

Aus der Abteilung Allgemein- und Viszeralchirurgie
(Prof. Dr. med. H. Becker)
im Zentrum Chirurgie
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Applikation der Comparativen Genomischen Hybridisierung (CGH)
zur Vorhersage des Ansprechens von Rektumkarzinomen auf neoadjuvante
Radiochemotherapie**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Jaje Beckmann
aus
Braunschweig

Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichtstatter: Prof. Dr. med. Ghadimi

II. Berichtstatter/in: Prof. Dr. med. Füzesi

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Oktober 2011

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen	III
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
1 Einleitung	
1.1 Epidemiologie des Rektumkarzinoms	1
1.2 Genetische Grundlagen der kolorektalen Karzinogenese	1
1.2.1 Genetisches Progressionsmodell	2
<i>1.2.1.1 Deletion oder Mutation des APC-Gens</i>	2
<i>1.2.1.2 K-ras-Mutation</i>	2
<i>1.2.1.3 Mutation der SMAD-Gene</i>	3
<i>1.2.1.4 Deletion oder Mutation des p53-Gens</i>	4
1.2.2. Chromosomales Progressionsmodell	6
1.2.3. Ploidiestatus und genomische Instabilität	8
1.3. TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms	9
1.4 Klinische Problematik	10
1.5 Fragestellung der Dissertation	10
2 Material und Methoden	12
2.1 Kollektiv	12
2.2 Vergleichende Genomische Hybridisierung (CGH)	14
2.2.1 Isolierung der genomischen DNA	18
<i>2.2.1.1 Extraktion der Tumor-DNA aus Biopsaten</i>	18
<i>2.2.1.2 Extraktion der Referenz-DNA aus humanen Blut-Lymphozyten</i>	18
<i>2.2.1.3 Auftrennung der DNA mittels Gelelektrophorese</i>	20
<i>2.2.1.4 Photometrische Analyse der extrahierten DNA</i>	21
2.2.2 Präparation von Metaphase-Chromosomen	21
<i>2.2.2.1 Präparation der Metaphase-Chromosomen</i>	21
<i>2.2.2.2 Vorbehandlung der Metaphase-Chromosomen</i>	22
<i>2.2.2.3 Denaturierung der Metaphase-Chromosomen</i>	24

2.2.3 Nicktranslation der DNA	24
2.2.4 Hybridisierung	25
2.2.5 Fluoreszenzdetektion	27
2.2.6 Bildaufnahme	28
2.2.7 Auswertung	29
2.2.8 Statistische Auswertung	30
3 Ergebnisse	32
3.1 Chromosomale Veränderungen	32
3.2 Vergleich der zwei Gruppen	33
3.3 Zusammenfassung	38
4 Diskussion	39
4.1 Klinische Problematik	39
4.2 Überblick über bisher publizierte Studien	39
4.2.1 Immunhistochemische Studien	40
4.2.2 Andere Proteine	42
4.2.3 Hochdurchsatz-Analysen	44
4.3 Interpretation der Ergebnisse	46
4.4 Analyse der chromosomalen Regionen	47
4.4.1 Bandenbereich 7q21-31	47
4.4.2 Bandenbereich 7q32-36	48
4.4.3 Bandenbereich 20q12-13	48
4.5 Folgeexperimente	49
5 Zusammenfassung	51
6 Literaturverzeichnis	53

Abkürzungen

ANCA	Average Number of Copy Alterations
Aqua bidest.	doppelt destilliertes Wasser
Boris	Brother of the regulator of imprinted sites
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
CA	Karzinom
CCD	„charge coupled device“
CDK	„cyclin dependent kinase“
cDNA	komplementäre DNA
CGH	„Comparative Genomic Hybridization“
CIN	chromosomale Instabilität
CT	Computertomograph
DAPI	Diaminophenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanidintriphosphat
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DPD	Dihydropyrimidin-Dehydrogenase.
dTMP	Desoxythymidin-5'-monophosphat kinase
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUMP	Desoxyuridinmonophosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis
FISH	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
5-FU	5- Fluorouracil
g	Gramm
h	Stunde(n)
HAT	„human histon acetyltransferase“
HNPCC	Hereditäres nichtpolypöses kolorektales Karzinomsyndrom
IHC	Immunhistochemie
IRS	Immunoreactivity Score
ISCN	„International System for Human Cytogenetic Nomenclature“
Kb	Kilobasenpaare
l	Liter
LOH	„Loss of Heterozygosity“
m	Meter
M	Molarität
Mb	Megabasenpaare

min	Minute(n)
MMR	„Mismatch-Repair“
mRNA	„messenger“ Ribonukleinsäure
MSI	Mikrosatelliten-Instabilität
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionen-Konzentration
Rb	„retinoblastoma protein“
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
Smurf1	SMAD ubiquitin regulator receptor factor 1
SSC	„Standard saline citrate“
TBE	Tris-Borat-EDTA
TGF-β	Transforming Growth- Factor-β
TP	Thymidin-Phosphorylase.
TRAPP	Transformation-transactivation domain associated protein
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Salzsäure
TRITC	„Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanate“
TS	Thymidylatsynthetase
TWEEN	Polyethylenglycolsorbitanmonolaurat
UICC	„Union internationale contre le cancer“
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
Wisp-2	WNT-1-inducible signaling pathways protein 2

Dekadische Vorsilben

n	(nano)	10 ⁻⁹	G	(giga)	10 ⁹
μ	(mikro)	10 ⁻⁶	M	(mega)	10 ⁶
m	(milli)	10 ⁻³	k	(kilo)	10 ³
c	(zenti)	10 ⁻²	h	(hekto)	10 ²
d	(dezi)	10 ⁻¹	da	(deka)	10 ¹

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Seite	5
Abbildung 1.2	Seite	7
Abbildung 2.1	Seite	14
Abbildung 2.2	Seite	17
Abbildung 2.3	Seite	30
Abbildung 3.1	Seite	36
Abbildung 3.2	Seite	37

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1	Seite	9
Tabelle 2.1	Seite	12
Tabelle 2.2	Seite	19
Tabelle 2.3	Seite	20
Tabelle 2.4	Seite	23
Tabelle 2.5	Seite	24
Tabelle 2.6	Seite	25
Tabelle 2.7	Seite	26
Tabelle 2.8	Seite	28
Tabelle 3.1	Seite	34

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie des Rektumkarzinoms

In Mitteleuropa und den USA ist das kolorektale Karzinom mit ca. 300.000 Neuerkrankungen pro Jahr die zweithäufigste Krebs-Todesursache und stellt so ein erhebliches gesundheitspolitisches und sozioökonomisches Problem dar (Midgley und Kerr 1999). In etwa 95% der Fälle tritt es sporadisch auf, deutlich seltener im Rahmen familiärer Erkrankungen wie der Familiären Adenomatösen Polyposis (FAP) und des hereditären nicht-polypösen kolorektalen Karzinomsyndroms (HNPCC). Das Hauptmanifestationsalter liegt zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr. Es wird eine 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 40 Prozent beschrieben (Cancer Research Campaign 1999). Allein in Deutschland erkrankten im Jahr 1999 57.000 Menschen neu an einem kolorektalen Karzinom. 29.800 Menschen verstarben im gleichen Jahr an den Folgen dieser Erkrankung. Dabei lag in 60% der Fälle ein Adenokarzinom des Rektums vor (Liersch et al. 2005).

1.2 Genetische Grundlagen der kolorektalen Karzinogenese

Um maligne zu entarten muss eine normale Zelle verschiedene charakteristische Veränderungen durchlaufen, um den bestehenden Kontrollmechanismen zu entgehen. Als wichtigste onkogen wirksame Faktoren sind Apoptoseresistenz, unbegrenztes replikatives Potential, Angiogenese, Unempfindlichkeit gegenüber Wachstumsinhibitoren, Unabhängigkeit von Wachstumssignalen und invasives Wachstum bzw. Metastasierung zu nennen (Hanahan und Weinberg 2000).

Die Adenom-Karzinom-Sequenz beschreibt die einzelnen Schritte der Entwicklung vom normalen zum dysplastischen Epithel bis hin zum Karzinom (Morson 1974; Day und Morson 1978). Hierbei kommt es zur Akkumulation multipler genetischer Veränderungen. Vogelstein et al. entwickelten 1988 basierend auf dieser Beobachtung ein genetisches Progressionsmodell. Auch wenn die Karzinogenese im Prinzip sequentiell abläuft, ist insbesondere die Akkumulation von Aberrationen für die Entstehung und Progression maligner Tumoren verantwortlich (Vogelstein et al. 1988; Fearon und

Vogelstein 1990). Im Folgenden sollen die wichtigsten Schritte dieses Progressionsmodells detailliert erläutert und abschließend in der Abbildung 1.1 zusammengefasst werden. Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass sich die meisten Publikationen auf die gemeinsame kolorektale Karzinogenese beziehen. Es mehren sich auch Hinweise darauf, dass es in der Entstehung von Kolon- und Rektumkarzinomen viele Gemeinsamkeiten gibt (Grade et al. 2007).

1.2.1 Genetisches Progressionsmodell

1.2.1.1 *Deletion oder Mutation des APC-Gens*

Das APC-Gen (Adenomatous Polyposis Coli) befindet sich auf dem Chromosom 5q21 und kodiert für ein zytoplasmatisches Protein. Dieses bindet freies β -Catenin, fördert dessen Degradation und verhindert dadurch das Eindringen von β -Catenin in den Nukleus. Zellen mit verändertem APC-Gen sind unfähig, β -Catenin zu binden, folglich kommt es zu einer nukleären Akkumulation von β -Catenin (Morin et al. 1997; Ghadimi et al. 1999). Dort fungiert es als Koaktivator für Transkriptionsfaktoren der T-Zell-Faktor-Familie und führt zur Expression von Genen, wie z.B. c-MYC, Cyclin D1 und Matrilysin. Daraus kann letztendlich ein neoplastisches Wachstum resultieren (He et al. 1998; Brabletz et al. 2000). Während ungefähr 60 bis 80 Prozent der sporadischen kolorektalen Karzinome Mutationen von APC aufweisen, wurden Keimbahn-Mutationen dieses Gens im Zusammenhang mit der Familiären Adenomatösen Polyposis (FAP) gefunden (Grodin et al. 1991). Diese Patienten entwickeln schon in jungen Jahren hunderte Adenome im gesamten Dickdarm mit einer Entartungswahrscheinlichkeit von annähernd 100 Prozent.

1.2.1.2 *K-ras-Mutation*

Das K-ras-Gen, als eines der drei ras-Gene (Rat sarcoma), kodiert für ein Membran-assoziiertes Guanin-Nukleotid-bindendes Protein (G-Proteine, p21) und ist somit an der Signaltransduktion für die normale Differenzierung und Proliferation der Zelle beteiligt (Bos 1989; Bourne et al. 1990). Im Ruhezustand ist es an GDP gebunden und funktionell inaktiv. Durch Interaktion mit einem Austauschfaktor wird GDP durch GTP ersetzt und die Signaltransduktion gestartet. Die Bindung von GTP führt also zu einer Aktivierung,

während die GTP-Hydrolyse durch die intrinsische GTPase zu einer Inaktivierung führt. In der Onkogenese stattfindende Punkt-Mutationen betreffen die GTP-Bindungsdomäne, meist das Kodon 12, und führen zu einer Reduktion der GTPase-Aktivität. Somit kommt es zu verstärkter Bindung von GTP. Sehr wahrscheinlich führt dies zu einer Verstärkung der Signaltransduktion, wodurch das onkogene Potential der ras-Gene erklärt werden kann (Campbell et al. 1998; Ellis und Clark 2000). Allerdings führen bei dem kolorektalen Karzinom Mutationen von K-ras nur dann zu einer dysplastischen Gewebeveränderung, wenn der K-ras-Mutation eine APC-Mutation vorausgeht (Jen et al. 1994 b).

Therapeutisch relevante Aspekte liefern aktuelle Publikationen. Bei Untersuchung von 463 Patienten mit metastasiertem kolorektalem Karzinom zeigten Amado et al. (2008) für Tumoren mit K-Ras-Mutation ein fehlendes Ansprechen auf EGFR-Antikörpertherapie, während 17% aller Wildtyp-K-ras-Tumoren sensibel auf Panitumumab-Therapie reagierten. Sehr ähnliche Ergebnisse wurden kürzlich auch für die Therapie mit Cetuximab publiziert (Karapetis et al. 2008).

1.2.1.3 Mutation der SMAD-Gene

SMAD2 und SMAD4 sind auf Chromosom 18q lokalisiert und kodieren für intrazelluläre Mediatoren des inhibitorischen Transforming Growth-Factor- β (TGF- β)- Signalwegs. Die Funktionen von TGF- β sind Regulation des Zellwachstums, der Differenzierung, Matrixproduktion und Apoptose (Duff und Clarke 1998). Gezielte Deletion des SMAD4-Gens in kolorektalen Krebszelllinien führt zu einer Unterbrechung der TGF- β -Signaltransduktion. Desweiteren werden mutierte SMAD2/4 Proteine Ziel eines rapiden Abbaus durch Proteasomen (Zhou et al. 1998).

Mutationen von SMAD2 und SMAD4 wurden in diversen humanen Karzinomen sowie deren Zelllinien gefunden (Riggins et al. 1997). Obwohl SMAD Mutationen bei der Entstehung sporadischer Adenome keine gesicherte Rolle spielen, können sie ab dem Stadium hochgradig dysplastischer Adenome nachgewiesen werden. In mehr als 90 Prozent aller kolorektalen Karzinome mit Mikrosatelliteninstabilität (MSI) wurden durch SMAD2 und SMAD4 verursachte Mutationen des TGF- β -Typ-II-Rezeptors gefunden. Zu erklären ist dies dadurch, dass SMAD-Gene, analog zu Mikrosatelliten, Mononukleotid-

repeats enthalten und daher besonders empfindlich für Defekte der DNA-Mismatch-Reparatur (MMR) sind (Parsons et al. 1995).

Nach Ligandenbindung kommt es zur Phosphorylierung von SMAD 3 und in der Folge zur Assoziation mit SMAD4. Der so gebildete hetero-oligomere Komplex transloziert in den Nucleus und bindet dort an spezifische für die Transkription verantwortliche DNA-Sequenzen.

1.2.1.4 Deletion oder Mutation des p53-Gens

Mutationen von p53 zählen zu den häufigsten aller genetischen Veränderungen solider Tumoren. Ca. 70 Prozent aller sporadischen kolorektalen Karzinome weisen Mutationen von p53 auf, häufig verbunden mit einem Verlust der Heterozygotie (LOH) (Guimaraes und Hainhaut 2002).

Das p53-Gen, genannt der „Wächter des Genoms“ (Lane 1992), ist auf dem Chromosom 17p13.1 lokalisiert und kodiert für ein Phosphoprotein (53 kD), welches eine zentrale Bedeutung in der Regulation der DNA-Integrität besitzt. DNA-Schäden führen in gesunden Zellen zu einem p53-vermittelten Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus, um die Fehler beheben zu können. Im Falle irreparabler Schäden induziert p53 die Apoptose der Zelle. Veränderungen des p53-Gens bewirken daher eine zunehmende genetische Instabilität und es kommt zu einer Zunahme des Überlebens von Zellen mit DNA-Schäden (Levine 1997).

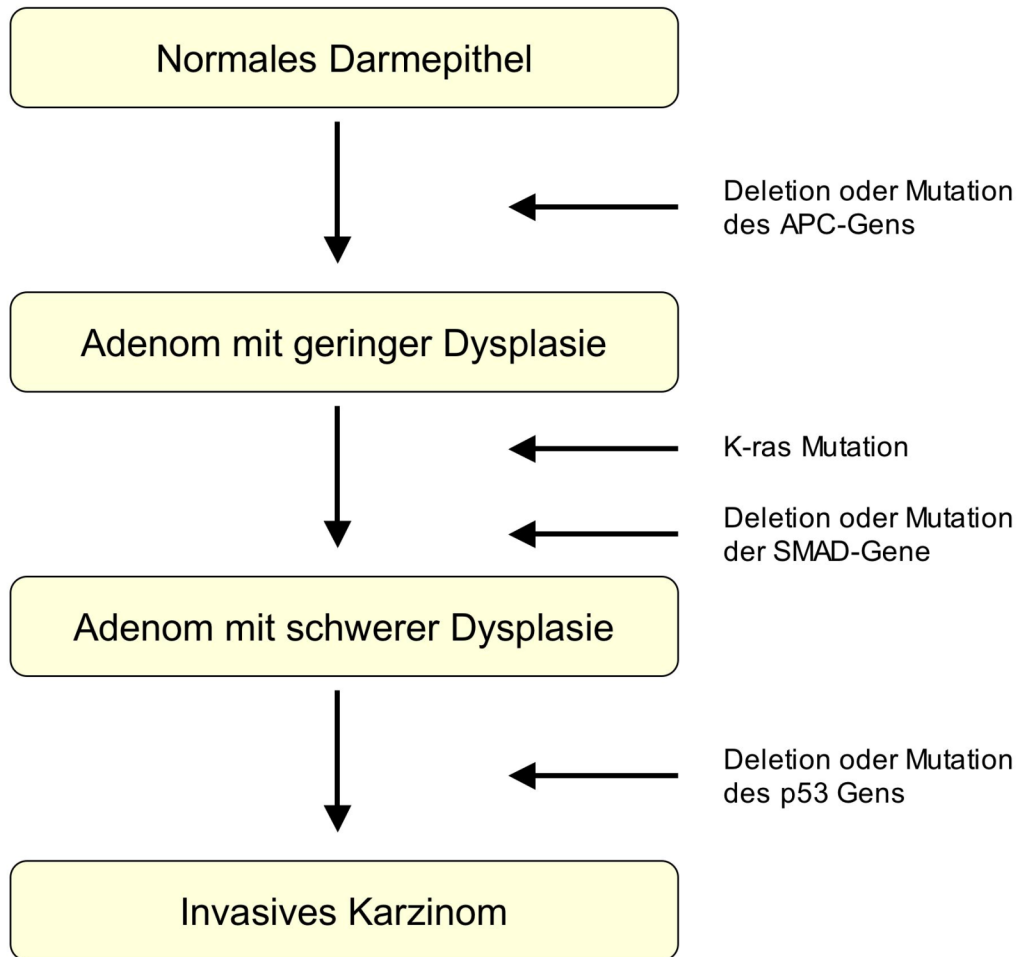


Abb. 1.1: Genetisches Progressionsmodell des kolorektalen Karzinoms

Diese Abbildung zeigt die beschriebenen genetischen Veränderungen, die im Verlauf der kolorektalen Karzinogenese auftreten können. Es sei an dieser Stelle nochmals darauf hingewiesen, dass die Akkumulation genetischer Aberrationen bedeutsamer für die Entstehung und Progression maligner Tumoren ist als der sequentielle Ablauf.

1.2.2 Chromosomales Progressionsmodell

Bereits auf chromosomalem Level zeigt sich eine Anhäufung numerischer und struktureller Aberrationen. Ried et al. beschrieben 1996 als erste eine Korrelation zwischen dem Phänotyp definierter Stadien der kolorektalen Karzinogenese und deren Genotyp. Mittels Vergleichender Genomischer Hybridisierung (CGH) und DNA-Zytometrie untersuchten sie normales epitheliales Mukosagewebe, verschiedene Grade dysplastischen Gewebes und Karzinome. Normales Mukosaepithel zeigte diploide Werte (2c) und keinerlei chromosomale Veränderungen. Die DNA-Gehalte der Adenome mit leichter Dysplasie hingegen schwankten von 2,6c bis 3,9c und deuteten darauf hin, dass bereits die frühen Karzinogenese-Stadien durch Aneuploidie gekennzeichnet sind. Schwer dysplastische Adenome waren charakterisiert durch Sequenzgewinne der Chromosomen 7 und 20, und eine Zunahme des DNA-Gehaltes auf 2,6c bis 5,1c. Die Untersuchung der Karzinome ergab Zugewinne der Chromosomen 20q, 13, 8q, 7p und 1q, und Verluste für die Chromosomen 18q, 8p und 4. Der DNA-Gehalt in den Histogrammen zeigte in vielen Fällen Werte von über 8c. Meijer et al. bestätigten 1998 in einer späteren Studie diese Beobachtungen. Des Weiteren zeigten Ghadimi et al. 2003 mittels CGH, dass ein Zugewinn der chromosomalen Region 8q23-24 als ein prädiktiver Marker für den Lymphknotenbefall bei kolorektalen Karzinomen angesehen werden kann. Ein Großteil der lymphknotenpositiven Tumoren zeigte Zugewinne dieser Region, während dies bei lymphknotennegativen Tumoren nicht der Fall war.

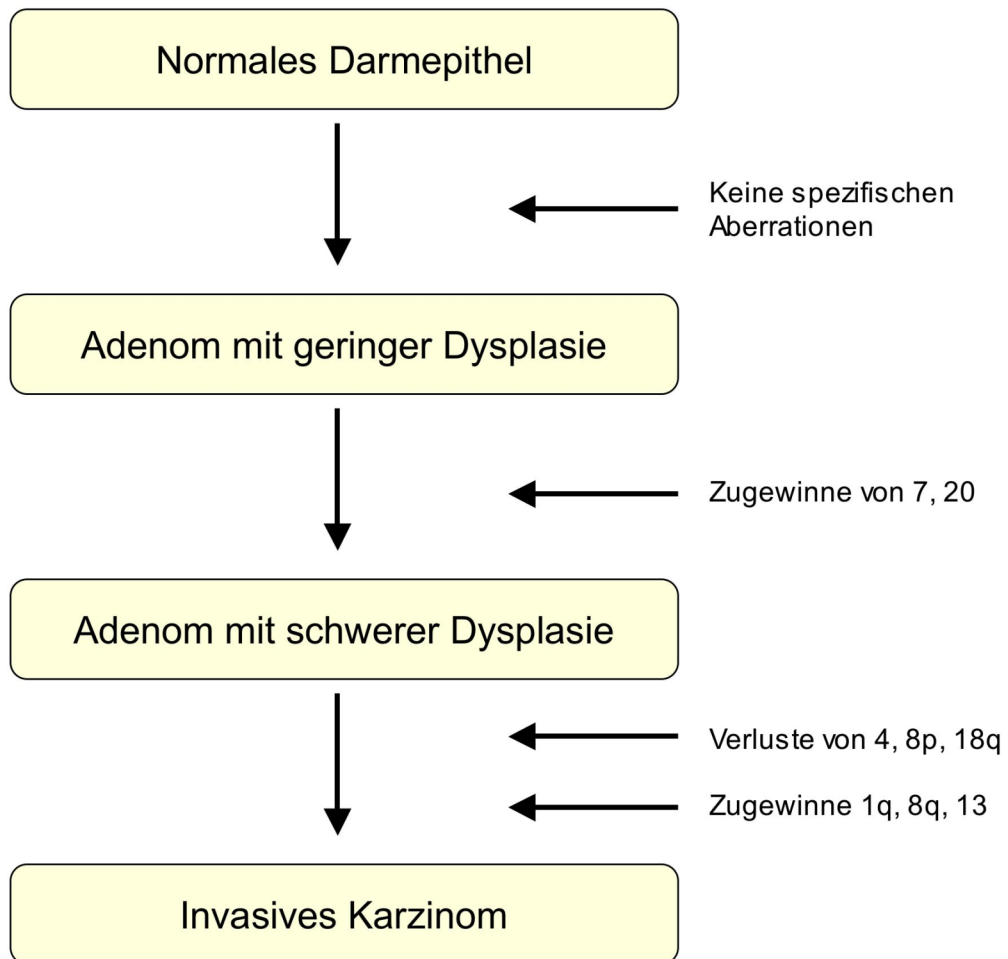


Abb. 1.2: Chromosomales Progressionsmodell des kolorektalen Karzinoms

Diese Abbildung zeigt in Anlehnung an das genetische Progressionsmodell von Fearon und Vogelstein die chromosomalen Aberrationen im Verlauf der Adenom-Karzinom-Sequenz

1.2.3 Ploidiestatus und genomische Instabilität

Kolorektale Karzinome zeichnen sich aber nicht nur durch morphologische Besonderheiten aus, sondern auch durch eine große Variabilität in der zellulären DNA-Zusammensetzung. Tumoren können aufgrund ihres DNA-Gehalts in zwei Ploidieklassen unterteilt werden: Diploide Tumoren zeigen einen normalen DNA-Gehalt, während dieser bei aneuploiden Tumoren verändert ist (Sieber et al. 2003).

Mehr als 90% aller kolorektalen Karzinome zeigen einen aneuploiden Chromosomensatz und es gilt als sicher, dass diese Aneuploidie durch chromosomale Instabilität (CIN) verursacht ist (Emdin et al. 1987; Giaretti und Santi 1990; Steinbeck et al. 1993).

Eine große Anzahl von Genveränderungen kann zur Entstehung von CIN führen (Nasmyth 1996). Fehler in der Kondensation der Chromosomen, Kohäsion der Schwesterchromatiden, Bildung oder Funktion der Zentrosomen und Mikrotubuli sowie des Spindelapparates können zum Phänotyp der chromosomalen Instabilität führen (Lengauer et al. 1997). Wesentlich sind also Gene betroffen, die für Replikation bzw. Segregation der Chromosomen während der Mitose zuständig sind oder den Zellzyklus kontrollieren.

Ghadimi et al. zeigten 2003 anhand eines Kollektivs von 50 kolorektalen Karzinomen eine vermehrte chromosomale Instabilität für lymphknotenpositive kolorektale Karzinome gegenüber lymphknotennegativen Karzinomen (ANCA-Werte von 9,8 vs. 7,5). Der ANCA-Wert (average number of copy alterations) ist ein Maß für die durchschnittliche Anzahl an chromosomalen Veränderungen pro Gruppe und damit Ausdruck der chromosomalen Instabilität (Ried et al. 1999). Um sie zu berechnen, werden alle chromosomalen Aberrationen der Karzinome einer Gruppe addiert und durch die Gesamtzahl der Karzinome dieser Gruppe dividiert.

Nur etwa 10 Prozent der kolorektalen Tumoren weisen einen diploiden Chromosomensatz auf. Da sie einem alternativen Weg der Tumorgenese folgen, stellen sie eine separate Untergruppe kolorektaler Karzinome dar (Thibodeau et al. 1993; Hawkins et al. 2001). Eine mögliche Ursache sind Fehler in der Mismatch Repair Funktion (MMR), aufgrund derer es zu Mikrosatelliteninstabilität (MSI) kommt (Boland et al. 1998). Mikrosatelliten bestehen aus repetitiven Nukleotidsequenzen wie z.B. G-T-G-T-G-T-G-T, die mit einer Länge von fünf bis 100 Basenpaaren über das gesamte Genom verteilt sind. Sie finden sich sowohl in den kodierenden und den nicht kodierenden Sequenzen des Genoms. Im gesunden Organismus korrigieren Gene des MMR-Systems Basenfehlpaarungen während

der Replikation. Eine MMR-Defizienz führt durch eine Veränderung der Nukleotidsequenzen zu einer verstärkten Akkumulation von Mutationen und daher zur Entwicklung eines Karzinoms (Ilyas und Tomlinson 1996).

1.3 TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms

Das kolorektale Karzinom wird anhand der TNM-Kategorien klassifiziert (siehe Tabelle 1.1). Dabei beschreibt T die Tiefeninfiltration des Primärtumors, N den Nodalstatus und M das Vorhandensein von Fernmetastasen.

T – Primärtumor	
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumorinfiltration bis in die Submukosa
T2	Tumorinfiltration bis in die Muscularis propria
T3	Tumorinfiltration bis in die Subserosa oder das perikolische/-rektale Fettgewebe
T4	Tumorinfiltration direkt in andere Organe oder Strukturen und/oder Perforierung des viszeralen Peritoneums
N – regionale Lymphknotenmetastasierung	
Nx	Benachbarte (regionäre Lymphknoten sind nicht beurteilbar)
N0	Kein Anhalt für regionale Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in 1-3 perikolischen/-rektalen Lymphknoten
N2	Metastasen in 4 oder mehr perikolischen/-rektalen Lymphknoten
N3	Metastasen entlang eines benannten Gefäßstamms und/oder apikale Lymphknotenmetastasen
M – Fernmetastasen	
M0	Kein Anhalt für Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tab. 1.1: TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms

1.4. Klinische Problematik

Adenokarzinome des Rektums zählen zu den häufigsten malignen Tumoren der westlichen Welt. In Kombination mit der Chirurgie kann die neoadjuvante Radiochemotherapie die lokale Rezidivrate reduzieren und gewinnt in spezialisierten chirurgischen Zentren zunehmend an Bedeutung. Für lokal-fortgeschrittene Karzinome (UICC II-III) kann durch eine ergänzende präoperative Radiochemotherapie das 5-Jahres-Lokalrezidiv-Risiko von 13% auf 6% reduziert werden (CAO/AIO/ARO-94-Studie, Sauer 2004). Allerdings reicht das Spektrum des Ansprechens auf neoadjuvante Therapien von komplettem Respons bis zur kompletten Resistenz. Eine prätherapeutische Einschätzung des Respons wäre daher sehr wichtig für eine individuelle Therapieplanung. Daher wurde in vielen Studien nach prädiktiven Markern gesucht. Allerdings konnte bis jetzt kein klinisch akzeptierter Standard zur prätherapeutischen Stratifizierung in Responder und Nicht-Responder auf eine neoadjuvante Radiochemotherapie etabliert werden (Pasche et al. 2002; Adlard et Richman 2002). Patienten mit resistenten Tumoren könnten alternativen Therapiestrategien zugeführt werden, z.B. einer aggressiveren zytostatischen Behandlung mit 5-FU und Oxaliplatin (Rödel C et al. 2003; Gerard et al. 2003). Alternativ könnten Non-Responder primär operiert werden, um ihnen die Nebenwirkungen einer eventuell ineffektiven präoperativen Radiochemotherapie zu ersparen (Nelson und Sargent 2001).

1.5 Fragestellung der Dissertation

Da aus onkologischer Sicht also zusätzliche Marker nötig sind, um das Verhalten eines Primärtumors auf eine präoperative kombinierte Radiochemotherapie voraussagen zu können, ergab sich für diese Arbeit folgende Fragestellung:

- 1.) Inwieweit unterscheiden sich die genetischen Aberrationen der „Responder“ von denen der „Non-Responder“?
- 2.) Lässt sich ein signifikantes Muster erkennen, anhand dessen sich das Ansprechverhalten eines Tumors auf Radiochemotherapie voraussagen lässt?

Da nach dem aktuellen Stand der Wissenschaft vermutlich nicht ein separates Gen für diesen Prozess verantwortlich ist, sondern wahrscheinlich das Zusammenspiel mehrerer Faktoren dessen Ansprechverhalten begründet, wurde in dieser Arbeit keine Einzel-Gen-Analyse durchgeführt, sondern mit Hilfe einer Screening-Methode das gesamte Genom auf chromosomale Aberrationen untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Kollektiv

Diese Studie umfasste 42 Patienten, die aufgrund eines Rektumkarzinoms therapiert wurden. Die histomorphologische Klassifikation der Tumoren erfolgte an Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Gewebeschnitten, und das Staging wurde entsprechend geltenden UICC-Kriterien durchgeführt. Das Tumorgewebe wurde direkt aus Operationspräparaten entnommen, innerhalb von 30 Minuten mit Hilfe flüssigen Stickstoffs schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Die zugehörigen klinisch-pathologischen Daten der 19 Frauen und 33 Männer mit einem Durchschnittsalter von 67 Jahren und eine schematische Darstellung des Studienablaufs sind in Tabelle 2.1 sowie Abb. 2.1 zusammengefasst. Als Kontrollgewebe dienten Blut-Lymphozyten gesunder Probanden.

P-code	Geschlecht	Alter	uT	uN	cUICC	ypT	ypN	ypUICC	R	G	R/NR
P001	m	61	3	0	II	0	0	0	0	x	R
P002	m	61	3	1	III	0	0	0	0	x	R
P004	m	68	3	1	III	3	0	I	0	2	R
P006	m	65	3	1	III	2	0	I	0	2	R
P007	m	49	3	0	II	1	0	II	0	2	R
P010	m	53	3	1	III	3	1	III	0	2	NR
P011	m	64	3	1	III	3	0	II	0	2	NR
P012	m	55	3	0	II	2	1	III	0	3	NR
P013	f	70	3	1	III	3	1	III	0	2	NR
P014	m	58	3	1	III	4	1	III	0	2	NR
P015	m	53	3	1	III	3	0	II	0	2	NR
P017	m	78	3	1	III	3	1	III	0	3	NR
P020	m	58	3	0	II	3	0	II	1	2	NR
P021	f	59	3	1	III	3	0	II	0	2	NR

P022	m	62	3	1	III	3	0	II	0	2	NR
P023	f	40	3	1	III	4	1	III	1	2	NR
P024	m	68	3	0	II	2	0	I	0	2	R
P026	m	62	3	1	III	3	0	II	0	2	NR
P028	m	59	3	1	III	Tis	1	III	0	3	R
P029	f	68	3	0	II	2	0	II	0	2	NR
P030	m	71	3	0	II	2	0	I	0	2	R
P031	m	63	3	1	III	1	0	I	0	2	R
P032	m	50	3	0	II	3	0	II	0	2	NR
P033	f	58	3	0	II	3	0	II	0	2	NR
P034	m	68	3	1	III	2	0	I	0	2	R
P035	m	61	3	1	III	3	0	II	0	2/3	NR
P036	m	66	3	1	III	0	0	0	0	x	R
P037	m	61	3	2	III	4	2	II	0	2	NR
P038	m	57	3	0	II	2	0	I	0	2	R
P039	m	70	4	1	III	3	2	III	0	2	R
P040	m	73	3	1	III	3	1	III	0	2	NR
P041	m	59	3	1	III	2	0	I	0	2	R
P042	m	64	3	1	III	1	0	I	0	1/2	R
P043	f	48	3	1	III	1	0	I	0	1/2	R
P044	m	50	3	0	II	3	0	II	0	2/3	NR
P045	m	70	3	0	II	2	0	I	0	2/3	R
P046	f	71	3	0	II	2	0	I	0	2	R
P047	f	67	3	0	II	3	1	III	0	2	NR
P048	m	52	3	1	III	2	0	I	1	2	R
P049	m	70	3	1	III	3	1	III	0	3	NR
P050	f	53	3	1	III	1	0	I	0	2	R
P051	m	65	3	0	II	0	0	0	0	x	R

Tab. 2.1: Klinische Daten der Patienten sowie jeweils prä- und posttherapeutische Stadieneinteilung der Karzinome

Abkürzungen: uT: T-Level vor jeglicher Therapie, festgestellt durch endorektalen Ultraschall; uN, Lymphknotenstatus vor jeglicher Therapie, festgestellt durch endorektalen Ultraschall; cUICC, klinisches Stadium nach „Union internationale contre le cancer“; ypUICC, Stadium der “Union internationale contre le

cancer” nach Therapie; ypT, histopathologisches T-level nach präoperativer Therapie; ypN, histopathologisch gesicherter Lymphknotenstatus nach präoperativer Therapie; G, Grading (Differenzierungsgrad des Krebsgewebes) nach UICC; R, Resektionsgrad: R0= Resektionsrand ist frei von Tumor; R/NR Zugehörigkeit zur Gruppe der Responder oder Non-Responder.

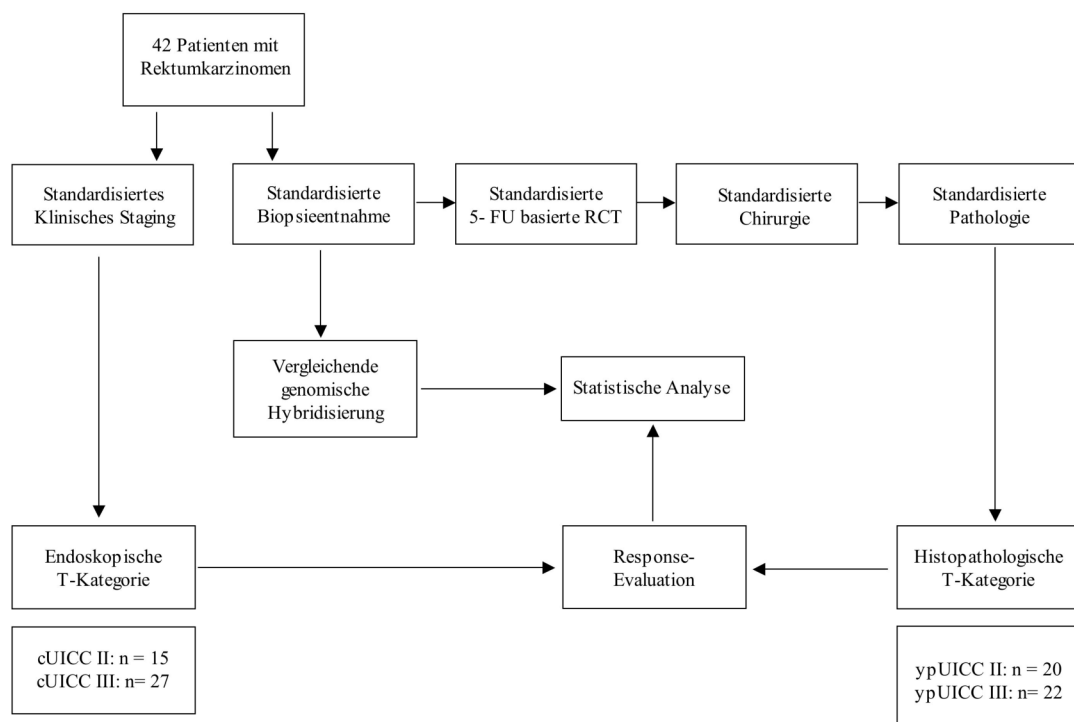


Abb. 2.1 Schematische Darstellung des Studiendesigns

2.2 Vergleichende Genomische Hybridisierung (CGH)

Die Vergleichende Genomische Hybridisierung (Comparative Genomic Hybridization, CGH), erstbeschrieben 1992, ist ein Screening-Test zur Aufdeckung chromosomaler Imbalancen (Kallioniemi et al. 1992; Kallioniemi et al. 1994; du Manoir et al. 1993). Test- und Kontroll-DNA werden in einem Zwei-Farben-FISH-Experiment simultan auf normale Metaphase-Chromosomen hybridisiert. Durch digitale Bildaufnahme und

Analyse der Fluoreszenzintensitäten können Sequenzgewinne oder -verluste einzelner Chromosomen der Test-DNA dargestellt werden (siehe Abbildung 2.1).

Die Gewinnung der Test-DNA erfolgt standardisiert aus Tumorgewebe, die Kontroll-DNA erhält man aus Blut-Lymphozyten gesunder Probanden. Jeweils identische Mengen dieser DNA werden enzymatisch mit verschiedenen Haptenen oder Fluoreszenzfarbstoffen markiert und unter Standardbedingungen auf normale Metaphase-Chromosomen hybridisiert. Ein Überschuss an hochrepetitiver COT-1-DNA wird beigefügt, um Heterochromatin-reiche Regionen zu blocken. Käme es dadurch nicht zu einer Bindung der repetitiven Sequenzen der Tumor- und Kontroll-DNA, würden diese ubiquitär auf den Chromosomen hybridisieren und eine genaue Messung der Fluoreszenz behindern. Um Aberrationen der Geschlechts-Chromosomen analysieren zu können, werden je gleichgeschlechtliche Proben und Metaphasen verwendet. Jeweils weibliche Tumor- und Kontroll-DNA werden auf XX-Metaphasen hybridisiert, und entsprechend männliche Proben auf XY-Metaphasen. Die Detektion erfolgt, zwecks Signalverstärkung, je mittels dreier Antikörper. Die Basis bilden Avidin-konjugiertes Fluoreszein oder Anti-Digoxigenin-Rhodamin. Zur Vereinfachung der späteren Analyse erfolgt eine Gegenfärbung der Metaphasen mit DAPI. Als Bildquelle dient eine sensitive CCD-Kamera (du Manoir et al. 1993 und 1995), welche separat die Fluoreszein-, Rhodamin- und DAPI-Bilder erstellt. Ein Computerprogramm berechnet schließlich das Verhältnis der Fluoreszenz-Intensitäten von Tumor- und Kontroll-DNA. Nach Mittlung der Werte über 8 bis 12 Metaphasen werden diese anhand eines Chromosomenideogrammes visualisiert.

Ein großer Vorzug der CGH ist, dass nur die genomische DNA aus dem Testmaterial benötigt wird, weswegen sich vor allem solide Tumoren für die CGH-Analyse eignen. Denn obwohl die Zytogenetik im klassischen Sinne einen sehr guten Überblick über die genetischen Veränderungen ermöglicht, ist eine Anwendung auf solide Tumoren doch problematisch, da die Präparation qualitativ hochwertiger Metaphase-Chromosomen sowie die exakte Interpretation der teilweise hochkomplexen Karyotypen äußerst schwierig sind. Außerdem erlaubt es die CGH, in nur einem Experiment einen Überblick über sämtliche chromosomale und subchromosomale Veränderungen des gesamten Genoms zu gewinnen. Ein weiterer Vorteil ist, dass auch archiviertes Material untersucht werden kann, da sich Paraffin-Schnitte genauso wie Frischmaterial zur CGH-Analyse eignen. Limitierend wirkt allerdings die Tatsache, dass balancierte Veränderungen wie reziproke Translokationen und Inversionen (häufige Veränderungen hämatologischer und

mesenchymaler Tumoren) in der CGH nicht zu erkennen sind, weil hier keine quantitativen Abweichungen zwischen Tumor- und Kontroll-DNA auftreten. Des Weiteren sollte die Kontamination des Tumorgewebes durch normale Zellen nicht mehr als 40% betragen. Insbesondere bei fibrotischen Tumoren ist dies häufig schwer zu realisieren. Eine weitere Begrenzung stellt zudem das Auflösungsvermögen der CGH dar. Eine Sequenzzunahme um ca. 50% kann erst dann erfasst werden, wenn die Größe der von diesem Zugewinn betroffenen chromosomalen Region im Bereich von ca. 2 Megabasen-Paaren (Mb) liegt. Dies entspräche für eine amplifizierte Region von 250 Kilobasen-Paaren (Kb) einer Zunahme von 400% (Hermsen et al. 1996). Die Grenze für Sequenzverluste wird sogar auf etwa 3 bis 5 Mb geschätzt, kleinere Deletionen unterhalb dieses Bereiches lassen sich daher mittels CGH nicht detektieren.

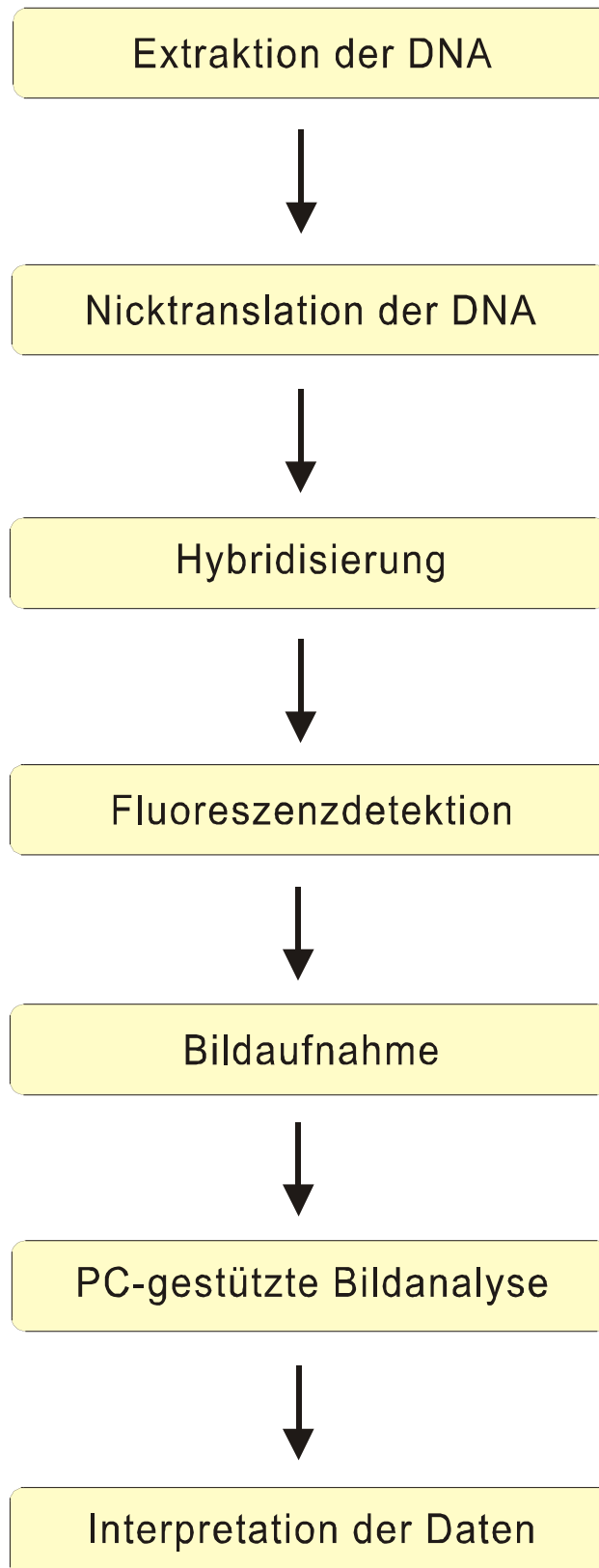


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte eines CGH-Experiments

2.2.1 Isolierung der genomischen DNA

2.2.1.1 Extraktion der Tumor-DNA aus Biopsaten

Das tiefgefrorene Gewebe wird nach mechanischer Zerkleinerung proteolytisch verdaut, um anschließend die DNA mit Hilfe des QIAamp-Tissue-Kits (Qiagen; Hilden, Deutschland) freilegen zu können.

Ein kleines Gewebestück wurde mittels eines Skalpells zerkleinert und mit 360 µl ATL-Puffer (Qiagen; Hilden, Deutschland) sowie 40 µl Proteinase K (20 mg/ml; Boehringer; Mannheim, Deutschland) versetzt. Das Gemisch wurde in einem Eppendorf-Cup gevortext und bei 55°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden 400 µl AL-Puffer (Qiagen; Hilden, Deutschland) hinzugegeben und für 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Nach Zugabe von 400 µl 99%igem Ethanol (Roth; Karlsruhe, Deutschland) und erneutem Vortexen musste der Inhalt auf zwei QIAamp-Säulen verteilt werden. Diese wurden dann auf QIAamp-Sammelröhrchen aufgesetzt, verschlossen und für 1 Minute bei 8000 U/min zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen, die Säule in ein neues Sammelröhrchen überführt und nach Zugabe von 500 µl AW1-Puffer (Qiagen; Hilden, Deutschland) wurde für 1 Minute bei 8000 U/min zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde mit 500 µl AW2-Puffer (Qiagen; Hilden, Deutschland) und Zentrifugation für 3 Minuten bei 14000 U/min wiederholt. Dann wurde die Säule in ein neues Eppendorf-Gefäß gesetzt und mit ca. 100 µl Aqua bidest. für 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 8000 U/min für 1 Minute wurde die QIAamp-Säule verworfen. Die Tumor-DNA befand sich nun im Eppendorf-Gefäß und wurde bei 4°C gelagert.

2.2.1.2 Extraktion der Referenz-DNA aus humanen Blut-Lymphozyten

10 ml Vollblut eines gesunden Probanden wurden mit 30 ml Lyse-Puffer (siehe Tabelle 2.2) versetzt, gut durchmischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde bei 4°C und 1200 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden wiederum 10 ml Lyse-Puffer hinzugefügt, Pellet und Puffer gut durchmischt und für 10 Minuten bei o.g. Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet mit 5ml SE-Puffer (siehe Tabelle 2.2) aufgespült und 10 Minuten zentrifugiert. Nach wiederholtem Verwerfen des Überstandes wurden 5 ml SE-Puffer 40 µl Proteinase

K (10mg/ml) und 250 µl SDS (siehe Tabelle 2.2), hinzupipettiert, das Gefäß leicht geschüttelt und über Nacht bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Am nächsten Tag wurden 3ml Phenol beigefügt, 10 Minuten von Hand geschüttelt und dann bei 3000 rpm und 10°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt, 1,5 ml Phenol sowie 1,5 ml Chloroform/Isoamylalkohol (siehe Tabelle 2.2) addiert, 10 Minuten per Hand geschüttelt und bei 10°C und 3000rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der neu gebildete Überstand wurde nochmals in ein neues Gefäß pipettiert, mit 3ml Chloroform/Isoamylalkohol versetzt, 10 Minuten per Hand geschüttelt und bei 3000rpm und 10°C für 5 Minuten zentrifugiert. Ein letztes Mal wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt, 300µl 3M Natrium Acetat (pH 5,2) (Quality Biological; Gaithersburg, USA) und 10 ml Isopropanol hinzugefügt, vorsichtig geschüttelt, bis die DNA ausgefallen war. Abschließend wurde die DNA in 70% igem Alkohol gewaschen und bei 4°C über Nacht auf einem Rüttelmixer in Aqua bidest. gelöst. Nach Feststellung der DNA- Konzentration wurde die Zellsuspension mit PBS aufgefüllt, um Konzentrationen von ein bis fünf Millionen Zellen pro 200 µl PBS zu erzielen. Diese Suspension wurde aliquotiert und bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren. Ab diesem Schritt wurde nach dem Protokoll für die DNA-Extraktion aus Frischgewebe verfahren.

<u>Lösung</u>	<u>Zusammensetzung</u>	<u>Hersteller</u>
Lyse Puffer	8,29 g NH ₄ Cl 1 g KHCO ₃ 0,034 g Na ₂ EDTA ad 1000 ml Aqua bidest. pH 7,4	
SE Puffer	4,39 g NaCl 8,41 g Na ₂ EDTA ad 1000 ml Aqua bidest pH 8,0	
Natrium Acetat	246 g/l Aqua bidest. pH 5,2	
Proteinase K	100mg/10ml TE	EM Science; Gibbstown, USA
Chloroform/Isoamylalkohol	24 ml Chloroform 1ml Isoamylalkohol	Mallinckrodt; Phillipsburg, USA SIGMA; St. Louis, USA

Tab. 2.2: Zusammensetzung der Lösungen für die DNA-Extraktion aus Blut-Lymphozyten

2.2.1.3 Auftrennung der DNA mittels Gelelektrophorese

Die Molekülgröße der DNA kann durch Einsatz der Gelelektrophorese abgeschätzt werden. Aufgrund der negativen Ladung der DNA wandert diese in einem elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Kleine Fragmente bewegen sich dabei schneller in Richtung der Anode als große. Sichtbar wird die DNA mittels Ethidiumbromid, welches die DNA-Helix interkaliert und unter Bestrahlung mit UV-Licht fluoresziert. Anhand eines Vergleichs mit definierten Längenstandards ist eine relativ genaue Abschätzung der Fragmentlänge möglich.

Ein 1%iges Agarosegel wurde in eine mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer eingespannt. In die Taschen des Gels wurden jeweils 5 µl des DNA-Eluates und 2 µl Ladungs-Puffer pipettiert. Als Längenstandard dienten 1,5 µl Lambda-DNA, versetzt mit 5 µl Aqua bidest. und 2 µl Ladungs-Puffer. Nach einer Laufzeit von etwa 45 Minuten bei einer konstanten Spannung von 80 V wurde das Gel unter UV-Licht mit einer Wellenlänge von 312 nm fotografiert.

<u>Reagenzien</u>	<u>Zusammensetzung</u>	<u>Hersteller</u>
1%ige Agarose	0,5 g Agarose 5 ml 10 x TBE 45 ml Aqua bidest. 7,5 µl Ethidiumbromid	FMC Bio Products; Rockland, USA SIGMA; St. Louis, USA
6 x Ladungspuffer	0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylencyanat 30 % Glycerol 50 mM EDTA	MBI-Fermentas; St. Leon-Rot, USA
Laufpuffer	100 ml 1 x TBE 15 µl Ethidiumbromid	 SIGMA; St. Louis, USA
DNA-Längenmarker Lambda HindIII	Fragmentlänge: 21-0,13 Kb	MBI-Fermentas; St. Leon-Rot, USA

10 x TBE-Puffer	108 g Trishydroxymethyl-aminomethan	Merck; Darmstadt, Deutschland
	55 g Borsäure	Merck; Darmstadt, Deutschland
	40 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 ad 1000 ml Aqua bidest.	SERVA; Heidelberg, Deutschland

Tab 2.3: Zusammensetzung der Reagenzien für die Gelelektrophorese

2.2.1.4 Photometrische Analyse der extrahierten DNA

Um Quantität und Sauberkeit der gewonnenen DNA bewerten zu können, werden die DNA-Eluat photometrisch ausgewertet. Bei einer Wellenlänge von 260 nm wird die Absorptionsintensität der doppelsträngigen DNA anhand der Extinktion gemessen. Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz ist diese proportional zum molaren Extinktionskoeffizienten, der Konzentration des gelösten Stoffes und der durchstrahlten Schichtdicke. Der Vergleich der Extinktion von Leerwert und Probe bei 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) erlaubt die Bildung eines Quotienten, der eine Angabe über die Menge und Reinheit der gelösten DNA ermöglicht.

Je 5 µl DNA-Eluat wurden mit 95 µl Aqua bidest. versetzt und die Extinktion bei 260 und 280 nm gegen Wasser als Leerwert in einem Photometer (Bio Photometer; Eppendorf; Hamburg, Deutschland) gemessen. Nur die Proben mit Ratio-Werten zwischen 1,8 und 2,0 wurde untersucht.

2.2.2 Präparation der Metaphase-Chromosomen

2.2.2.1 Erstellung von Metaphase-Chromosomen

3-5 ml heparinisieretes Vollblut wurden für 10 Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert. Das Serum wurde abgesaugt und verworfen. 2 ml der verbliebenen Lymphozytenschicht (Buffy-Coat) wurden in eine 50 ml Kulturflasche gegeben. Nun wurde zur Erstellung einer speziellen Nährlösung eine 500 ml Flasche RPMI Medium 1640 (Gibco; Karlsruhe, Deutschland) mit 5 ml einer konzentrierten antibiotischen-antimykotischen Lösung

(Antibiotic-Antimycotic 100x; Gibco; Karlsruhe, Deutschland) versetzt. 40 ml dieser Nährlösung, 8 ml fetales Rinderserum (Gibco; Karlsruhe, Deutschland) und 400 µl Phytohämagglutinin (Murex Diagnostics Ltd.; Dartford, England) wurden nun zum Buffy-Coat in die Kulturflasche gefüllt. Anschließend wurde für 72 Stunden bei 37°C inkubiert und durch Zugabe von 400 µl des Spindelgiftes Colcemid (10 µg/ml; Gibco, Karlsruhe, Deutschland) die Mitose gestoppt. Nach gründlichem Schütteln der Flasche wurde der Inhalt auf zwei neue Kulturflaschen verteilt, für 20 Minuten bei 37°C inkubiert und dann für 10 Minuten bei 1.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, so dass ungefähr 5 ml in der Flasche verblieben. Nach sorgfältiger Durchmischung erfolgte die Zugabe von ungefähr 35 ml einer auf 37°C vorgewärmten 0,4%igen Kaliumchloridlösung (Merck; Darmstadt, Deutschland), um die Lymphozyten zu lysieren. Dann wurde für 15 Minuten in einem 37°C warmen Wasserbad inkubiert, für 10 Minuten bei 1.000 U/min zentrifugiert und der Überstand bis auf einen Rest von 5 ml verworfen. Dieser wurde gut vermischt und mit ca. 20 ml frischer Methanol-Eisessiglösung (3:1; Merck; Darmstadt, Deutschland) fixiert. Nach 20 bis 30 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde erneut für 10 Minuten bei 1.000 U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die letzten Schritte mussten mehrmals wiederholt werden, bevor das verbliebene Zellpellet in ein neues Gefäß überführt und in 4 ml der Fixierlösung gelöst werden konnte. Nun wurden 100 µl der Zellsuspension auf saubere, fettfreie Objektträger aufgetropft. Sofern die erstellten Präparate eine ausreichende Anzahl an Metaphase-Chromosomen mit entsprechender Spreitung und möglichst wenig Zytoplasma aufwiesen, konnten die Objektträger in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (70%, 85%, 99%) gewaschen, dehydriert und bei -20°C in 99 %igem Ethanol weggefroren werden.

2.2.2.2 Vorbehandlung der Metaphase-Chromosomen

Proteinrückstände auf dem Objektträger können eine gute Hybridisierung verhindern, daher werden diese einer proteolytischen Verdauung unterzogen.

Nach Äquilibration der Objektträger in 2x SSC für fünf Minuten wurden auf jeden Slide 120 µl RNase (Boehringer; Mannheim, Deutschland, 1:200 verdünnt in 2x SSC) pipettiert, diese mit einem Deckglas versehen und bei 37°C für 45 Minuten inkubiert. Zum Entfernen der DNase wurden die Objektträger abermals in 2x SSC für drei mal fünf Minuten gewaschen.

In einer Glasküvette wurden 100 ml HCL Lösung (siehe Tabelle 2.4) auf 37°C vorgewärmt. Nach Zugabe von 20 µl Pepsin (100 mg/ml; SIGMA; St. Louis, USA) wurden die Objektträger für 2 bis 5 Minuten in dieser Lösung verdaut. Im Anschluss wurden sie für zweimal fünf Minuten bei Raumtemperatur in 1x PBS gewaschen, nun einmal fünf Minuten in 1x PBS/MgCl₂, gefolgt von 10 Minuten in 1% Formaldehyd/1xPBS/MgCl₂. Nach einem finalen Waschschrift in 1x PBS wurden die Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert.

<u>Lösung</u>	<u>Zusammensetzung</u>	<u>Hersteller</u>
20 x SSC	87,75 g Natriumchlorid 47,145 g Natriumcitratdihydrat ad 1000 ml Aqua bidest. pH 7,0	Merck; Darmstadt, Deutschland Merck; Darmstadt, Deutschland
10 x PBS	80,14 g NaCl 2,02 g KCl 11,6 g Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O 2 g KH ₂ PO ₄ ad 1000 ml Aqua bidest.	Merck; Darmstadt, Deutschland
1 x PBS/MgCl ₂	50 ml 1M MgCl ₂ 950 ml 1x PBS	Merck; Darmstadt, Deutschland
1% Formaldehyd/1 x PBS/MgCl ₂	2,7ml Formaldehyd 37% 97,3 ml 1x PBS/MgCl ₂	Merck; Darmstadt, Deutschland
HCL Lösung	1ml 1M HCl 99 ml Aqua bidest ad pH 2,0	Merck; Darmstadt, Deutschland

Tab. 2.4: 20 x SSC-Lösung

Aufgeführt sind die Bestandteile einer 20 x SSC-Lösung. Diese wird im Verhältnis 1:10 mit Aqua bidest. verdünnt, um eine 2 x SSC-Lösung herzustellen.

2.2.2.3 Denaturierung der Metaphase-Chromosomen

Um eine Hybridisierung zu ermöglichen, wird die DNA-Doppelhelix der Metaphase-Chromosomen in Einzelstränge gespalten.

Die Präparate wurden für 2 Minuten in eine 69°C heiße Denaturierungslösung (Tabelle 2.5) überführt, anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe bei -20°C dehydriert und bei Raumtemperatur getrocknet.

<u>Lösung</u>	<u>Inhaltsstoffe</u>	<u>Hersteller</u>
Denaturierungslösung	35 ml deionisiertes Formamid 5 ml 20 x SSC pH 7,2	Merck; Darmstadt, Deutschland
	5 ml 0,5 M Natriumdihydrogen- phosphat 5 ml Aqua bidest. pH 7,0	Merck; Darmstadt, Deutschland

Tab. 2.5: Zusammensetzung der Denaturierungslösung

2.2.3 Nicktranslation der DNA

Die Nicktranslation ist ein Verfahren zur nichtradioaktiven DNA-Markierung. Die DNA wird mittels einer DNase geschnitten, so dass Strangbrüche (nicks) entstehen. Die so gebildeten Fragmentenden sind Angriffspunkt für eine DNA-Polymerase, welche unter Einsatz von markierten und nichtmarkierten Nukleotiden die Strangelongation katalysiert. Das Resultat sind Biotin-markierte Tumor- und Digoxigenin-markierte Kontroll-DNA. Es wurde ein 50 µl Ansatz nach dem folgenden Pipettierschema erstellt.

<u>Menge</u>	<u>Reagenz</u>	<u>Zusammensetzung</u>	<u>Hersteller</u>
2,0 µg	DNA		
10,0 µl	10 x NT-Puffer	500 mM Tris-HCl pH 8,0	
		50 mM Magnesiumchlorid	
		0,5 mg/ml BSA	
10,0 µl	dNTP	0,5 mM dATP, dCTP, dGTP, 0,1mM dTTP	Boehringer; Mannheim, Deutschland
4,0 µl	Digoxigenin-11-dUTP bzw. Biotin-16-dUTP		Boehringer; Mannheim, Deutschland
2,0 µl	DNA-Polymerase I		Boehringer; Mannheim, Deutschland
3-8 µl	DNase I, 1:1000 verdünnt	1 mg/ml DNase I 0,15 M NaCl 50% Glycerol 35% Aqua bidest.	Boehringer; Mannheim, Deutschland
ad			
50 µl	Aqua bidest.		

Tab. 2.6: Pipettierschema für die Nicktranslation

Dieser Ansatz wurde auf Eis in Eppendorf-Gefäße pipettiert und für etwa 75 Minuten bei 15°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei -20°C aufbewahrt, um eine weitere Verdauung durch die DNase zu verhindern.

Zur Überprüfung der Fragmentlänge wurde ein 1,5%iges Agarosegel mit einem entsprechenden Längenstandard (Lambda HindIII DNA-Marker, Fragmentlänge: 125-21.226 bp; MBI Fermentas; St. Leon-Rot, USA) erstellt. Bei Fragmentlängen von 500-900 Basenpaaren wurden die Proben nach Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 (SERVA; Heidelberg, Deutschland) nochmals bei 65°C für 10 Minuten inkubiert und anschließend bei -20°C gelagert.

2.2.4 Hybridisierung

Gleiche Teile nicktranslatierter Tumor- sowie Kontroll-DNA werden zusammen mit humaner COT-1-DNA in Ethanol präzipitiert, gewaschen und resuspendiert. Durch Hinzufügen von deionisiertem Formamid und Erhöhung der Temperatur für 7 min auf 76°C denaturiert das DNA-Gemisch.

Jeweils etwa 20 µl nicktranslatierte Tumor- bzw. Kontroll-DNA wurden mit insgesamt 60 µl humaner COT-1-DNA (Roche; Mannheim, Deutschland), 10 µl 3 M Natriumacetatlösung pH 4,8 (Merck; Darmstadt, Deutschland) sowie 300 µl 99%igem Ethanol (Roth; Karlsruhe, Deutschland) versetzt und bei -20°C über Nacht präzipitiert. Am nächsten Tag wurde bei 4°C und 14000 U/min für 30 Minuten zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet mit 800 µl 70%igem Ethanol bei Raumtemperatur gewaschen. Nach 10 Minuten wurde das Ethanol abpipettiert und das DNA-Pellet getrocknet. Die Resuspension des DNA-Pellets erfolgte daraufhin bei 37°C für 30 Minuten in 5µl deionisiertem Formamid (pH 7,5). Anschließend wurden 5 µl eines Hybridisierungspuffers (Tabelle 2.7) hinzugefügt und dann kurz gevortext und leicht anzentrifugiert, gefolgt von einer weiteren Inkubation von etwa 20 Minuten.

<u>Puffer</u>	<u>Inhaltsstoffe</u>	<u>Hersteller</u>
Hybridisierungspuffer	20% Dextransulfat 4 x SSC	Pharmacia Biotech; Freiburg, Deutschland

Tab. 2.7: Zusammensetzung des Hybridisierungspuffers

Die Denaturierung der Probe erfolgte bei 80°C denaturiert für 5 Minuten, gefolgt von einer etwa 90 minütigen Prähybridisierung.

Die 10 µl Hybridisierungsansatz wurden abschließend auf die bereits denaturierten sowie dehydrierten Metaphase-Chromosomen pipettiert. Der hybridisierte Abschnitt mit einem Deckglas versehen und mit Fixogumm (Marabu; Tamm, Deutschland) luftdicht verschlossen. Anschließend erfolgte in einer feuchten Kammer (Biometra; Göttingen, Deutschland) bei 37°C für 72 Stunden die Inkubation.

2.2.5 Fluoreszenzdetektion

Die Detektion erfolgt durch Bindung von FITC-Avidin an Biotin und Mouse-anti-DIG (Sigma) an Digoxigenin, gefolgt von zwei weiteren Antikörpern, um die Signalstärke zu erhöhen. Für die Biotin-markierten Nukleotide folgt die Bindung eines sekundären Antikörpers (Biotinylated anti-avidin; Vector), abschließend erneut FITC-Avidin. Das Signal der Digoxigenin-markierten Bereiche wird unter Zuhilfenahme von sekundären und tertiären Antikörpern verstärkt. An Mouse-anti-DIG bindet Rabbit anti-mouse TRITC (Sigma), an diesen wiederum Goat anti-rabbit TRITC (Sigma).

Die Fluorochrome senden, nach Bestrahlung mit kurzwelligem Licht, rotes (Kontroll-DNA) bzw. grünes (Tumor-DNA) Licht aus, dessen Intensität sich proportional zur hybridisierten DNA-Menge verhält.

Nach 72 Stunden Inkubationszeit wurden die Objektträger anschließend in Lösung A getaucht, die Deckgläser entfernt und die Präparate bei 45°C in Lösungen A und bei 60°C in Lösung B gewaschen (Tabelle 2.8), um nicht-hybridisierte DNA zu entfernen. Danach wurden je 120 µl Blockinglösung auf die Objektträger gebracht, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu inhibieren. Es folgte eine Inkubation für etwa 30 Minuten bei 37°C. Hinterher wurden 100 µl Detektionslösung auf jeden Objektträger gegeben und diese für mindestens 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Nun wurden die nicht gebundenen Antikörper durch Waschen in der Lösung C entfernt. Die Schritte des Aufbringens der Detektionslösung, verbunden mit dem Waschen in Lösung C wurden nun zwecks Bindung der sekundären und tertiären Antikörper je zweimal wiederholt. Abschließend wurden die Chromosomen zur späteren Identifizierung mit 20 µl DAPI (4',6'-Diamino-2-phenylindol; VECTOR; Burlingame, USA) gefärbt und die Objektträger mit Deckgläsern abgedeckt. Um das Ausbleichen der Fluorochrome durch Lichtexposition zu minimieren, wurden die Präparate im Dunkeln bei 4°C gelagert.

<u>Reagenz</u>	<u>Zusammensetzung</u>	<u>Hersteller</u>
Waschlösung A	50% deionisiertes Formamid 2 x SSC	SIGMA; St. Louis, USA
Waschlösung B	0,1 x SSC	SIGMA; St. Louis, USA
Waschlösung C	4 x SSC 0,1% TWEEN 20	
Blockinglösung	4 x SSC 3 % BSA 0,1% TWEEN 20	SIGMA; St. Louis, USA
Detektionspuffer-Stock	4 x SSC 1% BSA 0,1% TWEEN 20	
Primäre Detektionspuffer- Gebrauchslösung	1000 µl Detektionspuffer-Stock 5,0 µl Mouse anti-DIG 5,0 µl FITC-Avidin	VECTOR; Burlingame, USA
Sekundäre Detektionspuffer- Gebrauchslösung	1000 µl Detektionspuffer-Stock 5,0 µl Biotinylated anti avidin 5,0 µl Rabbit anti mouse TRITC	VECTOR; Burlingame, USA SIGMA; St. Louis, USA
Tertiäre Detektionspuffer- Gebrauchslösung	1000 µl Detektionspuffer-Stock 5,0 µl FITC-Avidin 5,0 µl Goat anti- rabbit TRITC	VECTOR; Burlingame, USA SIGMA; St. Louis, USA

Tab. 2.8: Zusammensetzung der für die Detektion benötigten Lösungen

2.2.6 Bildaufnahme

Die Bildaufnahmen entstanden bei 820-facher Vergrößerung mittels einer CCD-Kamera (Photometrics SENSYS; München, Deutschland), welche auf ein Fluoreszenz-Mikroskop (Axiovert 25; Zeiss; Jena, Deutschland) aufgebaut wurde. Es wurden je drei Bilder pro Metaphase photographiert. Die Anregung der Fluorochrome erfolgte bei 330-370 nm (DAPI), 505 nm (FITC) und 580-590 nm (Rhodamin), anschließend wurden die Emissionen bei Wellenlängen von 450-460 nm (DAPI), 535 nm (FITC) und 615-630 nm (Rhodamin) gemessen. Durch Überlagerung der drei Bilder bildete sich ein so genanntes Triple-Bild.

2.2.7 Auswertung

Der definitive Karyotyp wurde vom Verfasser der Arbeit und von Herrn Dr. Marian Grade, der große Erfahrung in der Auswertung und Interpretation von CGH-Experimenten hat (Ghadimi et al. 2003, Ghadimi et al. 2006, Grade et al. 2006, Grade et al. 2007, Camps et al. 2008) festgelegt.

Pro Patient wurden Chromosomen von acht bis zwölf repräsentativen Metaphasen mittels eines CGH-Analyseprogramms (CW-4000, Leica, Wetzlar) nach dem ISCN (Mitelman 1995) karyotypisiert. Anschließend wurden die gemessenen Fluoreszenzintensitäten von Tumor- (grünes Licht) und Kontroll-DNA (rotes Licht) graphisch dargestellt (Abbildung 2.2). Die schwarze Linie in der Mitte entspricht per Definition einem Ratio-Wert von 1, also einem ausgeglichenem Fluoreszenzverhältnis. Werte rechts dieser Linie entsprechen Sequenzgewinnen (vermehrte Intensität von grünem Fluoreszenzlicht, also grün), während Abweichungen nach links einen Verlust anzeigen (vermehrte Intensität von rotem Fluoreszenzlicht, also rot). Die Schwellenwerte für Verluste und Zugewinne wurden auf 0,8 bzw. 1,2 festgelegt. Sequenzgewinne mit einem Ratio-Wert von über 1,6 wurden als Amplifikation klassifiziert. Keine Berücksichtigung fanden Veränderungen der Telo- und Zentromere sowie der kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen.

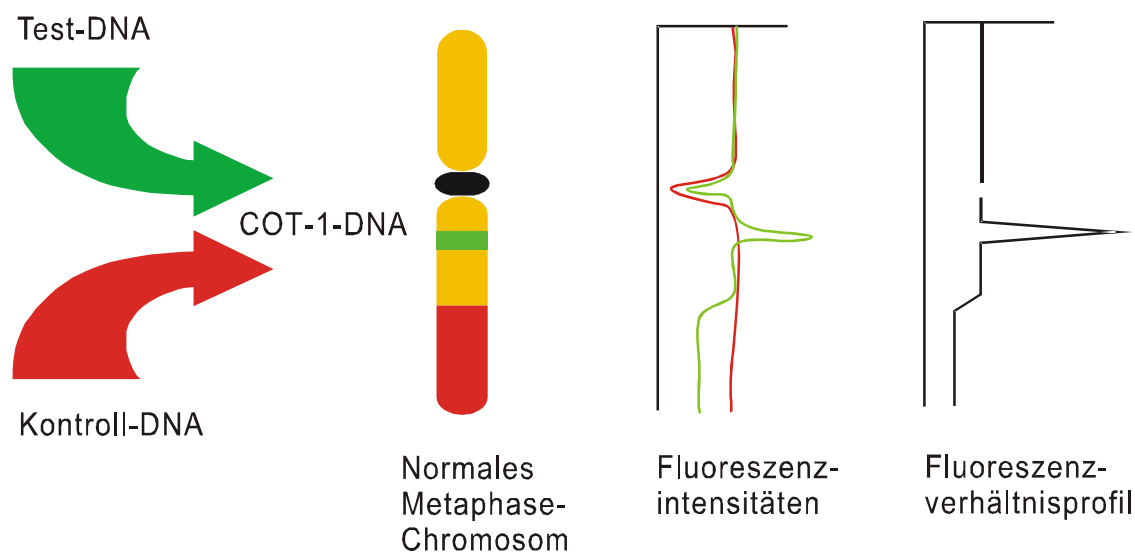


Abb. 2.3: Schematische Übersicht der Auswertung eines CGH-Experiments

Die Test-DNA (grüne Fluoreszenz) und die Kontroll-DNA (rote Fluoreszenz) werden im gleichen Verhältnis und unter Zusatz von COT-1-DNA auf normale Metaphase-Chromosomen hybridisiert. Die Fluoreszenzintensitäten werden getrennt für die Test-DNA und die Kontroll-DNA aufgezeichnet. Das Ratio-Profil wird berechnet und stellt die Durchschnittswerte von 8-12 Metaphasen dar.

2.2.8 Statistische Auswertung

Um in den veränderten Regionen Gewinne und Verluste zu identifizieren, wurde zu Beginn das menschliche Genom gemäß dem „International System of Cytogenetic Nomenclature“ in 320 Banden unterteilt. Die p-Arme der akrozentrischen Chromosomen 13, 14, 15, 21 und 22, die Zentromere sowie das X- und Y- Chromosom wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen, so dass ein endgültiges Set von 260 Chromosomenbanden verblieb. Jede Bande erhielt einen definierten numerischen Wert, der den jeweiligen Veränderungen entsprach (Verlust=-1, keine Veränderung=0, Zugewinn=1, Amplifikation=2). Diese Banden wurden dann anhand des Musters an Verlusten und Zugewinnen aller Tumorproben in 69 Bandengruppen eingeteilt, sprich diejenigen Banden wurden zusammengefasst, die das exakt gleiche Muster in allen Tumoren zeigten.

Um die Assoziation zwischen chromosomalen Veränderungen und dem Ansprechverhalten auf die Radiochemotherapie zu analysieren, wendeten wir dann die Wilcoxon-Statistik an. In einer Rangstatistik wurden die Werte nach Rang in

aufsteigendem Muster angeordnet, anstatt den eigentlichen Untersuchungswert zu nutzen. Diese Ränge wurden in einer Rangstatistik zusammengefasst und dienen als Basis weiterer Analysen, um Unterschiede des Medians beider Gruppen zu finden. Wir wendeten dann eine Permutationsmethode an, um die p-Werte für die Rangstatistik zu berechnen. Dieses Verfahren ist zuverlässiger als die klassischen Analysemethoden, wenn die Untersuchungswerte miteinander in Verbindung stehen. Zur Berechnung der p-Werte für jede (CGH-) Bandengruppe änderten wir wiederholt die Anordnung der Gruppenzugehörigkeit (Respons verglichen mit Non-Respons) und errechneten so die Häufigkeit, dass die Rangstatistik des daraus resultierenden Datensets extremer ist als zuvor.

3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, eine mögliche Assoziation zwischen genomischen Veränderungen von Rektumkarzinomen und deren Ansprechen auf eine neoadjuvante Radiochemotherapie zu identifizieren. Dazu analysierten wir chromosomale Aberrationen von 42 Adenokarzinomen des Rektums (cUICC II, n=15, cUICC III, n=27). Als Definition von Respons wählten wir die T-Level Reduktion. Tumoren mit einer Reduktion um mindestens ein T-Level wurden als Responder klassifiziert (prätherapeutische Bestimmung der Tumordinfiltration mittels rektaler Endosonographie; postoperative Tumordinfiltrationsbestimmung mittels histopathologischer Aufarbeitung). Somit teilte sich das Kollektiv in 21 Responder (Gruppe 1) und 21 Non- Responder (Gruppe 2) auf (vgl. Tab 3.1).

3.1 Chromosomale Veränderungen

Die Karyogramme (Abb. 2a und 2b) fassen die jeweiligen CGH-Experimente zusammen. Wie Abbildungen 3.1 und 3.2 zeigen, betreffen Zugewinne vor allem Chromosomarme 7p (40%), 8q (52%), 13q (67%), 20p (38%), sowie 20q (67%), während die häufigsten Verluste auf den Armen 8p (45%), 17p (74%), 18q (43%) zu finden waren. Diese Ergebnisse stimmen mit den publizierten Daten zum kolorektalen Karzinom überein (Ried et al. 1996; Ghadimi et al. 2003; Grade et al. 2006; Ghadimi et al. 2006, Grade et al. 2007).

Nur ein Tumor (P 37) zeigte keine genomischen Aberrationen, während ein bis 18 Chromosomen in den übrigen Tumoren verändert waren. Teilt man die Gesamtzahl der Kopieveränderungen (n=330) durch die Anzahl der Tumoren (n=42), so kommt man auf einen ANCA- Wert (Average Number of Copy Alterations) von 7,9. Das heißt, dass jeder Tumor im Mittel 7,9 chromosomale Aberrationen aufweist.

Amplifikationen fanden wir an den Chromosomenarmen 8q (n=2), 13q (n=13), 20p (n=2) und 20q (n=7) sowie an Chromosom 20 (n=2) und 22 (n=1). Regionale Amplifikationen waren auf Chromosom 8q23-ter und 12p13 lokalisiert.

3.2 Vergleich der zwei Gruppen

Vergleicht man die chromosomalen Unterschiede der 21 Responder mit denen der 21 Non-Responder, so weisen die therapiesensiblen Tumoren eine höhere Anzahl an chromosomalen Veränderungen auf (Abb. 2a und 2b). So fanden wir in der Gruppe der Responder ANCA-Werte von 8,9, im Kollektiv der Non-Responder ANCA-Werte von 6,8.

Unter Verwendung der p-Werte aus der Permutationsanalyse identifizierten wir darüber hinaus drei Bandengruppen, die p-Werte von $p < 0,05$ aufwiesen und somit einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen zeigten: 7q32-36 ($p=0.015$), 7q11-7q31 ($p=0.025$) und 20q11-20q13 ($p=0.040$). Wir berechneten dann, wie wahrscheinlich es ist, zufällig drei Bandenbereiche mit signifikant unterschiedlicher Kopieanzahl ($p < 0,05$) zu detektieren. Dazu permutierten wir die Gruppenkennzeichnung, d.h. jegliche Gruppenzugehörigkeit und Korrelation zwischen Responder und Non-Responder wurde aufgehoben. Daraufhin wiederholten wir die beschriebene Analyse (CGH p-Wert-Berechnung) und schätzten so die Wahrscheinlichkeit ab, drei oder mehr Banden mit p-Werten von kleiner als 0,05 zu erhalten. Der zugehörige p-Wert für diese Analyse betrug $p=0,21$, das heißt es kann nicht sicher ausgeschlossen werden, dass diese drei Bereiche der chromosomalen Veränderungen zufällig entdeckt wurden.

Patient	Sequenzgewinne	Sequenzverluste
Gruppe 1		
P1	5p, 7p, 8q, 13q21-ter, 20p, Xq	6p22-ter, 10p, 15, 17, 18p
P2	13, 20q	14, 17p, 18q
P4	20q	no
P6	7, 13, 20q++	4, 8p, 18q
P7	1q, 3q, 7p, 7q11-31, 13++, 20p, 20q++	8p, 11q, 14, 15, 18
P24	6p11-21.3, 8q, 13, 17q, 20q++	17p
P28	7, 13++, 20q++	4q, 9, 10p, 14, 15, 18, 20p
P30	1q, 2, 3q, 6, 7, 8q, 9, 11, 12p12-12q14, 13++, 14, 20, X	8p, 12q23-ter, 15, 17, 18
P31	2, 5p, 6q, 7, 8q, 11, 13++, 20p, 20q++, X	5q, 8p, 17p, 18
P34	6q11-22, 8q, 13, X	17, 18p, 22
P36	1q, 2p, 4q32-ter, 7, 12p, 13	1p, 2q, 4p, 4q11-31.3, 17p, 18, 22
P38	2q23-33, 6p12-q23, 8q, 10q21-22, 11, 13	17
P39	2, 8q, 11, 13++, 20++, X	8p, 17, 18q
P41	4, 5, 8q, 13q21-ter, 20p++, 20q, X	6p, 14, 17, 18q, 22
P42	2, 8q, 13q21-ter, 20p, Xq	8p, 17p, 21
P43	7, 8q, 13, 20q	8p, 17p, 18, 21q22
P45	5p, 7, 8q, 13++, 19p, 20++, X	5q, 15, 17, 18q
P46	2, 7, 8q++, 13, 20q++	8p, 17p, 18, 22
P48	13, 20q, X	17p, 18q22-ter
P50	1q, 7, 8q, 13q++, 19, 20q	4, 8p, 15, 17p, 18
P51	1q22-ter, 3q, 7, 8q, 9p, 13, 20, X	8p, 14, 17p, 18q

Patient	Sequenzgewinne	Sequenzverluste
Gruppe 2		
P10	2q32-ter, 8q23-ter++, 9, 20p, 20q++	4, 5, 6q, 8p, 15, 17, 18q
P11	8q, 13	6p, 8p, 9q22-ter, 10p, 15, 17, 20, 21
P12	no	17
P13	4	17, 20q
P14	8q, 13	10p, 12p, 12q23-ter, 17
P15	1q, 7p, 9q, 13, 16, 19, 20	4, 18q
P17	9q, 20q	9p
P20	5p, 8q, 13, 20	8p, 9p, 10p, 18q22-ter, 19p
P21	7, 8q, 13, 20q	8p, 12q24.3-ter, 14, 15, 17p, 18p, 21q22
P22	1q, 2, 3, 5, 6p, 8, 12, 13++, 14, 20p++, 20q, 21, Xp	17, 18p
P23	1q, 4q, 9, 12p13++, 13++, 20, Xq	1p, 6q11-16, 11, 14, 17, 18
P26	7p, 13, Xp, Xq11-21	17p, 18q
P29	No	17
P32	2q22-34, 8q, 11, 13++, 22++, X	8p, 17, 18q21-ter
P33	3, 5p, 6, 7p, 8q, 9, 11, 12q14-22, 13++, 20p, 20q++, Xq	8p, 17p, 18, 19, 22
P35	8q, 20	8p, 15, 18q
P37	no	no
P40	5q14-23, 6q11-22, 7p, 8q++, 9p, 11, 12p, 13++, 20, X	8p, 15, 17p, 18q, 22
P44	6q11-22, 7, 8q, 13q21-ter, 20q, X	8p, 17, 18q12-ter, 21q22, 22q12-ter
P47	1q, 8q, 12p	8p, 10q22-ter, 17
P49	1q, 5q, 7q11-31, 12q, 13q++, 20q, X	8p21-ter, 18q21-ter

Tab. 3.1: Zusammenfassung der chromosomalen Aberrationen

Diese Tabelle fasst die chromosomalen Aberrationen aller untersuchten Tumoren zusammen. Die beobachteten Veränderungen wurden nach dem ISCN (Mitelman 1995) klassifiziert.

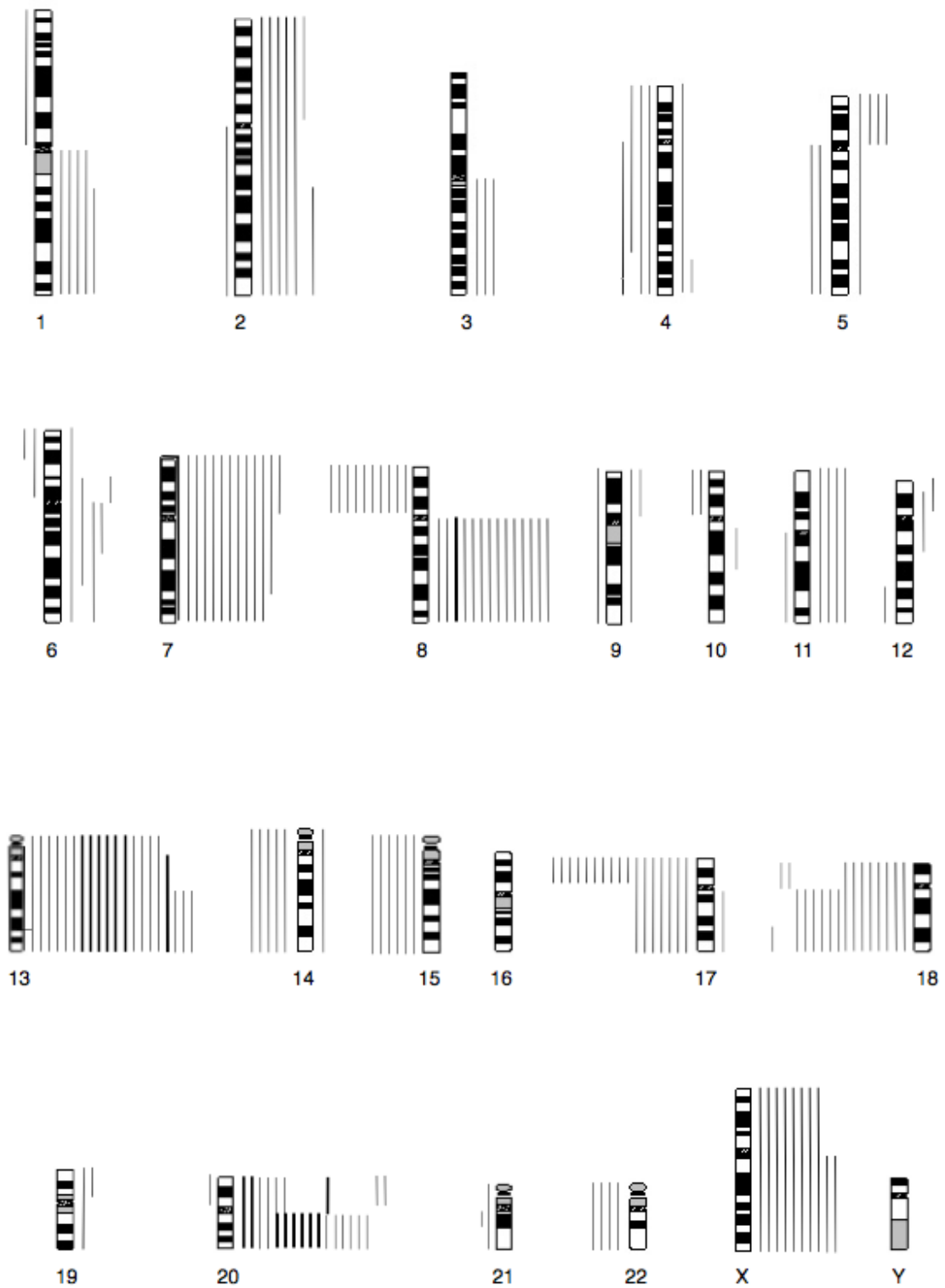


Abb. 3.1: Chromosomale Aberrationen der Gruppe 1 (Responder)

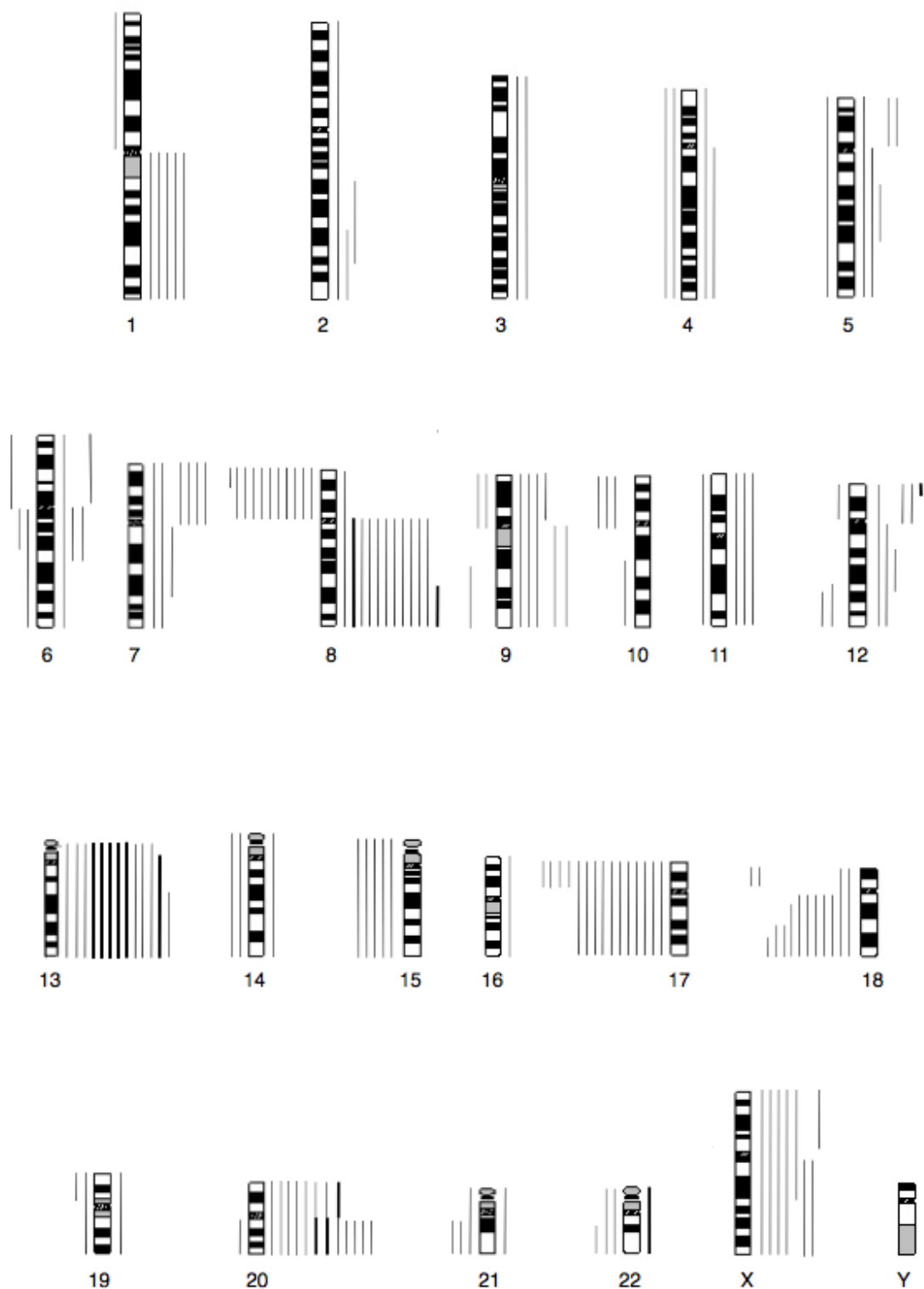


Abb. 3.2: Chromosomale Aberrationen der Gruppe 2 (Non-Responder)

Abb. 3.1 - 3.2: Summenkaryogramme der chromosomalen Aberrationen

In den Summenkaryogrammen sind die humanen Chromosomen sowie das zugehörige chromosomale Bandenmuster dargestellt. Die Linien links der Chromosomen repräsentieren einen Sequenzverlust,

während die Linien rechts der Chromosomen einen Sequenzgewinn anzeigen. Zudem stellen die kräftigen Linien Amplifikationen dar.

3.3 Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die Tumoren der beiden Gruppen in zwei wesentlichen Merkmalen unterschieden. Erstens zeigte die Gruppe der Responder eine höhere Frequenz chromosomaler Veränderungen pro Tumor als die Gruppe der Non-Responder (8,9 versus 6,8). Zweitens zeigte sich im Vergleich der beiden Gruppen, dass die Responder signifikant häufiger Zugewinne der Banden 7q32-7q36, 7q11-7q31 und Amplifikationen der Region 20q11-20q13 aufweisen ($p < 0,05$). Allerdings kann nicht sicher ausgeschlossen werden, dass diese drei chromosomalen Aberrationen zufällig entdeckt wurden ($p = 0,21$).

4 Diskussion

4.1 Klinische Problematik

Adenokarzinome des Rektums zählen zu den häufigsten malignen Tumoren der westlichen Welt. In Kombination mit der Chirurgie senkt die neoadjuvante Radiochemotherapie die lokale Rezidivrate (CAO/AIO/ARO-94-Studie, Sauer 2004) und gilt seitdem in Deutschland als Goldstandard in der Behandlung lokal fortgeschrittener Rektumkarzinome (UICC-II/-III Stadien). Allerdings reicht das Spektrum des Ansprechens auf eine solche kombinierte Therapie von komplettem Respons bis zur Resistenz. Eine prätherapeutische Einschätzung des Respons wäre daher wichtig für eine individuelle Therapieplanung. Patienten mit resistenten Tumoren könnten dann zum Beispiel einer aggressiveren zytostatischen Behandlung mit 5-FU und Oxaliplatin zugeführt werden (Rödel C et al. 2003; Gerard et al. 2003; Rödel C et al. 2007). Alternativ könnten Non-Responder primär operiert werden, um ihnen die Nebenwirkungen einer möglicherweise ineffektiven präoperativen Radiochemotherapie zu ersparen (Nelson et Sargent 2001, Smith et al. 2006).

4.2 Überblick über die bisher publizierten Studien

Es existiert eine Vielzahl an Studien, in denen nach prädiktiven Markern gesucht wurde, um eine prätherapeutische Stratifizierung von Patienten in Responder und Non-Responder zu ermöglichen. Ein Vergleich der einzelnen Ergebnisse ist allerdings sehr problematisch, da uneinheitliche, nicht standardisierte Stagingverfahren und Therapien verwendet wurden und zudem die Definition von Respons variiert. Zum prätherapeutischen Staging der Tumoren verwendeten einige Verfasser die endorektale Sonographie (endorektaler Ultraschall, Okonkwo et al. 2001, Saw et al. 2003, Spitz et al. 1997), während andere Gruppen die Computertomographie (Scott et al. 1998, Diez et al. 2003) oder aber beide Methoden nutzten (Rödel F et al 2002, Rödel C et al. 2002). Komplizierend kommt hinzu, dass teilweise selbst innerhalb eines Kollektivs das Staging mit unterschiedlichen Methoden durchgeführt wurde

(Rau et al. 2003). Bei Abe 2001 fehlt gar die Angabe zur Stagingmethode. Ferner weisen einige Studien innerhalb ihrer Kollektive heterogene Therapiestrategien auf, zum Beispiel 5-FU mit oder ohne Oxaliplatin (Rödel C et al. 2002, Rödel F et al. 2002), Radiochemotherapie mit oder ohne Hyperthermiebehandlung (Rau et al. 2003), Radiochemotherapie oder nur Bestrahlung (Esposito et al. 2001, Saw et al. 2003). Auch die variable Definition des Respons kompliziert die Vergleichbarkeit der bisher publizierten Studienergebnisse. Einige Autoren wählten ein T-Level Downsizing (Saw et al. 2003; Qui et al. 2000) oder die Reduktion des Tumordurchmessers bzw. Tumorumfanges zur Einschätzung des Respons (makroskopische Parameter). Andere Verfasser verwendeten histomorphologische Regressionsmodelle (mikroskopische Parameter), zum Beispiel die Dworak- (Rödel C 2002, Esposito et al. 2001, Jakob et al. 2005) oder Gavioli-Klassifikation (Günther et al. 2003), oder aber modifizierte Modelle (Elsaleh et al. 2000, Diez et al. 2003). Gleichfalls kamen klinische Verlaufsdaten wie Fünf-Jahres-Überleben oder Fünf-Jahres-Rezidivfreiheit als Parameter fürs klinische Ansprechen zur Anwendung (Rödel F et al. 2002).

4.2.1 Immunhistochemische Studien

Im Folgenden sollen die bisher publizierten Daten zusammengefasst und diskutiert werden. Fast alle bisher publizierten Studien zur Vorhersage des Ansprechens von Rektumkarzinomen auf eine neoadjuvante Radiochemotherapie basierten auf immunhistochemischen (IHC) Untersuchungen.

Das Protein p53, welches als „Wächter des Genoms“ eine zentrale Rolle in der Karzinogenese spielt, wurde am häufigsten auf seine Eignung als prädiktiver Faktor untersucht. Rödel C et al. (2002) analysierten prätherapeutische Biopsien von 43 Patienten. Allerdings konnten sie keine Korrelation zwischen der p53-Expression und dem Ansprechverhalten der Tumoren (Respons im Sinne der Dworak-Klassifikation) entdecken. Es bleibt anzumerken, dass sieben Patienten mit besonders weit fortgeschrittenen Tumoren neben der Standardtherapie (5-FU-basierte Langzeit-Radiochemotherapie) zusätzlich noch Oxaliplatin erhielten. Zahlreiche Studien bestätigen diese fehlende Korrelation. So untersuchten Diez et al. (2003) 73 Patienten

mittels prätherapeutisch gewonnener Biopsien. Allerdings wählten Sie als Definition des Respons das Vorhandensein oder Fehlen von Tumorzellen in Lymphknoten und bildeten vier Klassen, basierend auf dem Anteil verbliebener Tumorzellen. Elsaleh et al. (2000) fanden anhand eines Kollektivs von 48 Patienten ebenfalls keine Korrelation, wählten jedoch bei der Definition des Respons drei Grade, basierend auf der makroskopischen Reduktion der Tumorgroße mittels digital rektaler Untersuchung, Koloskopie, endorektalem Ultraschall oder CT. Zu der gleichen Schlussfolgerung kamen Okonkwo et al. (2001) bei der Untersuchung von 25 Biopsien. Es muss allerdings kritisiert werden, dass in der Veröffentlichung generell statistische Angaben wie zum Beispiel p-Werte fehlen. Auch die Studie von Qui et al. (2000), mit Analyse von 72 prätherapeutischen Biopsien, bestätigt das Fehlen einer prognostischen Eignung von p53. Anzumerken bleibt jedoch, dass nur etwa zwei Drittel der Patienten (51 von 72 Patienten) eine kombinierte Radiochemotherapie erhielten. Kim et al. (2001) analysierten prätherapeutische Biopsien von 23 Patienten. Auch sie konnten keinen prognostischen Wert für die p53 Expression in Bezug auf das Ansprechverhalten aufzeigen. Neben T-Level-Abnahme wählten sie im Unterschied zu vielen anderen Arbeiten als Respons-Definition teilweise auch die Abnahme des Tumolvolumens um mehr als 50%. Auch Rau et al. (2003) konnten keine besondere Bedeutung von p53 nachweisen. Allerdings ist auch hier anzuführen, dass 31 von 66 Patienten zusätzlich zur Radiochemotherapie eine lokale Hyperthermiebehandlung erhielten. Im Kollektiv von Rödel F et al. (2002) erhielten neun Patienten zusätzlich Oxaliplatin, außerdem wählten sie krankheitsfreies Überleben als Responsdefinition. Bei Betrachtung der p53 Expressionslevel von insgesamt 52 Patienten konnte keine prognostische Aussagekraft bezüglich des Ansprechverhaltens auf neoadjuvante Therapie beschrieben werden. Saw et al. (2003) untersuchten insgesamt 60 Patienten, wobei bei 48 Individuen die Biopsie vor Therapiebeginn entnommen wurde, hingegen bei den übrigen 12 Patienten posttherapeutisch aus dem Resektat. Zudem erhielten 35 Patienten eine kombinierte Radiochemotherapie, während 25 Patienten nur bestrahlt wurden. Auch diese Arbeitsgruppe fand keine Beziehung zwischen Expressionslevel von p53 und Respons der individuellen Tumoren. Scott et al. (1998) betrachteten 24 prätherapeutisch untersuchte Patienten und zeigen in ihren Resultaten eine Übereinstimmung mit den oben genannten Studien. Zur Responseinteilung wurden basierend auf der verbleibenden Tumorgroße vier Gruppen gebildet, das Staging fand

mittels CT statt. Sakakura et al. (1998) präsentierten ebenfalls ein ähnliches Ergebnis, allerdings unterscheidet sich die Studie von den bisher dargestellten dadurch, dass die Biopsien 5-10 Tage nach Therapiebeginn entnommen wurden. Esposito et al. (2001) entnahmen bei 38 Patienten je eine Biopsie prä- und posttherapeutisch. Bei der Betrachtung der p53 Expressionsdaten vor Therapiebeginn und dem daraus resultierendem Ansprechverhalten individueller Tumoren konnte ebenfalls keine Verbindung nachgewiesen werden. Anzumerken bleibt, dass fünf Patienten mittels alleiniger Radiotherapie behandelt wurden, während die übrigen 33 eine kombinierte Radiochemotherapie erhielten. Einzig Spitz et al. (1997) konnten in ihrer Untersuchung an 42 Biopsien eine Korrelation zwischen p53 Expression und klinischem Respons nachweisen, wobei eine niedrige p53 Expression mit einem gutem Ansprechen assoziiert war.

4.2.2 Andere Proteine

Survivin, lokalisiert auf Chromosom 17 gehört zu einer Familie von Apoptose inhibierenden Genen. Zum einen blockt es Caspase-3 und Caspase-7, inhibiert aber ebenfalls den Zelltod durch Modulation des Fortschreitens im Zellzyklus sowie Verhinderung der Zellteilung und Veränderung von Signal-Transduktions-Wegen.

Während Survivin im Normalgewebe eines Erwachsenen nur eine minimale Expression zeigt (Alitieri 2003) findet sich in diversen Malignomen eine deutlich erhöhte Expression (Wang et al. 2007). Rödel F et al. (2002) konnten darüber hinaus für Patienten mit Rektumkarzinom eine Assoziation der Survivin-Expression mit einem deutlich verbesserten krankheitsfreien Überleben nach neoadjuvanter Therapie nachweisen.

Das mutmaßliche Tumorsupressor-Gen p27 ist Teil der cyclin-depend kinase (CDK) Inhibitorfamilie und nach aktuellem Wissensstand beteiligt an Zelldifferenzierung sowie Apoptose (Katayose et al. 1997). Es wurde von Esposito et al. (2001) und Günther et al. (2003) untersucht. Während Erstere durch Untersuchung von 38 prätherapeutischen Proben eine Korrelation zwischen hoher p27 Expression und gutem Therapie-Ansprechen fanden, konnten Günther et al. dieses Resultat bei Betrachtung von 42 Patienten nicht bestätigen. Die beiden Studien lassen sich gut vergleichen, da die Größe der Kollektive ähnlich ist und Untersuchungs- sowie

Stagingmethode mit IHC und dem endorektalen Ultraschall gleich gewählt wurden. In ihren Ergebnissen widersprechen sie sich jedoch wesentlich.

Iba T et al. (1998) zeigten einen Zusammenhang zwischen verminderter Expression der Thymidylatsynthetase (TS) und damit verbundenem besseren Ansprechverhalten auf präoperative 5-FU basierte Radiochemotherapie bei Magen- und Kolonkarzinomen. Die Thymidylatsynthetase (TS) katalysiert die Transformation von dUMP in dTMP. Sie ist somit ein essentieller Faktor der DNA Replikation. Es gibt Hinweise, dass die TS für das Ansprechen von Kolonkarzinomen auf eine adjuvante Chemotherapie von Relevanz zu sein scheint. Basierend auf diesem Wissen untersuchten Okonkwo et al. (2001), Saw et al. (2003) sowie Jakob et al. (2005) TS-Expressionslevel im Rektum. Alle drei Arbeitsgruppen kommen zu dem Schluss, dass eine geringe Expression von TS mit gutem Respons auf Therapie korreliert. Die Publikationen lassen sich zwar aufgrund des analogen Stagings mittels endorektalen Ultraschalls gut vergleichen und entsprechen sich in ihren Resultaten, allerdings erhielten 25 der 60 Patienten des Kollektivs von Saw et al. (2003) nur isolierte präoperative Bestrahlung während der andere Teil der Gruppe kombinierte Radiochemotherapie erhielt. Desweiteren unterscheiden sich die drei Publikationen durch die Definition des Ansprechverhaltens. Hinzu kommt, dass im Kollektiv von Okonkwo et al. (2001) ebenfalls 50% der Non-Responder ein Fehlen von TS zeigen. Jakob et al. erweiterten ihre Analyse noch um die Analyse der Proteine Thymidin-Phosphorylase (TP) und Dihydropyrimidin-Dehydrogenase. (DPD). Diese beiden Proteine sind Bestandteile des 5-FU-Metabolismus. Während ein vermindertes Vorhandensein von TP statistisch signifikant ($p=0.02$) mit einem schlechten Ansprechverhalten korrelierte, konnte für DPD-Werte kein prognostischer Nutzen entdeckt werden.

Für das protektive und die Apoptose hemmende Protein bcl-2, welches eine wichtige Rolle im Zellzyklus spielt, konnte in einem Großteil der Studien keine Funktion als prognostischer Faktor gefunden werden (Okonkwo et al. 2001, Scott et al. 1998, Rödel C et al. 2002, Kim et al. 2001). Einzig Qui et al. (2000) erwähnten in ihrer Veröffentlichung, dass die vermehrte Expression von bcl-2 und p21 mit verbessertem Respons assoziiert ist, aber auch das singuläre Vorhandensein von p21 wurde als

prognostischer Faktor für verbesserten Respons beschrieben. Rau et al. (2003) widersprechen diesem Ergebnis.

Basierend auf dem Wissen, dass proliferierende Zellen besonders sensibel auf Radiochemotherapie reagieren, suchten viele Arbeitsgruppen nach dem Vorkommen spezifischer Marker der Proliferation. So wurde das Ki67-Antigen auf seine mögliche Funktion als prädiktiver Marker überprüft. Kim et al. (2001) beschreiben einen verbesserten Respons bei erhöhten Werten von Ki-67, allerdings sprechen die Ergebnisse einiger anderer Studien (Rau et al. 2003, Rödel C et al. 2002) gegen eine solche Verbindung. Ergänzend wurde das Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) als ein Indikator für die Menge für sich teilenden- und wachsenden Zellen untersucht. Diez et al. (2003) fanden einen Zusammenhang zwischen erhöhten PCNA Werten und verbessertem Respons.

4.2.3 Hochdurchsatz-Analysen

Wie die obige Zusammenfassung zeigt, bietet die Analyse einzelner Gene bisher nicht zufriedenstellende Ergebnisse. Bisher wurden erst wenige Hochdurchsatz-Screening-Analysen publiziert:

Ghadimi et al. (2005) versuchten Marker zur prätherapeutischen Einschätzung des Respons zu separieren. Sie untersuchten mit Hilfe von Genexpressions-Microarrays Biopsien von 30 Rektumkarzinompatienten. Ziel der Untersuchung war es, ein charakteristisches Set an Genen zu identifizieren, welche in den Gruppen „Responder“ und „Nicht-Responder“ unterschiedlich exprimiert waren. Für 54 Gene zeigten sich signifikant unterschiedliche Expressionslevel in beiden Gruppen ($P < 0,001$). Unter diesen Genen befanden sich Wachstumsfaktoren, Apoptose-, Zellproliferations- sowie Signaltransduktionsgene. Nachfolgend konnte das Ansprechverhalten der Tumoren in 83 % der Fälle korrekt vorausgesagt werden ($p = 0.02$).

Watanabe et al. (2005) untersuchten mittels Genexpressions-Microarrays ein Kollektiv von 52 präoperativ radiotherapierten Patienten. Sie fanden für 33 Gene signifikant unterschiedliche Expressionslevel in beiden Gruppen. Ebenfalls konnte so

das Ansprechverhalten der Tumoren in 82,4% korrekt vorausgesagt werden ($P < 0.05$). Auch hier fanden sich Wachstumsfaktoren, Apoptose-, Zellproliferations- sowie Signaltransduktionsgene. Die Apoptose-Induktoren (Lumican, Thrombospondin, Galectin-1) zeigten erhöhte Expressionswerte in der Gruppe der „Responder“, während Apoptoseinhibitoren (Cyclophilin 40 und Glutathion Peroxidase) in der Gruppe der „Nicht-Responder“ höher exprimiert waren.

Auch Kim I et al. (2007) bestätigen die Möglichkeit der Voraussage des Ansprechverhaltens auf eine Radiochemotherapie. Bei Betrachtung der Expression von 95 ausgewählten Genen in prätherapeutischen Biopsien von 15 Patienten mit lokal fortgeschrittenem rektalem Karzinom, konnte in dieser Gruppe die Reaktion der Tumoren auf Radiochemotherapie in 87% korrekt vorausgesagt werden.

Rimkus et al. (2008) lieferten übereinstimmende Ergebnisse mit o.g. Studien. Sie wählten prätherapeutische Biopsien von 43 Patienten mit lokal fortgeschrittenem rektalem Karzinom zur Microarray CGH und erstellten so Genexpressionsprofile. Für 42 Gene, meist Kern- oder Apoptose-assoziiert, fanden sich auch in diesem Kollektiv signifikant veränderte Expressionslevel. Das Ansprechverhalten eines Tumors auf die Radiochemotherapie konnte für die Responder-Gruppe in 71% der Fälle korrekt vorausgesagt werden, während dieser Wert für das Kollektiv der Nicht-Resonder bei 86% lag.

Untersuchungen auf DNA-Ebene gab es zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit nicht und existieren bis dato nach wie vor nicht. Daher war es unser Ziel zu erforschen, ob ein charakteristisches Muster chromosomaler Aberrationen auf DNA Ebene zu finden ist, anhand dessen man das Ansprechverhalten von Rektumkarzinomen voraussagen kann. Hierzu untersuchten wir Biopsien von 42 Patienten mit rektalen Adenokarzinomen mittels CGH (Comparative Genomic Hybridization).

4.3 Interpretation der Ergebnisse

Wie die Abbildungen 3.1 und 3.2 zeigen, betreffen Zugewinne vor allem Chromosomarme 7p (40%), 8q (52%), 13q (67%), 20p (38%) sowie 20q (67%), während die häufigsten Verluste auf den Armen 8p (45%), 17p (74%), 18q (43%) zu finden waren. Diese Ergebnisse stimmen mit den publizierten Daten zum kolorektalen Karzinom überein (Ried et al. 1996; Ghadimi et al. 2003; Grade et al. 2006; Ghadimi et al. 2006, Grade et al. 2007)

Vergleicht man die chromosomalen Unterschiede der 21 Responder mit denen der 21 Non-Responder, so weisen die therapiesensiblen Tumoren eine höhere Anzahl an chromosomalen Veränderungen auf (Abb. 2a und 2b). So fanden wir in der Gruppe der Responder ANCA-Werte von 8,9, im Kollektiv der Non-Responder ANCA-Werte von 6,8.

Weiterhin identifizierten wir in der Gruppe der therapiesensiblen Tumoren drei Bandenbereiche, die signifikant höhere Veränderungen zeigten als im Kollektiv der therapieresistenten Tumoren: Zugewinne der Regionen 7q32-7q36 ($p=0.015$), 7q11-7q31 ($p=0.025$) und Amplifikationen der Region 20q11-20q13 ($p=0.040$). Allerdings besteht die Möglichkeit, dass diese Veränderungen zufällig detektiert wurden. Vom aktuellen Standpunkt gesehen, ist es daher unsicher, ob diese genomischen Veränderungen tatsächlich biologische Unterschiede zwischen den beiden Gruppen charakterisieren oder lediglich Artefakte darstellen.

Begründungen, warum keine signifikanten Unterschiede gefunden wurden, bleiben spekulativ. Einerseits wäre es theoretisch denkbar, dass es keine genomischen Veränderungen gibt, anhand derer sich therapiesensible von nicht therapiesensiblen Tumoren unterscheiden. Das erscheint eher unwahrscheinlich, da viele relevante klinische Patienteneigenschaften/-merkmale mit eindeutigen DNA Veränderungen korreliert sind. Beispielsweise untersuchten Ghadimi et al. 2003 50 kolorektale Karzinome mit Hilfe der CGH hinsichtlich genomischer Unterschiede zwischen lymphogen metastasierten und nicht metastasierten Tumoren und konnten zeigen, dass lymphogen metastasierte Karzinome eine deutlich höhere Inzidenz an Sequenzgewinnen dieser Region aufweisen als nodal negative Tumoren der gleichen T-Kategorie ($p=0,0016$). Schleicher et al. (2007) entdeckten bei der Analyse von 33 Pankreastumoren mittels CGH eine signifikante Korrelation zwischen einem

Zugewinn der chromosomalen Region 8q ($p=0,029$) und einer verminderten Überlebenszeit. Als prognostisch ungünstig stellte sich auch ein chromosomaler Zugewinn der Region 2q24 bei Hepatoblastom-Patienten dar (Kumon et al. 2001) dar. Andererseits wäre es möglich, dass das relativ geringe Auflösungsvermögen der Metaphasen CGH ein Grund für die fehlende Signifikanz ist. Allerdings konnten mittels dieser Methode bereits für Lymphome und Leukämien neue Subtypen mit klinischen und prognostischen Unterschieden separiert werden (Gebhardt 2005).

Trotzdem sollte in Betracht gezogen werden, dass höher auflösende Technologien genomische Veränderungen mit einer deutlich erhöhten statistischen Signifikanz darstellen könnten. Folglich wurde bereits begonnen, diese 42 Tumoren mittels hochauflösender Oligonukleotid-Microarray CGH (array CGH) zu analysieren.

4.4 Analyse der chromosomalen Regionen

Obwohl sichere statistische Evidenz fehlt, dass die drei Bandenbereiche, in denen sich Responder von Nicht-Respondern unterscheiden, für deren unterschiedliches Ansprechverhalten auf eine Radiochemotherapie verantwortlich sind, so ist es dennoch interessant, die Gene zu betrachten, die sich auf diesen Abschnitten befinden, da diese im Verdacht stehen, ursächlich an der ungleichen Therapiesensibilität der Tumoren beteiligt zu sein. In allen drei Bandenabschnitten zeigten sich in den CGH Analysen im Kollektiv der Responder deutlich höhere chromosomale Zugewinne als im Kollektiv der Nicht-Responder. Im Folgenden sollen einige relevante dort lokalisierte Gene beschrieben werden.

4.4.1 Bandenbereich 7q21-31

CDK6

Viele Defekte in Krebszellen sind auf Moleküle zur Regulation des Zellzyklus zurückzuführen. Eine wichtige Rolle spielen hierbei die cyclin dependent kinases (CDK). Diese steuern neben diversen Enzymaktivitäten physiologischerweise auch die Aktivität des Tumorsuppressorgens Rb (retinoblastoma protein), welches Eintritt und Durchlaufen des Zellzyklus reguliert (Lucas et al. 2004). In vielen Tumoren

kommt es zur Inaktivierung von Rb durch Hyperaktivierung von CDKs und somit zu unkontrolliertem Wachstum. Die Inaktivierung von CDKs ist daher immer wieder Angriffspunkt von Therapieversuchen, wie z.B. mittels Alkalioden (Sausville et al. 2000).

TRRAP (transformation-transactivation domain associated protein) ist Bestandteil mehrerer Multiprotein-Acetyltransferase Komplexe (z.B. TIP48/49, TIP60 HAT) (Nikiforov et al. 2002) und sowohl an der Transkriptionsregulierung als auch an der DNA-Reparatur beteiligt. Liu et al. (2003) zeigten, dass durch gemeinsame Stimulation einer Myc Bindungsdomäne sowohl TRAPP als auch die humane Histon-Acetyltransferase (HAT) GCN5 als wichtige Kofaktoren an der Myc-vermittelten Zelltransformation beteiligt sind. Des Weiteren verhält sich TRRAP in in-vitro Versuchen synergistisch zum Tumorsuppressor p53 (Penny et al. 2002, Ard et. Al 2002).

4.4.2 Bandenbereich 7q32-36

Untersuchungen an Zellreihen sowie an Tumormaterial von Mammakarzinomen zeigen, dass die E3 Ubiquitin- Ligase Smurf1 (SMAD ubiquitin regulator receptor factor 1) durch Regulation der RhoA-GTPase entscheidend die Mobilität von Tumorzellen steuert (Sahai et al. 2007, Morén et al. 2005). Eine weitere Funktion beschreiben Ebisawa et al. 2001 anhand von Zellreihenstudien. Durch Smurf1 kommt es zur Induktion der inhibitorischen SMADs (SMAD6, SMAD7), diese binden an Zytokine der TGF- β Familie und entwickeln so ihre regulatorische Wirkung.

4.4.3 Bandenbereich 20q12-13

BORIS (Brother of the regulator of imprinted sites) ist Mitglied der Familie der „cancer/testis antigen“ Gene. Normalerweise werden diese C/T Gene nur in Spermatozyten exprimiert, allerdings sind sie ebenfalls in diversen Malignomen wie z.B. Kolon-, Brust- Lungen-, Prostata-, Magen- Ösophaguskrebs zu finden (Loukinov et al. 2006). BORIS ähnelt in seiner Struktur dem an zahlreichen Zellfunktionen beteiligten Transkriptionsfaktor CTCF und enthält eine beinahe identische 11 Zink-

Finger Domäne wie dieser (Loukinov et al. 2002). Durch einen daher möglichen Ersatz von CTCF, z.B. auf der Promotorregion durch BORIS, kann es zum Aufheben des Ruhezustandes und somit zur Änderung der normalen Expression vieler Gene (nicht nur C/T Gene) kommen (Hong et. al. 2005).

In der von D'Arcy et al. (2006) veröffentlichten Studie zeigten 88,5% aller Brustkrebspatienten einen signifikant erhöhten Immunoreactivity Score (IRS) für BORIS in den untersuchten Granulozyten. Die Zunahme des IRS korrelierte mit zunehmender Tumorgröße. Risinger et al. (2007) fanden in 77% der untersuchten mesodermalen sowie endodermalen Uteruskarzinome eine Expression von BORIS, während andere C/T Gene (MAGEA9, DSCR8) keine spezifische Erhöhung aufwiesen.

Ebenfalls in diesem Bandenbereich liegt **WISP-2** (WNT-1-inducible signaling pathways protein 2). Es ist Mitglied der CCN Familie von Wachstumsfaktoren als Teil der Untergruppe „connective tissue growth factor“ (CTGF Familie). Erhöhte Expressionslevel finden sich neben Mamma- auch in kolorektalen Karzinomen (Banerjee et al. 2003). Bei der Untersuchung 25 kolorektaler Adenokarzinome wurde in 92% ein zwei- bis vierfacher Wert für WISP-2, verglichen mit der Kontrollgruppe zehn gesunder Probanden, gefunden (Pennica et al. 1998). Des Weiteren besteht eine Assoziation zwischen hoher Expression von WNT-1 und deutlich erhöhter Induktion von WISP-2. Diese Verbindung zwischen WISPs und der WNT Familie ist interessant, da WNTs eine zentrale und komplexe Rolle in der Steuerung diverser zellulärer Entwicklungsprozesse spielen und aufgrund dieser bedeutungsvollen Position im Zellzyklus auch an der Entstehung sporadischer und familiärer Kolonkarzinome (APC) beteiligt sind (Bodmer 2006).

4.5 Folgeexperimente

Wir konnten also zeigen, dass therapiesensible Karzinome wesentlich häufiger Zugewinne der chromosomalen Bandenbereiche 7q32-7q36 ($p=0.015$), 7q11-7q31 ($p=0.025$) und Amplifikationen der Region 20q11-20q13 ($p=0.040$) aufweisen. Da allerdings aufgrund des multiplen Testens die Möglichkeit besteht, dass diese Veränderungen zufällig detektiert wurden und nicht durch wirkliche biologische Unterschiede zwischen Respondern und Nicht-Respondern bedingt sind, werden wir

diese Karzinome nun mittels einer hochauflösenden Methode (Oligonukleotid-Microarray CGH) untersuchen.

5 Zusammenfassung

Adenokarzinome des Rektums zählen zu den häufigsten malignen Tumoren der westlichen Welt. In Kombination mit der Chirurgie ist die neoadjuvante Radiochemotherapie Behandlungsstandard. Allerdings reicht das Spektrum des Ansprechens auf neoadjuvante Therapien von komplettem Response bis zu kompletter Resistenz. Es besteht daher ein außerordentliches klinisches Interesse, bereits zum Zeitpunkt der Diagnose, zur prätherapeutischen Einschätzung und Therapieplanung, eine sichere Aussage über das Ansprechverhalten des Tumors treffen zu können. Bisher konnte jedoch kein klinisch akzeptierter Standard zur prätherapeutischen Stratifizierung in Bezug auf eine neoadjuvante Radiochemotherapie etabliert werden. Daher war es Ziel dieser Arbeit, mit Hilfe einer Genom-Screening-Methode zu untersuchen, inwieweit sich Responder und Nicht-Responder unterscheiden, und ob ein spezifisches chromosomales Muster abgeleitet werden kann, welches die beiden Gruppen voneinander unterscheidet.

Das untersuchte Kollektiv umfasste 42 kolorektale Karzinome (jeweils 15 Tumoren der UICC-Stadien I und II sowie 27 Karzinome des Stadiums III), die mit Hilfe der Vergleichenden Genomischen Hybridisierung (CGH) analysiert wurden. Die CGH erlaubt es, die Gesamtheit der chromosomalen Aberrationen eines Genoms zu bestimmen, indem fluoreszenzmarkierte Tumor-DNA und Referenz-DNA zu gleichen Teilen simultan auf normale Metaphase-Chromosomen hybridisiert werden. Der Vergleich der unterschiedlichen Fluoreszenzprofile beider Genome zeigt dann die genetischen Veränderungen als DNA-Verluste oder Sequenzgewinne bestimmter Regionen.

Wir konnten demonstrieren, dass die Gruppe der Responder durch eine höhere Frequenz an chromosomalen Veränderungen gekennzeichnet ist als die Gruppe der Nicht-Responder (ANCA-Werte von 8,9 bzw. 6,8). Weiterhin konnten wir zeigen, dass die Responder signifikant häufiger ($p < 0,05$) Zugewinne der chromosomalen Regionen 7q32-q36, 7q11-7q31 und Amplifikationen der Region 20q11-20q13 aufweisen. Da nicht sicher ausgeschlossen werden kann, dass diese drei chromosomalen Aberrationen zufällig entdeckt wurden ($p = 0,21$), werden diese

Karzinome zur Zeit mittels einer hochauflösenden Methode (Oligonukleotid-Microarray CGH) untersucht, um diese Ergebnisse zu validieren.

6. Literaturverzeichnis

- Adlard JW, Richman SD (2002): Prediction of the response of colorectal cancer to systemic therapy. *Lancet Oncol* 3, (2): 75-82
- Alitieri DC (2003): Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* 22, 8581-8589
- Amado RG, Wolf M, Peters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, Juan T, Sikorski R, Sugs S, Radinsky R, Scott D (2008): Wild-Type KRAS is required for Panitumumab Efficacy in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol* 26, (10) 1626- 34
- Ard PG, Chatterjee C, Kunjibettu S, Adside LR, Gralinski LE, McMahon SB (2002): Transcriptional Regulation of the mdm2 Oncogene by p53 requires TRRAP Acetyltransferase Complexes. *Mol Cell Biol* 22: 5650-5661
- Banerjee S, Saxena N, Sengupta K, Tawfik O, Mayo MS, Banerjee SK (2003): WISP 2 Gene in Human Breast Cancer: Estrogen and Progesteron Inducible Expression and Regulation of Timor Cell Proliferation. *Neoplasia* 5, 63-73
- Bodmer WF (2006): Cancer genetics: colorectal cancer as a model. *J Hum Genet* 51(5), 391-396
- Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN et al. (1998): A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 58, 5248-5257

-
- Bos JL (1989): Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 49(17), 4682-9
- Bourne HR, Sanders DA, McCormick F (1990): The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* 348(6297):125-32
- Berry RJ (1969): Effects of x-irradiation on the cell population kinetics in a model tumor and a normal tissue system: Implications for the treatment of human malignancies. *Br J Radiol* 42, 372-377
- Brabletz T, Herrmann K, Jung A, Faller G, Kirchner T (2000): Expression of nuclear beta-catenin and c-myc is correlated with tumor size but not with proliferative activity of colorectal adenomas. *Am J Pathol* 156, 865-870
- Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, Clark GJ, Der CJ (1998): Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene* 17, 1395-1413
- Cancer Research campaign. *Cancer statistics: Large Bowel- UK*. CRC, London 1999.
- Camps J, Grade M, Nguyen QT, Hörmann P, Becker S, Hummon AB, Rodriguez V, Chandrasekharappa S, Chen Y, Difilippantonio MJ, Becker H, Ghadimi BM, Ried T. (2008): Chromosomal breakpoints in primary colon cancer cluster at sites of structural variants in the genome. *Cancer Res* Mar 1;68(5):1284-95
- D'Arcy V, Abdullaev ZK, Pore N, Docquier F, Torrano V, Chernukhin I, Smart M, Farrar D, Metodiev M, Fernandez N, Richard C, Delgado MD, Lobanenkova V, Klenova E (2006): The Potential of BORIS Detected in Leucocytes of Breast Cancer Patients as an early Marker of Tumorigenesis, *Clinical Canc Res* 12(20) 5978-5986
- Day DW, Morson BC (1978): The adenoma-carcinoma sequence. *Major Probl Pathol* 10, 58-71

- Díez M, Ramos P, Medrano MJ, Mugüerza JM, Villeta R, Lozano O, Escribano J, Noguerales F, Ruíz A, Granell J (2003): Preoperatively irradiated rectal carcinoma: analysis of the histopathologic response and predictive value of proliferating cell nuclear antigen immunostaining. *Oncology* 64(3):213-9
- du Manoir S, Speicher MR, Joos S, Schröck E, Popp S, Dohner H, Kovacs G, Robert-Nicoud M, Lichter P, Cremer T (1993): Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. *Hum Genet* 90, 590-610
- du Manoir S, Schröck E, Bentz M, Speicher MR, Joos S, Ried T, Lichter P, Cremer T (1995): Quantitative analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* 19, 27-41
- Duff EK, Clarke ER (1998): SMAD4 (DPC4) –a potent tumor suppressor? *Br J Cancer* 78, 1615-19
- Ebisawa T, Fukuchi M, Murakami G, Chiba T, Tanaka K, Imamura T, Miyazono K (2001): Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J Biol Chem* Apr 20;276(16):12477-80
- Ellis CA, Clark G (2000): The importance of being K-Ras. *Cell Signal* 12, 425-434
- Elsaleh H, Robbins P, Joseph D, Powell B, Grieu F, Menso L, Iacopetta B (2000): Can p53 alterations be used to predict tumour response to pre-operative chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer? *Radiother Oncol* 56(2): 239-44
- Emdin SO, Stenling R, Roos G (1987): Prognostic value of DNA content in colorectal carcinoma. A flow cytometric study with some methodologic aspects. *Cancer* 60, 1282-1287

- Esposito G, Pucciarelli S, Alaggio R, Giacomelli L, Marchiori E, Iaderosa GA, Friso ML, Toppan P, Chieco-Bianchi L, Lise M (2001): P27kip1 expression is associated with tumor response to preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer. *Ann Surg Oncol* 8, 311-8
- Fearon ER, Vogelstein (1990): A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759-767
- Gebhardt E (2005): Genomic imbalances in human leukemia and lymphoma detected by comparative genomic hybridization (Review). *Int J Oncol* 27, 593-606
- Gerard JP, Chapet O, Nemoz C, Romestaing P, Mornex F, Coquard R, Barbet N, Atlan D, Adeleine P, Freyer G (2003): Preoperative concurrent chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer with high-dose radiation and oxaliplatin-containing regimen: the Lyon R0-04 phase II trial. *J Clin Oncol* 21, 1119-1124
- Ghadimi BM, Behrens J, Hoffmann I, Haensch W, Birchmeier W, Schlag PM (1999): Immunohistological analysis of E-cadherin, alpha-, beta- and gamma-catenin expression in colorectal cancer: implications for cell adhesion and signaling. *Eur J Cancer* 35, 60-65
- Ghadimi BM, Grade M, Liersch T, Langer C, Siemer A, Füzesi L, Becker H (2003): Gain of chromosome 8q23-24 is a predictive marker for lymph node positivity in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 25(3)1808-14
- Ghadimi BM, Grade M, Difilippantonio MJ, Varma S, Simon R, Montagna C, Füzesi L, Langer C, Becker H, Liersch T, Ried T (2005): Effectiveness of gene expression profiling for response prediction of rectal adenocarcinomas to preoperative chemoradiotherapy. *J Clin Oncol* 23, 1826-38
- Ghadimi BM, Grade M, Mönkemeyer C, Kulle B, Gaedcke J, Gunawan B, Langer C, Liersch T, Becker H (2006): Distinct chromosomal profiles in metastasizing and non-metastasizing colorectal carcinomas. *Cell Oncol* 28(5-6):273-81

- Giaretti W, Santi L (1990): Tumor progression by DNA flow cytometry in human colorectal cancer. *Int J Cancer* 45, 597-603
- Grade M, Becker H, Liersch T, Ried T, Ghadimi BM (2006): Molecular cytogenetics: genomic imbalances in colorectal cancer and their clinical impact. *Cell Oncol* 28(3):71-84
- Grade M, Hörmann P, Becker S, Hummon AB, Wangsa D, Varma S, Simon R, Liersch T, Becker H, Difilippantonio MJ, Ghadimi BM, Ried T (2007): Gene expression profiling reveals a massive, aneuploidy-dependent transcriptional deregulation and distinct differences between lymph node-negative and lymph node-positive colon carcinomas. *Cancer Res* 67(1): 41-56
- Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, Joslyn G, Stevens J, Spirio L, Robertson M (1991): Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 66, 589-600
- Günther K, Dimmler A, Rödel F, Reulbach U, Merkel S, Bittorf BR, Matzel KE, Papadopoulos T, Hohenberger W, Sauer R, Rödel C (2003): P27 Does not Predict Histopathological Response to Radiochemotherapy in Rectal Cancer, *J Surg Res* 113, 179-188
- Guimaraes DP, Hainaut P (2002): TP53: a key gene in human cancer. *Biochimie* 84, 83-93
- Hanahan D, Weinberg RA (2000): The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70
- Hawkins NJ, Tomlinson I, Meagher A, Ward RL (2001): Microsatellite-stable diploid carcinoma: a biologically distinct and aggressive subset of sporadic colorectal cancer. *Br J Cancer* 84, 232-236
- He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Winzler KW (1998): Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281, 1509-1512

-
- Hermesen MA, Meijer GA, Baak JP, Joenje H, Walboomers JJ (1996): Comparative genomic hybridization: a new tool in cancer pathology. *Hum Pathol* 27, 342-349
- Hong J, Kang Y, Chen GA (2005): Modulation of NY-ESO-1 expression in lung cancer cells by brother of the regulator if imprinted sites. *Cancer Res* 65, 7763-64
- Ilyas, M, Tomlinson IPM: (1996): Genetic pathways in colorectal cancer. *Histopathology* 28, 389-399
- Iba T, Yagi Y, Kidokoro A, Ishi K, Koyatsu J. (1998): The intratumoral levels of thymidylate synthetase and folate in gastric and colon cancer. *Gan To Kagaku Ryoho* 25, 1165-1171
- Jakob C, Liersch T, Meyer W, Baretton GB, Häusler P, Schwabe W, Becker H, Aust DE (2005): Immunohistochemical analysis of thymidylate synthase, thymidine phosphorylase, and dihydropyrimidine dehydrogenase in rectal cancer (cUICC II/III): correlation with histopathologic tumor regression after 5-fluorouracil-based long-term neoadjuvant chemoradiotherapy. *Am J Surg Pathol* 29, 1904-9
- Jen J, Kim H, Piantadosi S, Liu ZF, Levitt RC, Sistonen P, Kinzler KW, Vogelstein B, Hamilton SR (1994 a): Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med* 331, 213-221
- Jen J, Powell SM, Papadopoulos N, Smith KJ, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler W (1994 b): Molecular determinants of dysplasia in colorectal lesions. *Cancer Res* 54, 5523-5526
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D (1992): Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258, 818-821
- Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D (1994): Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA

sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 10, 231-243

Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, Simes RJ, Chalchal H, Shapiro JD, Robitaille S, Price TJ, Shepherd L, Au HJ, Langer C, Moore MJ, Zalberg JR (2008): K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 359 (17):1757-65.

Katayose Y, Kim M, Rakkar AN, Li Z, Cowan KH, Seth P (1997): Promoting apoptosis: a novel activity associated with the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Cancer Res* 15, 5441-5

Kim I, Lim S, Kang H, Chang H, Ahn S, Park H, Jang S, Park J, Kim D, Jung K, Choi H, Jeong S, Sohn D, Kim D, Park J (2007): Microarray gene expression profiling for predicting complete response to preoperative chemoradiotherapy in patients with advanced rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 50(9), 1342-53

Kim N, Park J, Lee K, Yang W, Yun S, Sung J, Min J (2001): p53, BCL-2, and Ki-67 expression according to tumor response after concurrent chemoradiotherapy for advanced rectal cancer. *Ann Surg Oncol* 8, 418-24

Kumon K, Kobayashi H, Namiki T, Tsunematsu Y, Miyauchi J, Kikuta A, Horikoshi Y, Komada Y, Hatae Y, Eguchi H, Kaneko Y (2001): Frequent increase of DNA copy number in the 2q24 chromosomal region and its association with a poor clinical outcome in hepatoblastoma: cytogenetic and comparative genomic hybridization analysis. *Jpn J Cancer Res* 92, 854-62

Lane DP (1992): Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358, 15-16

Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1997): Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 386, 623-627

- Lenz HJ, Hayashi K, Salonga D, Danenberg KD, Danenberg PV, Metzger R, Banerjee D, Bertino JR, Groshen S, Leichman LP, Leichman CG. (1998): p53 mutations and thymidylate synthase messenger RNA levels in disseminated colorectal cancer: An analysis of response and survival. *Clin Cancer Res* 4, 1243-1250
- Levine AJ (1997): p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-331
- Liersch T, Meller J, Kulle B, Behr TM, Markus P, Langer C, Ghadimi BM, Wegener WA, Kovacs J, Horak ID, Becker H, Goldenberg DM (2005): Phase II trial of carcinoembryonic antigen radioimmunotherapy with ¹³¹I-labetuzumab after salvage resection of colorectal metastases in the liver: five-year safety and efficacy results. *J Clin Oncol* 23, (27) 6763-70h
- Liu X, Tesfai J, Evrard YA, Dent SY, Martinez E (2003): c-Myc Transformation Domain recruits the human STAGA complex and requires TRRAP and GCN5 acetylase activity for transcription activation. *J Biol Chem* 22: 20405-20412
- Loukinov DI, Pugacheva E, Vatolin S, Pack SD, Moon H, Chernukhin I, Mannan P, Larsson E, Kanduri C, Vostrov AA, Cui H (2002): Boris, a novel male- germ- line specific protein associated with epigenetic reprogramming events, shares the same 11-zinc finger domain with CTCF, the insulator protein involved in reading imprinting marks in the soma. *Proc Natl Acad Sci* 99, 6806-11
- Loukinov D, Ghochikyan A, Mkrtychyan M, Ichim TE, Lobanenko VV, Cribbs DH, Agadjanyan MG (2006): Antitumor efficacy of DNA vaccination to the epigenetically acting tumor promoting transcription factor BORIS and CD80 molecular adjuvant. *J Cell Biochem.* 98(5): 1073-43
- Lucas JJ, Domenico J, Gelfand EW (2004): Cyclin-dependent kinase 6 inhibits proliferation of human mammary epithelial cells. *Mol Cancer Res* 2, 105-14
- Meijer GA, Hermsen MA, Baak JP, van Diest PJ, Meuwissen SG, Belien JA, Hoovers JM, Joenje H, Snijders PJ, Walboomers JM (1998): Progression from colorectal

adenoma to carcinoma is associated with non-random chromosomal gains as detected by comparative genomic hybridisation. *J Clin Pathol* 51, 901-909

Midgley R, Kerr D (1999): Colorectal cancer. *Lancet* 353, 391-399

Mitelman F: *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*; Karger, Basel 1995

Mitsuru Horiki, Takeshi Imamura, Mina Okamoto, Makoto Hayashi, Junko Murai, Akira Myoui, Takahiro Ochi, Kohei Miyazono, Hideki Yoshikawa, and Noriyuki Tsumaki (2001): Smurf1 Interacts with Transforming Growth Factor- β Type-I Receptor through Smad7 and Induces Receptor Degradation. *J Biol Chem* 276, 12477-12480

Morén A, Imamura T, Miyazono K, Heldin CH, Moustakas A (2005): Degradation of the Tumor Suppressor by WW and HECT Domain Ubiquitin Ligases. *J Biol Chem* 280: 22115-22123

Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW (1997): Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 275, 1787-1790

Morson B (1974): President's address. The polyp-cancer sequence in the large bowel. *Proc R Soc Med* 67, 451-457

Nasmyth, K. (1996): At the heart of the budding yeast cell cycle. *Trends Genet.* 12, 405-412

Nelson H, Sargent DJ (2001): Refining multimodal therapy for rectal cancer. *N Engl J Med* 345, 690-692

Nikiforov MA, Chandriani S, Park J, Kotenko I, Matheos D, Johnsson A, McMahon SB, Cole MD (2002): TRRAP- Dependent and TRRAP-Independent Transcriptional Activation by Myc Family Oncoproteins. *Mol Cell Biol* 22: 5054-5063

-
- Okonkwo A, Musunuri S, Talamonti M, Benson A 3rd, Small W Jr, Stryker SJ, Rao MS (2001): Molecular markers and prediction of response to chemoradiation in rectal cancer. *Oncol Rep* 8(3):497-500
- Parsons R, Myeroff LL, Liu B, Willson JKV, Markowitz SD, Kinzler KW (1995): Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor β type II gene in colorectal cancer. *Cancer Res* 55, 5548-50
- Pasche P, Mulcahy M, Benson AB 3rd. (2002): Molecular markers in prognosis of colorectal cancer and prediction of response to treatment. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 16(3):331-45
- Pennica D, Swanson TA, Welsh JW, Roy MA, Lawrence DA, Lee J, Brush J, Taneyhill LA, Deuel B, Lew M, Watanabe C, Cohen RL, Melhem MF, Finley GG, Quirke P, Goddard AD, Hillan KJ, Gurney AL, Botstein D, Levine AJ (1998): WISP genes are members of the connective tissue growth factor family that are up-regulated in wnt-1-transformed cells and aberrantly expressed in human colon tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 14717-22
- Penny G, Chatterjee C, Kunjibettu S, Adside L, Gralinski L, McMahon S (2002): Transcriptional Regulation of the mdm2 Oncogene by p53 Requires TRRAP Acetyltransferase Complexes. *Mol Cell Biol*, Aug, 5650–5661
- Pollack JR, Perou CM, Alizadeh AA, Eisen MB, Pergamenschikov A, Williams CF, Jeffrey SS, Botstein D, Brown PO (1999): Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet* 23, 41-6
- Qui H, Sirivongs P, Rothenberger M, Rothenberger D, Garcia J (2000): Molecular prognostic factors in rectal cancer treated by Radiation and surgery. *Dis Colon Rectum* 43, 451-459

- Rau B, Sturm I, Lage H, Berger S, Schneider U, Hauptmann S, Wust P, Riess H, Schlag PM, Dörken B, Daniel PT (2003): Dynamic expression profile of p21WAF1/CIP1 and Ki-67 predicts survival in rectal carcinoma treated with preoperative radiochemotherapy *J Clin Oncol* 21(18):3391-401
- Ried T, Just KE, Holtgreve-Grez H, du Manoir S, Speicher MR, Schröck E, Latham C, Blegen H, Zetterberg A, Cremer T (1995): Comparative genomic hybridization of formalin-fixed, paraffin-embedded breast tumors reveals different patterns of chromosomal gains and losses in fibroadenomas and diploid and aneuploid carcinomas. *Cancer Res* 55, 5415-5423
- Ried T, Knutzen R, Steinbeck R, Blegen H, Schröck E, Heselmeyer K, du Manoir S, Auer G (1996): Comparative genomic hybridization reveals a specific pattern of chromosomal gains and losses during the genesis of colorectal tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 15, 234-245
- Ried T, Heselmeyer-Haddad K, Blegen H, Schröck E, Auer G (1999): Genomic changes defining the genesis, progression, and malignancy potential in solid human tumors: a phenotype/genotype correlation. *Genes Chromosomes Cancer* 25, 195-204
- Riggins GJ, Kinzler KW, Vogelstein B, Thiagalingam S. (1997): Frequency of SMAd gene mutations in human cancers. *Cancer Res* 57, 2578-80
- Rimkus C, Friederichs J, Boulesteix AL, Theisen J, Mages J, Becker K, Nekarda H, Rosenberg R, Janssen KP, Siewert JR (2008): Microarray-based prediction of tumor response to neoadjuvant radiochemotherapy of patients with locally advanced rectal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 6(1), 53-61
- Risinger JI, Gadiseti VR, Chandramouli, Maxwell L, Custer M, Pack S, Loukinov D, Aprelikova O, Tracy T, Schrump D, Murphy SK, Berchuck A, Lobanenko V, Barrett JC (2007): Global Expression Analysis of Cancer/Testis Genes in Uterine

- Cancer Reveals a High Incidence of BORIS Expression. *Clin Cancer Res* 13(6), 1714-1719
- Rödel C, Grabenbauer GG, Papadopoulos T, Bigalke M, Günther K, Schick C, Peters A, Sauer R, Rödel F (2002): Apoptosis as a cellular predictor for histopathologic response to neoadjuvant radiochemotherapy in patients with rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 52(2):294-303
- Rödel C, Grabenbauer GG, Papadopoulos T, Hohenberger W, Schmoll HJ, Sauer R (2003): Phase I/II trial of capecitabine, oxaliplatin, and radiation for rectal cancer. *J Clin Oncol* 15;21(16): 3098-104
- Rödel C, Weiss C, Sauer R. (2007): Combined systemic therapy and radiotherapy for bladder cancer. *Strahlenther Onkol* 183 Spec No 2:29-31
- Rödel F, Hoffmann J, Grabenbauer GG, Papadopoulos T, Weiss C, Günther K, Schick C, Sauer R, Rödel C (2002): High Survivin Expression is associated with Reduced Apoptosis in Rectal Cancer and May Predict Disease-Free Survival after Preoperative Radiochemotherapy and Surgical Resection. *Strahlenther Onkol* 178:426-35
- Sahai E, Garcia-Medina R, Pouyssegur J, Vial E (2007): Smurf1 regulates tumor cell plasticity and motility through degradation of RhoA leading to localized inhibition of contractility. *J Cell Biol* 176, 35-42
- Sakakura C, Koide K, Ichikawa D, Wakasa T, Shirasu M, Kimura A, Taniguchi H, Hagiwara A, Yamaguchi T, Inazawa J, Abe T, Takahashi T, Otsuji E (1998): Analysis of histological therapeutic effect, apoptosis rate and p53 status after combined treatment with radiation, hyperthermia and 5-fluorouracil suppositories for advanced rectal cancers. *Br J Cancer* 77, 156-66
- Sauer R (2002): Adjuvant and neoadjuvant radiotherapy and concurrent radiochemotherapy for rectal cancer. *Pathol Oncol Res* 8, 7-17

-
- Sauer R (2004): Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med* 351(17): 1731-40
- Sauer R, Fietkau R, Wittekind C, Martus P, Rödel C, Hohenberger W, Jatzko G, Sabitzer H, Karstens JH, Becker H (2001): Adjuvant versus neoadjuvant radiochemotherapy for locally advanced rectal cancer. A progress report of a phase-III randomized trial (protocol CAO/ARO/AIO-94). *Strahlenther Onkol* 177, 173-181
- Sausville EA, Johnson J, Alley M, Zaharevitz D, Senderowicz AM (2000): Inhibition of CDKs as a therapeutic modality. *Ann NY Acad Sci* 910; 207-21
- Saw RP, Morgan M, Koorey D, Painter D, Findlay M, Stevens G, Clarke S, Chapuis P, Solomon MJ (2003): p53, deleted in colorectal cancer gene, and thymidylate synthase as predictors of histopathologic response and survival in low, locally advanced rectal cancer treated with preoperative adjuvant therapy. *Dis Colon Rectum* 46(2): 192-202
- Schleicher C, Poremba C, Wolters H, Schäfer KL, Senninger N, Colombo-Benkmann M (2007): Gain of chromosome 8q: a potential prognostic marker in resectable adenocarcinoma of the pancreas? *Ann Surg Oncol* 14, 1327-35
- Scott N, Hale A, Deakin M, Hand P, Adab FA, Hall C, Williams GT, Elder JB (1998): A histopathological assessment of the response of rectal adenocarcinoma to combination chemo-radiotherapy: relationship to apoptotic activity, p53 and bcl-2 expression. *Eur J Surg Oncol* 24(3): 169-73
- Sieber OM, Heinimann K, Tomlinson IP (2003): Genomic instability-the engine of tumorigenesis? *Nat Rev Cancer* 3(9) 701-8
- Smith FM, Reynolds JV, Miller N, Stephens RB, Kennedy MJ. (2006): Pathological and molecular predictors of the response of rectal cancer to neoadjuvant radiochemotherapy. *Eur J Surg Oncol* 32(1):55-64

- Spitz FR, Giacco GG, Hess K, Larry L, Rich TA, Janjan N, Cleary KR, Skibber JM (1997): p53 immunohistochemical staining predicts residual disease after chemoradiation in patients with high-risk rectal cancer. *Clin Cancer Res* 3(10): 1685-90
- Steinbeck RG, Heselmeyer KM, Neugebauer WF, Falkmer UG, Auer GU (1993): DNA ploidy in human colorectal adenocarcinomas. *Anal Quant Cytol Histol* 15, 187-194
- Thibodeau SN, Bren G, Schaid D (1993): Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 260, 816-819
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL (1988): Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319, 525-532
- Wang TT, Qian XP, Liu BR (2007): Survivin: Potential role in diagnosis, prognosis and targeted therapy of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 13, 2784-2790
- Watanabe T, Komuro Y, Kiyomatsu T, Kanazawa T, Kazama Y, Tanaka J, Tanaka T, Yamamoto Y, Shirane M, Muto T, Nagawa H (2005): Prediction of sensitivity of rectal cancer cells in response to preoperative radiotherapy by DNA microarray analysis of gene expression profiles. *Cancer Res* 66(7), 3370-4
- Zhou S, Buckhaults P, Zawel L, Bunz F, Riggins G, Dai JL, Kern SE, Kinzler KB (1998): Targeted deletion of SMAD4 shows it is required for transforming growth factor β and acticin signalling in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 2412-16

Lebenslauf

Am 30.10.1980 wurde ich in Braunschweig als erstes von zwei Kindern der Eheleute Hermann und Gudrun Beckmann, geb. Meier, geboren.

Von 1987 bis 1991 besuchte ich die Grundschule sowie von 1991 bis 1993 die Orientierungsstufe in Walsrode. Von 1993 bis 2000 war ich Schüler des Gymnasiums Walsrode, an dem ich das Abitur ablegte.

Meinen Zivildienst leistete ich von 2000 bis 2001 bei der Lebenshilfe Walsrode e.V.

Von Sommersemester 2001 bis Sommersemester 2008 studierte ich Medizin an der Georg-August-Universität Göttingen.

Während meines Praktischen Jahres absolvierte ich das chirurgische Tertial an der Università degli Studi di Firenze in Italien. Für mein Wahlfach Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde sowie Innere Medizin wechselte ich an das Evangelische Krankenhaus Oldenburg.

Nach dem erfolgreichen Abschluss des Studiums im Mai 2008 arbeite ich nun seit August 2008 als Assistenzarzt in der HNO-Klinik des Evangelischen Krankenhauses Oldenburg.

Die experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Doktorarbeit begann ich im Frühjahr 2003 in der Klinik für Allgemeinchirurgie der Universität Göttingen unter der Leitung von Prof. Dr. H. Becker.