3	Korrelation der Patientenprognose mit klinischen Parametern mittels Kaplan- Meier- Analysen unter Berücksichtigung der Heterozygotität	32
4.3.1	<i>Verlust der Heterozygotität in der Region 2p16.3</i>	32
4.3.2	<i>Verlust der Heterozygotität in der Region 5q22.2</i>	36
4.3.3	<i>Die chromosomale Region 2p16.3 und 5q22.2</i>	40
4.3.4	<i>Bedeutung einer Mikrosatelliteninstabilität in den Regionen 2p16.3 und 5q22.2 für die Überlebenswahrscheinlichkeit</i>	41

4.4	Korrelation des chromosomalen Verlusts mit den histologischen Patientendaten anhand des Chi- Quadrat- Tests	43
4.4.1	<i>Die chromosomale Region 2p16.3</i>	43
4.4.2	<i>Die chromosomale Region 5q22.2</i>	44
4.4.3	<i>Die chromosomale Region 2p16.3 und 5q22.2</i>	45
4.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	46
5	Diskussion	47
5.1	Kandidatengene in der chromosomalen Region 2p16.3	47
5.2	Prognostische Relevanz eines Verlusts in der Region 2p16.3	49
5.3	Kandidatengene in der chromosomalen Region 5q22.2	50
5.4	Prognostische Relevanz eines Verlusts in der Region 5q22.2	50
5.5	Prognostische Relevanz einer Mikrosatelliteninstabilität	51
5.6	Erweiterte Adenom- Karzinom- Sequenz unter Berücksichtigung der Regionen 2p16.3 und 5q22.2	52
5.7	Probleme der LOH- Analyse	53
5.7.1	<i>Kontamination mit Normalschleimhaut</i>	54
5.7.2	<i>Stotterbanden und Summationspotential</i>	56
6	Zusammenfassung	57
7	Literaturverzeichnis	58

1 Einleitung

1.1 Das kolorektale Karzinom

Kolorektale Karzinome sind die häufigsten bösartigen Tumore des Gastrointestinaltraktes. Die Inzidenz des kolorektalen Karzinoms betrug in Deutschland 2002 ca. 60/100.000 Einwohner. Das kolorektale Karzinom war 2002 bei Männern weltweit der vierthäufigste maligne Tumor mit einer Inzidenz von 20/10000 hinter dem Lungen-, dem Prostata- und dem Magen-Karzinom, bei den Frauen der dritthäufigste nach dem Mamma- und dem Zervix- Karzinom (Parkin et al., 2005). Bei der tumorbedingten Sterberate lag das Kolonkarzinom 2002 weltweit bei Männern und Frauen an dritter Stelle nach dem Bronchialkarzinom an erster Stelle, gefolgt von dem Prostata-, bzw. dem Mamma- Karzinom (Parkin et al., 2005). Der Häufigkeitsgipfel bei beiden Geschlechtern liegt zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr, wobei die Inzidenzrate ab dem 50. Lebensjahr exponentiell ansteigt. Über 50% der Menschen in den USA werden mit Erreichen des 70. Lebensjahres einen adenomatösen Polypen entwickelt haben, davon gehen jedoch lediglich 10 % in ein invasives Karzinom über. Das lebenslange Risiko, ein kolorektales Karzinom zu entwickeln beträgt etwa 5-6% (Johns und Houlston, 2001). Ätiologisch sind beim kolorektalen Karzinom sowohl endogene als auch exogene Faktoren von Bedeutung. Besonders ernährungsbedingte Einflüsse, wie fettreiche und fleischreiche Kost sowie Übergewicht, langjähriger Nikotin- und Alkoholkonsum werden als Risikofaktoren angesehen (Potter et al., 1982; Willet et al., 1990). Dahingegen wirken sich eine faserreiche Kost und eine schnelle Darmpassage eher protektiv aus (Scheppach et al., 2000). Den endogenen Faktoren liegen genetische Veränderungen zugrunde, die sowohl erworben als auch angeboren sein können. Als Präkanzerosen sind kolorektale Adenome, multiple Adenome bei der familiären Adenomatosis coli (FAP) und die Colitis ulcerosa gesichert. Allgemein kann man sagen, dass kolorektale Karzinome aufgrund von kumulativen Effekten multipler aufeinander folgender genetischer Alterationen

erfolgen (siehe Adenom-Karzinom-Sequenz nach Fearon und Vogelstein, 1990, Kapitel 1.2, Seite 2). Diese Mutationen können einerseits erworben, wie in den sporadischen Karzinomen, oder angeboren sein. Der Hauptteil der kolorektalen Karzinome tritt sporadisch auf, lediglich 5-6% haben einen genetischen Hintergrund.

1.2 Grundlagen der Karzinomentstehung

Ein maligner Tumor entsteht auf dem Boden einer Mutation, die einer Zelle einen Wachstumsvorteil gegenüber den umliegenden Zellen verschafft. Eine einfache Zelle unterliegt während ihrem Wachstum und ihrer Entwicklung natürlichen Kontrollmechanismen. Potentielle Tumorzellen werden entweder repariert oder zur Apoptose veranlasst. Diese Kontrollmechanismen sind bei der Entstehung eines Tumors, wie dem kolorektalen Karzinoms verloren gegangen. Um diesen natürlichen Abwehrmechanismus wie die Apoptose zu überwinden, reicht eine einfache Mutation nicht aus. Um eine normale Epithelzelle in einen malignen Tumor umzuwandeln sind circa sechs bestimmte, voneinander unabhängige Mutationen in der selben Zelle erforderlich (Strachan et al., 2005). Die Wahrscheinlichkeit, dass eine Zelle sechs dieser Mutationen entwickelt wird dadurch erhöht, dass einige Mutationen die Zellproliferation verstärken. Dadurch ergibt sich eine größere Zielpopulation für die nächste Mutation. Insgesamt wird die Mutationsrate auch durch eine vorausgegangene Mutation, die die Stabilität des Genoms beeinträchtigt, erhöht.

Gene, die von diesen Mutationen betroffen sind und in Tumoren sehr häufig vorkommen sind Onkogene, Tumorsuppressorgene und Mutatorgene. Kinzler und Vogelstein prägten 1997 die Begriffe „care-taker- Gene“ für Tumorsuppressorgene, die direkt an der DNA-Reparatur beteiligt sind und „gate-keeper- Gene“ für (Proto)onkogene mit positiv regulierendem Einfluss auf die Zellteilung und ebenfalls Tumorsuppressorgenen, die negativen Einfluss auf Wachstum und Proliferation einer Zelle haben. Durch Mutationen in den „care-taker- Genen“ oder „gate-keeper- Genen“ kommt es zu einer vermehrten

Proliferation und unkontrollierter Zellteilung und damit zur Tumorentstehung. Auf diesen Grundlagen beruht auch der Pathomechanismus des kolorektalen Karzinoms.

1.2.1 Onkogene und Protoonkogene

Protoonkogene haben eine positive regulatorische Wirkung auf die physiologische Zellvermehrung. Sie kodieren für Proteine, die Wachstum, Teilung und Differenzierung einer Zelle kontrollieren und steuern. Protoonkogene werden an Hand der kodierenden Proteine in mehrere Gruppen eingeteilt, wie beispielsweise Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, G-Proteine, von den Ras- Protoonkogenen kodiert, Nicht- Rezeptor-Proteinkinasen, z.B. Tyrosinkinasen und nukleäre Transkriptionsfaktoren. Mutiert ein Protoonkogen, kommt es im häufigsten Fall zu einem Funktionsverlust, die Zellteilung wird nicht mehr gefördert und die Zelle kann sich nicht mehr teilen. Es gibt aber auch die Möglichkeit, dass durch die Mutation des Protoonkogens eine übermäßige oder inadäquate Expression dieses Gens entsteht und eine unkontrollierte Zellteilung mit sich bringt. In diesem Fall spricht man von einem Onkogen. Durch multifaktorielle Einflüsse können Protoonkogene zu Onkogenen mutieren. Zu nennen wäre die Amplifikation, Punktmutation, Translokation (Rabbitts, 1994) und Transposition. Bereits ein mutiertes Allel kann den Phänotyp der Zelle beeinträchtigen und zur Tumorgenese beitragen.

Onkogene kontrollieren zellulären Funktionen, die am Zellwachstum beteiligt sind und bei Tumoren gestört sein können. Dazu zählen die Wachstumsfaktoren (z. B. SIS), Zelloberflächenrezeptoren (z.B. ERBB oder FMS), Bestandteile des intrazellulären Signalübermittlungssystems (z.B. Ras- Familie, ABL), Transkriptionsfaktoren und DNA-bindende Kernproteine (z.B. MYC) sowie Faktoren, die den Fortgang des Zellzyklus steuern (Kamb, 1995).

1.2.2 Tumorsupressorgene, p53 und APC

Tumorsupressorgene als „gatekeeper“ sind die Gegenspieler zu Onkogenen, da sie das Wachstum einer Zelle, auch einer Tumorzelle in negativer Weise beeinflussen. Sie können aber mutationsbedingt ihre Funktion verlieren und ebenfalls zur Tumorgenese und Tumorprogression beitragen. Tumorsupressorgene können in Form von Zellzyklusregulatoren (p53, RB1), oder als Adhäsionsmoleküle (APC, DCC) fungieren. Das Tumorsupressorgen p53, auch „Wächter des Genoms“ genannt (Vousden, 2000) verhindert eine weitere Zellteilung der mutierten Zellen durch Einleitung der Apoptose oder durch einen Zellzyklus- Arrest bei irreparablen Schäden. In mehr als der Hälfte aller menschlichen Tumoren wird eine Mutation von p53 gefunden. Beim APC- Gen handelt es sich um ein Tumorsupressorgen, welches für das APC- Protein kodiert. Normalerweise bildet das Protein zusammen mit dem Gerüstprotein Axin und der Proteinkinase GSK- 3 β einen Proteinkomplex, welcher β - Catenin abbaut. Entsteht nun eine Mutation im APC- Gen, kann die Affinität von β - Catenin zu dem Komplex gemindert werden, was eine intrazelluläre Anreicherung von β - Catenin zur Folge hat. Da β - Catenin die Produktion einer Reihe wichtiger Gene, wie cyclin D und c- myc kontrolliert, die im Rahmen der zellulären Proliferation eine wichtige Rolle spielen, kann es zu einer unkontrollierten Proliferation einer Zelle kommen. Ebenso ist β - Catenin an der Zelladhäsion beteiligt. Der APC- β - Catenin- Signalweg ist in mehr als 90% aller sporadischen kolorektalen Karzinome inaktiviert und deshalb von grundlegender Bedeutung für das Verständnis der Pathogenese der kolorektalen Karzinome. Der APC- Inaktivierung liegt eine Schlüsselfunktion in der Tumorinitiation zugrunde (Morin et al., 1996).

Zur Inaktivierung eines Tumorsupressorgens müssen nach der Knudson-Hypothese anders als bei den Onkogenen beide Allele durch zwei aufeinanderfolgende Mutationen, „two- hit- theory“ inaktiviert werden. (Knudson et al., 1971). Knudson und Mitarbeiter prägten diese Hypothese am Beispiel des Retinoblastoms. 1983 wurde die Knudson-Hypothese durch Cavenee und Mitarbeiter bestätigt und die Punktmutation, Nondisjunction,

mitotische Rekombination oder Deletion für den Funktionsausfall des zweiten Allels gesichert. Die Wahrscheinlichkeit, dass beide Genkopien eines Tumorsuppressorgens in einer Zelle zufällig inaktiviert werden ist sehr gering. Anders verhält es sich bei einer genetischen Prädisposition, bei der es bereits durch eine Keimbahnmutation zu einem ersten Verlust- „first hit“ eines Allels gekommen ist. Hier kommt es bereits bei der zusätzlichen Inaktivierung der verbleibenden Genkopie, dem „second hit“ zum Verlust der Aktivität des Tumorsuppressorgens, wie es bei hereditären Karzinomen wie FAP und HNPCC der Fall ist. Der Deletionsverlust eines Allels wird „loss of heterozygosity“ (LOH) genannt. Durch vergleichende LOH- Analysen von Tumorgewebe und Normalgewebe kann man den Verlust eines Wildtypallels nachweisen.

1.2.3 Mismatch- repair- Gene und Mutatorgene, wichtige Gene in der Karzinogenese

Ein defektes Mismatchreparatursystem ist charakteristisch für HNPCC assoziierte Tumoren. Die Basis der Tumorgenese ist verursacht durch Fehler im DNA-Reparatur-System, welchem wiederum eine Mutation in den DNA- Mismatch-repair- Genen, wie hMLH1 und hMSH2 auf 3p21- 23 zugrunde liegt (Marra et Boland, 1995; Lynch et de la Chapelle, 2003). Die Mutationen treten seltener auch bei FAP- assoziierten Tumoren auf (Park et al., 2005). Als Folge dieses Defektes weisen die Tumoren eine Mikrosatelliteninstabilität auf.

Mutatorgene sind Gene, die in die Replikation und/ oder Reparatur der DNA eingreifen und somit zur Stabilität des Genoms beitragen. Insbesondere bei der erblichen Form des Kolonkarzinoms sind verschiedene Mutationen entdeckt worden, die zu einer Steigerung der Gesamtmutationsrate im Genom führen, weil das DNA- Reparatursystem gestört ist. Sie sind wie die Tumorsuppressorgene für Mutationen rezessiv und bedürfen zum Funktionsverlust ebenfalls den Verlust zweier Allele.

1.3 Adenom- Karzinom- Sequenz

Die Entwicklung eines Kolonkarzinoms aus einem Adenom wird als Adenom-Karzinom-Sequenz bezeichnet. Fearon und Vogelstein haben 1990 das Tumorprogressionsmodell in einzelne Entwicklungsstufen von der Entwicklung eines Adenoms bis zur Entstehung eines Karzinoms eingeteilt. Die Adenome entwickeln sich über ein frühes Stadium (< 1cm) in ein mittleres Stadium (> 1cm) gefolgt vom späten Stadium (>1 cm) bis zu einem invasiv wachsendem Karzinom mit der Möglichkeit der Metastasenbildung. Die erste Phase in der Entstehung von Neoplasien des Dickdarms ist die Mutation des APC- Gens (Adenoma Polyposis Coli) am Genlocus 5q21. Histologisch sind aberrante und dysplastische Krypten zu erkennen. In der zweiten Phase kommt es zu aktivierenden Mutationen des k-ras- Onkogens auf Chromosom 12. In der intermediären Phase sind also k-ras Mutationen an der Entstehung von niedrig- bis mittelgradigen Adenomen beteiligt. Diese Mutationen treten bei 50% der mittleren bzw. späten Adenome auf, aber nur bei 10% der frühen Adenome. Während der Weiterentwicklung zum späten Adenom erfolgt ein Verlust der Heterozygotität auf Chromosom 18 (Fearon et al., 1990) und zur Inaktivierung des dort lokalisierten Tumorsuppressorgens DCC oder SMAD4 (White, 1998). Der Übergang zu hochgradig dysplastischen Adenomen bzw. Karzinomen wird durch die dritte Phase eingeleitet, in der es zu Mutationen und Deletionen des Tumorsuppressorgens p53 auf Chromosom 17p kommt (Baker et al., 1989). Hamelin und Jen stellten 1994 in ihren Untersuchungen fest, dass ein Tumor umso aggressiver ist, je mehr genetische Veränderungen auftreten.

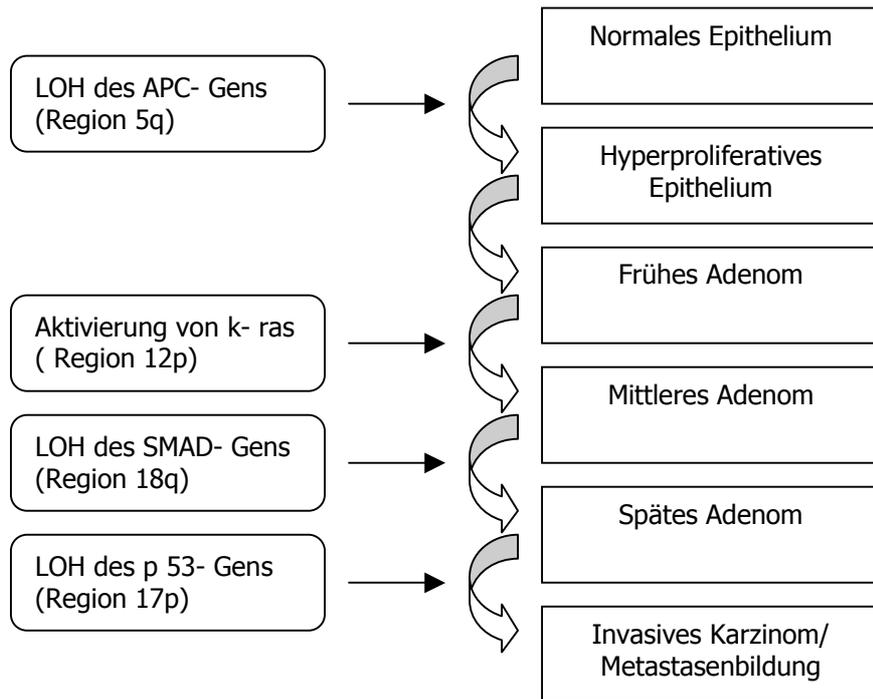


Abbildung 1: Tumorgenese nach Vogelstein (abgewandelt)

1.4 Genetische Instabilität

Als Ursache der Karzinomentstehung ist die Anzahl einer kritischen Menge von Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen allgemein akzeptiert. Diese endogene Mutationsfrequenz reicht aber nicht aus, um die notwendige Anzahl von Mutationen innerhalb einer Zelle zu verursachen, die einen Tumor entstehen lässt. Die große Anzahl von Mutationen in Tumorzellen lässt die Vermutung zu, dass die Entstehung von genetischer Instabilität einen frühen Schritt in der Tumorphysion darstellt (Bertholon et al., 2006). Deshalb geht man heute davon aus, dass der Entstehung einer malignen Krebszelle und deren raschen Progression ihres neoplastischen Wachstums eine genetische Instabilität zugrunde liegt (Loeb, 1991; Hartwell, 1992).

Es werden zwei Formen der genetischen Instabilität unterschieden. Die chromosomale Instabilität und die Mikrosatelliteninstabilität. Unter dem Begriff der chromosomalen Instabilität (CIN) auf chromosomaler Ebene versteht man die Folgeerscheinungen von Verlusten kompletter Chromosomen oder chromosomaler Stückverluste, wie Monosomien, Trisomien oder Deletionen.

Ursache kann aber auch eine Translokation oder Chromosomenfusionen sein. Die chromosomale Instabilität tritt in 85% aller sporadischen und FAP-assoziierten Kolonkarzinome auf.

Die weitaus seltenere Form der genetischen Instabilität auf DNA- Ebene ist die Mikrosatelliteninstabilität. Mikrosatelliten sind repetitive DNA- Sequenzen. Die Mikrosatelliteninstabilität ist gekennzeichnet durch die Längenvariation von Mikrosatelliten im Tumor, die einen direkten Hinweis auf einen Funktionsverlust von DNA-Reparatursystemen darstellen (Seyffert et al., 2002). Da es sich um veränderte Mikrosatelliten handelt, wurde 1993 von Thibodeau der Begriff der Mikrosatelliteninstabilität geprägt. Bei HNPCC findet man Sequenzlängendifferenzen zwischen Tumor und gesundem Gewebe als Zeichen für eine fehlerhafte Replikation der DNA. In ungefähr 95% der HNPCC-Tumoren und 15% der sporadischen kolorektalen Karziome sind Replikationsfehler nachzuweisen (Wheeler, 2005).

Interessanterweise schließen sich eine chromosomale Instabilität und eine Mikrosatelliteninstabilität in Tumoren meist gegenseitig aus (Melcher et al., 2002).

1.5 Loss of Heterocytosity (und Two- Hit- Hypothese nach Knudson)

Um die chromosomale Position von Tumorsupressorgenen zu ermitteln wird der Test auf einen Verlust der Heterozygotität (LOH= Loss of heterocytosity) angewandt. Ein Heterozygotitätsverlust eines Locus entsteht durch einen Verlust eines der beiden Allele der Chromosomen. Cavene und Mitarbeiter stellten 1983 fest, dass somatische genetische Veränderungen am Retinoblastom einen LOH bei Markern hervorrufen, die in der Nähe des RB-Locus liegen. Nach der „Two- Hit Hypothese“ nach Knudson kommt es aber nur dann zu einem Verlust der Heterozygotität, wenn es zu einer doppelten Inaktivierung der beiden Tumorsupressorgenele kommt (siehe Abbildung 2).

Deshalb wird der Verlust genetischen Materials einer bestimmten chromosomalen Region in einem Tumor als Hinweis auf das Vorhandensein von Tumorsuppressorgenen gesehen (Canzian et al., 1996). Diese chromosomalen Regionen können mittels Marker identifiziert werden. In der LOH Analyse werden polymorphe Marker zur Beurteilung homologer Allele eingesetzt. Die hierbei verwendeten "Mikrosatelliten- Marker" bestehen aus kurzen Di-, Tri- oder Tetranukleotidwiederholungen. Um diese kurzen Repetitionen durch Vervielfältigung kenntlich zu machen, bedient man sich der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Die dazu ausgewählten Primer sollten den spezifischen Mikrosatellitenloкус flankieren. Das durch die PCR entstandene DNA- Produkt des Tumorgewebes und des entsprechenden Normalgewebes unterscheiden sich anhand der Fragmentlänge, welches durch elektrophoretische Auftrennung und Färbung sichtbar gemacht werden kann. Ein LOH in der Tumor- DNA zeigt sich durch einen Verlust bzw. eine signifikante Reduktion eines der beiden in der Normal- DNA nachgewiesenen Allelfragmente. (Niederacher et Beckmann, 1998). Bei Homozygotität der Allele für einen Marker kann die LOH- Analyse keine Information über einen Allelverlust im Tumorgewebe liefern. Deshalb verwendet man vorzugsweise hoch polymorphe Mikrosatellitenmarker. Für die Region 2p16.3 und 5q22.2 können die Marker D2S123 und D5S346 verwendet werden.

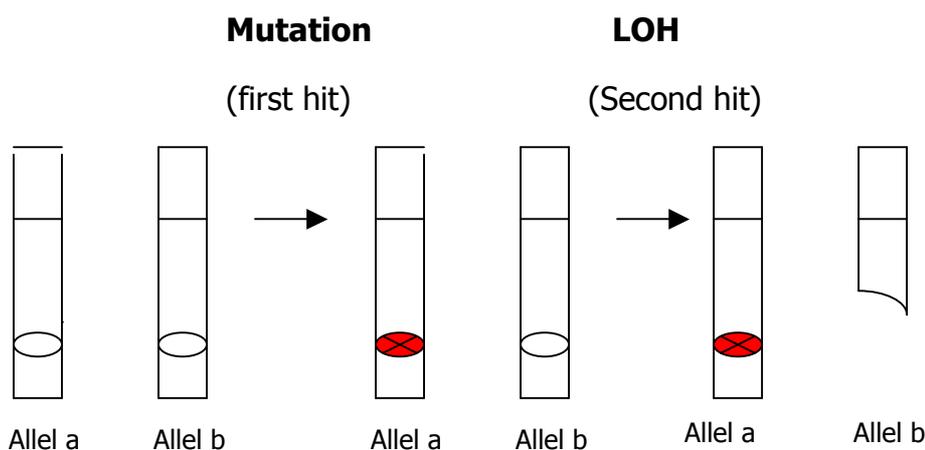


Abbildung 2: Knudson „two- hit Hypothese der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen durch Mutation und LOH;
 ○ Intaktes Allel, ⊗ Mutiertes Allel;

2 Aufgabenstellung und Ziel: Prognostische Relevanz allelischer Verluste in den chromosomalen Regionen 2p16.3 und 5q22.2

Verluste der Heterozygotität (LOH = „loss of heterozygosity“) in chromosomalen Abschnitten von Tumoren sind indirekte Hinweise auf dort lokalisierte Tumorsuppressorgene und haben zum Teil eine prognostische Relevanz für den Patienten. In einer früheren Publikation konnte ein häufiger LOH im Bereich der Regionen 2p16.3 und 5q22.2 beim kolorektalen Karzinom nachgewiesen werden und gezeigt werden, dass ein LOH 2p16.3 mit einer signifikant schlechteren Prognose assoziiert ist (Bisgaard et al., 2001). Ziel dieser Arbeit ist, die prognostische Relevanz von allelischen Verlusten (LOH) in den chromosomalen Bereichen 2p16.3 und 5q22.2 beim kolorektalen Karzinom mittels der dort lokalisierten hoch polymorphen Mikrosatellitenmarker D2S123 und D5S346 zu überprüfen. Hierzu wird eine Serie von 165 kolorektalen Karzinomen, die von 2000 bis 2004 von der interdisziplinären Forschungsgruppe Kolonkarzinom Würzburg gesammelt wurden, untersucht. Für alle Karzinome stehen die klinischen Verlaufsparemeter und die histopathologischen Daten aus dem Tumorzentrum Würzburg zur Verfügung. Analysiert werden die beiden Regionen 2p16.1-3 und 5q22.2 mittels der Polymerase- Kettenreaktion auf einen Verlust der Heterozygotität und die Ergebnisse werden anschließend mit dem Patientenüberleben und weiteren klinischen (z.B. Alter, Geschlecht) und histologischen Parametern (z.B. Staging, Grading) korreliert.

3 Material und Methoden

3.1 Untersuchtes Patientenkollektiv

Untersucht wurden 165 Patienten die während eines Zeitraums von 2000 bis 2004 in der Universitätsklinik Würzburg wegen eines kolorektalen Karzinoms operiert wurden. In Tabelle 1 sind ausschließlich die 156 Patienten aufgelistet, deren Angaben bezüglich des Geschlechts, des Alters, des Stadiums des Tumors und dessen Grading komplett sind.

Von diesen 156 Patienten sind 86 männlich und 70 Personen weiblich. Das Durchschnittsalter betrug 71 Jahre. Der jüngste Patient war 29 Jahre alt, der älteste 91 Jahre.

27 der 156 Tumoren befanden sich zum Zeitpunkt der Operation im UICC-Stadium I, 59 im Stadium II, 40 im Stadium III und 30 im Stadium IV. Vom Differenzierungsgrad wurde ein Tumor mit G1, 120 Tumoren mit G2 und 35 Tumoren mit G3 eingestuft.

DNA- Nr.	Geschl.	Alter	Stadium	G	DNA- Nr.	Geschl.	Alter	Stadium	G
1	W	87	1	2	23	W	78	2	2
2	M	77	3	2	24	W	49	3	2
3	M	65	3	2	25	M	62	2	2
5	W	69	1	3	26	M	77	3	2
6	M	47	3	2	27	W	79	1	2
7	W	68	3	2	28	M	76	4	2
8	W	52	4	2	29	W	63	4	2
9	M	67	4	2	30	W	55	4	3
10	W	78	2	2	31	W	82	4	3
11	W	90	3	2	32	M	84	2	2
12	W	73	3	3	33	M	63	4	2
13	M	70	2	2	34	M	67	2	3
14	W	72	2	3	35	M	66	2	2
15	M	77	4	2	36	M	58	3	2
16	W	64	4	2	37	W	39	3	2
17	M	64	3	2	38	M	62	1	2
18	W	70	2	3	39	M	67	4	2
19	M	72	1	2	40	M	32	3	2
20	M	62	1	2	50	M	51	4	3
21	W	73	2	2	51	M	72	1	1
22	M	66	3	2	52	W	66	3	2

DNA- Nr.	Geschl.	Alter	Stadium	G	DNA- Nr.	Geschl.	Alter	Stadium	G
54	M	63	4	3	104	M	44	4	2
55	W	36	2	2	105	M	64	3	2
56	M	74	2	3	106	M	63	2	2
58	M	63	3	3	107	W	89	2	2
59	M	75	2	3	108	M	74	2	2
60	M	61	4	2	110	M	72	2	2
61	M	60	3	2	111	M	71	3	2
62	M	68	3	2	112	M	64	2	2
63	M	40	2	2	113	M	70	2	2
64	M	55	3	3	114	M	61	3	2
65	M	29	1	2	115	M	57	4	3
66	M	58	3	2	116	W	80	1	2
67	M	52	2	2	117	M	60	4	2
68	W	89	1	2	118	W	78	2	2
69	M	73	2	2	119	W	69	4	2
70	M	78	3	3	120	M	69	2	2
71	M	74	1	2	121	W	74	4	2
72	M	74	2	2	122	M	73	1	3
74	M	64	3	3	125	M	64	2	2
75	M	76	4	2	126	M	72	2	3
76	W	87	2	2	127	M	71	1	2
77	W	82	2	2	128	M	61	3	2
78	W	74	2	2	129	W	72	4	3
79	M	60	2	2	130	W	66	1	2
80	M	77	3	2	131	W	85	3	3
81	W	59	2	2	132	W	75	2	2
82	W	78	2	2	133	W	74	1	2
83	W	69	1	2	134	W	73	2	2
84	M	70	2	2	135	M	62	2	2
85	M	80	2	2	136	M	59	2	2
86	W	31	3	3	137	W	79	4	2
87	M	73	1	2	138	M	56	2	2
88	W	84	3	3	139	M	67	4	2
89	W	66	2	2	140	M	65	1	2
90	M	71	4	2	141	W	70	2	2
91	M	60	2	2	142	W	54	3	2
92	M	64	1	2	143	M	72	1	2
93	M	72	3	3	144	W	88	2	2
94	W	71	4	2	145	M	78	2	2
95	W	67	3	2	146	W	86	1	2
97	M	66	3	3	147	W	60	2	2
98	M	65	4	2	148	W	64	2	2
99	W	63	4	2	149	M	72	1	2
100	M	74	2	3	150	W	49	2	3
102	M	74	3	2	151	W	47	2	2
103	W	67	3	2	152	M	68	3	2

DNA- Nr.	Geschl.	Alter	Stadium	G	DNA- Nr.	Geschl.	Alter	Stadium	G
154	W	63	2	2	167	W	73	3	2
155	M	68	2	2	168	W	91	2	3
156	W	75	1	3	169	W	66	4	3
157	W	53	1	2	170	W	86	2	3
158	M	68	4	3	171	W	64	1	2
160	W	66	2	2	172	W	76	3	3
161	W	71	4	2	173	W	83	4	3
162	W	30	2	2	174	M	83	2	2
164	W	81	2	2	175	M	60	1	2
165	M	71	3	3	177	M	80	2	2
166	W	56	1	2	178	W	56	3	3

Tabelle 1: Untersuchtes Patientenkollektiv (nur Patienten mit vollständig vorhandenen Daten), eingeteilt nach DNA- Nummer (=DNA-Nr.), Geschlecht (=Geschl.), Alter, Stadium und Grading (=G)

3.2 Material

3.2.1 Geräte und Software

Gerät	Typenbezeichnung	Hersteller	Herkunftsort
Autoklav		Fedegari	Albuzzano, Italien
Elektrophoresekammer	<ul style="list-style-type: none"> - Mini Protein II Cell - Electrophoresis Power Suuply EPS 3500 	BioRad Pharmacia	Hercules CA, USA
Magnetrührer	Ikamag RCT	IKA-Labortechnik	Staufen i.Br.
PCR-Maschine	Thermocycler "T-Gradient"	Biometra	Göttingen
Photometer	Ultrospec 2100 pro	Amersham Biosciences	Freiburg
Photometerküvette	Präzisionsküvette	Hellma	Müllheim
Pipetten (2,5; 10; 20; 100; 200; 1000µl)		Eppendorf	Hamburg
Präzisionswaage	Präzisionswaage	Sartorius	Göttingen
Sequenzier	CEQ 8000 Genetic Analysis System	Beckman Coulter	Fullerton CA, USA
Thermoschüttler		GFL	Burgwedel
UV-Illuminator	TI 3 (312nm)	Biometra	Göttingen
Videodokumentationssystem	Biometra Biodoc	Biometra	Göttingen
Vortex	<ul style="list-style-type: none"> - Vortex Genie 2 - MS2 Minishaker 	Bender & Hohbein AG IKA Works Inc.	Zürich, CH Wilmington, USA
Zentrifugen	<ul style="list-style-type: none"> - Biofuge Fresco - Microfuge 	Heraeus Sigma-Aldrich	Hanau

Tabelle 2: Gerätebeschreibung

Software	Hersteller
CEQ Software Version 9.0	Beckman Coulter

Tabelle 3: Spezialsoftware zur Auswertung

3.2.2 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
Nukleotidlösung	peqGold dNTP- Set	peqLab	Erlangen
PCR-Buffer		Invitrogen	Karlsruhe
Polymerase	Taq-DNA Polymerase, recombinant; 5 units/	Invitrogen	Karlsruhe
Sample Loading Solution (SLS)	Sequencer-Puffer für die Probenplatte	Beckman Coulter	Fullerton CA, USA
Separation puffer	Separations-Puffer pH 7,0 für die Pufferplatte	Beckman Coulter	Fullerton CA,USA

Tabelle 4: eingesetzte Kits und PCR- Reagenzien

3.2.3 Größenmarker

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

Tabelle 5: Größenmarker

3.2.4 Chemikalien

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
Trishydroxymethyl-aminomethan	Merck	Darmstadt
Tris-HCl		
Xylen (für DNA-Iso)		

Tabelle 6: Chemikalien

3.2.5 Puffer und Gele

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

Tabelle 7: Puffer und Gele

3.2.6 Verwendete Primer

Ein Primer ist ein Oligonukleotid. Er besteht aus kurzen DNA-Einzelstrangstücken mit etwa 18 bis 25 Nukleotiden Länge und wird für die Durchführung einer Polymerase Ketten Reaktion (PCR) benötigt. Da nur eine bestimmte DNA-Sequenz vervielfältigt werden soll, muss der Primer bzw. der Mikrosatellitenmarker spezifisch für diesen Bereich ausgewählt werden. Die Orientierung der verwendeten Primerpaare muss so gewählt werden, dass sie

den zu untersuchenden Abschnitt der DNA einrahmen. Ein Primer beginnt am 5'Ende für den kodierenden Strang, der andere für den nicht-kodierenden Strang am 3'Ende. So können die neu synthetisierten Stränge ihrerseits wieder als Matrizen für die weitere DNS Synthese dienen.

Primer	Region	Verlauf	Sequenz	Repeat	Markierung	Größe	Firma
D2S123	2p16.3	Forward Reverse	5'AAACAGGATGCC TGCCTTTA 5'GGACTTTCCAC CTATGGGAC	(CA)n	Dye D4	197-227 bp	Sigma Proligo
D5S346	5q22.2	Forward Reverse	5'ACTCACTCTAGT GATAAATCGGG 5AGCAGATAAGAC AGTATTACTAGTT	(GT)n	Dye D4	96 bp	Sigma Proligo

Tabelle 8: verwendete Primer

3.3 Methoden

3.3.1 DNA- Isolation

Zur Isolation der DNS aus Tumor und korrespondierender Schleimhaut wird das DNeasy- Extraktionssets der Firma Qiagen® verwendet. Es werden jeweils ca. 25 mg vom jeweiligen Gewebe abgetrennt, in ein autoklaviertes 2ml Eppendorf-Gefäß eingelegt, mit 1200 µl Xylol versetzt und mit einem Vortexer vermengt. Anschließend wird bei maximaler Geschwindigkeit 5 min lang zentrifugiert. Der Überstand ist zu verwerfen. Durch Zugabe von 1200 µl 96%igem Ethanol werden die Xylenreste entfernt. Das Ethanol wird mit der Probe vermischt und für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das übriggebliebene Ethanol wird abpipettiert. Nach Wiederholung dieses Waschvorgangs wird das offene Eppendorfgefäß für 10-15 min im Wasserbad bei 37°C inkubiert, bis das restliche Ethanol verdampft ist. Zur vollständigen Lyse des gewonnenen Sediments wird es mit 180 µl ATL- Puffer für die Gewebelyse und 20 µl Proteinase K versehen und nach guter Durchmischung für ein bis drei Stunden bei 55°C im Thermoschüttler inkubiert. Die nun gelösten Proben werden gevortext, 200 µl AL- Puffer (Präparationspuffer) hinzugefügt und nach erneuter Durchmischung 10 min lang in einem 70°C Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl 96%igem Ethanol und Durchmischung der gesamten Flüssigkeit wird diese in eine gesonderte DNA- Säule („Dneasy Mini spin column“) gebracht, in einem speziellen 2 ml- Übergefäß („collection- tube“) platziert und anschließend für 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Das Übergefäß und das Filtrat werden verworfen und die DNA- Säule in ein neues „collection- tube“ gebracht , mit 500 µl AW1- Puffer (Waschpuffer) versehen und nochmals zentrifugiert. Auch hier wird der Durchfluss samt Übergefäß verworfen. Erneut wird die DNA- Säule in ein „collection- tube“ gestellt und 500 µl AW2- Puffer beigemischt. Um die Membran der DNA- Säule zu trocknen muss das „collection- tube“ bei 1400rpm drei Minuten lang zentrifugiert werden. Übergefäß und Puffer werden verworfen. Die DNA- Säule wird in ein 1,5ml Eppendorf- Gefäß gebracht und 200 µl AE- Puffer auf die DNA- Membran pipettiert. Als letzter Schritt wird die

DNA für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und bei 8000 rpm zentrifugiert. Die eluierte DNA befindet sich nun im Eppendorfgefäß. Mit einem neuen Gefäß wird die Eluierung nochmals durchgeführt. Die Gefäße enthalten nun die 2 DNA- Eluate, deren Konzentration und Reinheitsgrad mit Hilfe eines Photometers spektrometrisch bestimmt werden kann.

3.3.2 Konzentrationsbestimmung der DNA

Die Absorption einer Substanz, hier Nukleinsäure, bei einer spezifischen Wellenlänge ist von der Konzentration dieser Substanz abhängig. Nukleinsäuren haben ein charakteristisches Absorptionsspektrum bei $\lambda = 260\text{nm}$. Dadurch lassen sie sich photometrisch quantifizieren. Eine Absorptionseinheit bei 260 nm entspricht ca. 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNA. Das Ergebnis kann durch Proteine verunreinigt werden, deren Maximum bei $\lambda = 280$ liegt. Das Verhältnis der Absorption bei $\lambda=260$ nm zu $\lambda=280$ nm beträgt bei zuverlässigen Bestimmungen 1,6 bis 2 zu1. Nach photometrischer Bestimmung der Konzentration wird die DNA- Lösung mit destilliertem Wasser auf 10 $\text{ng}/\mu\text{l}$ verdünnt und bei -20°C aufbewahrt.

3.3.3 PCR und Touchdown- PCR

Nach der Isolation der DNA und deren Konzentrationsbestimmung erfolgt deren Amplifizierung durch die von Saiki et al. (Saiki, 1986) erstmals beschriebene Methode der Polymerase Kettenreaktion (PCR). Das PCR-Verfahren ist eine in vitro ablaufende, enzymatische Kettenreaktion, die bestimmte DNA- Bereiche definierter Länge und Sequenz mit dem Enzym *Taq*DNA- Polymerase in theoretisch unbegrenzter Menge vervielfältigen kann. Hierdurch können kleinste Mengen an DNA für weitere Untersuchungen vermehrt werden. Die *Taq*Polymerase ist eine hitzestabile Polymerase, die einen Einzelstrang zum Doppelstrang vervollständigen kann. Voraussetzung für eine PCR ist die Kenntnis der Nukleotidsequenz am Anfang und am Ende des gewünschten

DNA- Bereichs. Es werden zwei Oligonukleotid- Primer verwendet, die in ihrer Basensequenz genau dem Bereich entsprechen, die die gesuchte Sequenz flankieren.

Die PCR besteht aus einer Folge von Zyklen mit jeweils drei Schritten:

Melting (Denaturierung der Matrize):

Durch Erhitzung des DNA- Doppelstrangs auf 93- 95°C werden die Wasserstoffbrückenbindungen gelöst und die DNA- Stränge getrennt.

Annealing (Anlagerung der Primer an die Matrize):

Abhängig von der Schmelztemperatur der zu erwartenden Doppelstrang- DNA und der Basenzusammensetzung der Primer erfolgt die Anlagerung der Primer an die Matrize bei 50- 70°C.

Elongation (DNA- Synthese):

Die DNA- Synthese erfolgt bei 70- 75°C. An den Primern beginnt die Synthese der neuen komplementären DNA- Stränge mit Hilfe einer hitzestabilen DNA- Polymerase und der vier Desoxynucleotidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP und dTTP. Die Primer müssen so gewählt werden, dass die Richtung der Synthese des neuen Strangs des einen Primers in Richtung der Bindungsstelle des andere Primers verläuft. Die DNA- Synthese erfolgt immer von 3' in Richtung 5' Ende. Auf diese Weise können die neu synthetisierten Stränge wieder als Matrize für die weitere DNA- Synthese dienen, was zu einer Kettenreaktion mit exponentieller Produktzunahme führt (Abbildung 3).

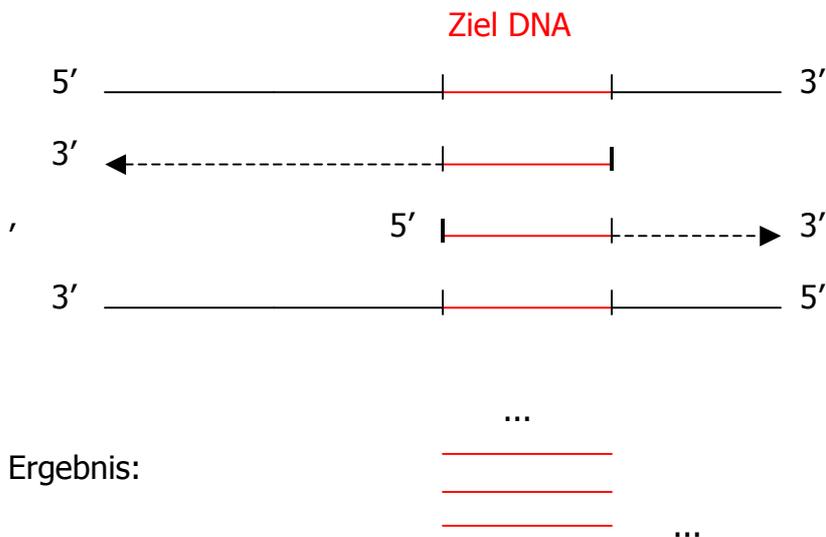


Abbildung 3: Bildung der komplementären DNA- Stränge vom noch variablen 3' zum festen 5' Ende. Danach Bildung eines neuen Matrizenstrang mit festem 3' und 5' Ende. Als Ergebnis: Vervielfältigung eines spezifischen DNA-Abschnitts

Die PCR findet in einem Thermocycler statt.

Für die Durchführung der PCR werden folgende Komponenten benötigt:

- Original- DNA
- Ein Primerpaar, bestehend aus einem Forward- und einem Reverse-Primer
- DNA- *Taq*Polymerase (500 Units, Firma: Invitrogen), Nukleotidlösung und PCR- Puffer.
- Aqua dest.
- Diverse Arbeitsgeräte: PCR- Gefäß, Pipetten u.a.

Um die Spezifität der PCR- Reaktion zu erhöhen und das Risiko unspezifischer Banden in der Auswertung zu minimieren, findet die Touch down- PCR in diesem Versuch Verwendung. Hierbei wird die Annealing- Temperatur während der PCR- Zyklen zunehmend verringert. Resultat ist die Unterdrückung der

Bildung falscher Produkte und die verstärkte Synthetisierung der gewünschten Sequenzen.

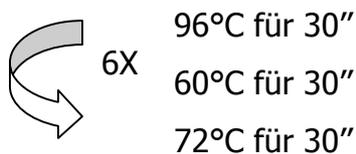
PCR- Ansatz:

- 1 µl Primer mit je 1 pmol/ µl Forward- und Reverse- Primer
- 1 µl DNA
- 23 µl Mastermix
- 25 µl Aqua dest.

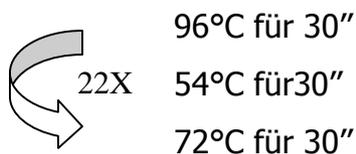
Die Amplifizierung der PCR erfolgt unter den folgenden **PCR Touch down-Bedingungen**:

Die „lid temperature“ (Heizdeckel- Temperatur) liegt bei 110°C. Vor dem eigentlichen Beginn ist ein „Preheating“ von 96°C für zwei Minuten empfehlenswert.

Für den Marker **D2S123** erfolgen sechs Zyklen „touch down“, wobei die Annealingtemperatur pro Zyklus um 1°C verringert wird.



Anschließend werden 22 Zyklen unter folgenden Bedingungen ausgeführt:



Das Gerät kühlt auf 4°C ab und bleibt unter dieser Temperatur in Betrieb. Das fertige PCR- Produkt wird für den weiteren Gebrauch im Sequencer mit 100 µl Aqua dest. gemischt.

Die PCR- Bedingungen für den Marker D5S346 unterscheiden sich von den oben genannten nur in der Anzahl der Zyklen. Für den Marker D5S346 werden statt 22 Zyklen 24 Zyklen verwendet.

3.3.4 Agarose- Gelelektrophorese

Den Erfolg der PCR kann man durch Auftrennung und Analyse der PCR-Produkte auf einem Agarosegel nach Anlegen einer Spannung überprüfen.

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode, die die DNA nach ihrer Größe trennt. Anhand eines Vergleichs mit einem Längenstandard kann ihre Größe bestimmt werden. Wird eine Spannung angelegt, wandern die DNA- Moleküle, die durch ihre Phosphate negativ geladen sind Richtung Anode. Kleinere DNA- Moleküle wandern schneller Richtung Pluspol als größere Moleküle. Dadurch ist eine Auftrennung nach Größe möglich. Der ebenfalls mitaufgetragene Längenstandard besteht aus einem Gemisch von unterschiedlichen DNA- Strängen bekannter Länge. Vergleicht man die Wanderweite der aufgetragenen DNA- Moleküle mit dem Längenstandard, lässt sich deren Menge und Größe bestimmen.

Zum Anfärben der Nukleinsäure wird Ethidiumbromid verwendet. Einzelne Moleküle interkalieren mit den Basen der DNA, wodurch sich das Anregungsspektrum von Ethidiumbromid verändert. Bei Anregung durch ultraviolettes Licht wird die Fluoreszenz der Substanz stark erhöht. Wie in Abbildung 4 zu sehen leuchten die Stellen, an denen sich DNA befindet deshalb im Gel hell auf. Das Gel ohne DNA erscheint schwarz. Die Lichtintensität ist dabei proportional zur vorhandenen DNA- Menge.

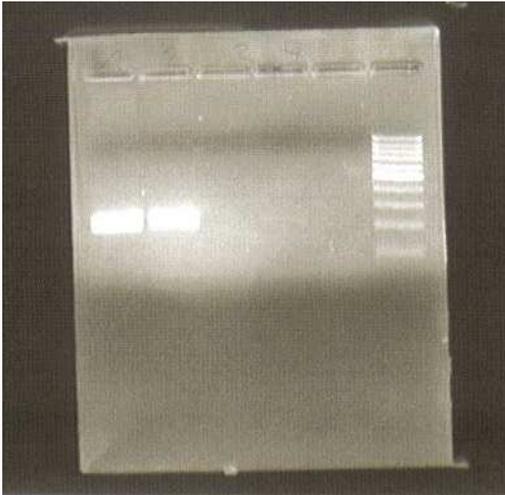


Abbildung 4: Gelelektrophorese mit dem Primer D2S123. Zu sehen ist eine Aufhellung im Bereich der ersten und zweiten Laufstrecke, die fluoreszierender DNA im ultravioletten Licht entspricht.

Zur Durchführung der Agarose- Gelelektrophorese muss das Gel hergestellt werden. Man benötigt eine 1,4%ige Agaroselösung in TBE- Puffer. Hierzu wird 0,6 mg Agarose in 40 ml TBE- Puffer vermischt und anschließend drei bis viermal in der Mikrowelle aufgekocht, bis eine klare Lösung entsteht. Die Flüssigkeit muss nun leicht bis auf 60°C abkühlen. Die Lösung wird in einen Ethidiumbromidkolben umgefüllt und 1 µl Ethidiumbromid dazugegeben. Danach wird die Gelkammer präpariert. Dazu wird der Kamm in der dafür vorgesehenen Halterung des Schlittens befestigt. Der Schlitten wird in die Gelkammer gesteckt und darauf geachtet, dass die Gummiecken des Schlittens die Seiten luftdicht abschließen, um ein Austreten des Gels zu verhindern. Jetzt kann das Gel luftblasenfrei in den Schlitten gegossen werden. Ist das Gel abgekühlt und fest, wird der Kamm gezogen. Die durch den Kamm verursachten Hohlräume werden Taschen genannt. Der Schlitten wird nun um 90° gedreht, dass die Taschen am Kathodenende zu liegen kommen. Die Gelkammer wird mit 1x TBE- Puffer übergossen, so dass das Gelkissen vollständig mit Puffer bedeckt ist. Anschließend werden jeweils 5- 10 µl der mit Bromphenolblau markierten DNS in die Taschen pipettiert. In die letzte Tasche wird der Längenstandard aufgetragen. Nach Anlegen einer 100 Volt Spannung beginnen die DNA- Fragmente wegen ihrer negativen Ladung Richtung Anode

zu wandern und werden anhand ihrer Größe aufgetrennt. Hat die schnellste Farbfront das Ende des Gels erreicht, wird die Spannung unterbrochen.

Zur Auswertung der Gelelektrophorese wird der Schlitten mit Gel entnommen und unter einem UV- Illuminator betrachtet. Durch das Ethidiumbromid fluoresziert die DNS im ultravioletten Licht.

Ist ein positives Ergebnis zu verzeichnen, können die DNA- Proben zur Fragmentlängenanalyse am automatischen Sequenziergerät verwendet werden.

3.3.5 Fragmentlängenanalyse

Die Fragmentanalyse erfolgt an einem 8 Kanal Capillar Elektrophorese Sequenzautomaten vom Typ CEQ 8000 Genetic Analysis System der Firma Beckman Coulter nach dem Prinzip der Glaskapillarelektrophorese.

Wird eine Spannung an eine offene Kapillare gelegt, die mit einer einheitlichen Lösung gefüllt ist, nämlich dem zu analysierenden DNA- Fragment, erfolgt die Separation anhand der Kombination des elektrophoretischen und des elektroosmotischen Flusses. Der elektrophoretische Fluss basiert auf der elektrischen Anziehungskraft, welche die negativ geladenen DNA- Fragmente der Probe zum Fluss durch das Kapillarsystem des Automaten veranlasst. Dies geschieht durch eine angelegte positive Spannung.

Durch das angelegte Potential erfolgt eine innere Ladung der Kapillare. Dadurch entsteht ein Elektrolytfluss, den man elektroosmotischen Fluss nennt. Der elektroosmotische überlagert meist den elektrophoretischen Fluss. Kommt eine Kapillare mit einer Elektrolytlösung in Kontakt, die einen pH- Wert $> 1,5$ hat, wird die innere Kapillarwand bedingt durch die Dissoziation der Silanolgruppen negativ geladen. Es lagern sich nun positiv geladene Ionen aus der Elektrolytflüssigkeit an der Oberfläche der negativ geladenen Kapillarinnenwand an und es kommt zur Ausbildung einer Doppelschicht. In der Elektrolytlösung bleibt eine geringe positive Restladung zurück, die einen Fluss zur Kathode (negativ geladen) verursacht, den elektroosmotischen Fluss. Legt man nun ein

elektrisches Feld an, so wandern die Kationen aus der Elektrolytlösung zur Kathode und ziehen die gesamte Flüssigkeit mit. Das hat zur Folge, dass nicht nur Kationen, sondern auch neutrale Verbindungen und sogar Anionen, alle mit unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten, zur Kathode gezogen werden. Weil der elektroosmotische Fluss eine größere Wirkung hat als der elektrophoretische, erreichen Kationen die Kathode schneller, da sich sowohl der elektrophoretische als auch der elektroosmotische Fluss auf die Kathode zu bewegt. Jedes Molekül, das durch die Kapillare fließt, braucht eine bestimmte Zeit, die von der Kapillarlänge, dem Kapillardurchmesser, den Moleküleigenschaften, dem pH- Wert und der angelegten Spannung abhängig ist. Daraus folgt, dass Moleküle mit unterschiedlichen Eigenschaften auch zu unterschiedlicher Zeit detektiert werden. Die Phosphatgruppe der DNA ist für ihre negative Ladung verantwortlich. Diese Negativität ist abhängig von der DNA- Fragmentgröße. Aus diesem Grund benötigen die DNA- Fragmente eine unterschiedlich Durchlaufzeit durch die Kapillare, was mittels Laser detektiert werden kann.

Folgende Materialien werden am **Sequencer** benötigt:

- Amplifizierte DNA-Fragmente
- SLS- Puffer
- Separationspuffer
- Längenstandards „Ceq DNA size standard kit 400 oder 600“
- Öl („Mineral oil“)
- Puffer- Platte
- Probenplatte
- Aqua ad iniectibila

Für die Fragmentlängenanalyse muss die aus der Touch down- PCR gewonnene DNA wie oben beschrieben mit 100 µl Aqua dest. verdünnt werden.

Der Ansatz für die „Sample plates“ des Sequencers enthält folgende Substanzen:

Reagenz	Menge
PCR- Produkt verdünnt mit 100 µl Aqua dest.	3 µl
0,3 µl Sizestandard verdünnt mit 35 µl Aqua dest.	30µl
Mineral-oil	1 µl

Tabelle 9: Für die Fragmentlängenanalyse benötigte Substanzen

3.3.6 Auswertung

Die Gelpräparation, Denaturierung, Datenerhebung und Datenauswertung mit der Version 9.0 der „CEQ 8800“- Software der Firma Beckman Coulter erfolgt vollautomatisch.

Die Bedingungen unter denen die Sequenzierung unter dem Programm Frag 50/ 50 abläuft sind folgende: Die Denaturierung erfolgt für 120 Sekunden bei 90°C, die Injektion für 30 Sekunden bei 2000 Volt, die Separation für 50 Minuten bei 6000 Volt und die Kapillartemperatur bei 50°C.

Als Resultat ist unten aufgeführte Graphik zu sehen, welche wie folgt zu verstehen ist.

Am Ende der Kapillare befindet sich ein Fenster durch das ein Laserlicht geschickt wird. Das Licht regt die Fluoreszenzfarbstoffe der DNA- Fragmente an, die dann ihrerseits Licht entsenden, das von einem Detektor aufgezeichnet wird. Als Ergebnis erhält man eine Grafik, deren x- Achse den Zeitverlauf dargestellt, umgerechnet in Fragmentlänge, da die Zeit, die ein Fragment benötigt um bis zu dem Sichtfenster der Kapillare zu gelangen umgekehrt proportional zur Fragmentlänge ist. Die y- Achse wird von der Intensität des emittierten Lichts der Fragmente gebildet. (siehe Abbildung 5)

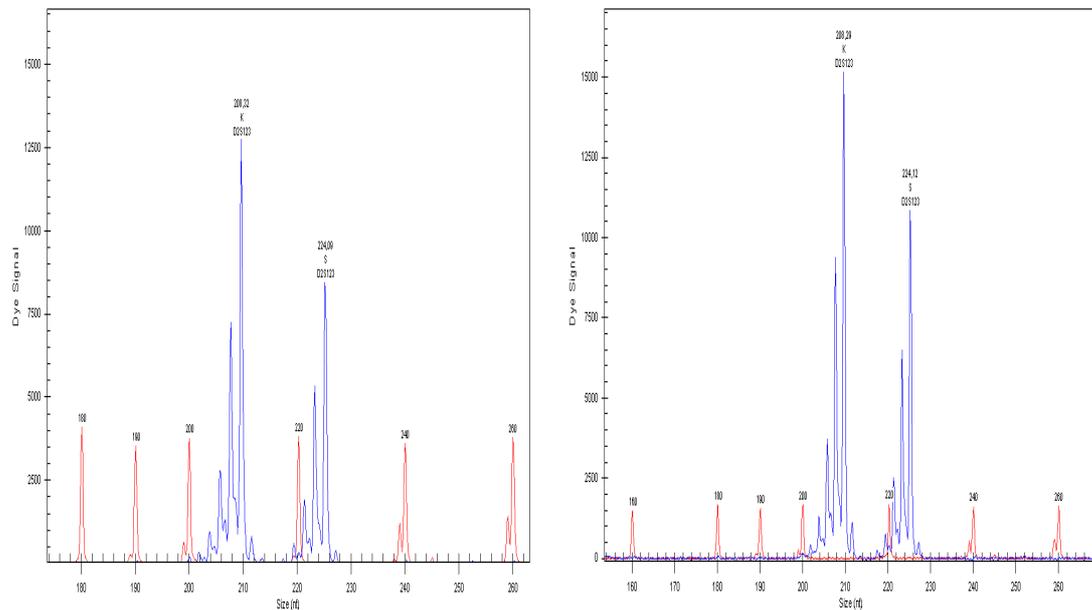


Abbildung 5: Heterozygote Schleimhautprobe. Untersuchung der Schleimhautprobe (links) und der Tumorprobe (rechts) mit der Nummer 163 anhand des Markers D2S123. Die mit „K“ und „S“ beschriebenen Peaks zeigen die beiden, verschieden langen Fragmente der Allele dieser Probe.

3.3.7 Kaplan- Meier- Analysen

Analysen über die Überlebenszeit des Tumorpatientenkollektivs werden anhand der Kaplan- Meier- Methode durchgeführt. Hierbei entsteht eine fallende Treppenfunktion, die den geschätzten Verlauf der Überlebenszeit der Tumorpatienten wiedergibt. Als Überlebenszeit wird die Zeit zwischen primärer Tumoroperation und tumorbedingtem Tod festgelegt. Durch die Teststatistik wird die Nullhypothese „die Überlebenszeitkurve der verschiedenen Kollektive unterscheiden sich nicht in ihrem Verlauf“ gegen die Alternativhypothese „die Überlebenszeitkurven der verschiedenen Kollektive unterscheiden sich in ihrem Verlauf“ geprüft. Das Tumorpatientenkollektiv wird in zwei Gruppen aufgeteilt. Eine Gruppe besteht aus den Patienten, deren Tumor- DNA einen Verlust der Heterozygotität aufweist. In der anderen Gruppe lässt sich kein Verlust der Heterozygotität nachweisen. Die Prüfung auf Signifikanz zwischen den

einzelnen Gruppen wird mit dem Log-rank-Test durchgeführt. Die Auswertung erfolgt als univariante Analyse.

Mit Hilfe der Kaplan-Meier-Kurven werden diese Ergebnisse graphisch abgebildet. Die Kaplan-Meier-Kurven beschreiben einen Beobachtungszeitraum für die Überlebenszeit der Subpopulationen von 60 bis 70 Monaten.

3.3.8 Korrelation mit den histopathologischen Daten

Die Korrelation der chromosomalen Verluste mit den klinischen und histopathologischen Daten wird anhand des Chi-Quadrat-Tests verdeutlicht. Ein p-Wert von $< 0,05$ wird als statistisch signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

Das Patientenkollektiv umfasst 165 Personen, die an einem kolorektalen Karzinom erkrankt sind. Anhand der Primer D2S123 und D5S346 wird die Tumor- DNA auf einen Verlust der Heterozygotität für die Mikrosatellitenloci 2p16.3 und 5q22.2 untersucht.

4.1 Etablierung der PCR- Methoden für die Marker D2S123 und D5S346 und deren Informationsgehalt

Um eine möglichst spezifische, reine und ausreichende Menge an amplifizierter DNA zu erhalten, müssen die PCR- Bedingungen optimiert werden. Dies wird durch Veränderung der DNA-Konzentration, der Konzentration der Primer, durch Variation der Anzahl der Zyklen und durch Veränderung der Annealing-Temperatur erreicht. Durch Verwendung einer Touch down- PCR kann die Spezifität der PCR- Reaktion nochmals erhöht werden.

Um die LOH- Analyse durchzuführen müssen beide Allele in heterozygotem Zustand vorliegen. Im Falle zweier homozygoter Allele sind diese nicht auswertbar, da sich die zwei Allele überlagern und folglich der Verlust der Heterozygotität nicht dargestellt werden kann. Der Primer D2S123 ist für 53 Allele (32%) homozygot, der Mikrosatellitenmarker D5S346 für 34 (20%). Auch nicht auswertbar ist der chromosomale Abschnitt der Region 2p16.3 in 13 Fällen auf Grund von Mikrosatelliteninstabilität, die Region 5q22.2 für den Marker D5S346 in nur 7 Fällen. Das entspricht jeweils 7% und 4%.

4.2 Analyse des Patientenkollektivs

An dieser Untersuchung beteiligten sich 46% weibliche und 54% männliche Patienten. Insgesamt können innerhalb des gesamten Patientenkollektivs in 39% der Fälle zumindest in einer der beiden chromosomalen Regionen 2p16.3 und 5q22.2 ein LOH nachgewiesen werden, das entspricht 65 Karzinomen. Ein LOH in der Region 2p16.3 findet sich in 20% der Fälle. Im Vergleich dazu tritt ein Verlust der Heterozygotität wesentlich häufiger im Bereich 5q22.2 auf, nämlich bei 50% der Kolonkarzinome (siehe Abbildung 6 und 7).

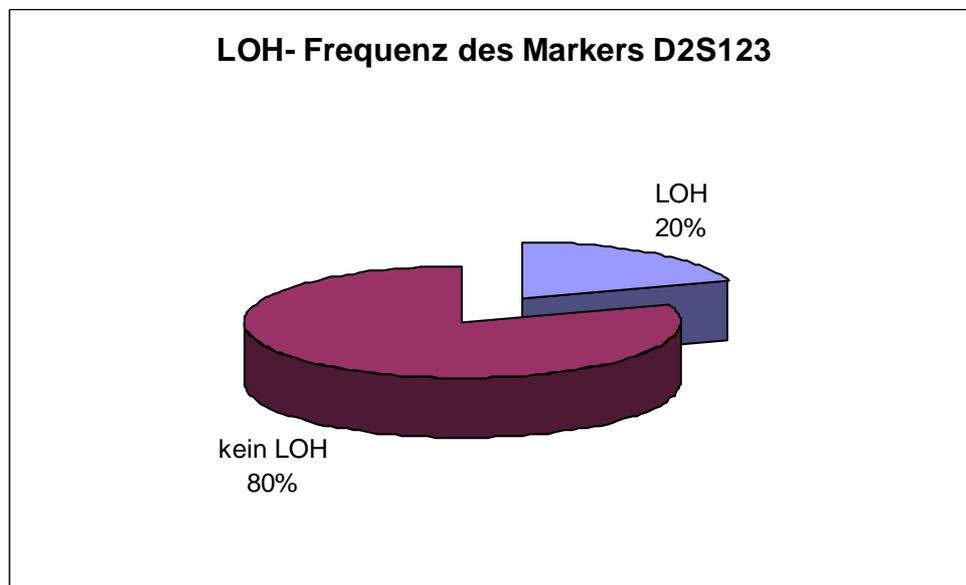


Abbildung 6: LOH- Frequenz des Markers D2S123

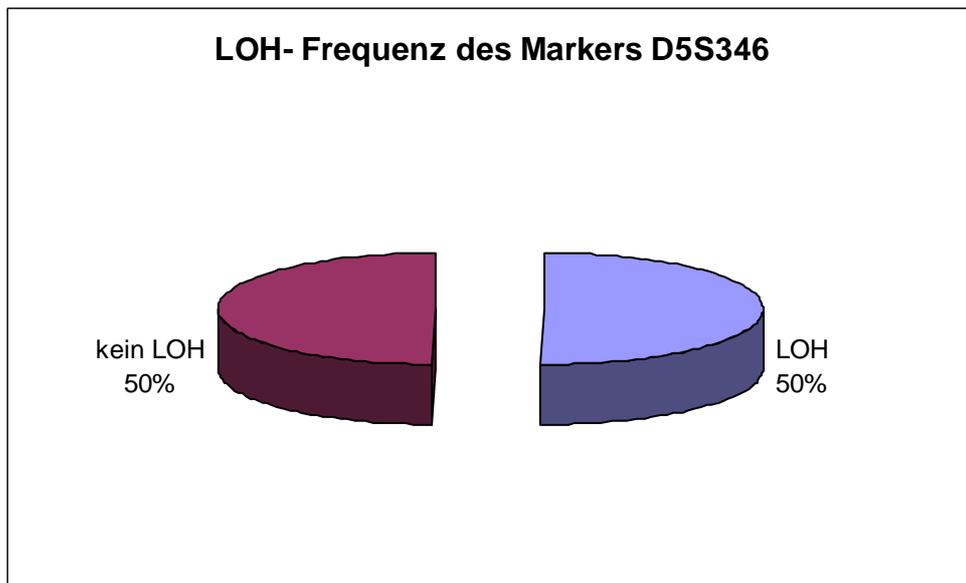


Abbildung 7: LOH- Frequenz des Markers D5S346

Insgesamt erwiesen sich 102 der 165 der vom Primer D2S123 flankierten Tumor- DNA- Abschnitte als informativ und damit auswertbar. Für den Mikrosatellitenmarker D5S346 kamen 125 Abschnitte in Frage.

	D2S123	D5S346
Informativ	102/165 (62%)	125/165 (76%)
LOH	20/102 (20%)	66/125 (50%)
MSI	13/165 (8%)	7/165 (4%)
Homozygote Marker	34/165 (21%)	53/165 (32%)

Tabelle 10: Unterscheidung der Marker D2S123 und D5S346 nach der Anzahl der informativen Marker, Vorkommen eines LOHs, einer Mikrosatelliteninstabilität (MSI) und der Anzahl an homozygoten Markern

4.3 Korrelation der Patientenprognose mit den klinischen Parametern mittels Kaplan- Meier-Analysen unter Berücksichtigung der Heterozygotität

4.3.1 Verlust der Heterozygotität in der Region 2p16.3

Der Verlust eines Allels in der Region 2p16.3 hat keinen signifikanten Einfluss auf die Patientenüberlebensrate ($p= 0,9244$). Die 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) lag bei Patienten mit LOH bei 60% und ohne LOH bei ca. 65%. Nur ca. 45% der Patienten mit einem Verlust der Heterozygotität lebte länger als 5 Jahre.

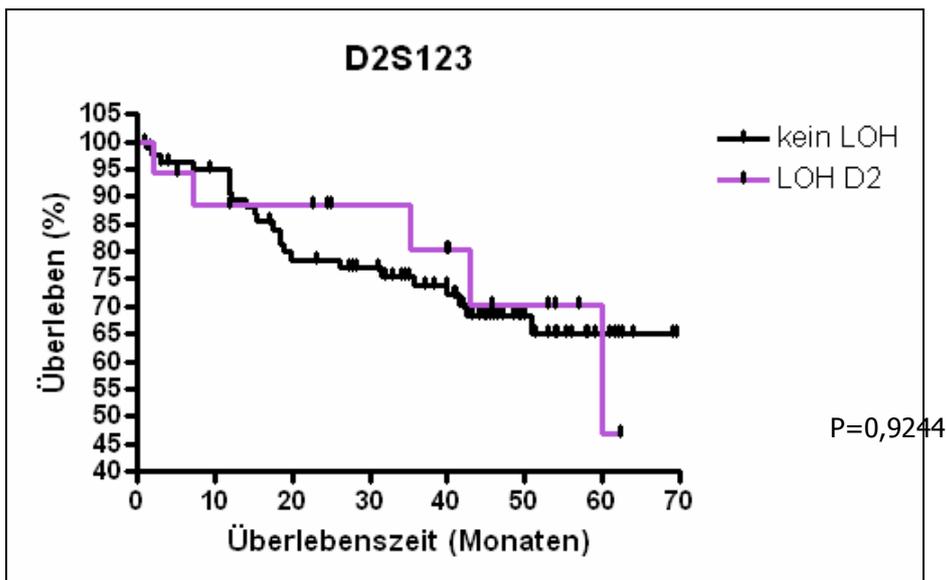


Abbildung 8: Kaplan- Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit eines LOH im Bereich 2p16.

Geschlecht und LOH in der Region 2p16.3

Bezogen auf das Geschlecht, hier das Kollektiv an Frauen, zeigt sich ein ganz anderes Bild. In dieser Untersuchung ist keine Frau, deren Kolonkarzinom im Bereich 2p16.3 einen Verlust der Heterozygotität aufweist in unserem Beobachtungszeitraum von ca. 5 Jahren gestorben. Es ergibt sich eine 100%ige Überlebensrate der Frauen mit LOH im Gegensatz zu dem Frauenanteil ohne einen chromosomalen Verlust. Hier liegt die 5- JÜR bei ungefähr 65%. Die Patientenüberlebensrate ist bei einem Verlust der Heterozygotität bedeutend besser als ohne diesen Verlust. Die Ergebnisse erweisen sich als nicht signifikant, da das Kollektiv an Frauen, die an einem Kolonkarzinom ohne LOH erkrankten zu klein ist.

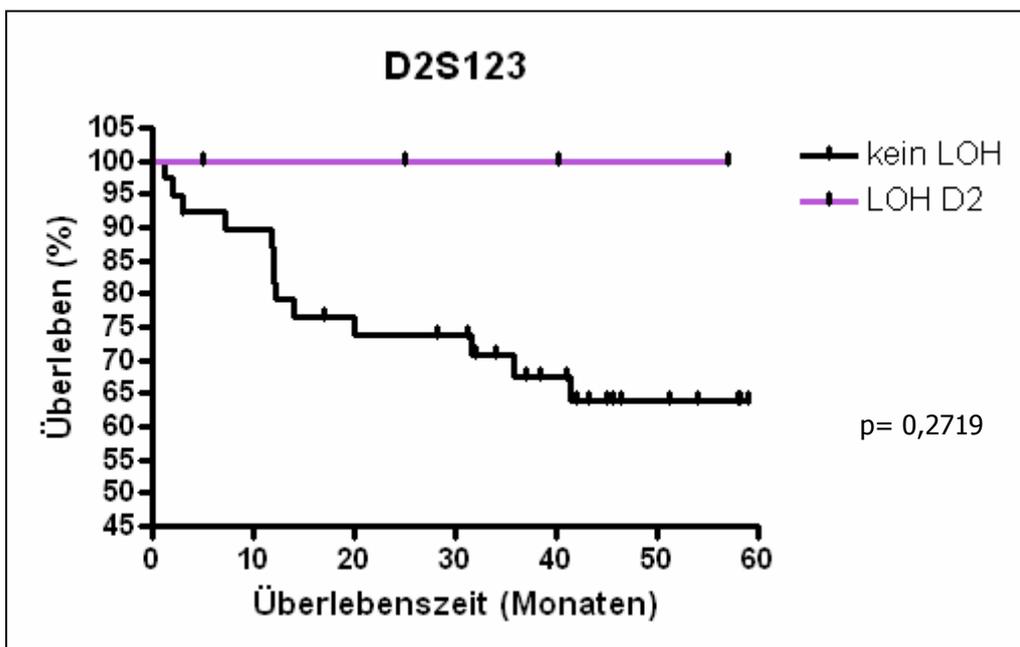


Abbildung 9: Kaplan- Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit eines LOH im Bereich 2p16.3 für Frauen

Bei **Männern** liegt die 5-JÜR unabhängig von einem Verlust der Heterozygotität zwischen 60 und 65% mit einem geringen Trend zu schlechterem Überleben bei einem LOH.

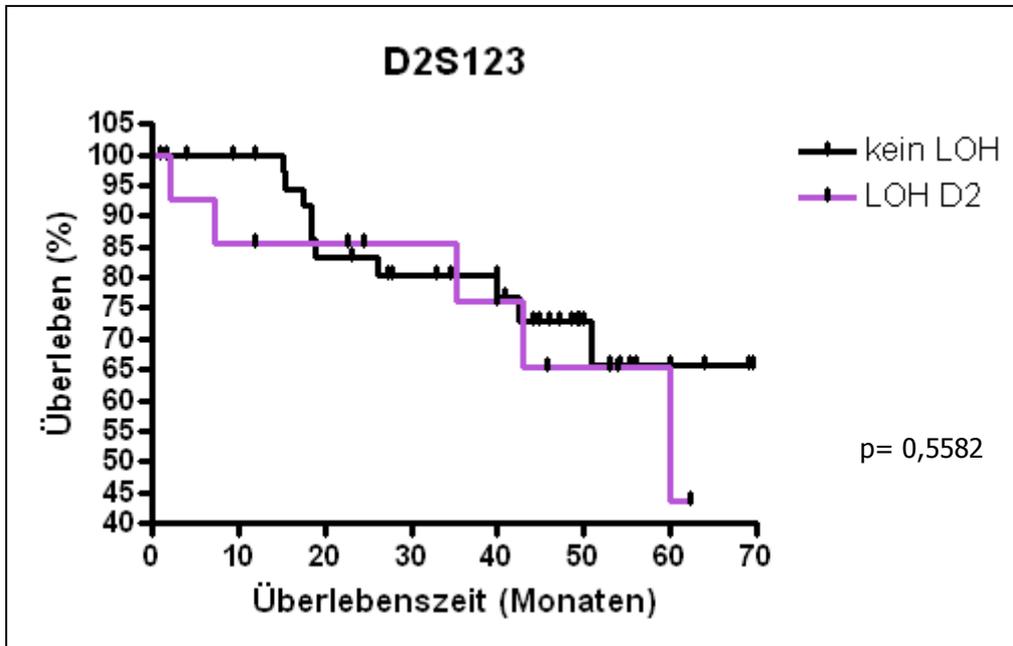


Abbildung 10: Kaplan- Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit eines LOH im Bereich 2p16.3 für Männer

Alter und LOH in der Region 2p16.3

Kommt ein LOH im Bereich der Region 2p16.3 bei mindestens 70 Jahre alten Patienten vor, so zeigt sich für einen Verlust der Heterozygotität eine deutlich bessere Prognose. Die durchschnittliche Überlebensrate von 70jährigen ohne einen Verlust der Heterozygotität befindet sich nach fünf Jahren im Bereich von ungefähr 65%, während bis zu diesem Zeitpunkt kein Patient mit einem LOH in dieser Region gestorben ist, was sich aber als nicht signifikant herausstellte ($p=0,2107$)

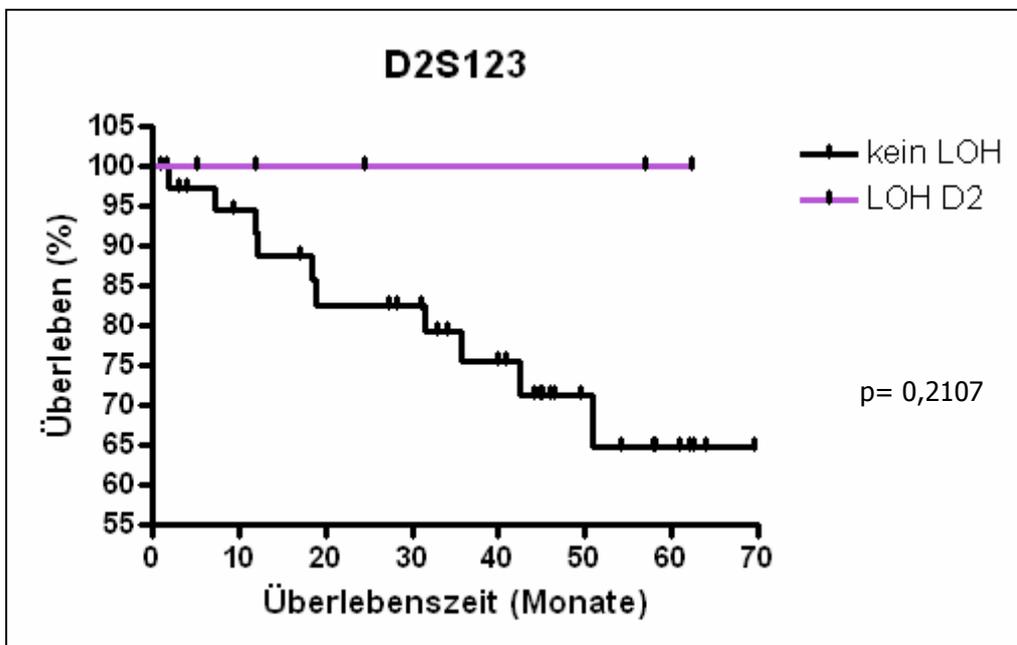


Abbildung 11: Kaplan- Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit eines LOH im Bereich 2p16.3 für Patienten mit mindestens 70 Jahren

4.3.2 Verlust der Heterozygotität in der Region 5q22.2

Für Patienten, die einen LOH in der untersuchten Region 5q22.2 aufweisen, zeigt sich insgesamt kein Trend zum schlechteren Überleben. Die 5-JÜR der Patienten ohne einen LOH liegt bei ca. 60%. Ein Verlust der Heterozygotität in dieser Region hat eine gering bessere Prognose. So zeigt die 5-JÜR einen Wert von ca. 65% an. Demnach hat der Verlust der Heterozygotität bei einem p-Wert von 0,8734 keinen signifikanten Einfluss auf die Patientenprognose.

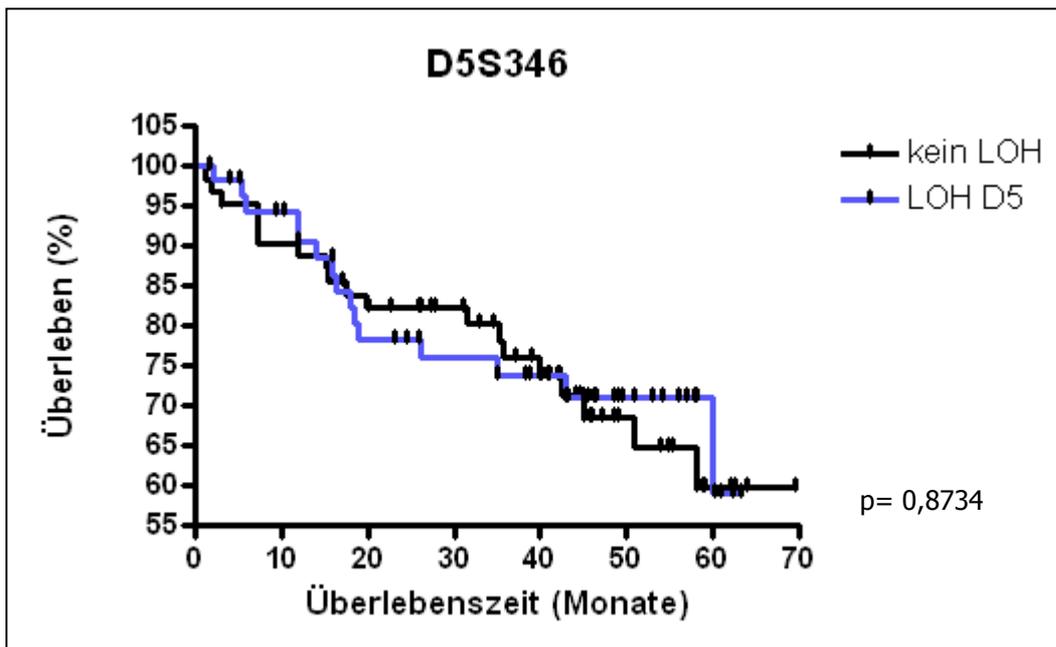


Abbildung 12: Kaplan- Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit eines LOH im Bereich 5q22.2

Geschlecht und LOH in der Region 5q22.2

Frauen weisen eine deutlich bessere Prognose bei einem chromosomalen Verlust in der Region 5q22.2 auf. Nach 5 Jahren waren lediglich 25% der Patienten verstorben. Im Gegensatz dazu verstarben über die Hälfte der Patienten mit einem kolorektalen Karzinom ohne LOH in dieser Region nach fünf Jahren. Das Ergebnis ist nicht signifikant.

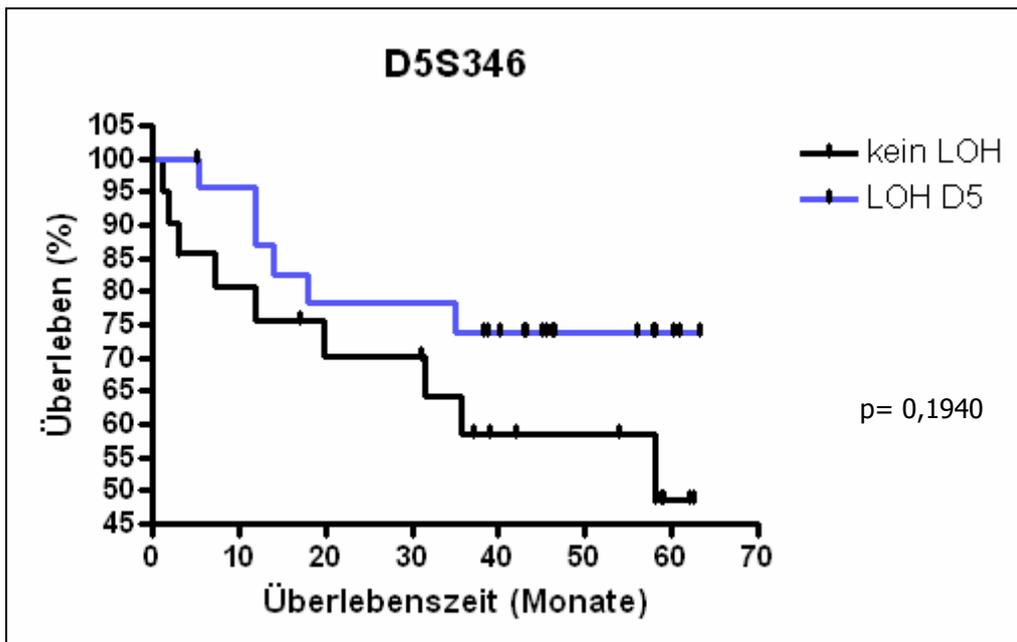


Abbildung 13: Kaplan- Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit eines LOH im Bereich 5q22.2 für Frauen

Bei **Männern** wiederum zeigen sich keine großen Unterschiede in der Überlebensprognose in Bezug auf einen Verlust der Heterozygotität. Die 5- JÜR liegt für beide Kollektive zwischen 60 und 75% mit einer gering besseren Prognose für Patienten ohne einen LOH in der Region 5q22.2.

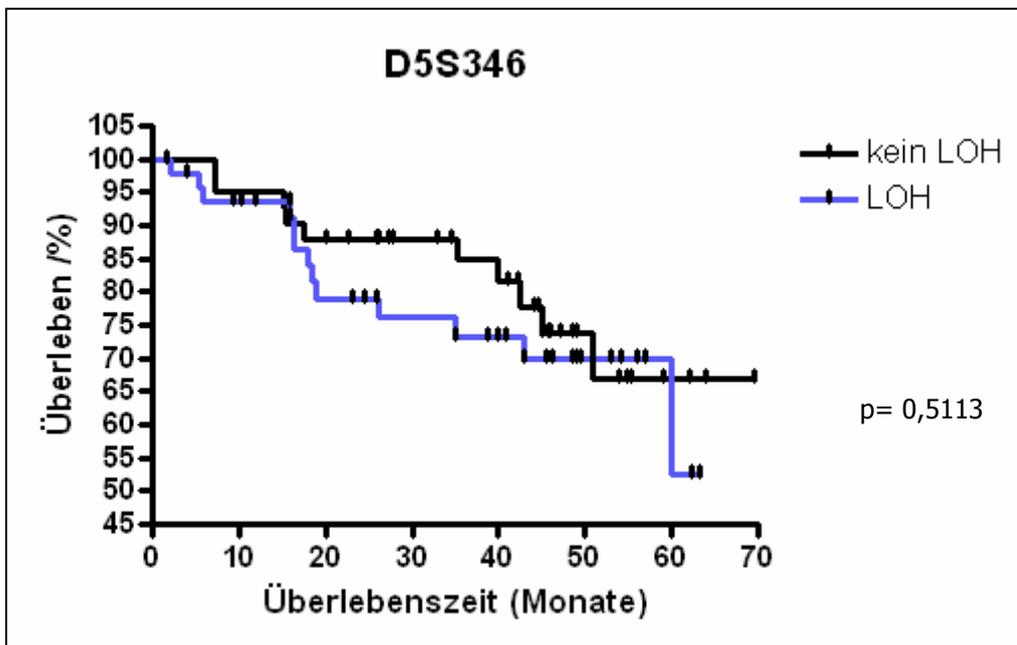


Abbildung 14: Kaplan- Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit eines LOH im Bereich 5q22.2 für Männer

Alter und LOH in der Region 5q22.2

Die 5-JÜR für mindestens 70jährige Patienten liegt bei einem LOH in der Region 5q22.2 bei 75% und ist damit höher als bei Karzinomen ohne chromosomalen Verlust (55%). Was sich aber mit $p=0,6211$ als nicht signifikant erwies.

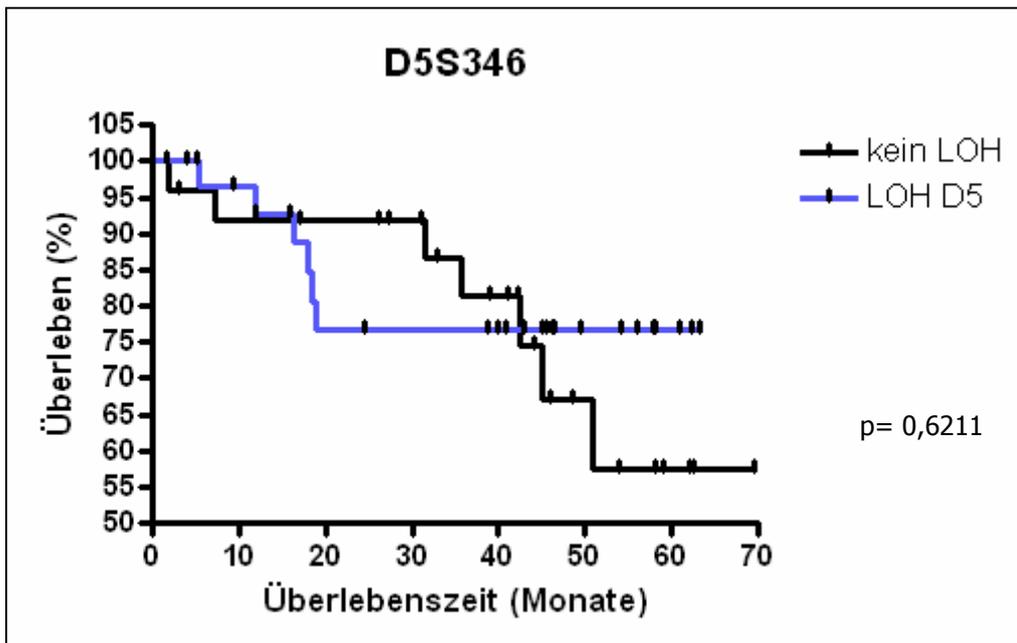


Abbildung 15: Kaplan- Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit eines LOH im Bereich 5q22.2 für Patienten mit mindestens 70 Jahren

4.3.3 Die chromosomale Region 2p16.3 und 5q22.2

Für Patienten, die einen LOH in beiden untersuchten chromosomalen Regionen aufweisen, ist in den ersten vier Jahren ein eindeutiger Trend zu einer besseren Überlebensprognose zu beobachten, wobei dieser aber nicht signifikant ist ($p=0,6375$). Die 5- JÜR gibt einen Wert zwischen 50 und 70% für einen doppelten LOH und einen Wert von 55% bei Tumor- DNA ohne Verlust der Heterozygotität an.

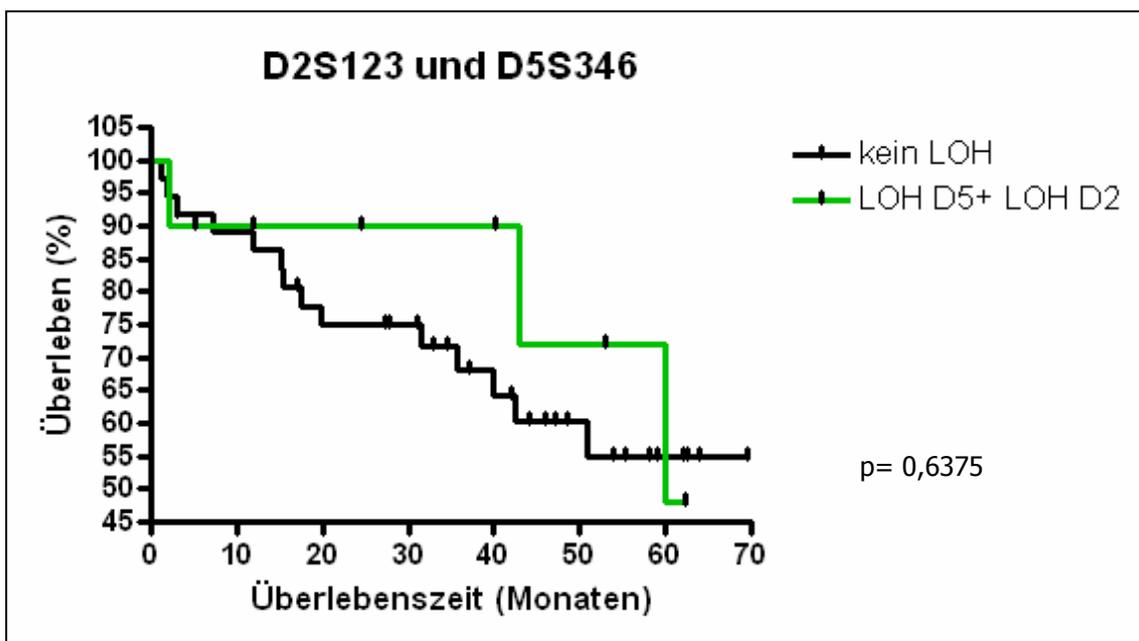


Abbildung 16: Kaplan- Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit eines doppelten LOH im Bereich 2p16.3 und 5q22.2

4.3.4 Bedeutung einer Mikrosatelliteninstabilität in der Region 2p16.3 und 5q22.2 für die Überlebenswahrscheinlichkeit

Region 2p16.3

Betrachtet man das Patientenkollektiv, dessen Tumor- DNA in der Region 2p16.3 eine Mikrosatelliteninstabilität (MSI) aufweist, so lässt sich feststellen, dass diese Population eine 5 JÜR von 100% besitzt. Es lässt sich eine signifikant bessere Überlebensprognose mit einem Wert von $p= 0,0266$ bei MSI feststellen. Die 5 JÜR bei Mikrosatelliteninstabilität beträgt ca. 60%.

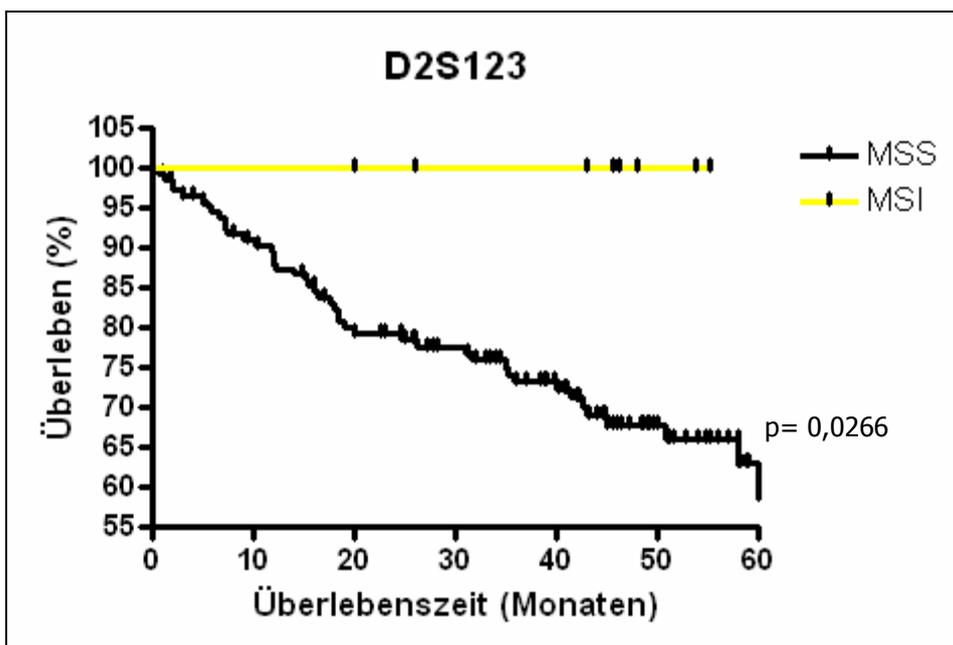


Abbildung 17: Kaplan- Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit einer MSI im Bereich 2p16.3

Region 5q22.2

Eine Mikrosatelliteninstabilität in der chromosomalen Region 5q22.2 hat keinen signifikanten Einfluss auf die Überlebensprognose. Es zeigt sich in den ersten vier Jahren ein Trend zu einer deutlich besseren Überlebenschance für Patienten in deren Tumor- DNA eine Mikrosatelliteninstabilität nachzuweisen ist. Nach 5 Jahren zeigen beide Kollektive, d.h. mit Mikrosatelliteninstabilität und mit Mikrosatellitenstabilität eine Überlebenswahrscheinlichkeit von ca. 65%.

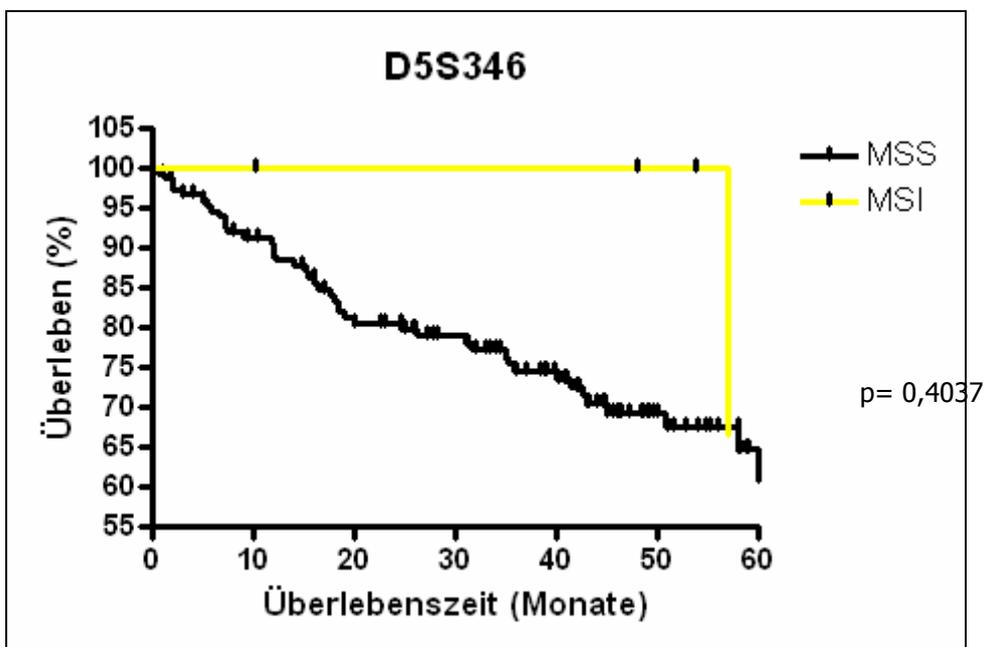


Abbildung 18: Kaplan- Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit einer MSI im Bereich 5q22.2

4.4 Korrelation des chromosomalen Verlusts mit den histologischen Patientendaten anhand des Chi-Quadrat- Tests

Die Daten für den allelischen Verlust beider Regionen wird mit den histopathologischen Daten der Patienten verglichen und mittels des Chi-Quadrat- Tests korreliert.

4.4.1 Die chromosomale Region 2p16.3

UICC- Stadien und LOH in der Region 2p16.3

Der Primer D2S123 detektiert in der Region 2p16.3 18 LOH positive Tumoren. Zwei (11,1%) dieser 18 LOH- positiven Tumoren befinden sich im UICC- Stadium I, acht (72,7%) im Stadium II, fünf (27,8%) im Stadium III und drei (16,7%) im Stadium IV. Eine statistische Signifikanz besteht insofern, als dass es keinen Unterschied macht, ob ein LOH in dieser Region vorliegt oder nicht. Es kommt auch zu keiner Häufung eines LOHs in einem bestimmten Stadium.

D2S123	Anzahl n= 94	LOH 19,1% (n= 18)	Kein LOH 80,9% (n= 76)	p
UICC-Stadium				
Stadium I	13, 8% (n= 13)	11,1% (n= 2)	14,5% (n= 11)	0,9635
Stadium II	41,5% (n= 39)	72,7% (n= 8)	40,8% (n= 31)	
Stadium III	25,5% (n= 24)	27,8% (n= 5)	15,0% (n= 19)	
Stadium IV	19,1% (n= 18)	16,7% (n= 3)	19,7%(n= 15)	

Tabelle 11: Korrelation der LOH positiven und LOH negativen Tumoren mit dem UICC- Stadium der Karzinome

Differenzierungsgrading und LOH in der Region 2p16.3

Bezogen auf den Differenzierungsgrad zeigen sich keine wesentlichen signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne LOH.

D2S123	Anzahl (n= 93)	LOH 19,4% (n= 18)	Kein LOH 80,6% (n= 75)	p
Differenzierungsgrad				
G 2	83,9% (n= 78)	88,9% (n= 16)	82,7% (n= 62)	0,5192
G 3	16,1% (n= 15)	11,1% (n= 2)	17,3% (n= 13)	

Tabelle 12: Korrelation der LOH positiven und LOH negativen Tumoren mit dem Grad der Differenzierung

4.4.2 Die chromosomale Region 5q22.2

UICC- Stadium und LOH in der Region 5q22.2

Unterscheidet man die Patientenkollektive der LOH- positiven (49,5%) und LOH- negativen (50,5%) Fälle der Region 5q22.2 nach dem UICC- Stadium so ergibt sich für keine der Stadien ein signifikante Häufung eines Verlustes der Heterozygotität in dieser Region.

D5S346	Anzahl n= 110	LOH 46,3% (n= 51)	Kein LOH 53,7% (n= 59)	p
UICC-Stadium				
Stadium I	15,4% (n= 17)	13,7% (n= 7)	16,9% (n= 10)	0,4227
Stadium II	33,6% (n= 37)	41,2% (n=21)	27,1% (n= 16)	
Stadium III	29,1% (n= 32)	23,5% (n= 12)	33,9% (n= 20)	
Stadium IV	21,8% (n= 24)	21,6% (n=11)	22,1%(n= 13)	

Tabelle 13: Korrelation der LOH positiven und LOH negativen Tumoren mit dem UICC- Stadium der Karzinome

Differenzierungsgrading und LOH in der Region 5q22.2

Etwas mehr Patienten, die in Differenzierungsgrad 2 eingeteilt werden, zeigen einen chromosomalen Verlust der Region 5q22.2 verglichen mit Differenzierungsgrad 3. Hier entwickeln eine Minderheit der Patienten einen LOH in dieser Region. Das Ergebnis ist nicht signifikant.

D5S346	Anzahl (n= 107)	LOH 46,7% (n= 50)	Kein LOH 53,3% (n= 57)	p
Differenzierungsgrad				
G 2	77,6% (n= 83)	82,0% (n= 41)	73,7% (n= 42)	0,3035
G 3	22,4% (n= 24)	18,0% (n= 9)	26,3% (n= 15)	

Tabelle 14: Korrelation der LOH positiven und LOH negativen Tumoren mit dem Differenzierungsgrad

4.4.3 Die chromosomale Region 2p16.3 und 5q22.2

Bezogen auf einen doppelten Verlust der Heterozygotität in den Regionen 5q22.2 u 2p16.3 kommt man zu keinem signifikanten Ergebnis. Es besteht keine signifikante Häufung eines LOHs bezogen auf ein spezifisches Stadium.

D2S123 D5S346	Anzahl n= 41	LOH 19,5% (n= 8)	Kein LOH 80,5% (n= 3)	p
UICC-Stadium				
Stadium I	9, 7% (n= 4)	0,0% (n= 0)	12,1% (n= 4)	0,3421
Stadium II	36,6% (n= 15)	62,5% (n= 5)	30,3% (n= 10)	
Stadium III	31,7% (n= 13)	25,0% (n= 2)	33,3% (n= 11)	
Stadium IV	22,0% (n= 9)	12,5% (n= 1)	24,3%(n= 8)	

Tabelle 15: Korrelation der LOH positiven und LOH negativen Tumoren mit dem UICC- Stadium der Karzinome

4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden die chromosomalen Verluste der Regionen 2p16.3 und 5q22.2 mittels zweier Mikrosatellitenmarker D2S123 und D5S346 nachgewiesen und mit den klinischen und histologischen Patientendaten verglichen. Ein LOH in der Region 2p16.3 erbrachte eine geringfügig schlechtere Patientenprognose. Die 5-JÜR liegt bei ca. 60% verglichen mit einer Überlebensrate von 65% bei Patienten mit Tumoren ohne allelische Verluste. Dieser Trend erwies sich als nicht signifikant ($p=0,9244$). Interessanterweise ist keine Frau mit einem LOH der Region 2p16.3 in dem Beobachtungszeitraum von fünf Jahren gestorben. Da es sich dabei aber nur um 6 Frauen handelt und das Ergebnis nicht signifikant war, können folglich daraus keine Schlussfolgerungen gezogen werden. Das Kollektiv an Männern zeigt keinen Unterschied in der Prognose bezüglich eines LOHs.

Auch ein LOH der Region 5q22.2 hat keinen signifikanten Einfluss auf die Patientenprognose. Betrachtet man für diese Region das Alter und das Geschlecht der Patienten, so lässt sich für die über 70jährigen und bei Frauen ein nicht signifikanter Trend zu einer besseren Prognose bei einem LOH der Region 5q22.2 feststellen.

Für beide untersuchten Regionen ist eine Mikrosatelliteninstabilität mit einer besseren Überlebensprognose verbunden, welche sich für die Region 2p16.3 als signifikant herausstellt ($p= 0,0266$). Zwischen dem Differenzierungsgrad und einem Verlust der Heterozygotität der Region 2p16.3 und 5q22.2 lässt sich kein Zusammenhang feststellen. Betrachtet man die verschiedenen Tumorstadien bezüglich eines LOHs in der Region 2p16.3 so lässt sich sagen, dass es zu keiner Häufung eines Verlustes der Heterozygotität in den verschiedenen Stadien kommt. Dieses Ergebnis ist nicht als signifikant zu betrachten ($p= 0,9635$).

5 Diskussion

5.1 Kandidatengene in der chromosomalen Region 2p16.3

Aus dem Patientenkollektiv konnte in 20% der Tumor- DNA ein Verlust der Heterozygotität mit dem Marker D2S123 nachgewiesen werden. Der Marker ist wie in Abbildung 19 zu sehen im chromosomalen Bereich 2p16.3 lokalisiert (chr2:51200029-51200308).

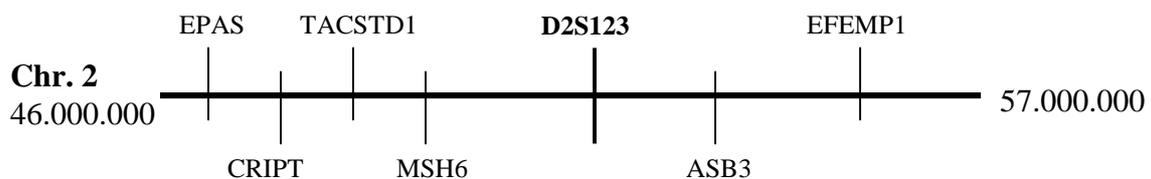


Abbildung 19: Lokalisation des Markers D2S123 auf 2p16.3

In der Region 2p16.3 ist bisher kein für die Kolonkarzinogenese signifikantes Tumorsuppressorgen bekannt. In Abbildung 20 ist die Umgebung des Markers und mögliche Kandidatengene abgebildet. Das Genprodukt des Gens EPAS-1 ist ursächlich an der Entstehung der VEGF- vermittelten Angiogenese infolge einer Gewebshypoxie beteiligt. Die Größenzunahme des Tumors auf 1-2 mm wird unter anderem erst durch EPAS-1 möglich. Bangoura und seine Mitarbeiter konnten 2004 beweisen, dass es bei hepatozellulären Karzinomen zu einer Überexpression dieses Gens vor allem bei den Tumoren kommt, die bereits die Tumorkapsel oder die V. portae infiltriert haben. Ein Verlust der Expression von TACSTD 1 (tumor- associated calcium signal transducer1 oder Ep-CAM) konnte bei Patienten mit Magenkarzinom mit einer signifikanten Prognoseverschlechterung assoziiert werden (Songun et al., 2005). Bei Kolonkarzinomen wurde dies noch nicht untersucht. In der Tumorgenese des Magenkarzinoms spielen neben den Genen wie ras und myc auch das CRIPT- Gen eine bedeutende Rolle, welches sich in der zu untersuchenden Region um den Marker D2S123 befindet. Untersuchungen am Kolonkarzinom stehen für dieses Gen noch aus (Kikuchi et al. 1999).

Pinto und Mitarbeiter schlugen in einem 2006 veröffentlichten Artikel die Mitbeteiligung des mutierten MSH6- Gens an der Entstehung von frühen

kolorektalen Karzinomen vor (Pinto et al., 2006). Das Genprodukt von ASB3 vermittelt die Ubiquitierung und damit die Degradation von Tumor Necrosis Faktor Rezeptor II (TNFR2) (Chung et al., 2005). Es konnte gezeigt werden, dass das in Tumoren heraufregulierte TNFR2 eine Rolle bei der Karzinogenese und Metastasierung spielen könnte (Carpentier et al., 2004). ASB3 ist damit ein interessanter Gegenspieler zu TNF2 und von eventueller Bedeutung für die Tumorprogression. Gallagher und seine Mitarbeiter diskutierten die Rolle der Fibuline bei der Krebsentstehung. Im Gegensatz zu Fibulin- 1, -4 und -5 konnte eine Bedeutung von Fibulin- 3, auch EFEMP1 genannt auf die Krebsentstehung bisher nicht geklärt werden. Die Hinweise auf eine komplexe Rolle im Rahmen der Karzinogenese häufen sich jedoch.



Position des EPAS- Gens auf Chromosom 2:	46.436.214- 46.525.485
Position des CRIPT- Gens auf Chromosom 2:	46.755.959- 46.763.834
Position des TACSTD1 - Gens auf Chromosom 2:	47.508.118- 47.525.808
Position des MSH6- Gens auf Chromosom 2:	47.921.937- 47.945.743
Position des Markers D2S123 auf Chromosom 2:	51.200.029
Position des ASB3 - Gens auf Chromosom 2:	53.808.769- 53.925.730
Position des EFEMP1- Gens auf Chromosom 2:	56.004.749- 56.060.856

Abbildung 20: Umgebung des Markers D2S123 auf dem Chromosom 2p und mögliche Kandidatengene und ihre Lokalisation

5.2 Prognostische Relevanz eines Verlusts in der Region 2p16.3

Nach Ausschluss der nicht auswertbaren Tumor-Schleimhautpaare der Region um den Mikrosatellitenmarker D2S123 können 102 Proben weiter analysiert werden. Ein LOH wird bei 20% nachgewiesen und ist nicht mit einer signifikant schlechteren oder besseren Patientenprognose verknüpft. Dies steht im Widerspruch zu der von Bisgaard et al. 2001 verfassten Veröffentlichung über den Verlust der Heterozygotie in der Region 2p21-16.3 als unabhängigen Indikator für eine verringerte Patientenüberlebenszeit (Signifikanz von 0,0003). Bisgaard und Mitarbeiter führten eine Untersuchung an 67 Tumoren durch und kamen zu einer signifikanten Abnahme der 5-JÜR von 35% bei Auftreten eines Verlustes der Heterozygotie im Marker D2S123. Nach fünf Jahren lebten nur noch 15% der Patienten, die an einem kolorektalen Karzinom mit einem chromosomalen Verlust in dieser Region erkrankten. Patienten in deren Tumor-DNA sich kein LOH zeigte, überlebten zu 53%. In unserem Kollektiv lag die 5-Jahres-Überlebensrate bei Patienten mit und ohne LOH zwischen 60% und 65%. Im Vergleich zu Bisgaard et al. war unser Patientenkollektiv größer (n=102 versus n=67). Ob in einem noch größeren Patientenkollektiv ein signifikanter Einfluss eines LOH im Bereich des Marker D2S123 wieder nachweisbar wäre, müsste in weiteren Studien untersucht werden. Seit der Veröffentlichung von Bisgaard et al., 2001 gab es keine weiteren Berichte mehr zu einer prognostischen Signifikanz des Markers D2S123.

5.3 Kandidatengene in der chromosomalen Region 5q22.2

In 50% der Fälle ist für den Marker D5S346 ein Verlust der Heterozygotität in der Region 5q22.2 nachzuweisen. Der Marker D5S346 ist wie in Abbildung 21 aufgeführt im chromosomalen Bereich 5q22.2 (chr5:112.141.523-112.341.647) lokalisiert und umspannt 200.125 Basenpaare. Das APC- Tumorsuppressorgen liegt nur 31.689 Basenpaare entfernt und ist damit bei einer Deletion des Markers D5S346 mit hoher Wahrscheinlichkeit inaktiviert.



Abbildung 21: Position des Markers D5S346 auf dem Chromosom 5q22.2

5.4 Prognostische Relevanz eines Verlusts in der Region 5q22.2

Von den 125 analysierbaren Tumoren weisen 50% einen allelischen Verlust in der untersuchten Region 5q22.2 auf. Die 5- JÜR der Patienten mit einem Verlust der Heterozygotität liegt bei ca. 65% im Vergleich zu einer durchschnittlichen Überlebenswahrscheinlichkeit ohne LOH bei knapp unter 60%. Für Patienten, die keinen LOH in der untersuchten Region 5q22.2 aufweisen, zeigt sich ein Trend zum schlechteren Überleben, der allerdings nicht signifikant ist ($p= 0,8734$).

Gerdes und Mitarbeiter untersuchten 1994 63 kolorektale Tumoren in Bezug auf Verluste der Chromosomenabschnitte 1p, 5q, 17p, 18q. Trat bei den Chromosomen 1p und 17p ein Verlust der Heterozygotität auf, so war dies signifikant mit einer schlechteren Überlebensrate verbunden. Für einen LOH auf dem Chromosom 5q22.2 konnte dies nicht belegt werden. Zu dem gleichen Ergebnis kam auch Bisgaard et al. Im Jahre 2001. De Filippo et al. (2002) korrelierten einen Verlust der Heterozygotität mit klinischen und histopathologischen Parametern, wie Alter, Geschlecht, Tumorlokalisation und

histologische Differenzierung und konnten für einen LOH auf Chromosom 5 ebenfalls keine signifikante Beziehung zur Überlebensrate aufdecken. Nur wenige Forschungsgruppen konnten einen signifikanten Effekt eines LOH der Region 5q22.2 zeigen. So zeigte Gruppe um Kazama im Jahr 2006 den Zusammenhang eines Verlustes der Heterozygotie in der Region 2p, 5q, 17p und 18q bei muzinösen kolorektalen Karzinomen mit einem gehäuften Vorkommen von Lymphknotenmetastasen und einem fortgeschrittenen Stadium.

5.5 Prognostische Relevanz einer Mikrosatelliteninstabilität

Eine Mikrosatelliteninstabilität wird durch den Defekt bestimmter DNA-Reparaturenzyme verursacht (z.B. hMLH1, hMSH2). Bei der DNA-Replikation durch die DNA-Polymerase entstehen Fehler, und zwar am häufigsten in Regionen mit repetitiven Sequenzen, den Mikrosatelliten. Können diese Fehler nicht mehr korrigiert werden, kommt es zu einer Akkumulation von Fehlern in diesen Bereichen, die zu einer Verlängerung oder Verkürzung der betroffenen Mikrosatelliten führen kann. Dies wird als Mikrosatelliteninstabilität bezeichnet. Bei einem Vergleich zwischen Normalgewebe und Tumor zeigen sich meist komplex alterierte Bandenstrukturen bei den mikrosatelliteninstabilen Tumoren. Ein quantitativer Vergleich der Bandenintensitäten zwischen Normalschleimhaut und Tumorgewebe, wie für die LOH-Analyse notwendig, ist bei mikrosatelliteninstabilen Tumoren nicht möglich, so dass diese Tumore identifiziert und von der weiteren LOH-Analytik ausgeschlossen werden müssen. Dies wurde in dieser Arbeit durchgeführt und zusätzlich eine Analyse des prognostischen Einflusses einer Mikrosatelliteninstabilität durchgeführt. Dabei zeigte sich ein signifikant besseres Überleben bei Patienten mit einer Mikrosatelliteninstabilität im Bereich des Markers D2S123 und ein (nicht

signifikanter) Trend zur besseren Prognose bei einer Mikrosatelliteninstabilität im Bereich des Markers D5S346.

Von den meisten Autoren konnte für die Mikrosatelliteninstabilität entweder ebenfalls ein Trend (Lothe et al., 1993; Pietra et al., 1998; Johannsdottir et al., 1999) oder meistens sogar eine signifikante Assoziation (Thibodeau et al., 1993; Halling et al., 1999; Sankila et al., 1996; González-García et al., 2000; Hemminki et al., 2000; Sinicrope et al., 2006) mit einer besseren Prognose gezeigt werden. Neuere Arbeiten haben gezeigt, dass MSS- und MSI-Tumore unterschiedlich auf eine Chemotherapie ansprechen. So konnte gezeigt werden, dass MSI-Tumore schlechter auf eine 5-FU basierte Chemotherapie ansprechen (Warusavitarne and Schnitzler, 2007). Trotzdem wird in den ASCO-Empfehlungen von 2006 "Update of Recommendations for the Use of Tumor Markers in Gastrointestinal Cancer" die Analyse der Mikrosatelliteninstabilität noch nicht für die Routinediagnostik empfohlen (Locker et al., 2006). Insbesondere die erheblichen Auswirkungen auf eine adjuvante Chemotherapie wird zu einer Überprüfung dieser Empfehlung führen müssen.

5.6 Erweiterte Adenom- Karzinom- Sequenz unter Berücksichtigung der chromosomalen Regionen 2p16.3 und 5q22.2

Im Jahr 2002 forderte die Arbeitsgruppe um Smith eine Erweiterung des von Vogelstein geprägten Modells der Adenom- Karzinom- Sequenz. In ihren Untersuchungen konnte nur in sieben von 106 Tumoren Mutationen in allen drei Genen (APC, k- ras und p53) gefunden werden. Deshalb postulierten sie alternative Wege der Tumorgenese. Durch eine größere Anzahl an polymorphen Markern wurden die Regionen 1p32-36, 2p21-16, 3p23, 4p14-16, 8p21-22, 11q22-23, 14q32 und 22q13 ebenfalls als häufig deletierte Regionen in kolorektalen Adenomen/ Karzinomen identifiziert (Praml et al., 1995; Bisgaard

et al., 2001; Iniesta et al., 2000; Arribas et al., 1999; Gutafson et al., 1996; Tomlinson und Bodmer, 1996; Young et al., 1993; Yana et al., 1995). Der Verlust der Regionen 8p, 14q32 und 22q wird eher bei fortgeschrittenen Karzinomen, der Verlust von 11q22-q32 bei Karzinomen in früheren Stadien und der Verlust von 1p35 bereits bei Adenomen beobachtet (Cunningham et al. 1994; Young et al., 1993; Lee et al., 2000; Lothe et al., 1995). Es scheinen somit erheblich mehr Tumorsuppressorgene zu existieren als in der Adenom-Karzinom-Sequenz zunächst dargestellt wurde.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die chromosomalen Regionen 2p21-16 und 5q22.2 bei kolorektalen Karzinomen häufig deletiert sind (20%, bzw. 50%). Obwohl kein Einfluss auf die Patientenprognose gezeigt werden konnte, ist eine Relevanz für die Kolonkarzinogenese wahrscheinlich. Im Bereich von 5q22.2 liegt das APC- Tumorsuppressorgen. Im Bereich von 2p21-16 wurde bisher noch kein Tumorsuppressorgen identifiziert. Eine Existenz eines solchen Gens ist jedoch aufgrund der häufigen Deletionen wahrscheinlich und sollte in weiteren Studien untersucht werden.

5.7 Probleme der LOH- Analyse

LOH- Analysen von verschiedenen chromosomalen Regionen bildeten in den letzten Jahrzehnten ein wichtiges Forschungsgebiet in der Krebsforschung. Um aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen, ist ein großes Kollektiv an Tumoren notwendig, um die spezifischen Veränderungen aus dem allgemeinen Hintergrund herauszufiltern. Zur Minimierung der nicht informativen Resultate werden hoch polymorphe Mikrosatellitenmarker verwendet. Durch die häufige Kontamination des Tumorgewebes mit Normalschleimhaut und Nicht-Tumorzellen und Problemen in der Ergebnisinterpretation treten zusätzliche Schwierigkeiten auf.

5.7.1 Kontamination mit Normalschleimhaut

Ein grundlegendes Problem der Diagnostik mit molekularen Markern ist die Kontamination der Tumorproben mit Normalgewebe, bzw. Nicht-Tumorzellen. Aus diesem Grund ist die Ergebnisanalyse erschwert. Bei einem „Verlust der Heterzygotität“ sollte im Vergleich zur Normalschleimhaut ein Allel komplett erhalten und das andere Allel komplett verschwunden sein. Wegen der „Kontaminationsproblematik“ ist dies jedoch fast nie der Fall. Generell wird von den Pathologen, die das Gewebe zur Verfügung stellen ein mindestens 50%iger Tumoranteil gefordert. Besser noch ist die Mikrodissektion mit weit höheren Tumoranteilen, die jedoch aus logistischen Gründen nicht immer möglich ist. Auch in dieser Arbeit wurde Tumormaterial benutzt, das mindestens 50% Tumorzellen enthalten sollte. Aus diesem Grund würde theoretisch eine 50%ige Reduktion des Signals im Vergleich zur Normalschleimhaut einem LOH entsprechen. Da es allerdings Signalabweichungen geben kann und auch geringere Tumorzellanteile in Ausnahmefällen möglich sein können, wurde in dieser Arbeit ein LOH definiert als eine Signalreduktion eines Allels von mindestens 30% („Cut- off Wert“). Es existiert ein deutlicher Einfluss der Wahl des Cut- off Wertes auf die mögliche prognostische Bedeutung des Markers (siehe Abbildung 22/23), ein signifikanter Einfluss eines LOH D2S123 oder D5S346 konnte allerdings bei keinem untersuchten Cut- off Wert festgestellt werden.

Für die Region 2p21-16 auf dem kurzen Arm der Chromosom 2 lässt sich bei einem Cut- off Wert von 20% und 30% ein nicht signifikanter Trend zu einer schlechteren Überlebensprognose bei Verlust der Heterozygotität feststellen. Bei einem Cut- off Wert von 50% besteht ein nicht signifikanter Trend zu einer besseren Prognose beim Vorliegen eines LOH.

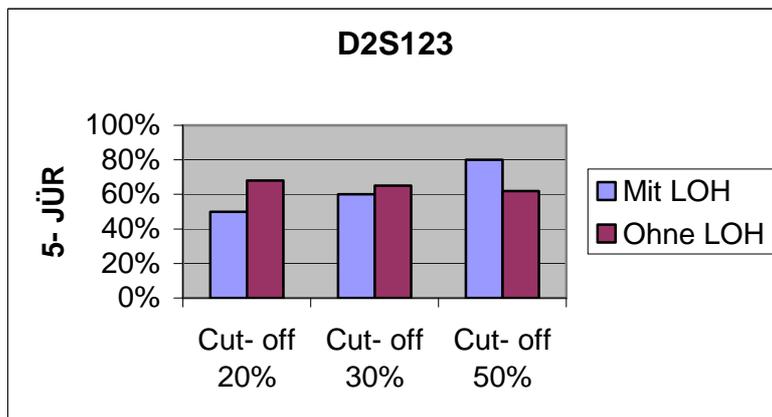


Abbildung 22: Die 5- JÜR in Abhängigkeit des Cut- off- Wertes unter Berücksichtigung eines LOH in der Region 2p16.3 (Marker D2S123)

Für die Region 5q22.2 auf dem langen Arm der Chromosom 5 lässt sich sowohl bei einem Cut- Off- Wert von 20% als auch 30% und 50% ein nicht signifikanter Trend zu einer besseren Überlebensprognose bei Verlust der Heterozygotität feststellen.

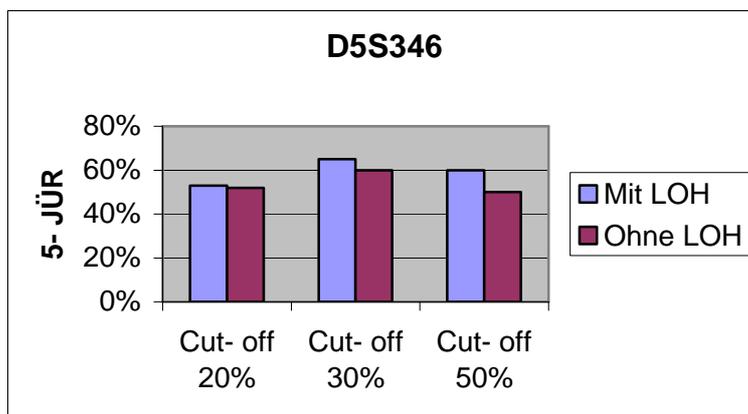


Abbildung 23: Die 5- JÜR in Abhängigkeit des Cut- off- Wertes unter Berücksichtigung eines LOH in der Region 5q22.2

5.7.2 Stotterbanden und Summationspotential

Durch vorzeitige Replikationsabbrüche der *Taq*Polymerase kann es zur Produktion von Fragmenten kommen, welche im Produkt weniger Repeats aufweisen. Diese unspezifischen Fragmente werden als Stotterbanden bezeichnet und stellen sich als kürzere Fragmente in der Gelanalyse dar. Unterscheiden sich die beiden Allele in ihren Repeatlängen nur geringfügig, ist es somit denkbar, dass es zu einem Summationsaffekt einer Stotterbande des größeren Allels mit dem Fragment des kürzeren Allels kommt und sich dadurch ein höherer Intensitätsspeak des eigentlich kürzeren Allels entwickelt (siehe Abbildung 24).

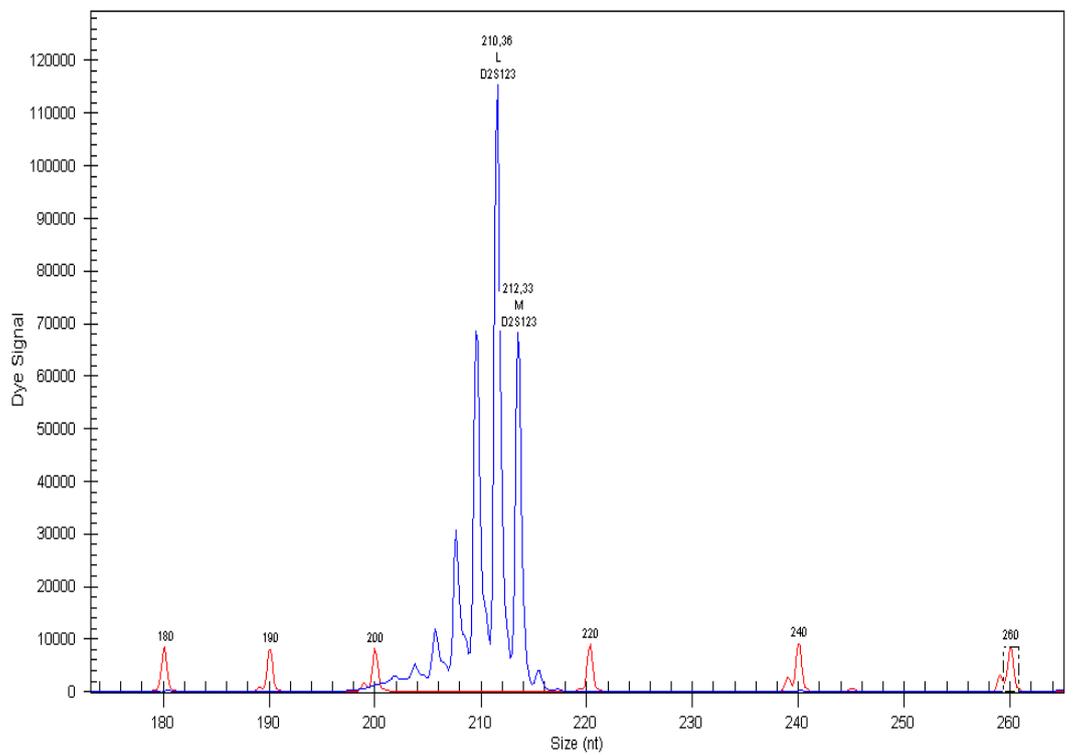


Abbildung 24: Beispiel eines Summationseffektes durch Stotterbanden an einer Schleimhautprobe der Nummer 50 mit dem Marker D2S123.

Hier stellt sich ein deutlich höherer Intensitätsspeak des eigentlich kleineren Allels L dar, welcher sich durch den Summationseffekt der Stotterbanden des größeren Allels M erklären lässt.

6 Zusammenfassung

In einem von Bisgaard et al. 2001 veröffentlichten Artikel wurde ein allelischer Verlust der Heterozygotie (LOH) in der Region 2p16 beim kolorektalen Karzinom als unabhängiger Prognosefaktor für eine schlechtere Patientenüberlebensrate beschrieben, wohingegen der allelische Verlust der Region 5q22.2 keinen Einfluss auf die Patientenprognose hatte. Ziel dieser Arbeit war es, diese Aussagen an einem eigenen Kollektiv zu überprüfen.

Hierzu wurde eine Serie von 165 kolorektalen Karzinomen analysiert, die von 2000 bis 2004 von der interdisziplinären Forschungsgruppe Kolonkarzinom Würzburg gesammelt wurden. Analysiert wurden die beiden Regionen 2p16.3 und 5q22.2 mittels der hoch polymorphen Marker D2S123 und D5S346. Mit dem Mikrosatellitenmarker D2S123 konnte nach Ausschluss der nicht-informativen Marker in 20% der Fälle ein LOH nachgewiesen werden, mit dem Marker D5S346 in 50% der Fälle. Damit konnte nachgewiesen werden, dass beide Regionen häufig deletiert sind. Im Bereich des Marker D5S346 ist das APC- Tumorsuppressorgen lokalisiert. Im Bereich des Marker D2S123 ist bisher kein Gen eindeutig identifiziert worden. Dies sollte im Rahmen weiterer Studien erfolgen.

Es wurde eine Korrelation der allelischen Verluste mit der Patientenprognose und mit mehreren klinischen Parametern durchgeführt. Dabei konnte weder für den Verlust der Region 5q22.2, noch für die Region 2p16.3 ein signifikanter Einfluss auf die Patientenprognose gezeigt werden. Eine Mikrosatelliteninstabilität im Marker D2S123 war signifikant mit einer besseren Patientenprognose assoziiert und es zeigte sich für eine Mikrosatelliteninstabilität des Markers D5S346 ebenfalls ein Trend zum einem besseren Überleben. Dies verdeutlicht die Bedeutung der Bestimmung einer Mikrosatelliteninstabilität in allen kolorektalen Karzinomen, wie sie auch von anderen Gruppen gezeigt werden konnte. Die Bestimmung eines LOHs in 2p16.3 und 5q22.2 ist nach unseren Ergebnissen dagegen nicht sinnvoll.

7 Literaturverzeichnis

1. **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.
2. **Baisse** B, Bouzourene H, Saraga EP, Bosman FT, Benhattar J (2001) Intratumor genetic heterogeneity in advance human colorectal adenocarcinoma. *Int J Cancer* 93(3):346-52.
3. **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.
4. **Baker** SJ, Markowitz S, Fearon ER, Willson JKV, Vogelstein B. (1990) Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wildtype p53. *Science* 249:912-915.
5. **Bangoura** G, Yang LY, Huang GW, Wang W. (2004) Expression of HIF-2alpha/EPAS1 in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 10: 525-30-
6. **Barber** JC, Ellis KH, Boweles LV, Delhanty JD, Ede RF, Male BM, Eccles DM. (1994) Adenomatous polyposis coli and a cytogenetic deletion of chromosome 5 resulting from a maternal intrachromosomal insertion. *J Med Genet*. 31(4):312-6-
7. **Barnetson** RA, Tenesa A, Farrington SM, Nicholl ID, Cetnarskyj R, Porteous ME, Campbell H, Dunlop MG Identification and survival of carriers of mutations in DNA mismatch-repair genes in colon cancer. (2006) *N Engl J Med*. 354(26):2751-63.
8. **Baylin** SB, Herman JG (2000) DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet* 16:168- 174-
9. **Bertholon** J, Wang Q, Galmarini CM, Puisieux A (2006) Mutational targets in colorectal cancer cells with microsatellite instability. *Fam Cancer*. 5(1):29-34.

10. **Bisgaard** ML, Jager AC, Dalgaard P, Sondergaard JO, Rehfeld JF, Nielsen FC (2001) Allelic loss of chromosome 2p21-16.3 is associated with poor survival in sporadic colorectal cancer. In: Scand. Journal of Gastroenterology, 36(4): 405-409-
11. **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.
12. **Carpenier** I, Coornaert B, Beyaert R (2004) Function and regulation of tumor necrosis factor type 2. Curr Med Chem. 11(16):2205-12-
13. **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.
14. **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.
15. **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.
16. **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.
17. **Classen** M, Diehl V, Kochsiek K, Berdel W. E., Böhm M, Schmiegel W (2004) Innere Medizin, 5. Auflage, München, Jena, Urban u. Fischer: Seite 1236-1241-
18. **De Filippo** C, Luceri C, Caderni G, Pacini M, Messerini L, Biggeri A, Mini E, Tonelli F, Cianchi F, Dolara P (2002) Mutations of the APC gene in human sporadic colorectal cancers, Scand J Gastroenterol. 37(9):1048-53-

19. **Esteller** M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. (2001) A Gene Hypermethylation Profile of Human Cancer. *Cancer Research* 61:3225-3229.
20. **Eichholzer** M. Nutrition and cancer (2000) *Ther Umschau* 57(3):146-51.
21. **Fabre** M, Martin M, Ulloa F, Real FX. (1999) In vitro analysis of the role of DCC in mucus-secreting intestinal differentiation. *Int J Cancer* 81:799-807.
22. **Fearon** ER, Vogelstein B. (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61 (5):749-867.
23. **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.
24. **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.
25. **Gallagher** WM, Currid CA, Whelan LC. (2005) Fibulins and cancer: friend or foe? *Trends Mol Med* 11:336-40-
26. **Ganten** D, Ruckpaul K, Hahn S, Schmiegel W, *Molekularmedizinische Grundlagen von nicht- hereditären Tumorerkrankungen.* (2002) Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Seite 231-251.
27. **Garinis** GA, Menounos PG, Spanakis NE, Papadopoulos 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. **Geibe** H. and Durst, J. (1996) *Kolorektale Karzinome und Präkanzerosen.* Chirurgische Operationslehre. Stuttgart, New York, Schattauer: 596-599.
29. **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.
30. **González-García** I, Moreno V, Navarro M, Martí-Ragué J, Marcuello E, Benasco C, Campos O, Capellà G, Peinado MA. (2000) Standardized approach for microsatellite instability detection in colorectal carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 92:544-9.
 31. **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.
 32. **Grady** WM, Willis J, Guilford PJ, Dunbier AK, Toro TT, Lynch H, Wiesner G, Ferguson K, Eng C, Park JG, Kim SJ, Markowitz S.(2000) Methylation of the CDH1 promoter as the second genetic hit in hereditary diffuse gastric cancer. *Nat Genet* 26:16-17.
 33. **Gruis** NA, Abeln EC, Bardoel AF, Devilee P, Frants RR, Cornelisse CJ (1993) PCR-based microsatellite polymorphisms in the detection of loss of heterozygosity in fresh and archival tumour tissue. *Br J Cancer* 68(2):308-13.
 34. **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
 35. **Haber** JE. (1999) DNA recombination: the replication connection. *Trends Biochem Sci* 24(7):271-275.
 36. **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 Natl Cancer Inst* 91(15):1295-1303.

37. **Hamelin** R, Laurent-Puig P, Olschwang S et al. (1994) Association of p53 mutations with short survival in colorectal cancers. *Gastroenterology*, 106: 42-48.
38. **Hartwell** L. (1992) Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. *Cell* 7(14):543-546.
39. **Hemminki** A, Mecklin JP, Järvinen H, Aaltonen LA, Joensuu H. (2000) Microsatellite instability is a favorable prognostic indicator in patients with colorectal cancer receiving chemotherapy. *Gastroenterology* 119:921-8.
40. **Iino** H, Fukayama M, Maeda Y, et al. (1994) Molecular genetics for clinical management of colorectal carcinomas: 17p, 18q and 22q loss of heterozygosity and decreased DCC expression are correlated with the metastatic potential. *Cancer* 73 (5): 1324-1331.
41. **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.
42. **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.
43. **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.
44. **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.
45. **Jeter** JM, Kohlmann W, Gruber SB.(2006) Genetics of Colorectal cancer. *Oncology* 20(3):269-76; discussion 285-6, 288-9.

46. **Johannsdottir** JT, Bergthorsson JT, Gretarsdottir S, et al. (1999) Replication error in colorectal carcinoma: Association with loss of heterozygosity at mismatch repair loci and clinicopathological variables. *Anticancer Res* 19: 1821 -1826.
47. **Jones** PA, Laird PW. (1999) Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 21:163-167.
48. **Kamb** A (1995) Cell-cycle regulators and cancer. In: *Trends Genet.*, 11: 136-140.
49. **Kazama** Y, Watanabe T, Kanazawa T, Kazama S, Tada T, Tanaka J, Nagawa H (2006) Mucinous colorectal cancers with chromosomal instability: a biologically distinct and aggressive subtype. *Diagn Mol Pathol* 15(1):30-4.
50. **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. *J Am Med Assoc* 261:3099-3109.
51. **Kikuchi** K, Ueda M, Kitajima M (1999) Molecular biology in gastric cancer. *Gan To Kagaku Ryoho* 26(14):2139-46.
52. **Kinzler** KW, Nibert MC, Su LK, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, Smith KJ, Preisinger AC, Hamilton SR, Hedge P, Markham A, et al. (1991) Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. *Science* 251 (4999): 1366-1370.
53. **Kinzler** KW, Vogelstein B. (1997) Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 386:761, 763.
54. **Knudson** AG. (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 68:820-823.
55. **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.
56. **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.
57. **Locker** GY, Hamilton S, Harris J, Jessup JM, Kemeny N, Macdonald JS, Somerfield MR, Hayes DF, Bast RC Jr. (2006) ASCO. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. J Clin Oncol 24:5313-27.
 58. **Loeb** LA. (1991) Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. Cancer Res 51(12):3075-3079.
 59. **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.
 60. **Lynch** HT, de la Chapelle A. (2003) Hereditary colorectal cancer. N Engl J Med 348 (10):919-932.
 61. **Marra** G, Boland CR. (1995) Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: the syndrome, the genes and historical perspectives. J Natl Cancer Inst. 87(15):1114-1125.
 62. **Martinez-Lopez** E, Abad A, Font A, Monzo M, Ojanguren I, Pifarre A, Sanchez JJ, Martin C, Rosell R. (1998) Allelic loss on chromosome 18q as a prognostic marker in stage II colorectal cancer. Gastroenterology 114(6):1180-1187.
 63. **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.
 64. **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.
 65. **Meuth** M. (1990) The structure of mutation in mammalian cells. Biochem Biophys Acta. 1032(1):1-17.

66. **Morin** PJ, Vogestein B, Kinzler KW (1996) Apoptosis and APC in colorectal tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 23;93(15):7950-4.
67. **Niederacher** D, Beckmann M. (1998) Bedeutung der LOH Analyse für die Identifizierung von Tumorgenen. *Medgen* 10:256-258.
68. **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,
69. **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.
70. **Park** JG, Kim IJ (2005) Hereditary colorectal cancer. *Korean J Gastroenterol.* 45 (2): 78-87.
71. **Parkin** M, Bray F, Ferlay J, Pisani P. (2002) Global Cancer Statistics 2002. *CA Cancer J Clin* 55(2):74-108.
72. **Pietra** N, Sarli L, Costi R, et al (1998) Role of follow-up in management of local recurrences of colorectal cancer: A prospective, randomized study. *Dis Colon Rectum* 41: 1127 -1133.
73. **Pinto** C, Veiga I, Pinheiro M, Mesquita B, Jeronimo C, Sousa O, Fragoso M, Santos L, Moreira- Dias L, Baptista M, Lopes C, Castedo S, Teixeira MR (2006) MSH6 germline mutations in early-onset colorectal cancer patients without family history of the disease. *Br J Cancer* 18;95(6):752-6.
74. **Plaschke** J. et al (2002) Involvement of hMSH6 in the development of hereditary and sporadic colorectal cancer. *Int. J. Cancer:* 97, 643-648.
75. **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.
76. **Rabbitts** TH (1994) Chromosomal translocations in human cancer. In: *Nature*, 372: 143-149.

77. **Renz- Polster** H, Krauzig S, Braun J (2004) Basislehrbuch Innere Medizin, 3. Auflage, München, Urban und Fischer, Seite 587-594.
78. **Riggins** GJ, Thiagalingam S, Rozenblum E, Weinstein CL, Kern SE, Hamilton SR, Willson JKV, Mqarkowitz SD, Kinzler KW, Voelstein B. (1996) Mad- related genes in the human. *Nat Genet.* 13(3):347-349.
79. **Rowan** A, Halford S, Gaasenbeek M, Kemp Z, Sieber O, Volikos E, Douglas E, Fiegler H, Carter N, Talbot I, Silver A, Tomlinson I (2005) Refining molecular analysis in the pathways of colorectal carcinogenesis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 3(11):1115-23.
80. **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.
81. **Sanchez-Pernaute** A, Perez-Aguirre E, Cerdan FJ, Iñiesta P, Diez Valladares L, de Juan C, Moran A, Garcia-Botella A, Garcia Aranda C, Benito M, Torres AJ, Balibrea JL (2005) Overexpression of c-myc and loss of heterozygosity on 2p, 3p, 5q, 17p and 18q in sporadic colorectal carcinoma. *97(3):169-78.*
82. **Sankila** R, Aaltonen LA, Järvinen HJ, Mecklin JP. (1996) Better survival rates in patients with MLH1-associated hereditary colorectal cancer. *Gastroenterology* 110:682-7.
83. **Scheppach** W. (1991) Bedeutung von Ballaststoffen für die Entstehung und Therapie gastroenterologischer Erkrankungen. *Akt Ernähr* 16:143-145.
84. **Seyffert** W (Hrsg.) Lehrbuch der Genetik. Gustav-Fischer-Verlag, 24.4 Mismatch-Reparatur, 26.6.4.3 Genomische Instabilität, 568-569 u. 694-695.
85. **Selby** JV, Friedmann GD, Quesenberry CP Jr. (1996) Case- control evaluation of screening. *J clin Epidemiol.* 49(3):390- 391.
86. **Sinicrope** FA, Rego RL, Halling KC, Foster N, Sargent DJ, La Plant B, French AJ, Laurie JA, Goldberg RM, Thibodeau SN, Witzig TE. (2006)

- Prognostic impact of microsatellite instability and DNA ploidy in human colon carcinoma patients. *Gastroenterology* 131:729-37.
87. **Smedh** K, Khani MH, Kraaz W, Raab Y, Strand E. (2006) Abdominoperineal excision with partial anterior en bloc resection in multimodal management of low rectal cancer: a strategy to reduce local recurrence. *Dis Colon Rectum*. 49(6):833-40.
 88. **Smith** G, Carey FA, Beattie J, Wilkie MJ, Lightfoot TJ, Coxhead J, Garner RC, Steele RJ, Wolf CR. (2002) Mutations in APC, Kirsten- ras and p 53- alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(14): 9433- 9438.
 89. **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
 90. **Stanbridge** EJ. (1990) Human tumor suppressor genes. *Annu Rev Genet* 24:615-657.
 91. **Strachan** T (2005) molekulare Humangenetik, Originaltitel: Human molecular genetics. 3. Auflage, München, Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, Seite 575- 595, 143-151.
 92. **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.
 93. **Thiagalingam** S, Lengauer C, Leach FS, Schutte M, Hahn SA, Overhauser J, Wilson JKV, Markowitz S, Hamilton SR, Kern SE, Kinzler KW, Vogelstein B. (1996) Evaluation of candidate tumor suppressor genes on chromosom 18 in colorectal cancers. *Nat Genet*. 13(3), 343-346.
 94. **Thibodeau** SN, Bren G, Schaid D. (1993) Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 260(5109):816-819.
 95. **Tomlinson** IP, Bodmer WF (1996) Chromosome 11q in sporadic colorectal carcinoma: patterns of allele loss and their significance for tomorigenesis. *J. of Clin. Path.*, 5: 386-390.

96. **Tsafrir** D, Bacolod M, Selvanayagam Z, Tsafrir I, Shia J, Zeng Z, Liu H, Krier C, Stengel RF, Barany F, Gerald WL, Paty PB, Domany E, Notterman DA (2006) Relationship of gene expression and chromosomal abnormalities in colorectal cancer. *Cancer Res.* 15;66(4):2129-37.
97. **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.
98. **Vogelstein** B, Fearon ER, Kern SE, Hamilton SR, Preisinger AC, Nakamura Y, White R. (1989) Allelotype of colorectal carcinomas. *Science* 244(4901):207-211.
99. **Vousden** KH (2000) p53: death star. *Cell* 103(5):691-694.
100. **Warusavitarne** J, Schnitzler M. (2007) The role of chemotherapy in microsatellite unstable (MSI-H) colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 22:739-48.
101. **Wheeler** JM (2005) Epigenetics, mismatch repair genes and colorectal cancer. *Ann R Coll Surg Engl.* 87(1):15-20.
102. **White** (2) RL (1998) Excess risk of colon cancer associated with a polymorphism of the APC gene? *Cancer Res* 58(18): 4038-4039.
103. **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.
104. **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

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. M. Scheurlen sowie meinem Betreuer und Leiter des gastroenterologischen Labors, Priv.- Doz. Dr. R. Melcher für die Möglichkeit danken, unter ihrer Leitung dieses Thema bearbeiten und in ihrem Labor die dafür notwendigen Untersuchungen durchführen zu können. Auch möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. W. Scheppach bedanken, unter dessen Leitung ich die Bearbeitung meines Themas begonnen habe.

Herrn Priv.- Doz. B. Illert danke ich für die Übernahme des Koreferats. Frau Dr. S. Herterich möchte ich u.a. sehr für die Unterstützung und Anregungen bei der Durchführung des Längenfragmentanalysen an den Sequenzierautomaten danken.

Für die geduldige Betreuung und Anregung im praktischen und schriftlichen Teil dieser Arbeit gilt besonderer Dank meinem Betreuer und Doktorvater Herrn Priv.- Doz. 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.

Lebenslauf

Persönliche Angaben:

- geboren: • 20.03.1982 in Würzburg
Nationalität: • deutsch
Familienstand: • ledig

Schulische Ausbildung:

- Sept. 1988- Juli 1992: • Grundschule Ansbach Eyb
Sept. 1992- Juni 2001: • Jack Steinberger Gymnasium Bad Kissingen
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium der Humanmedizin:

- Okt. 2001- März 2002: • ein Semester Diplompsychologie an der Univ. Regensburg
April 2002- März 2004: • Vorklinischer Abschnitt der Humanmedizin an der Univ. Würzburg
März 2004: • Ärztliche Vorprüfung an der Univ. Würzburg nach alter AO
April 2004- Okt. 2005: • Klinischer Abschnitt am Universitätsklinikum Würzburg
Okt. 2005- Feb. 2006: • Halbjähriger Studienaufenthalt am Universitätsklinikum Centre Hôpital Universitaire Dupuytren in Limoges, (*Frankreich*)
März 2005- Okt. 2007: • Klinischer Abschnitt am Universitätsklinikum Würzburg
Okt 2008- Nov 2008: • Abschluss: Staatsexamen Humanmedizin

Praktisches Jahr:

- Aug. 2007- Okt. 2007: • Unfallchirurgie, 8 Wochen,
St. Michael´s Hospital, University of Toronto
(*Kanada*)
- Okt. 2007- Dez. 2007: • Chirurgie, Hand- Plastische Chirurgie und
Kinderchirurgie,
8 Wochen, Universitätsklinikum Würzburg
- Dez. 2007- März 2008: • Kinder- und Jugendpsychiatrische Dienste
Graubünden,
16 Wochen, Chur (*Schweiz*)
- März 2008- Juli 2008: • Innere Medizin, Gastroenterologie und
Kardiologie, 16 Wochen,
Juliusspital Würzburg

Auslandspraktika, Famulaturen und Pflegepraktikum

- Feb. 2002- April 2002: • Pflegepraktikum in der Pädiatrie, 8 Wochen,
St. Elisabeth Krankenhaus, Bad Kissingen
- Aug 2004: • Famulatur in der Inneren Medizin, Kardiologie, 4
Wochen,
Friedrichshafen, Lehrkrankenhaus der Universität
Tübingen
- Sept. 2004: • Famulatur in der Allgemeinchirurgie, 4 Wochen,
Asiri Hospital, Colombo (*Sri Lanka*)
- März 2006- April 2006: • Famulatur in der Pädiatrie, 4 Wochen,
Krankenhaus Barmherzige
Brüder Regensburg- Universitätsklinikum Regensburg
- Sept. 2007: • Famulatur in der Kinderchirurgie, 4 Wochen,
Universitätsklinikum Freiburg

Nebentätigkeiten:

- März 2003- April 2004 • Pflegehelfer in der Herz-/ Thorax- Intensivstation
Univ. Würzburg

Würzburg, Dezember 2008

Lisa Sauerhöfer