

Aus der Abteilung Gastroenteropathologie
(Prof. Dr. med. L. Füzesi)
im Zentrum Pathologie
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Das Kolorektale Karzinom:
Molekularzytogenetische Untersuchungen von Kolon- und Rektumkarzinomen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Meliha Cakir
aus
Mönchengladbach
Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: PD Dr. med. F. Haller

II. BerichterstatterIn:

III. BerichterstatterIn:

Tag der mündlichen Prüfung:

Meiner Mutter und meinem Vater gewidmet.

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie	6
1.2 Risikofaktoren	6
1.3 Pathogenese /Ätiologie	6
1.4 Lokalisation	11
1.4.1 Anatomische Grundlage für die Unterteilung zwischen Kolon und Rektum	11
1.4.2 Embryologische Grundlage für die Unterteilung zwischen Kolon und Rektum	12
1.5 Prognose und Therapie	12
1.5.1 TNM-Klassifikation	12
1.5.2 Prognose	14
1.5.3 Therapie	15
1.6 Die komparative genomische Hybridisierung (CGH)	16
1.7 Fragestellung	21

2. Material und Methoden

2.1 Beschreibung des Patientenkollektivs	22
2.2 DNA- Isolierung	23
2.2.1 Isolierung der Tumor- DNA aus Paraffin	23
2.2.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung	24
2.2.3 Gelelektrophorese	24
2.3 Komparative genomische Hybridisierung (CGH)	25
2.3.1 Nick-Translation	26
2.3.2 Hybridisierung	27
2.3.3 Waschung	30
2.3.4 Auswertung	31
2.3.5 Summeninterpreter	31

3. Ergebnisse

3.1 Klinisch-pathologische Parameter	33
3.1.1 Klinik	33
3.1.2 Lokalisation	33
3.1.3 Malignitätsgrad	33
3.1.4 Lymphknotenstatus	34
3.1.5 Fernmetastasierung (M-Stadium)	34

3.1.6 Klinisches UICC-Stadium	34
3.2 Prognostischer Wert klinisch-pathologischer Parameter	35
3.2.1 Follow-Up	35
3.2.2 Vergleich nach Lokalisation	35
3.2.3 Vergleich nach Lymphknotenstatus	38
3.2.4 Vergleich nach Fernmetastasierung	39
3.2.5 Vergleich nach klinischem UICC-Stadium	40
3.3 CGH	42
3.3.1 Gesamtübersicht	42
3.3.2 Vergleich nach Lokalisation	42
3.3.3 Vergleich nach Lymphknotenstatus	45
3.3.4 Vergleich nach Fernmetastasierung	45
3.3.5 Vergleich nach klinischem UICC-Stadium	46
3.3.6 Chromosomale Aberrationen und tumorfreies Überleben	46
3.3.7 Chromosomale Aberrationen und Gesamtüberleben	48
<u>4. Diskussion</u>	
4.1 Klinisch-pathologische Unterschiede zwischen proximalen und distalen KRK und die prognostische Bedeutung in Bezug auf die Lokalisation	50
4.1.1 Lokalisation und Fernmetastasen	50
4.2 CGH-Unterschiede zwischen proximalen und distalen KRK sowie die prognostische Bedeutung dieser Imbalancen	51
4.2.1 Übersicht	51
4.2.2 Veränderungen an 4q und 1p und die prognostische Bedeutung	52
4.2.3 Veränderungen an 12p und die prognostische Bedeutung	52
4.2.4 Veränderungen an 20q, 18q, 15q sowie 14q und die prognostische Bedeutung	53
4.2.5 Veränderungen an 20p, 6p, 14q, 4p sowie 18p und die prognostische Bedeutung	54
4.2.6 Veränderungen an 17q und die prognostische Bedeutung	54
<u>5. Zusammenfassung</u>	55
<u>6. Literaturverzeichnis</u>	58

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie

In den Industrieländern ist ein stetiger, altersabhängiger Anstieg der Inzidenz des kolorektalen Karzinoms (KRK) zu verzeichnen (Hauser 2004). Vor dem 40. Lebensjahr ist das sporadische KRK selten. Danach findet sich ein exponentieller Anstieg bis zum 85. Lebensjahr. Mit einer Inzidenz von 300 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr für die Altersgruppe von 70 bis 74 Jahre steht das KRK an zweiter Stelle aller Krebserkrankungen in den westeuropäischen Ländern (Hauser 2004). Bezogen auf Deutschland treten pro Jahr etwa 57000 Neuerkrankungen eines KRKs ohne Geschlechterprävalenz auf (Hauser 2004).

1.2 Risikofaktoren

Zu den Lebensgewohnheiten, die mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung eines KRK einhergehen, gehören geringe körperliche Aktivität, Adipositas, Insulinresistenz, übermäßiger Alkoholgenuss und übermäßiger Genuss von rotem Fleisch; im Gegensatz dazu gelten Vitamine und Ballaststoffe als protektive Faktoren (Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten 2005).

1.3 Pathogenese/Ätiologie

Die Grundlage für die Entstehung eines KRK stellt die intraepitheliale Neoplasie der Kolonschleimhaut dar, die durch zelluläre Atypie, Entdifferenzierung und eine gestörte epitheliale Architektur gekennzeichnet ist. Es wurde eine multiple bzw. parallel verlaufende Pathogenese beim KRK beschrieben (Fearon und Vogelstein 1990). In der Literatur werden drei Konzepte der Tumorigenese diskutiert: das 'gatekeeper-caretaker'-Konzept von Vogelstein (Kinzler und Vogelstein 1997) beschreibt die Aktivierung von Protoonkogenen durch Amplifikationen/Zugewinne und die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen durch Verluste an bestimmten Chromosomenabschnitten. Das 'evolutionäre Selektionsdruck'-Konzept von Bodmer (Bodmer et al. 1994) erklärt die Karzinogenese durch die Einwirkung einer zufälligen Mutation in den somatischen Zellen; dabei kommt es zum Selektionsvorteil der heterozygoten Zellen gegenüber den homozygoten Zellen und folglich zu einer neoplastischen Veränderung der betroffenen Zellen. Es ist dennoch sehr schwierig und

ungenau, genetische Instabilität mit den Prinzipien der Evolutionstheorie zu erklären (Breivik und Gaudernack 1999). Beim 'genetischen Instabilitätskonzept' kommt es aufgrund von Defekten in den DNA-Reparaturenzymen zur Längenveränderungen von repetitiven Sequenzen und daraufhin zur Instabilität im Genom (Breivik und Gaudernack 1999). Das von Fearon und Vogelstein beschriebene Mehrstufenmodell beim KRK erlaubt eine genetische Beschreibung von speziellen genetischen Veränderungen während der Tumorentstehung und der Tumorprogression (Klump et al. 2004). Auf molekularer Ebene sind das APC-Gen (Lokalisation Chromosom 5q), das DCC-Gen (Lokalisation 18q), das p53-Gen (Lokalisation 17p) und das K-ras-Gen (Lokalisation 12p) beim KRK häufig verändert (Hermsen et al. 2002).

Präkanzerosen des KRK werden nach den WHO-Richtlinien 1972 in 2 Gruppen unterteilt (Hauser 2004):

1. Präkanzeröse kolorektale Läsionen, die histopathologisch definiert sind

- Adenome
- Familiäre adenomatöse Polyposis coli (FAP)- Risiko für die Entstehung eines KRKs beträgt fast 100%
- Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (Colitis ulcerosa und Morbus Crohn)

2. Präkanzeröse kolorektale Bedingungen, die anamnestisch bzw. klinisch definiert sind

a) genetisch determinierte

- HNPCC- Risiko für die Entstehung eines KRKs beträgt fast 70-80%
- Blutsverwandte von Patienten mit KRK

b) erworbene

- Zustand nach Entfernung eines kolorektalen Adenoms
- Zustand nach einem KRK
- Zustand nach Diagnose eines anderen Karzinoms.

Adenome

Jedes histologisch gesicherte Adenom stellt ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines KRK dar (Schmiegel et al. 2004). Dies gilt besonders für Adenome, die multipel auftreten (≥ 3) oder die größer als 1 cm sind. Dabei ist das Karzinomrisiko 4 bis 6-fach erhöht (Schmiegel et al. 2004). Die Tumorentstehung beim KRK wird u.a. durch die Adenom-Karzinom-Sequenz beschrieben. Man nimmt an, dass im Laufe der Adenom-Karzinom-

Sequenz mehrere Mutationen stattfinden. Betroffen sind vor allem Gene, die für die Zellproliferation, Differenzierung und für den programmierten Zelltod verantwortlich sind. Eine genetische Instabilität wird bereits in der frühen Phase der Karzinogenese beobachtet (Shih et al. 2001). Die hypothetische Mehrstufenmutation nach Fearon und Vogelstein (Fearon and Vogelstein 1990) wurde folgendermaßen beschrieben:

- normales Epithel *APC- Genmutation (Verlust am Chromosom 5q)*
- hyperproliferatives Epithel *DNA- Demethylierung*
- Adenom I (early) *K-ras-Mutation (Mutation am Chromosom 12p)*
(Vogelstein et al. 1988)
- Adenom II (intermediate) *MCC/DCC-Mutation (Verlust am Chromosom 18q)*
(Arends 2000)
- Adenom III (late) *p53-Mutation (Verlust am Chromosom 17p)*
- Karzinom *nm23-Deletion..*

Familiäre adenomatöse Polyposis coli (FAP)

Für die familiäre adenomatöse Polyposis coli (FAP) ist das Vorhandensein von über 100 Polypen im Kolon mit Beginn in der 2. Lebensdekade charakteristisch. Das Karzinom-Risiko beträgt nahezu 100%. Die FAP ist zusätzlich mit extraintestinalen Tumoren vergesellschaftet; zu diesen gehören abdominale und extraabdominale Desmoidtumore, Schilddrüsenkarzinome, maligne ZNS-Tumoren, Hepatoblastome und Osteome, Epidermoidzysten oder Pigmentanomalien der Retina (Foulkes 1995).

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)

Colitis ulcerosa

Es konnte gezeigt werden, dass die Colitis ulcerosa mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms einhergeht (Ekbom et al. 1990b, Gyde et al. 1988).

Morbus Crohn

Bei Morbus Crohn ist ebenfalls mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms zu rechnen, jedoch ist die Datenlage diesbezüglich nicht ausreichend erforscht (Atkin et al. 1992, Bernstein et al. 2001, Binder et al. 1985, Ekbom et al. 1990a, Greenstein et al. 1981, Persson et al. 1994).

Hereditäres nicht-polypöses Kolonkarzinom (HNPCC)

Das HNPCC-Syndrom wird nach anamnestischen Kriterien, die in den Amsterdam-I-Kriterien festgelegt sind, definiert. Da das HNPCC-Syndrom phänotypisch nicht auffällig ist, mussten diese Kriterien aufgestellt werden, die es sinnvoll erscheinen lassen, eine molekularpathologische Analyse durchzuführen (Vasen et al. 1991, Vasen et al. 1999). Bei den Patienten, die die Amsterdam-I-Kriterien erfüllen, liegt bei bis zu 90% der Patienten eine Mikrosatelliteninstabilität (MSI) vor (Vasen et al. 1991, Vasen et al. 1999). Bei Patienten, die die Bethesda-Kriterien erfüllen, welche weniger spezifisch für die Diagnosestellung eines HNPCC- Syndroms sind, weisen 30% eine MSI auf (Rodriguez- Bigas et al. 1997).

Die Mikrosatelliteninstabilität ist definiert als eine Längenveränderung von repetitiven DNA-Sequenzen, die aufgrund defekter DNA-Reparaturproteine entsteht (s.u.). Dabei sind die Gene, die für diese DNA-Reparaturproteine kodieren, mutiert (Ionov et al. 1993, Thibodeau et al. 1993).

Amsterdam-I-Kriterien:

1. Mindestens drei Familienmitglieder mit HNPCC-assoziierten Karzinomen
2. Mindestens zwei aufeinanderfolgende Generationen betroffen
3. Ein Familienmitglied erstgradig verwandt mit den beiden anderen
4. Ein Erkrankter zum Zeitpunkt der Diagnose jünger als 50 Jahre
5. Ausschluss einer familiären adenomatösen Polyposis.

Zusätzliche Tumore können beim HNPCC-Syndrom beobachtet werden. In den Amsterdam-II-Kriterien werden diese extrakolischen Tumore beschrieben wie Endometrium- und Urothel- und Dünndarmkarzinome (Vasen et al. 1991, Vasen et al. 1999).

Überarbeitete Bethesda-Kriterien (Umar et al. 2004):

1. Diagnose eines KRK vor dem 50. Lebensjahr
2. Diagnose von synchronen oder metachronen kolorektalen oder anderen HNPCC-assoziierten Tumoren s.o. unabhängig vom Alter bei Diagnose
3. Diagnose eines KRK vor dem 60. Lebensjahr mit typischer Histologie eines MSI-H-Tumors
4. Diagnose eines KRK bei mindestens einem erstgradig Verwandten mit einem HNPCC-assoziierten Tumor, davon Diagnose mindestens eines Tumors vor dem 50. Lebensjahr

5. Diagnose eines KRK bei zwei oder mehr erstgradig Verwandten mit einem HNPCC-assoziierten Tumor, unabhängig vom Alter.

Mikrosatelliteninstabilität (MSI)

In der Literatur werden zwei unterschiedliche genetisch bedingte Instabilitätsmuster in der Tumorigenese des KRK beschrieben (Haydon und Jass 2002, Lengauer et al. 1997).

Die MSI beschreibt den Defekt eines DNA-Reparaturenzyms. Aufgrund dieses Defektes können Basenfehlpaarungen im Genom nicht mehr korrigiert werden und es kommt daraufhin zu Längenveränderungen von repetitiven DNA- Sequenzen, die zur Instabilität im Genom führen (Iino et al. 2000, Ionov et al. 1993, Thibodeau et al. 1993). Da bestimmte Tumorsuppressorgene auf diesen DNA- Sequenzen lokalisiert sind, kommt es aufgrund der nicht-korrigierten Basenfehlpaarungen häufig zu einer Mutation und Inaktivierung dieser Tumorsuppressorgene (Markowitz et al. 1995, Rampino et al. 1997, Souza et al. 1996). Beim Patienten mit HNPCC-Syndrom können Keimbahnmutationen von DNA-Reparaturenzymen gefunden werden, z.B. MSH1, MSH6, MLH2, PMS2.

Anhand weiterer Untersuchungen der MSI konnte bereits in mehreren Studien bestätigt werden, dass die MSI mit einer Prävalenz von 9-20% auch in sporadischen kolorektalen Karzinomen zu beobachten ist und nicht nur beim Vorliegen eines HNPCC-Syndroms (Aaltonen et al. 1994, Aaltonen et al. 1998, Arzimanoglou et al. 1998, Ishimaru et al. 1995, Lothe et al. 1993, Samowitz et al. 1995, Yagci et al. 1996). Hinzu kommt, dass sporadische KRK, die eine MSI aufweisen, größer und weniger differenziert sind als diejenigen Tumore ohne eine MSI. Weiterhin stellte man fest, dass die Tumore mit Nachweis einer MSI gehäuft im proximalen Kolon zu beobachten sind und weniger Mutationen im p53-Gen aufzeigen (Forster et al. 1998, Kahlenberg et al. 1996, Kim et al. 1994, Lothe et al. 1993, Olschwang et al. 1997, Risio et al. 1996).

Chromosomale Instabilität

Das zweite Instabilitätsmuster entsteht durch chromosomale Aberrationen, die z.B. mittels der komparativen genomischen Hybridisierung (CGH) detektiert werden können (Kallioniemi et al. 1992). Im Gegensatz zur MSI, bei der die Mutationen die repetitiven DNA-Sequenzen betreffen und der Chromosomensatz diploid ist, ist die chromosomale Instabilität (CIN) definiert als Veränderungen auf chromosomaler Ebene, die durch Zugewinne oder Verluste an bestimmten Abschnitten der Chromosomen entstehen (Lengauer et al. 1997, Breivik and Gaudernack 1999, Lindblom 2001). Die Folgen dieser Veränderungen sind eine Aktivierung

von Protoonkogenen (K-ras) durch Amplifikationen/Zugewinne oder eine Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (DCC, APC, p53) durch Verluste an den Chromosomenabschnitten (Breivik und Gaudernack 1999, Fearon und Vogelstein 1990). In der Literatur wurde bereits belegt, dass die CIN signifikant häufig in distalen KRK zu beobachten ist und mit Mutationen in Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen einhergeht (Ionov et al. 1993, Kim et al. 1994, Lothe et al. 1993, Salahshor et al. 1999, Thibodeau et al. 1993).

1.4 Lokalisation

Das KRK kann theoretisch in allen Dickdarmabschnitten entstehen, jedoch treten fast 70% im Rektum auf. Je nach Lokalisation des Tumors sehen die Prognose und vor allem die onkologische Therapie sehr unterschiedlich aus (Schmiegel et al. 2004). Die Lokalrezidivrate und die Entstehung von Fernmetastasen hängen wesentlich von der Lokalisation des Tumors ab (Madoff 2004, Schmiegel et al. 2004, Tominaga et al. 1996). Bei einer Lokalisation im Rektum ist mit einer höheren Lokalrezidivrate zu rechnen als bei einem KRK, das im proximalen Abschnitt des Kolons liegt (Tominaga et al. 1996). Da die Entstehung eines Lokalrezidivs die Lebensqualität des Patienten enorm beeinflusst, ist ein Hauptziel im Rahmen der Behandlung des Rektumkarzinoms, die Entstehung des Lokalrezidivs zu verhindern (Madoff 2004). KRK, die im proximalen Kolon lokalisiert sind, metastasieren am ehesten in die Leber oder Lunge und neigen wenig zur Entstehung eines Lokalrezidivs (Tominaga et al. 1996).

1.4.1 Anatomische Grundlage für die Unterteilung zwischen Kolon und Rektum

Die Grenze zwischen Kolon und Rektum wird unterschiedlich definiert. Die intraoperative Beurteilung der peritonealen Umschlagsfalte ist unzuverlässig, da sie sehr von Alter, Geschlecht und anderen Faktoren abhängig ist. Rektumkarzinome werden nach den Höhenangaben mit dem starren Rektoskop definiert, dabei gilt die Anokutanlinie als distaler Messpunkt. Nach der International Union Against Cancer (UICC) 2003 werden Rektumkarzinome entsprechend ihrem Abstand von der Anokutanlinie in Karzinome des oberen Rektumdrittels (12-16 cm), des mittleren Rektumdrittels (6-<12 cm) und des unteren Rektumdrittels (<6 cm) unterteilt (Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten 2005).

1.4.2 Embryologische Grundlage für die Unterteilung zwischen Kolon und Rektum

Ein weiterer Unterschied des distalen (Rektum) und proximalen Kolons ist die unterschiedliche embryonale Anlage der beiden Abschnitte (Birkenkamp- Demtroder et al. 2005). Coecum, Colon ascendens und die ersten zwei Drittel des Colon transversum sind aus dem embryonalen Mitteldarm angelegt (rechtes Kolon). Das distale Drittel des Colon transversum, Colon descendens, Sigma und Rektum entstehen aus dem embryonalen Enddarm (linkes Kolon). Damit ist auch die Blutversorgung unterschiedlich: das rechte Kolon wird von der Arteria mesenterica superior versorgt und das linke Kolon von der Arteria mesenterica inferior. Der venöse Abfluss und die Lymphdrainage richten sich nach diesen Gefäßen.

Nach den Definitionen des Kolons und des Rektums sind die Diagnostik, die Therapie und die Prognose der Tumore in den beiden Abschnitten des Dickdarms sehr unterschiedlich.

1.5 Prognose und Therapie

1.5.1 TNM- Klassifikation

Die TNM- Klassifikation beschreibt die Ausdehnung des Tumors. Dabei wird der histologische Ausbreitungsgrad T, der Befall von regionären Lymphknoten N und der Metastasierungsgrad M angegeben.

T – Primärtumor

TX Primärtumor kann nicht beurteilt werden.

T0 Kein Anhalt für einen Primärtumor

Tis Carcinoma in situ.

T1 Tumor infiltriert Submukosa.

T2 Tumor infiltriert Muscularis propria.

T3 Tumor infiltriert durch die Muscularis propria in die Subserosa oder in nicht peritonealisiertes perikolisches oder perirektales Gewebe.

T4 Tumor perforiert das viszerale Peritoneum oder infiltriert in andere Organe oder Strukturen.

Anmerkung

Tis liegt vor, wenn Tumorzellen innerhalb der Basalmembran der Drüsen (intraepithelial) oder in der Lamina propria (intramukös) nachweisbar sind, ohne dass eine Ausbreitung durch die Muscularis mucosae in die Submucosa feststellbar ist.

Direkte Ausbreitung in T4 schließt auch die Infiltration mehrerer Segmente des Kolorektums auf dem Weg über die Serosa ein, z.B. die Infiltration des Sigma durch ein Zökumkarzinom.

N - Regionäre Lymphknoten

NX Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden.

N0 keine regionären Lymphknotenmetastasen.

N1 Metastasen in 1-3 perikolischen bzw. perirektalen Lymphknoten.

N2 Metastasen in 4 oder mehr perikolischen bzw. perirektalen Lymphknoten.

pN0 Regionäre Lymphadenektomie und histologische Untersuchung üblicherweise von 12 oder mehr Lymphknoten. Wenn die untersuchten Lymphknoten tumorfrei sind aber die geforderte Richtzahl nicht erreicht wird, soll der Befund dennoch als pN0 klassifiziert werden.

M - Fernmetastasen

MX Das Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden.

M0 Keine Fernmetastasen.

M1 Fernmetastasen vorhanden.

Grading

Das Grading gibt den Malignitätsgrad des Tumors wieder, es richtet sich nach dem Differenzierungsgrad des Tumors.

GX Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden

G1 hoch differenziert

G2 mäßig differenziert

G3 niedrig differenziert

G4 entdifferenziert

Klinisches Stadium in Bezug auf die TNM- Klassifikation

Tabelle 1.5.1/1

Klinisches Stadium in Bezug auf die pathologische Klassifikation beim KRK

Klinisches Stadium	Tumorausbreitung (T)	Lymphknotenstatus (N)	Fernmetastasierung (M)
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1, T2	N0	M0
Stadium IIA	T3	N0	M0
Stadium IIB	T4	N0	M0
Stadium IIIA	T1, T2	N1	M0
Stadium IIIB	T3, T4	N1	M0
Stadium IIIC	Jedes T	N2	M0
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1

1.5.2 Prognose

Die Prognose des KRK ist wesentlich abhängig von der Lokalisation des Tumors, von der Ausdehnung des Tumors nach der TNM-Klassifikation und vom histologischen Malignitätsgrad. Die 5-Jahresüberlebensrate richtet sich nach dem klinischen Staging und der histopathologischen TNM-Klassifikation (Tab. 1.5.2/1, Schmiegel et al. 2000). Die tumorbedingte Mortalität wird mit etwa 40% angegeben (Felix-Burda-Stiftung, www.darmkrebs.de). Circa 30% der KRK sind bei Diagnosestellung in einem nicht resektablen Stadium und die Hälfte der Patienten mit einem KRK entwickeln im Laufe der Erkrankung ein Lokalrezidiv oder Metastasen (Hauser 2004).

Tabelle 1.5.2/1

5-Jahresüberlebensrate beim KRK nach klinischem Stadium, Dukes' Klassifikation und TNM-Klassifikation (Schmiegel et al. 2000, S. 80)

Stadium	Dukes	T	N	M	5- JÜR
0		Cis	0	0	98 – 100 %
I	A	1	0	0	95 – 100 %
	A	2	0	0	
II	B	3	0	0	80 – 85 %
	B	4	0	0	
III	C1	jedes T	1	0	50 – 70 %
	C2	jedes T	2, 3	0	
IV	D	jedes T	jedes N	I	5 – 15 %

1.5.3 Therapie

Die Therapie des KRK richtet sich nach der Lokalisation des Tumors im Dickdarm. Als Therapie kommt eine chirurgische Resektion mit einem kurativen Ansatz, und eine Chemo- und/oder Radiotherapie in Frage. Dabei muss klar zwischen der Therapie des Tumors im Kolon versus Rektum differenziert werden. Ein Rektumkarzinom wird entsprechend der Stadieneinteilung zusätzlich neoadjuvant behandelt. Im Stadium I (T1/2 N0 M0) ist eine neoadjuvante Therapie nicht indiziert (Schmiegel et al. 2008). Beim Rektumkarzinom im Stadium I ist bei adäquater operativer Therapie (radikale Operation + totale mesorektale Exzision + En-Bloc-Lymphknotendissektion) die Lokalrezidiv- und Fernmetastasenrate gering (Kapiteijn et al. 2001). Die neoadjuvante Radio- oder Radiochemotherapie ist im Stadium II und III indiziert (Schmiegel et al. 2008). Patienten im Stadium II und III profitieren von einer präoperativen Bestrahlung aufgrund einer signifikanten Reduzierung der Lokalrezidivrate und einer hohen Rate sphinktererhaltender Operationsverfahren durch die Vorbehandlung (Cedermark et al. 1997, Frykholm et al. 1993, Kapiteijn et al. 2001, Kinoshita et al. 2004, Sauer et al. 2004). Das Ziel der neoadjuvanten Radiochemotherapie (NRCT) ist es, bei fortgeschrittenem Rektumkarzinom (Aprigliano 2004) ein Downsizing und ein Downstaging des Tumors zu erreichen (Habr-Gama et al. 2004). Eine Standardempfehlung für die neoadjuvante Behandlung beim metastasierten Rektumkarzinom (Stadium IV) gibt es nicht; bei primärer Radiochemotherapie sollte eine intensivierete Kombinationschemotherapie durchgeführt werden (Schmiegel et al. 2008). Die NRCT stellt den wesentlichen Unterschied

zwischen dem Kolon- und Rektumkarzinom dar, da die Radiochemotherapie (RCT) für das Kolonkarzinom aufgrund der anatomisch ungünstigen Lage in Bezug auf die inneren Organe nicht angewandt wird.

Das Kolonkarzinom wird operativ mit nachfolgender adjuvanter Chemotherapie ohne eine vorangehende neoadjuvante Therapie behandelt (Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten 2005, Schmiegel et al. 2008). Durch die Chemotherapie wird versucht, das Gesamtüberleben zu verlängern (Brierley et al. 2004). Voraussetzung für eine kurative Therapie ist eine R0-Resektion (Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten 2005). Diese verlangt die Entfernung des tumortragenden Darmabschnittes mit den regionären Lymphknoten. In der Regel erfolgt die Resektion beim KRK als Hemikolektomie unter Mitnahme des Mesokolons und der dazu gehörigen Lymphknoten. Bei einer Lokalisation an einer Flexur wird die Tumorexstirpation als erweiterte Hemikolektomie durchgeführt.

Beim Rektumkarzinom erfolgt die Resektion je nach Lage des Tumors im Rektum als kontinenterhaltende Rektumresektion, oder als Rektumamputation mit Anlage eines Kolostomas.

1.6 Komparative genomische Hybridisierung

Die komparative genomische Hybridisierung (CGH) stellt eine molekularzytogenetische Methode dar, mit der es möglich ist, relative DNS-Sequenzveränderungen im chromosomalen Maßstab im gesamten Genom darzustellen. Durch den Vergleich von DNS der entarteten mit den normalen Zellen können Verluste und Zugewinne von Chromosomenabschnitten in den Tumorzellen aufgezeigt werden (Kallioniemi et al. 1992). Der Vorteil der CGH ist die Überwindung der technischen Probleme der klassischen Zytogenetik (Reutzel et al. 2001), weil sie nicht von der mitotischen Aktivität der Tumorzellen abhängig ist und auch an Formalin-fixiertem Gewebe möglich ist.

Chromosomale Veränderungen beim KRK

Im Folgenden wird versucht eine Übersicht von bereits in der Literatur angegebenen CGH-Veränderungen beim primären KRK darzulegen (Tabelle 1.6/1).

Tabelle 1.6/1
CGH-Ergebnisse bei primären KRK

	Zugewinne	Verluste
Diep et al. 2004	+20p, +20q, +13q, +8q, +7p, +7q	-18p, -18q, -8p, -4q, -17p
De Angelis et al. 1999	+20q, +13q, +8q, +7p, +17q, +5p, +6p, +19q, +Xq	-18q, -8p, -4q, -1p, -17p, -5q, -15q, -3p, -6q, -9p, -10q
Nakao et al. 1998	+20p, +20q, +12q, +11p, +16p	-18q, -22q
Meijer et al. 1998	+20q, +13q, +7p, +7q, +8q	-18q, -8p, -4q
Hermesen et al. 2002	+20q, +13q, +8q	-18q, -8p, -17p, -15q
Hughes et al. 2006	+1q, +3q, +3p	-6q, -9p, -21q
Rooney et al. 2001	+20q, +13q, +8q, +7p, +1q	-18q, -4q, -18p, -17p, -15q
Aust et al. 2000	+20p, +20q, +13q, +8q, +7p, +7q, +5p, +Xp, +Xq	-18q, -8p, -4p, -4q, -18p, -14q, -17p, -5q, -17q
Ried et al. 1996	+20q, +13q, +8q, +7p, +1q, +5p	-18q, -8p, -4p, -4q, -17p
Liu et al. 2007	+20q, +13q, +8q, +7p, +7q	-18q, -8p, -17p, -22q

Legende: + Zugewinn, - Verlust, ++ Amplifikation

Eine weitere Metaanalyse untersuchte bereits veröffentlichte Veränderungen von CGH-Analysen und versuchte zu beschreiben, dass einzelne Studien bedingt durch die begrenzte Anzahl der Teilnehmer eine eingeschränkte Reliabilität aufweisen (Tabelle 1.6/2, Hughes et al. 2006). In dieser Metaanalyse wurden zusätzliche Aberrationen beschrieben.

Tabelle 1.6/2
Untersuchung bereits veröffentlichter Veränderungen und zusätzliche Ergebnisse der Metaanalyse mittels CGH bei KRK (Hughes et al. 2006)

	Verluste	Zugewinne
Bereits veröffentlichte Veränderungen	-18 -17p -8p -4p	+20 +13q +8q +7p
Ergebnisse der Metaanalyse	-6q -9p -21q	+1q +3

Legende: + Zugewinn, - Verlust, ++ Amplifikation

Die aktuelle Datenlage über genetische Aberrationen beim KRK (Tabelle 1.6/3, Liu et al. 2007) beschreibt die beobachteten Veränderungen in Bezug auf das klinische Stadium, auf Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen und in Relation zu einer schlechteren Prognose.

Tabelle 1.6/3

Untersuchung von 73 Patienten mit einem KRK mittels CGH in Bezug auf klinisch- pathologische Parameter (Liu et al. 2007)

Klinisch- pathologische Parameter	Spezielle CGH- Veränderungen					
Stadium I	+8q			-17p	+13q	+20q
Stadium III/IV	+8q	-18q	-8p			
Lymphknotenmetastasen	+8q		-8p			
Fernmetastasen/ Lokalrezidiv	+8q	-18q				
Schlechtes Outcome	+8q	-18q	-8p			

Legende: + Zugewinn, - Verlust, ++ Amplifikation

Die Arbeit von Alcock et al. 2003 untersuchte 17 Fälle mit einem KRK (Tabelle 1.6/4). 57 subchromosomale Regionen (Tabelle 1.6/5) wurden in diesen Fällen mittels Mikrodissektion und anschließender CGH analysiert. Dabei wurden sechs Kategorien für die Auswertung definiert und die Veränderungen in Bezug auf diese aufgetragen. Es wurden bestimmte Veränderungen gleich oft bei den angegebenen Kategorien und bestimmte assoziative Veränderungen in Bezug auf die Kategorien beobachtet (Alcock et al. 2003)

Tabelle 1.6/4

Gleich häufige CGH-Veränderungen bei definierten 6 Kategorien bei 17 Fällen mit einem KRK (Alcock et al. 2003)

Kategorien	Zugewinne	Verluste
Coexistente Adenome	Xq	8p
Tumorausbreitung über die Muskelwand hinaus	12q	16p
Tumorausbreitung bis zur Muskelwand		9p
Tumorausbreitung bis zur Serosa		15q
Lymphknotenmetastasen vorhanden		18q
Lebermetastasen vorhanden		10q

Tabelle 1.6/5

Spezielle CGH- Veränderungen in Bezug auf 4 Kategorien bei 17 Fällen mit einem KRK (Alcock et al. 2003)

Kategorie	Spezielle Verluste	Spezielle Zugewinne
Metastasierter Tumor	12p 10p	
Nicht- metastasierter Tumor	8p	
Tumorausbreitung bis zur Serosa	6q	4q
Adenome	15q	

Des Weiteren werden Arbeiten vorgestellt, die jeweils den Primärtumor und die dazugehörigen Metastasen mittels CGH untersucht haben (Tabelle 1.6/6). Die Arbeit von Aragane et al. 2001 untersuchte Lebermetastasen von KRK. Al- Mulla et al. 1999 beschäftigten sich mit Metastasen von KRK in Lymphknoten und Leber, Knösel et al. 2002 haben CGH-Veränderungen bei Metastasen von KRK in Leber, Gehirn, Lymphknoten, Lunge und Peritoneum beschrieben.

Tabelle 1.6/6

CGH- Veränderungen beim Primärtumor (KRK) und dazugehörige Metastasen

	Veränderungen Primärtumor	Veränderungen Metastase
Aragane et al. 2001	+7p, +7q, +8q, +12p, +14q, +16p, +20p, +20q, +21q. -9p, -18q	Zusätzlich: +8q, +15q, +19p, +20q. -18q, -5q, -13q
Al- Mulla et al. 1999	+6p, +16q, -8p, -11q. -17p	+6p, +7p, +8q, +11q, +13q, +16q, +17q, +20q. -4p, -4q, -11q, -15p, -15q, -17p, -18p, -18q, -22p, -22q
Nakao et al. 2000	+8q, +13q, +20p, +20q. -17p, -18p, -18q, -22q	Vermehrte Banden an: +6q, +7q, +8q, +13q, +20q
Knösel et al. 2002	+20q, +7q, +16p, +19p, +9q, +19q, +13q, +17q, +22q, +8q, +1q. -18q, -4p, -4q, -5q, -1p, -21q, -6q, -3p, -8p, -9p, -11q, -14q, -3q, -10q, -15q, -10q, -2q	Zusätzlich : +1q, +17p, +17q, +17p, +19p, +19q. -2q, -3p, -5q, -8p, -9p, -10q, -11p, -12p, -21q

Legende: + Zugewinn, - Verlust, ++ Amplifikation

Knösel et al untersuchte 2003 den Zusammenhang zwischen den Veränderungen im Genom mittels der CGH und dem klinischen Überleben bei 37 Patienten (Tabelle 1.6/7). Dabei konnte festgestellt werden, dass bestimmte Veränderungen mit einem längeren oder kürzeren tumorspezifischen Überleben einhergehen und dass eine Einteilung in high- und low-risk-Gruppen aufgrund molekularer Veränderungen getroffen werden kann (Knösel et al. 2003).

Tabelle 1.6/7

CGH- Veränderungen in Bezug auf das tumorspezifische Überleben bei 37 Patienten mit einem KRK (Knösel et al. 2003)

	Zugewinne	Verluste
Kürzeres tumorspezifisches Überleben	2p 6q 15q 22q	1p 4q 8q 8p 9p
Längeres tumorspezifisches Überleben	20q	18q
Kürzeres Gesamtüberleben	2p 15q 22q	1p 4q

1.7 Fragestellung

Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit werden anhand der Tumorlokalisation des kolorektalen Karzinoms (KRK) unterschiedliche chromosomale Veränderungen im Zuge der Tumorigenese des KRK mittels der komparativen genomischen Hybridisierung (CGH) untersucht. Folgende Fragen sollen dabei beantwortet werden:

1. Gibt es ein unterschiedliches chromosomales Aberrationsmuster zwischen Rektumkarzinomen und rechtseitigen Kolonkarzinomen?
2. Welchen Einfluss haben chromosomale Aberrationsmuster auf die Prognose beim KRK?

2. Material und Methoden

2.1 Beschreibung des Patientenkollektivs

Es galten folgende Auswahlkriterien für das Kollektiv:

- 1) Ein Tumorstadium pT3 nach der TNM- Klassifikation
- 2a) Ein Adenokarzinom im rechten Kolon: Coecum, Colon ascendens, Flexura hepatica, Colon transversum *oder*
- 2b) Ein Adenokarzinom im Rektum unterhalb der peritonealen Umschlagsfalte
- 3) Es wurden nur Adenokarzinome ohne vorangegangene tumorspezifische Therapie (CT, RCT) untersucht
- 4) Vollständige Resektion des Primär-Tumors (R0-Resektion)

Aus dem Zeitraum von 1998-2004 wurden aus dem Archiv des Zentrums Pathologie des Universitätsklinikums Göttingen insgesamt **75** Patienten entsprechend den oben angegebenen Auswahlkriterien zufällig ausgewählt. **54** der **75** Patienten wurden in der Abteilung Allgemein Chirurgie aus dem Zentrum Chirurgie der Universitätsmedizin Göttingen (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H. Becker), **20** Patienten in der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie; Zentrum für Minimal Invasive Chirurgie des Albert-Schweitzer Krankenhauses Northeim (Chefarzt: Dr. med. J. Kuhlitz) und ein weiterer Patient in der Abteilung für Allgemein Chirurgie des Evangelischen Krankenhauses Göttingen- Weende e.V. (Chefarzt: Dr. med. B. Fleischer) tumorreseziert.

Das Kollektiv umfasste **75** primäre KKR von **44** männlichen und **31** weiblichen Patienten. Davon waren **26** KKR im proximalen Kolon lokalisiert, die übrigen **49** Fälle waren im Rektum unterhalb der peritonealen Umschlagsfalte lokalisiert.

Um Stadien-spezifische Unterschiede zwischen proximalen und distalen kolorektalen Karzinomen zu verdeutlichen, wurden für das vorliegende Kollektiv lediglich lokal fortgeschrittene Tumore im Stadium pT3 ausgewählt. Die Patienten in diesem Stadium wurden je nach Lymphknotenstatus und Metastasierungsgrad adjuvant oder palliativ behandelt. Daher ist es gerade bei diesen Tumoren interessant, ob aus der Genetik Ereignisse abzuleiten sind, die zur Metastasierung führten.

2.2 DNA-Isolierung

2.2.1 Isolierung der Tumor-DNA aus Paraffin

Um einen möglichst hohen Prozentsatz an Tumorzellen im Ausgangsmaterial zu haben, wurden auf den zu den Paraffinblöcken gehörenden HE-Schnitten die Tumorzellen enthaltenden Bereiche markiert. Anschließend wurden diese Bereiche mit einem Skalpell so bearbeitet, dass die folgenden mit dem Mikrotom (Reichert-Jung (Leica Microsystems AG), Wetzlar, Deutschland) hergestellten Schnitte möglichst kein tumorfreies Gewebe enthielten.

Zum Entparaffinieren wurde zu jeder Probe 1 ml Xylol (Merck, Darmstadt, Deutschland) in die Eppendorf-Cups gegeben (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und der Ansatz kurz mit einem Vortex-Gerät gemischt (Vortex Genie 2, Scientific Industries, Bohemia, USA). Anschließend erfolgte eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Nach 1 min Zentrifugation (Centrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 10000 rpm wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Mit 1 ml Xylol pro Probe wurde dieser Schritt wiederholt. Um die Xylolreste zu entfernen, wurde danach 1 ml 100% Ethanol (Roth; Karlsruhe, Deutschland) zu jeder Probe dazugegeben, kurz gevortext und der Ansatz wiederum 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 1 min Zentrifugation bei 10000 rpm wurde der Überstand erneut abgenommen verworfen. Auch dieser Schritt wurde mit 100%igem Ethanol wiederholt.

Nach Trocknung des Gewebes für 1 Stunde bei 60 °C im Wärmeschrank (Memmert, Schwabach, Deutschland) wurden 240 µl DNA-Isolierungspuffer (siehe Tabelle. 2.2.1/1) und 40 µl Proteinase K (50 U/ml, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) zum Gewebe in das Eppendorf-Cup pipettiert (für Frischgewebe 360 µl DNA-Isolierungspuffer und 40 µl Proteinase K). Anschließend wurde das Gewebe bei 55 °C über Nacht im Thermomixer mit einer Schüttelfrequenz von 850 rpm (Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) inkubiert, um die Zellproteine aufzuspalten und die DNA freizulegen (u.a. zelluläre DNAsen werden durch die Proteinase K inaktiviert).

Tabelle 2.2.1/1
Materialien DNA- Isolierung

Name	Zusammensetzung
DNS-Isolierungspuffer	50 mM Tris-HCl (MBI Fermentas; St. Leon-Rot, Deutschland) 1 mM EDTA (Serva, Heidelberg, Deutschland) 0,5% Tween20 (Merck, Darmstadt, Deutschland) ph 8,5 (ph-Meter: Schott, Mainz, Deutschland)

Am nächsten Tag erfolgte die anschließende Inaktivierung der Proteinase K über 8 min bei 95 °C im Thermomixer. Nach einer darauffolgenden 10 minütigen Zentrifugation bei 13500 rpm wurde der DNA-enhaltende flüssige Überstand in ein neues Eppendorf-Cup vorsichtig übernommen, dabei wurde darauf geachtet, Kontamination mit Paraffin und Geweberesten zu vermeiden. Die weitere Isolierung bzw. Aufreinigung der DNA erfolgte mit Hilfe eines Qiagen-Kit (QIAamp (DNA Mini Kit (250); Qiagen; Hilden, Deutschland) gemäß den Angaben des Herstellers. Die extrahierte DNA wurde bis zur Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Um die Konzentration und Reinheit der DNA zu überprüfen, wurde eine photometrische Messung (Photometer: Eppendorf, Hamburg, Deutschland) mit Einmalplastikküvetten (UVette, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Durch Aufnehmen der Extinktion, d.h. durch die Abschwächung einer Strahlung in einem Medium, hier bei einer Lichtwellenlänge von 260 nm kann man die Konzentration in $\mu\text{g}/\text{ml}$ angeben und die Reinheit der DNA in dieser Lösung bestimmen.

2.2.3 Gelelektrophorese

Um die Molekülgrößen der fragmentierten DNA zu bestimmen, wurde eine Gelelektrophorese (1,5%-Agarose-Gel) mit der extrahierten DNA durchgeführt. Die Bestimmung der Fragmentlängen erfolgte mit dem Lambda-Marker (Fragmentlänge: 21-0,56 kb MBI-Fermentas; St. Leon-Rot, Deutschland) als Längenstandard, der parallel zur Proben-DNA in eine eigene Geltasche pipettiert wurde. Zum Sichtbarmachen der DNA wurde Ethidiumbromid (SIGMA; St. Louis; USA) verwendet, welches in die DNA interkaliert und bei Bestrahlung

durch UV-Licht der Wellenlänge von 312 nm fluoresziert. Zur weiteren Verwendung für die CGH sollte die Länge der einzelnen Fragmente zwischen 600 bis 2000bp (Kallioniemi et al. 1992) liegen, bei kleineren Fragmenten ist die DNA zu stark fragmentiert.

Für die Vorbereitung der Gelproben wurden jeweils 5 µl DNA-Lösung und 3 µl Loading Dye (MBI-Fermentas; St. Leon-Rot, Deutschland) in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert. Für den Längenstandard wurden neben den 3 µl Loading Dye statt der DNA 5 µl Ampuwa und 1.5 µl Lambda-DNA (0,5 µg/µl) pipettiert. Der Zusatz von Bromphenolblau im Loading-Dye ermöglicht während der Elektrophorese den Lauf der DNA optisch verfolgen zu können.

2.3 Komparative genomische Hybridisierung

Die CGH wurde in allen 75 Fällen aus Paraffingewebe durchgeführt. Davon mussten 19 Fälle neu untersucht werden, da sie technisch nicht gelungen waren. Bei 16 der 19 Fälle wurde beim zweiten Versuch ein anderer Paraffinblock des Tumorgewebes genommen.

Die CGH ist eine auf der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) beruhende, erstmals 1992 beschriebene, molekularzytogenetische Methode, mittels der man einen Überblick über die gesamten chromosomalen und subchromosomalen Verluste und Zugewinne eines Tumors erlangen kann (Kallioniemi et al. 1992).

Die so gewonnenen Erkenntnisse können u.a. zur Identifizierung/Lokalisation von spezifischen Aberrationen benutzt werden, die eine prognostische Bedeutung für den Patienten haben können.

Die Größenordnung des Auflösungsvermögens der auswertbaren Veränderungen liegt bei etwa 10 MB (Megabasen), hin zu maximal 100 Kilobasen bei Amplifikationen, d.h. mehrfachen Zugewinnen (Kallioniemi et al. 1992).

Für eine CGH-Analyse sind folgende Schritte notwendig:

1. DNA-Isolierung aus Gewebe
2. Markierung der Tumor- und Referenz-DNA mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen durch die Nick-Translation
3. Hybridisierung der markierten Tumor- und Referenz-DNA mit Metaphase-Chromosomen
4. Auswertung der CGH.

Bei der Hybridisierung konkurrieren grün- farbmarkierte Tumor- und rot- farbmarkierte Referenz-DNA um die Bindungsstellen auf den Metaphase-Chromosomen. Beim Überwiegen von Tumor-DNA (Zugewinn) bindet diese statistisch häufiger an den Chromosomen als die Referenz, bei einem Verluste innerhalb des Tumor-Genoms überwiegt die Referenz-DNA. Durch quantitative Messung des roten und grünen Fluoreszenzsignals über die Längsachse eines jeden Chromosoms lässt sich nun eine Aussage treffen über Verluste, Zugewinne und Amplifikationen der Tumor- DNA.

2.3.1 Nick-Translation

Während der Nick-Translation wird in die extrahierte DNA als Marker Biotin (Tumor-DNA) bzw. Digoxigenin (Referenz-DNA) eingebaut, die im Detektionsschritt mit fluoreszenzmarkierten Antikörper gekoppelt werden (grün bei der Tumor- und rot bei der Referenz-DNA) . Mit Hilfe der DNase I werden bei diesem Prozess Einzelstrangbrüche in die DNA geschnitten (“nicks”), die dann durch die DNA-Polymerase I unter Einbau von Biotin bzw. Digoxigenin wieder aufgefüllt werden.

Für die Nick-Translation wurde zügig nach folgendem Schema in vorbereitete Eppendorf-Cups pipettiert:

- 3 µg Tumor-DNA
- 10 µl DNA-Puffer (10x konzentriert) MBI Fermentas; St. Leon-Rot, Deutschland
- 2 µl dATP, dCTP, dGTP Pharmacia Biotech; Freiburg, Deutschland
- 1 µl dTTP Pharmacia Biotech; Freiburg, Deutschland
- 1 µl 1 mM Biotin-16-dUTP/1 mM Digoxigenin-11-dUTP Roche; Mannheim, Deutschland
- 2 µl DNA-Polymerase I MBI Fermentas; St. Leon-Rot, Deutschland
- 1 µl DNase I – Verdünnung siehe Tabelle 2.3.1/1
- 100 µl Ampuwa.

Die 3 µg an benötigter DNA pro Ansatz wurden anhand der während der DNA-Isolierung gewonnenen DNA-Konzentrationswerte errechnet. Die bei -20 °C gelagerten Nukleotide wurden langsam auf Eis erwärmt.

Tabelle 2.3.1/1
Materialien Nick- Translation

Name	Zusammensetzung/ Hersteller
DNase I – Verdünnung (1: 50 verdünnt)	98 µl TRIS-HC, 100 mM, ph 7,5 2 µl DNase (Boehringer; Mannheim, Deutschland)

Die Eppendorf-Cups wurden anschließend nach kurzem vortexen bei 15 °C und 1400 rpm für 50 min (Tumor-DNA) bzw. 60 min (Referenz-DNA) auf dem Thermomixer inkubiert. Da die Referenz-DNA aus Frischgewebe besteht muss hier mit einer längeren Inkubationszeit gearbeitet werden. Wenn die Tumor-DNA, die aufgrund biochemischer Vorgänge bereits degradiert ist, ebenfalls 60 Minuten inkubiert wird entstehen zu kleine DNA-Fragmente, sodass die Sonden unspezifisch binden würden. Nach der Nick-Translation sollten die einzelnen DNA-Fragmente eine Länge von 500-1500 bp besitzen. Zur Überprüfung wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Diese erfolgte analog der Gelelektrophorese bei der DNA-Isolierung (siehe DNA-Isolierung). Als Längenstandard wurde abweichend pUC19 (MBI Fermentas; St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet. Im Falle zu langer DNA-Fragmente wurde eine zweite Inkubationszeit für 5-10 min bei 15°C auf dem Thermomixer angeschlossen. Zur Abstoppen der Reaktion wurden die Proben bei -20 °C eingefroren.

2.3.2 Hybridisierung

Auf die Nick-Translation folgte die Hybridisierung sowohl der markierten Tumor-DNA wie auch der Referenz-DNA auf die vorgefertigten Objektträger (CGH Target Slides; Vysis Inc.;Downers, Grove, IL) mit den Metaphasechromosomen. Die Objektträger wurden zur Beseitigung von Kondenswasser zu Beginn bei 37°C auf die Wärmeplatte der feuchten Kammer (Hybrite TM; Vysis; Stuttgart-Fasanenhof, Deutschland) gelegt. Zum Abstoppen der DNase und Polymerase wurde nun die Nick-DNA-Lösung mit 5 µl EDTA (Serva, Heidelberg, Deutschland) versetzt und für 5 min bei 37 °C und 1400 rpm im Thermomixer inkubiert. In die vorbereiteten Eppendorf-Cups wurden jetzt die Tumor- und Referenz-DNA, sowie die repetitive Sequenzen enthaltene humane Cot-1-DNA (1 µg/µl, Boehringer, Mannheim, Deutschland) zusammengeführt und mit 12 µl 3 M Natriumacetatlösung pH 4,8 (Merck, Darmstadt, Deutschland) sowie 570 µl Ethanol bei -80 °C für 0,5-2 Stunden präzipitiert. Aufgrund der im Mengenvergleich zur Tumor- und Referenz-DNA im starken Überschuss vorliegenden Cot-1-DNA blockiert diese die repetitiven Sequenzen. Repetitive Sequenzen sind

DNA-Bereiche im Erbgut, deren Sequenz aus sich wiederholenden Abschnitten besteht. Diese Bereiche, meistens um das Zentromer lokalisiert, enthalten sehr viel Heterochromatin, welches nicht transkribiert wird und somit nicht zu verwerten ist.

Pipettierschema:

- 67 µl Nick-Tumor DNA
- 67 µl Nick-Referenz DNA
- 80 µl Cot-1 DNA
- 12 µl NaAc / 3 M / pH 4,8
- 570 µl 100% Ethanol (-20 °C).

Der Ansatz wurde nach kurzen Vortexen der Eppendorf-Cups für 30 min bei -80 °C präzipitiert. Nach dem Fällen der DNA wurden die Ansätze 30 min bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert. Nach dem Abpipettieren und Verwerfen des Überstands wurden zum verbleibenden DNA-haltigen Pellet zur Reinigung 800 µl 70% Ethanol pipettiert und bei 45 °C sowie 1400 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend wurde erneut für 5 min bei 4 °C mit 14000 rpm zentrifugiert, bis auf das Pellet wurde danach der flüssige Überstand verworfen und das Pellet für 30 min bei Raumtemperatur unter dem Abzug getrocknet.

Das Pellet wurde nun mit 6 µl deionisiertem Formamid (Fluka Biochemika; Buchs, CH) resuspendiert und im Thermomixer bei 37 °C und 1400 rpm für 60 min inkubiert.

Da auf den Objektträgern die noch vorhandenen Proteinrückstände des Zellkerns die spätere Auswertung aufgrund unspezifischer Hybridisierung beeinflussen könnten, wurden die Objektträger im Vorfeld einer proteolytischen Pepsin-Behandlung unterzogen. Dazu wurde eine Glasküvette mit 70 ml Aqua dest. im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Nach dem Hinzufügen von 20 µl Pepsin (100 mg/ml, Sigma, St. Louis, USA) und von 700 µl 1 N HCl (Merck, Darmstadt, Deutschland) in eine Glasküvette wurden die Objektträger für 5 min darin belassen. Zum Abstoppen der Reaktion folgte für 5 min eine Küvette mit 2x SSC (siehe Tabelle 2.3.2/1) und die Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe mit 70%, 85% und 100% in -20 °C kaltem Ethanol für je 5 min. Die Objektträger wurden nun für 30 min bei Raumtemperatur getrocknet.

Zur Hybridisierung des Ansatzes an DNA-Einzelsträngen muss die in den Chromosomen bisher noch vorliegende Doppelhelix aufgetrennt (denaturiert) werden. Die Denaturierungslösung (siehe Tabelle 2.3.2/1) wurde in einer Glasküvette im Wasserbad auf 69 °C gebracht und jeweils 2 Objektträger aus der feuchten Kammer (Hybrite) genommen und für 2 min bei 69 °C in der Lösung belassen. Die anschließende Dehydrierung erfolgte nun in einer Küvette mit aufsteigender Alkoholreihe für jeweils 5 min mit 70%, 85% und 100% in -20°C kaltem Ethanol. Bei Raumtemperatur wurden die Objektträger getrocknet und bei 37 °C wiederum auf die Wärmeplatte der feuchten Kammer gelegt.

Tabelle 2.3.2/1
Materialien zur Hybridisierung

Name	Zusammensetzung
20xSSC (Strong Salt Concentration)	175,5 g Natriumchlorid (Merck, Darmstadt, Deutschland) 88,29 g Natriumcitratdihydrat (Merck, Darmstadt, Deutschland) ad 1000 ml Aqua bidest ph 7,0
Denaturierungslösung	5 ml 20xSSC , ph 7,0 5 ml 0,5 M NaH ₂ PO ₄ , ph 7,0 (Merck, Darmstadt, Deutschland) 5 ml Aqua bidest 35 ml deionisiertes Formamid (Merck, Darmstadt, Deutschland) ph 7,0
Master-Mix	30% Dextransulfat (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Den Proben im Eppendorf-Cup wurden 7 µl Master Mix zur Stabilisierung der DNA hinzugefügt und im Anschluss für 6 min bei 78 °C im Thermomixer denaturiert. Nach Zentrifugation bei 37°C für 30 Minuten wurden 13 µl des DNA-Mix zur Hybridisierung auf den Objektträger pipettiert. Der Objektträger wurde nun mit einem 15 x 15 mm Deckglas luftblasenfrei eingedeckelt und mit Fixogum (Marabu, Tamm, Deutschland) verschlossen und für 72 Stunden in der feuchten Kammer belassen. In dieser Zeit findet die Hybridisierungsreaktion statt, in der die einzelnen DNA-Fragmente, sowohl der Tumor- als auch der Referenz-DNA um die homologen Bindungsstellen auf den Metaphase-Chromosomen konkurrieren und, je nach Mengenverhältnis, binden.

2.3.3 Waschung

Nach 72 Stunden wurde zur Entfernung von Rückständen sowie unspezifisch hybridisierter DNA, nach Entfernung des Deckgläschen, ein dreimaliger Waschvorgang im Schüttelbad bei 42 °C in einer Küvette mit der Waschlösung A, danach ein dreimaliger Waschvorgang bei 42 °C mit der Waschlösung B, durchgeführt.

Unspezifische Bindungen durch die Fluoreszenz-Antikörper wurden durch 300 µl Blockinglösung blockiert und nach Inkubation für 30 min bei 37 °C in der feuchten Kammer erfolgte die Deckelung der Objektträger.

Lichtgeschützt wurden nun, nach einem Waschvorgang mit 2 ml der Waschlösung C, 300 µl der Detektionslösung mit den lichtempfindlichen fluoreszierenden Antikörpern gegen Biotin und Digoxigenin auf die Objektträger pipettiert und erneut bei 37 °C für 60 min in der feuchten Kammer inkubiert.

Materialien - Hybridisierung

Waschlösung A 70% deionisiertes Formamid + 2x SSC

Waschlösung B 0,1% Tween 20 + 2x SSC

Waschlösung C 0,1% Tween 20 + 2x SSC

Blockinglösung 3% bovines Serumalbumin (BSA), (SIGMA; St. Louis, USA) + 0,1%
Tween 20 + 4x SSC

Detektionspuffer 4x SSC + 1% BSA + 0,1% Tween 20

Detektionslösung 300 µl Detektionspuffer + 1,5 µl Fluoresceinisothiocyanat-Avidin
(Vector; Burlingame, USA) + 5 µl anti-Digoxigenin-Rhodamin (Roche;
Mannheim, Deutschland)

DAPI-Eindeckelungsmedium 1 ml Vectashield (Vector Laboratories; Burlingame, USA) + 50 µl Actinomycin (SIGMA; St. Louis, USA) + 1µl Diamino-2-phenylindol (SIGMA; St. Louis, USA)

Um die ungebundenen Antikörper zu entfernen, wurde ein dreimaliger Waschvorgang von je 5 min bei 42°C mit Waschlösung C in einem Schüttelwasserbad angeschlossen.

Die Präparate wurden mit je 20 µl DAPI-Eindeckelungsmedium eingedeckelt, die zur Gegenfärbung der einzelnen Chromosomen DAPI enthielt. Das langsame Ausbleichen der Fluochrome beschränkt die Fluoreszenzaufnahme auf ca. 14 Tage. Die Objektträger wurden anschließend bei 4°C lichtgeschützt gelagert.

2.3.4 Auswertung

Die Auswertung der Metaphasen erfolgte nach Aufnahme monochromer Bilder mit dem Programm SmartCapture2 (Vysis, Downers Grove, USA) durch eine computergekoppelte CCD-Kamera (Sensys Photometrics SENSYS; München, Deutschland) bei 880facher Vergrößerung und 8bit-Farbtiefe (256 Graustufen) mittels der Software Quips Karyotyping/CGH (Vysis, Downers Grove, USA). Als Mikroskop kam ein Axioskop 2 (ZEISS, Göttingen, Deutschland) mit 10er, 20er und 63er Objektiv (10x, 20x, 63x Ölimmersion, ZEISS, Göttingen, Deutschland) zum Einsatz. Die Ausleuchtung erfolgte durch eine Quecksilberdampf Lampe (HBO mit selbstjustierender Ausleuchtung; ZEISS, Göttingen, Deutschland), deren Licht durch ein softwareseitig gesteuertes Filterrad (Ludl-Filterrad, Ludl, Hawthorne, USA) mit einem anti-Digoxiginin-Rhodamin (FITC)-Filter (Firma, Ort, Land), einem Fluoresceinisothiocyanat (TRITC)-Filter (Firma, Ort, Land) und einem DAPI-Filter (Firma, Ort, Land) geschickt wurde.

2.3.5 Summeninterpretier

Durch die Generierung eines Summeninterpretiers mittels der CGH-Software aus durchschnittlich 15-20 CGH- Profilideogrammen wurden unerwünschte Rauscheffekte minimiert. Die Schwellenwerte für Verluste und Gewinne wurden für jede Hybridisierung individuell festgelegt (für Gewinne zwischen 1,15 bis 1,20 und für Verluste 0,80 bis 0,85). Von einer Amplifikation wurde bei einem Wert ab 1,5 gesprochen. In Einzelfällen wurden

diese Schwellenwerte verändert, wenn anhand des Interpreters ein deutlicher Trend zu beobachten war, der durch die Werte des 95% Konfidenzintervalls als signifikant angezeigt wurde. Die Beschreibung der Veränderungen erfolgte entsprechend der Nomenklatur für humane Chromosomen für in-situ Hybridisierung.

Nicht bewertet wurden chromosomale Aberrationen auf Chromosom 1p32-pter, 13p, 14p, 15p, 19, 21p, 22p, den Telomeren, den Zentromeren und in heterochromatinreichen Abschnitten auf 1q, 9q, 16q, Yq (Kallioniemi et al. 1992).

3. Ergebnisse

3.1 Klinisch-pathologische Parameter

3.1.1 Klinik

Das Kollektiv umfasste 75 primäre pT3-KRK von **44** männlichen und **31** weiblichen Patienten. Das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation lag zwischen 29 und 89 Jahren und betrug im Mittel 69,2 Jahre (\pm 11,7 Jahre) bei den Frauen und 65,7 Jahre (\pm 14,4 Jahre) bei den Männern. Das Alter der männlichen und weiblichen Patienten zum Zeitpunkt der Operation unterschied sich nicht signifikant ($p=0,3$, t-Test für unverbundene Stichproben).

3.1.2 Lokalisation

Von den 75 primären pT3-KRK waren 26 proximale Kolonkarzinome (34,67 %), darunter befanden sich sechs Fälle im Zökum, 15 im Colon ascendens, zwei an der Flexura hepatica und drei im Colon transversum. Die übrigen 49 Fälle lagen im Rektum (65,33 %) unterhalb der peritonealen Umschlagsfalte. Jeder Tumor wurde im Gesunden reseziert (R0).

3.1.3 Malignitätsgrad

Das KRK wurde bei einem der 75 (1,25%) Patienten als G1, bei 57 (76 %) Patienten als G2 und bei den restlichen 17 (22,67 %) Patienten als G3 klassifiziert. Die proximalen und die distalen KRK unterscheiden sich nicht signifikant im Differenzierungsgrad (Chi-Quadrat-Test, Tab. 3.1.3/1).

Tabelle 3.1.3/1

Malignitätsgrad bei 75 pT3-KRK Gesamt und nach Lokalisation

Grading	Gesamt	Proximales Kolon	Rektum	P-Wert
G1	1 (1,3 %)	1(3,9 %)	0 (0 %)	NA
G2	57 (76 %)	16 (61,5 %)	41 (83,7 %)	0,4
G3	17 (22,7 %)	9 (34,6 %)	8 (16,3 %)	0,2
Gesamt	75 (100 %)	26 (100 %)	49 (100 %)	

3.1.4 Lymphknotenstatus

Die durchschnittliche Anzahl untersuchter Lymphknoten betrug 25,5 pro Fall. Bei **40** der **75** Patienten (53,3 %) lagen regionäre Lymphknotenmetastasen (pN+) vor (Tab. 3.1.4/1). Bei den proximalen Kolonkarzinomen lag in 14 Fällen (53,8 %) und bei den Rektumkarzinomen in 26 Fällen (53,1 %) ein positiver Lymphknotenstatus vor. Die proximalen und die distalen KRK unterschieden sich nicht signifikant bezüglich eines Vorhandenseins von Lymphknotenmetastasen (Chi-Quadrat-Test, Tab. 3.1.4/1).

Tabelle 3.1.4/1
Lymphknotenstatus bei **75** pT3-KRK gesamt und nach Lokalisation

pN-Status	Gesamt	Proximales Kolon	Rektum	P-Wert
pN0	35 (46,7 %)	12 (46,2 %)	23 (46,9 %)	0,9
pN1	18 (24,0 %)	5 (19,2 %)	13 (26,5 %)	0,6
pN2	22 (29,3 %)	9 (34,6 %)	13 (26,5 %)	0,6
pN+	40 (53,3 %)	14 (53,8 %)	26 (53,1 %)	0,9
Gesamt	75 (100 %)	26 (100 %)	49 (100 %)	

3.1.5 Fernmetastasierung (M-Status)

Zum Zeitpunkt der Operation oder weniger als 3 Monate nach Erstdiagnose lag bei 12 (16%) der insgesamt 75 Patienten eine synchrone Fernmetastasierung vor.

Von den 26 Patienten mit einem proximalen KRK wiesen 8 (31 %) eine synchrone Fernmetastasierung auf, von den 49 Patienten mit einem Rektumkarzinom wiesen 4 (8,1 %) eine synchrone Fernmetastasierung auf. Die proximalen und die distalen KRK unterschieden sich signifikant bezüglich des Vorhandenseins von synchronen Fernmetastasen ($p=0,03$, Chi-Quadrat-Test).

3.1.6 Klinisches UICC-Stadium

Bei **31** (44,3 %) der 70 Patienten mit bekanntem pM-Status zum Zeitpunkt der Operation handelte es sich um Tumoren im klinischen UICC-Stadium II, bei **24** (34,3 %) Patienten um Tumoren im UICC-Stadium III und bei **15** (21,4 %) Patienten um Tumoren im UICC-Stadium IV (Tab. 3.1.6/1). Die proximalen Kolonkarzinome waren signifikant häufiger im Stadium IV

als die Rektumkarzinome (p=0,02, Chi-Quadrat-Test, Tab. 3.1.6/1).

Tabelle 3.1.6/1

Verteilung der UICC-Stadien bei 70 pT3-KRK

UICC-Stadium	Gesamt	Proximal Kolon	Rektum	P-Wert
II	31 (44,3 %)	9 (34,6 %)	22 (50,0 %)	0,6
III	24 (34,3 %)	7 (26,9 %)	17 (38,6 %)	0,6
IV	15 (21,4 %)	10 (38,5 %)	5 (11,4 %)	0,02
Gesamt	70 (100 %)	26 (100 %)	44 (100 %)	

3.2 Prognostischer Wert klinisch-pathologischer Parameter

3.2.1 Follow-up

Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich von 2 bis 103 Monaten und lag durchschnittlich bei 38 Monaten (\pm 24 Monate). Bei **5** der 75 Patienten konnte nicht eruiert werden, ob bzw. wann eine Metastasierung auftrat.

Als Progress wurde entweder eine synchrone oder metachrone Fernmetastasierung oder ein Lokalrezidiv angesehen. Bei 25 (35,7 %) der 70 Patienten lag ein Tumorprogress vor, davon bei 12 (17,1 %) Patienten als synchrone Fernmetastasierung, bei 9 weiteren (12,9 %) Patienten als metachrone Fernmetastasierung und bei 4 Patienten (5,7 %) als ein Lokalrezidiv.

Im Laufe des Beobachtungszeitraumes sind **27** (38,6 %) der **70** Patienten verstorben, davon **16** (21,3 %) am Tumorleiden und **8** (10,7 %) an einer anderen Ursache. Bei **3** (4 %) Patienten war die Todesursache unbekannt. Die restlichen **48** (64 %) Patienten lebten zum Zeitpunkt der letzten Kontaktaufnahme noch.

3.2.2 Vergleich nach Lokalisation

Bei 10 (38,5 %) der 26 Patienten mit einem proximalen Kolonkarzinom und bei 15 (30,6 %) der 49 Patienten mit einem Rektumkarzinom kam es innerhalb des Beobachtungszeitraumes zu einem Tumorprogress. Die mittlere tumorfreie Überlebenszeit lag beim Gesamtkollektiv bei 32,9 Monaten. Die Lokalisation des Primärtumors hatte keinen signifikanten Einfluss auf das rezidivfreie Überleben (Rektum: 32,5 Monate, proximal: 33,6 Monate, p=0,6; log-

rank/Mantel-Haenszel-Test, Abb. 3.2.2/1).

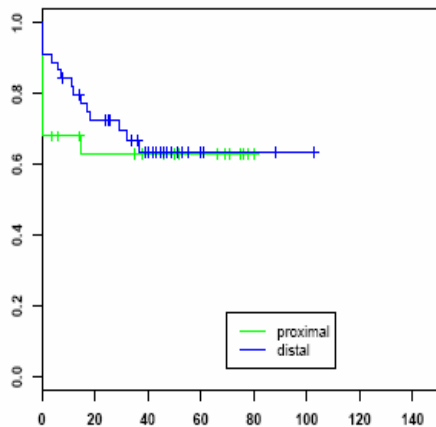


Abbildung 3.2.2/1
Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von der Lokalisation bei 70 pT3-KRK

Sieben (26,9 %) der 26 Patienten mit einem proximalen Kolonkarzinom und 9 (18,4 %) der 49 Patienten mit einem Rektumkarzinom verstarben innerhalb des Beobachtungszeitraumes an dem Tumorleiden. Die mittlere Gesamtüberlebenszeit lag für das Gesamtkollektiv bei 50,1 Monaten. Die Lokalisation des Primärtumors hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben (Rektum: 54,1 Monate, proximal: 42,6 Monate, $p=0,5$; log-rank/Mantel-Haenszel-Test, Abb. 3.2.2/2).

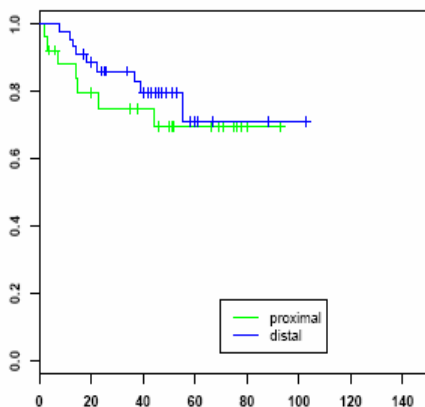


Abbildung 3.2.2/2
Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Lokalisation bei 70 pT3-KRK

Von den Patienten im UICC-Stadium III wiesen die Patienten mit einem Kolonkarzinom ein signifikant längeres tumorfreies Überleben auf als die Patienten mit einem Rektumkarzinom ($p=0,04$; log-rank/Mantel-Haenszel-Test, Abb. 3.2.2/3).

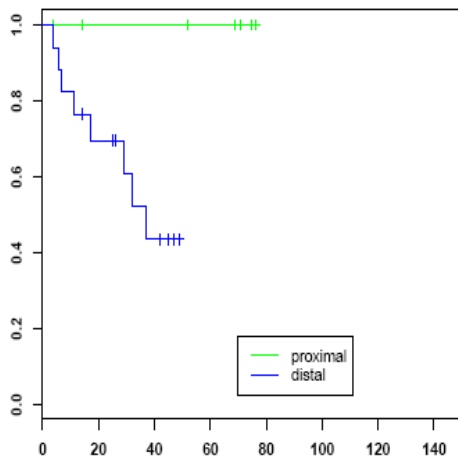


Abbildung 3.2.2/3
Tumorfreies Überleben in Monaten bei 24 Patienten mit einem pT3-KRK in Abhängigkeit von der Lokalisation bei einem UICC-Stadium III

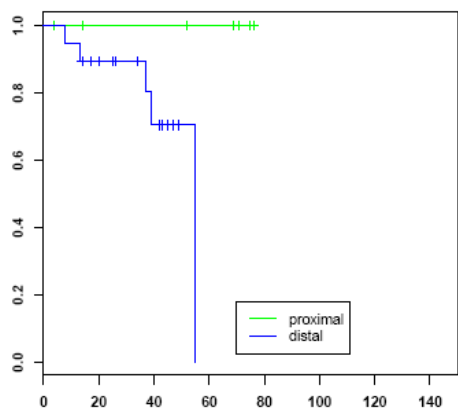


Abbildung 3.2.2/4
Gesamtüberleben in Monaten bei 24 Patienten mit einem pT3-KRK in Abhängigkeit von der Lokalisation bei einem UICC-Stadium III

Tabelle 3.2.2/1
UICC-Stadium versus Gesamtüberleben in Monaten bei 70 Patienten mit einem pT3-KRK

Klinisches Stadium	Durchschnittliches Gesamtüberleben in Monaten		
	Gesamtkollektiv	Proximales Kolon	Rektum
II	48,0	52,7	46,1
III	38,9	51,6	33,7
IV	28,7	27,2	31,6

3.2.3 Vergleich nach Lymphknotenstatus

Die Patienten mit tumorfreien Lymphknoten (pN0) hatten mit 43,3 Monaten ein signifikant längeres tumorfreies Überleben als die Patienten mit einem Tumorbefall der Lymphknoten (pN1/pN2), welche eine mittlere tumorfreie Überlebenszeit von 23,1 Monaten aufwiesen ($p=4,9 \times 10^{-5}$; log-rank/Mantel-Haenszel-Test, Abb. 3.2.3/1). Dieser Effekt war unabhängig von der Lokalisation des Primärtumors zu beobachten.

Tabelle 3.2.3/1

Rezidivfreies Überleben nach pN-Stadium bei 70 Patienten mit einem pT3-KRK

Lymphknotenstatus	Durchschnittliches rezidivfreies Überleben in Monaten		
	Gesamtkollektiv	Proximales Kolon	Rektum
pN0	43,4	43,1	43,5
pN1	36,5	40,0	34,6
pN2	16,8	19,6	14,3
pN+	23,1	26,9	20,6

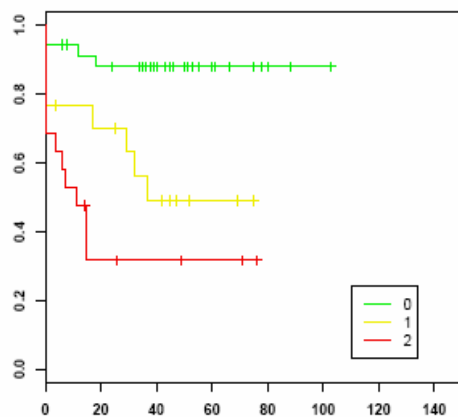


Abbildung 3.2.3/1

Tumorfreies Überleben in Monaten in Abhängigkeit von pN bei 70 Patienten mit einem pT3-KRK

Die Patienten mit tumorfreien Lymphknoten (pN0) hatten mit 49,4 Monaten auch ein signifikant längeres Gesamt-Überleben als die Patienten mit einem Tumorbefall der Lymphknoten (pN1/pN2), welche eine mittlere Gesamt-Überlebenszeit von 32,7 Monaten aufwiesen ($p=1,8 \times 10^{-5}$; log-rank/Mantel-Haenszel-Test, Abb. 3.2.3/1). Dieser Effekt war unabhängig von der Lokalisation des Primärtumors zu beobachten.

Tabelle 3.2.3/2

Gesamtüberleben nach pN-Stadium bei 70 Patienten mit einem pT3-KRK

Lymphknotenstatus	Durchschnittliches Gesamtüberleben in Monaten		
	Gesamtkollektiv	Proximales Kolon	Rektum
pN0	49,4	56,2	41,7
pN1	39,8	44,0	38,0
pN2	26,3	28,2	24,6
pN+	32,7	33,9	31,9

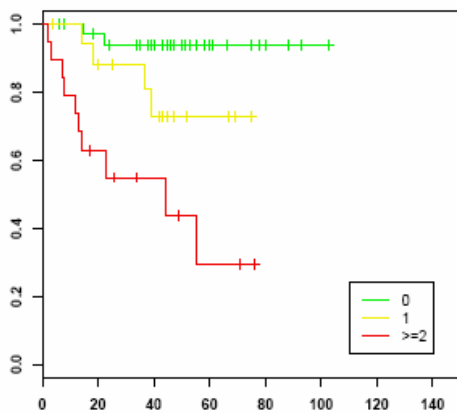


Abbildung 3.2.3/2

Gesamtüberleben in Monaten in Abhängigkeit von pN bei 70 Patienten mit einem pT3-KRK

3.2.4 Vergleich nach Fernmetastasierung

Bei fünf Patienten war es nicht möglich den Status der Fernmetastasierung zu eruieren. Bei **48** (68,6 %) der übrigen **70** Patienten gab es im Beobachtungszeitraum keinen Anhalt für eine Fernmetastasierung (Tab. 3.2.4/1). Bei den restlichen **22** (31,4 %) Patienten lagen Metastasen vor. **12** (17,1 %) Patienten hatten entweder bereits zum Zeitpunkt der Operation oder innerhalb von drei Monaten postoperativ synchrone Metastasen. Bei **9** (12,9 %) Patienten entwickelten sich die Metastasen erst nach drei Monaten im Laufe des Beobachtungszeitraumes (von 3 bis 103 Monaten). Bei einem Patienten mit Fernmetastasierung konnte nicht eruiert werden, wann die Metastasierung aufgetreten ist.

Die Patienten, die keine Fernmetastasierung aufwiesen, lebten signifikant länger als Patienten mit synchroner oder metachroner Fernmetastasierung ($p = 3 \times 10^{-9}$; log-rank/Mantel-Haenszel-Test, Abb. 3.2.4/1). Die Patienten mit metachroner Fernmetastasierung hatten kein signifikant längeres Gesamtüberleben als die Patienten mit synchroner Fernmetastasierung ($p=0,6$, log-rank/Mantel-Haenszel-Test). Dieser Effekt war unabhängig von der Lokalisation des Primärtumors zu beobachten.

Tabelle 3.2.4/1
Gesamtüberleben versus Fernmetastasierung bei 69 pT3-KRK

Fernmetastasierung	Durchschnittliches Gesamtüberleben in Monaten		
	Gesamtkollektiv	Proximales Kolon	Rektum
M0	45,1	52,2	41,6
M1	28,8	29,3	27,3
M2	34,3	19,0	38,7
M+	31,1	27,2	34,7

M0: Im gesamten Beobachtungszeitraum lag keine Fernmetastasierung vor
M1: Fernmetastasierung lag zum Zeitpunkt der ED oder <3 Monate nach ED vor
M2: Fernmetastasierung entwickelte sich im Verlauf (>3 Monate nach ED)
M+: Fernmetastasierung

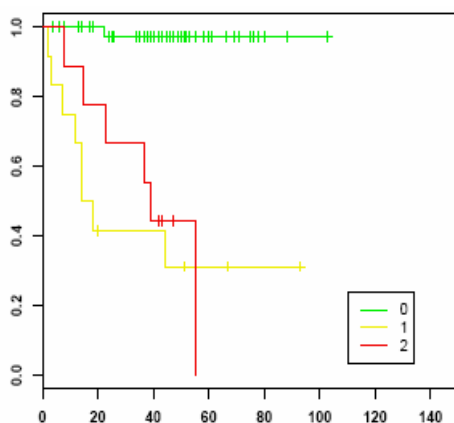


Abbildung 3.2.4/1
Gesamtüberleben in Monaten bei 70 Patienten in Abhängigkeit von Fernmetastasierung (0 = keine Fernmetastasierung; 1 = synchrone Fernmetastasierung; 2 = metachrone Fernmetastasierung)

3.2.5 Vergleich nach klinischem UICC-Stadium

Patienten im UICC-Stadium II oder III zeigten ein signifikant längeres Gesamtüberleben ($p=2,5 \times 10^{-7}$; log-rank/Mantel-Haenszel-Test, Abb. 3.2.5/1) als Patienten im Stadium IV.

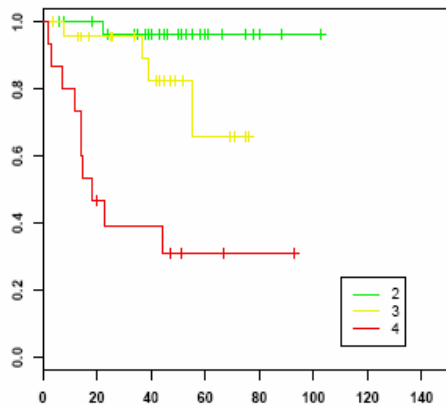


Abbildung 3.2.5/1

Gesamtüberleben in Monaten bei 70 Patienten mit einem pT3-KRK in Abhängigkeit vom UICC-Stadium II bis IV

Von den Patienten im UICC-Stadium III wiesen die Patienten mit einem Kolonkarzinom ein signifikant längeres Gesamtüberleben auf als die Patienten mit einem Rektumkarzinom ($p=0,04$; log-rank/Mantel-Haenszel-Test, Abb. 3.2.5/2).

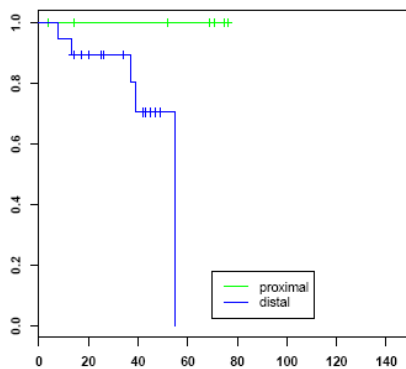


Abbildung 3.2.5/2

Gesamtüberleben in Monaten bei 24 Patienten mit einem pT3-KRK in Abhängigkeit von der Lokalisation bei einem UICC-Stadium III

3.3 CGH

3.3.1 Gesamtübersicht

Alle 75 Tumoren wurden mittels der komparativen genomischen Hybridisierung (CGH) untersucht, und in 66 (88%) Tumoren wurden chromosomale Veränderungen beobachtet, neun Tumore zeigten keine Veränderungen. Die Anzahl der genetischen Imbalancen in den einzelnen Tumoren reichte von 0 bis 27 Veränderungen, im Durchschnitt wiesen die Tumoren 7,5 Veränderungen auf. Die Anzahl der Bruchpunkte reichte von 0 bis 20 bei einem Mittelwert von 4,8, wobei bei 11 Patienten keine Bruchpunkte zu beobachten waren. Die Anzahl der Zugewinne betrug im Mittel 3,6 und reichte von 0 bis 12, wobei 12 Patienten keine Zugewinne aufwiesen. Die Anzahl der Verluste betrug im Mittel 3,9 und reichte von 0 bis 16, wobei 20 Patienten keine Verluste aufwiesen (Mittelwert 3,9).

Zugewinne waren am häufigsten an 20q (41/75; 54,7%), 13q (34/75; 45,3 %), 8q (25/75; 33,3%), 20p (20/75; 26,7%), 7p (15/75; 20%), 12p (11/75; 14,7%), 7q (10/75; 13,3%), 6p (9/75; 12%), 12q (8/75; 10,7%) und an 17q (8/75; 10,7%) (Tab. 3.3.1.3.1/1) zu beobachten. Verluste waren am häufigsten an 18q (45/75, 60 %), 8p (24/75, 32 %), 4q (23/75, 30 %), 18p (20/75, 26,7 %), 14q (17/75, 22,7 %), , 1p (15/75, 20 %), 17p (14/75, 18,7), 5q (12/75, 16 %), 15q (11/75, 14,7 %) und 3p (11/75, 14,7 %) (Tab. 3.3.1.3.2/1) zu beobachten.

3.3.2 Vergleich nach Lokalisation

Die 26 proximalen Kolonkarzinome und die 49 Rektumkarzinome wurden für die CGH-Ergebnisse getrennt ausgewertet, wobei in Bezug auf die Lokalisation signifikante Unterschiede vorlagen (Abb.3.3.2/1 und 3.3.2/2). Die pT3-Rektumkarzinome hatten signifikant mehr chromosomale Imbalancen (durchschnittlich 8,8 versus 5,4, $p=0,009$; Wilcoxon-Test), mehr Bruchpunkte (durchschnittlich 5,6 versus 3,4, $p=0,008$; Wilcoxon-Test), mehr Zugewinne (durchschnittlich 4 versus 2,8, $p=0,03$; Wilcoxon-Test), und auch mehr Verluste (durchschnittlich 4,7 versus 2,5, $p=0,02$; Wilcoxon-Test) als die proximalen pT3-Kolonkarzinome. Desweiteren hatten tendenziell weniger Rektumkarzinome einen normalen Karyotyp als die proximalen Kolonkarzinome (3/49 versus 6/26, $p=0,06$; Fisher-Test).

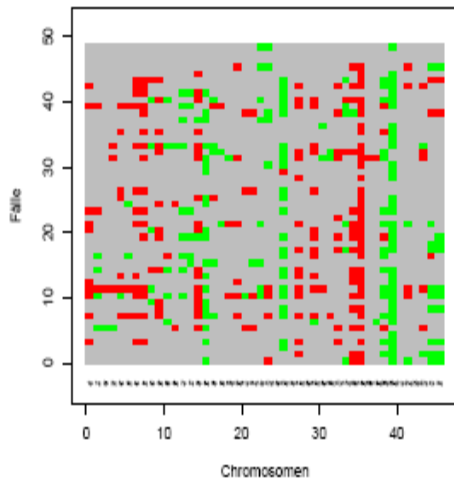


Abbildung 3.3.2/1
CGH-Übersicht von 26 pT3-KRK bei
einer proximalen Lokalisation (grün=
Zugewinn, rot= Verlust)

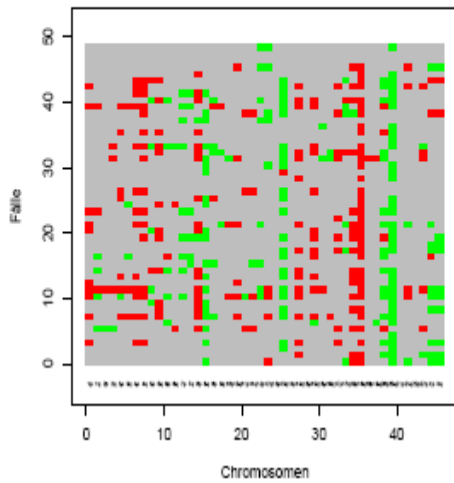


Abbildung 3.3.2/2
CGH-Übersicht von 49 pT3-
Rektumkarzinomen
(grün= Zugewinn, rot= Verlust)

Im Vergleich der einzelnen Aberrationen mit der Lokalisation zeigte sich eine signifikante Korrelation für einen Zugewinn an 20q ($p=0,006$; Fisher-Test), diese Aberration wurde häufiger bei den Rektumkarzinomen als bei den proximalen Kolonkarzinomen beobachtet (Tab. 3.3.2/1). Des Weiteren zeigte sich eine signifikante Assoziation mit der Lokalisation für einen Verlust an 18q ($p=0,001$; Fisher-Test), 15q ($p=0,006$; Fisher-Test) und 14q ($p=0,04$; Fisher-Test), sowie eine Tendenz für den Verlust an 18p ($p=0,05$; Fisher-Test). Auch diese Verluste wurden häufiger bei den Rektumkarzinomen als bei proximalen Kolonkarzinomen beobachtet (Tab. 3.3.2/2). Die übrigen häufigsten Zugewinne und Verluste wiesen keine signifikante Korrelation mit der Lokalisation auf.

Tabelle 3.3.2/1

Die 10 häufigsten chromosomalen Zugewinne bei 75 Patienten mit einem pT3-KRK

Chromosomen-Arm	Gesamthäufigkeit absolut (in %)	Lokalisation		p-Werte Fisher-Test
		Proximales Kolon (in %)	Rektum (in %)	
20q	41 (54,7)	10 (38,5 %)	31 (63,3 %)	0,006
13q	34 (45,3)	10 (38,5 %)	24 (49,0 %)	0,5
8q	25 (33,3)	5 (19,2 %)	20 (40,8 %)	0,1
20p	20 (26,7)	5 (19,2 %)	15 (30,6 %)	0,4
7p	15 (20,0)	6 (23,1 %)	9 (18,4 %)	0,8
12p	11 (14,7)	4 (15,4 %)	7 (14,3 %)	1,0
7q	10 (13,3)	4 (15,4 %)	6 (12,2 %)	0,7
6p	9 (12,0)	3 (11,5 %)	6 (12,2 %)	1,0
12q	8 (10,7)	2 (7,7 %)	6 (12,2 %)	0,7
17q	8 (10,7)	2 (7,7 %)	6 (12,2 %)	0,7

Tabelle 3.3.2/2

Die 10 häufigsten chromosomalen Verluste bei 75 Patienten mit einem pT3-KRK

Chromosomen- arm	Gesamthäufigkeit absolut (in %)	Lokalisation		P-Werte Fisher-Test
		Proximales Kolon (in %)	Rektum (in %)	
18q	45 (60,0 %)	9 (34,6 %)	36 (73,5 %)	0,001
8p	24 (32,0 %)	7 (26,9 %)	17 (34,7 %)	0,4
4q	23 (30,0 %)	7 (26,9 %)	16 (32,7 %)	0,8
18p	20 (26,7 %)	3 (11,5 %)	17 (34,7 %)	0,05
4p	17 (22,7 %)	4 (15,4 %)	13 (26,5 %)	0,4
14q	17 (22,7 %)	2 (7,7 %)	15 (30,6 %)	0,04
1p	15 (20,0 %)	5 (19,2 %)	10 (20,4 %)	1,0
17p	14 (18,7 %)	5 (19,2 %)	9 (18,4 %)	1,0
5q	12 (16,0 %)	2 (7,7 %)	10 (20,4 %)	0,1
15q	11 (14,7 %)	0 (0,0 %)	11 (22,4 %)	0,006

3.3.3 Vergleich nach Lymphknotenstatus

Tumore mit einem positiven Lymphknotenbefall wiesen tendenziell mehr Veränderungen ($p=0,09$; Wilcoxon-Test) und mehr Bruchpunkte ($p=0,2$; Wilcoxon-Test) auf als Tumoren ohne Lymphknotenbefall; die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

Tumore mit einem positiven Lymphknotenbefall zeigten signifikant häufiger Verluste an 4q ($p=0,005$; Fisher-Test) und 1p ($p=0,02$; Fisher-Test) als Tumore ohne Lymphknotenbefall.

3.3.4 Vergleich nach Fernmetastasierung

Es zeigte sich keine signifikante Assoziation zwischen dem Auftreten einer Fernmetastasierung und der Anzahl der Veränderungen ($p=0,8$; Wilcoxon-Test), oder dem Vorliegen spezieller Veränderungen ($p > 0,1$; Fisher-Test).

3.3.5 Vergleich nach klinischem UICC-Stadium

Zwischen dem klinischen Stadium und der Anzahl der chromosomalen Veränderungen ($p > 0,4$; Fisher-Test) sowie der Anzahl von Bruchpunkten lagen keine signifikanten Assoziationen vor ($p > 0,1$; Fisher-Test). Tumore in einem klinischen Stadium III/IV wiesen jedoch signifikant häufiger Verluste an 4q ($p = 0,04$; Fisher-Test) und 1p ($p = 0,04$; Fisher-Test) auf als Tumore im klinischen Stadium II.

3.3.6 Chromosomale Aberrationen und tumorfreies Überleben

Von den 9 Patienten mit einem Tumor ohne Aberrationen erlitt lediglich ein Patient während der Beobachtungszeit einen Tumorprogress in Form einer metachronen Fernmetastasierung, während von den übrigen 66 Patienten mit chromosomalen Aberrationen 25 einen Progress erlitten, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant ($p = 0,2$, log-rank/Mantel-Haenszel-Test, Abb. 3.3.6/1).

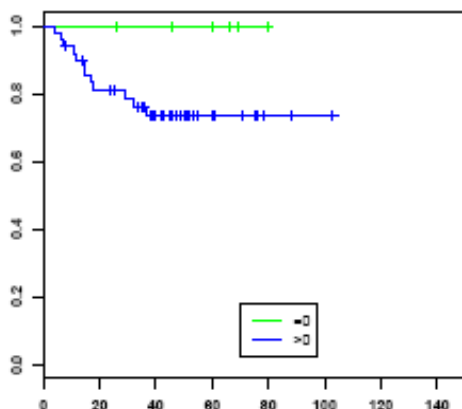


Abbildung 3.3.6/1

Rezidivfreies Überleben bei 75 Patienten mit einem pT3-KRK mit und ohne CGH-Aberrationen

Bei den Rektumkarzinomen kam es signifikant häufiger zum Rezidiv als bei proximalen Tumoren, wenn der Primärtumor mehr als 9 chromosomale Aberrationen aufwies ($p = 0,0135$, log-rank/Mantel-Haenszel-Test, Abb. 3.3.6/2).

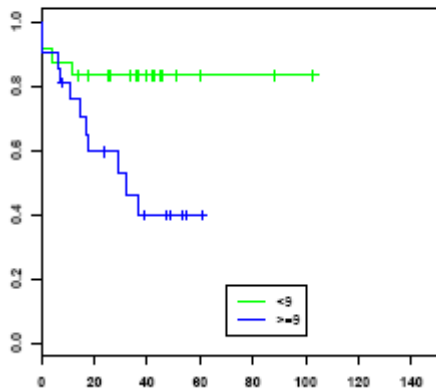


Abbildung 3.3.6/2

Rezidivfreies Überleben bei 49 pT3-Rektumkarzinomen mit weniger oder mehr als neun chromosomalen Aberrationen

Patienten, deren Tumor einen Verlust an 1p aufwies, hatten ein signifikant kürzeres tumorfreies Überleben ($p=0,01$; log-rank/Mantel-Haenszel-Test, Abb. 3.3.6/3) als Patienten, deren Tumor keinen Verlust an 1p aufwies.

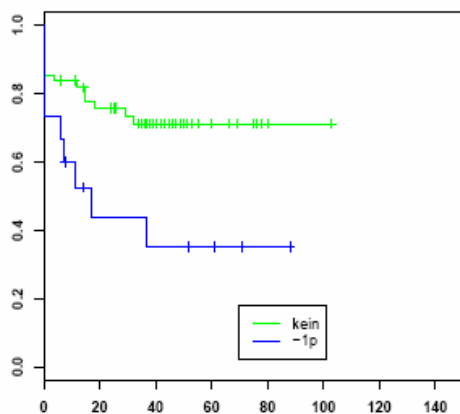


Abbildung 3.3.6/3

Tumorfreies Überleben in Abhängigkeit von 1p Verlust bei 75 pT3-KRK Patienten

Patienten, deren Tumor einen Zugewinn an 12p aufwies, hatten ein tendenziell kürzeres tumorfreies Überleben ($p=0,07$; log-rank/Mantel-Haenszel-Test) als Patienten, deren Tumor keinen Zugewinn an 12p aufwies.

Lokalisationsabhängig zeigte sich bei den proximalen KRK, dass bei einem Zugewinn an 20p und 6p sowie bei einem Verlust an 4p, 14q und 18p kein Tumorprogress auftrat. Beim distalen KRK konnte bei einem Zugewinn an 17q kein Tumorprogress beobachtet werden.

3.3.7 Chromosomale Aberrationen und Gesamtüberleben

Von den neun Patienten, deren Tumor gar keine Aberrationen aufwies, verstarb lediglich ein Patient am Tumorleiden, während von den übrigen 66 Patienten mit Aberrationen 15 Patienten tumorbedingt verstarben, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant ($p=0,3$, log-rank/Mantel-Haenszel-Test, Abb. 3.3.7/1).

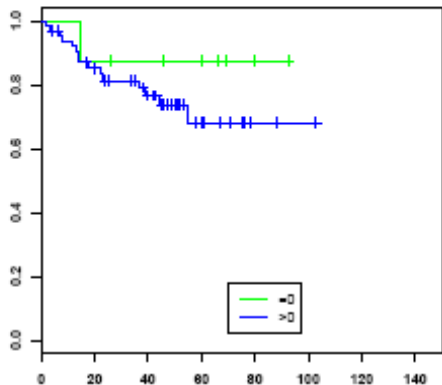


Abbildung 3.3.7/1

Gesamtüberleben bei 75 Patienten mit einem pT3-KRK mit oder ohne chromosomale Aberrationen

Patienten, deren Tumor einen Zugewinn an 12p aufwies, hatten ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben als Patienten, deren Tumor keinen Zugewinn an 12p zeigte ($p=0,03$; log-rank/Mantel-Haenszel-Test, Abb. 3.3.7/2).

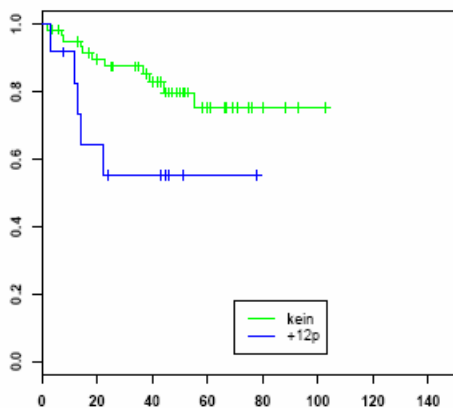


Abbildung 3.3.7/2

Gesamtüberleben in Abhängigkeit von 12p Zugewinn bei 75 pT3-KRK Patienten

Die Rektumkarzinome mit einem Zugewinn an 8q wiesen ein fast signifikant besseres Überleben als die gegenseitigen Tumoren im proximalen Kolon ($p=0,051$, Abb. 3.3.7/3); für das rezidivfreie Überleben lag keine signifikante Assoziation vor.

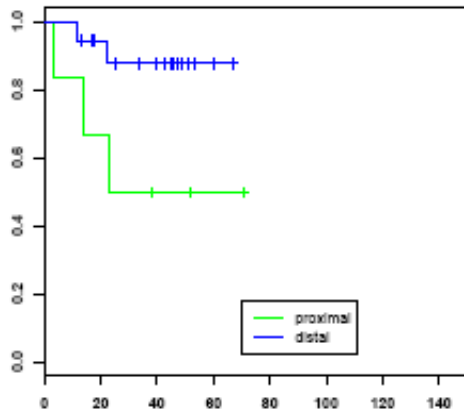


Abbildung 3.3.7/3
Gesamtüberleben in Abhängigkeit von 8q Zugewinn bei 75 pT3-KRK Patienten

4. Diskussion

4.1 Klinisch-pathologische Unterschiede zwischen proximalen und distalen KRK und die prognostische Bedeutung in Bezug auf die Lokalisation

4.1.1 Lokalisation und Fernmetastasen

In der vorliegenden Arbeit war der bedeutendste klinisch-pathologische Unterschied zwischen proximalen und distalen KRK der Grad der Fernmetastasierung und die daraus resultierende Prognose für den Patienten. Es konnte festgestellt werden, dass Patienten mit proximal lokalisiertem pM0-Tumor durchschnittlich zehn Monate (52,2 Monate) länger lebten als diejenigen mit einem distalen pM0-Tumor (41,6 Monate). 31% der Patienten (8/26) mit einem proximalen pT3-Tumor hatten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose Fernmetastasen wohingegen lediglich 9% (4/49) der Patienten mit einem distal lokalisierten Tumor synchrone Fernmetastasen aufwiesen. Überraschend ist die Tatsache, dass nur 11% (2/18) der proximalen pM0-Tumore einen Progress zeigten und bei den distalen pM0-Tumoren eine Progressrate von 27% (11/41) zu beobachten war.

Die Literaturangaben zur klinischen Wertigkeit der synchronen und metachronen Metastasen sind uneinheitlich. Die Arbeiten von Wang et al. und Taniai et al. zeigten, dass es keine signifikanten Unterschiede im Gesamtüberleben bei synchronen oder metachronen Metastasen beim KRK gibt (Bramhall et al. 2003, Nordlinger et al. 1987, Taniai et al. 2006, Wang et al. 2007). Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass Patienten mit synchronen Lebermetastasen einen biologisch ungünstigen Primärtumor aufwiesen, weil Tumorzellen bereits vor der Therapie des Primarius in andere Organe streuten (Scheele et al. 1995). Cummings et al. erläuterten, dass Patienten mit metachronen Metastasen ein besseres Gesamtüberleben zeigten (Cummings et al. 2007). Weiterhin stellten Nagashima et al. fest, dass synchrone Lebermetastasen mit einer schlechten Prognose assoziiert waren (Nagashima et al. 2006). Weitere Autoren erklärten jedoch, dass Patienten mit metachronen Metastasen eine schlechtere Prognose in Bezug auf das Gesamtüberleben hatten (Fong et al. 1997, Scheele et al. 1995, Sugihara et al. 1993) und dass das rezidivfreie Überleben bei metachronen Metastasen schlechter war als bei synchronen Metastasen (Zakaria et al. 2007). Obwohl die Differenzierung zwischen proximalen und distalen KRK in der oben genannten Literatur hinsichtlich der Fernmetastasierung fehlt, besteht dennoch Grund zur Annahme, dass seitenabhängige Unterschiede im Metastasierungsverhalten zwischen proximalen und distalen

KRK mit unterschiedlichen Mustern hinsichtlich der molekularen und zytogenetischen Pathogenese zusammenhängen.

4.2 CGH-Unterschiede zwischen proximalen und distalen KRK sowie die prognostische Bedeutung dieser Imbalancen

4.2.1 Übersicht

Die wichtigsten in der Literatur angegebenen CGH-Veränderungen beim KRK konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Bei den drei häufigsten chromosomalen Zugewinnen an 20q, 13q und 8q in dem untersuchten Kollektiv konnte eine Korrelation mit den Literaturangaben gezeigt werden. Die häufigsten in dieser Arbeit beobachteten chromosomalen Verluste an 18q, 8p und 4q wurden ebenfalls in der Literatur bereits beschrieben.

Es wird angenommen, dass chromosomale Aberrationen aus chromosomalen Instabilitäten (CIN) entstehen und vermehrt im distalen KRK vorkommen und bei einer proximalen Lokalisation eher eine Mikrosatelliteninstabilität (MIN) besteht, die durch Defekte der DNA-Reparaturgene bedingt ist (Breivik and Gaudernack 1999, Iino et al. 2000, Ionov et al. 1993, Kim et al. 1994, Lothe et al. 1993, Salahshor et al. 1999, Thibodeau et al. 1993).

Die Beobachtung der vorliegenden Arbeit, dass die 26 proximal lokalisierten KRK weniger chromosomale Imbalancen sowie weniger Bruchpunkte im Genom aufzeigten als die 49 distalen KRK und gleichzeitig normale Karyogramme aufwiesen führt zu der Annahme, dass das proximale KRK im Vergleich zum distalen KRK eine geringere Tendenz zu chromosomalen Instabilitäten zeigt; passend zu der bereits in der Literatur bekannten Annahme, dass bei distalen KRK häufiger eine chromosomale Instabilität vorliegt als bei proximalen Kolonkarzinome (Breivik und Gaudernack et al. 1999, Ionov et al. 1993, Kim et al. 1994, Lothe et al. 1993, Salahshor et al. 1999, Thibodeau et al. 1993). Zudem wurde beobachtet, dass vermehrte Imbalancen beim KRK eher mit einem metastasierten Tumor einhergehen (Ghadimi et al. 2006).

Das biologische Verhalten der beiden Tumorlokalisationen unterscheidet sich nur in bestimmten Punkten: proximale KRK hatten im Vergleich zu distalen KRK nur dann ein signifikant längeres tumorfreies Überleben, wenn mehr als 9 Aberrationen vorlagen. Eine ähnliche jedoch lokalisationsunabhängige Beobachtung wurde von Rooney et al (Rooney et al. 2001) gemacht. Sie stellten fest, dass bei mehr als zwei chromosomalen Veränderungen das

Gesamtüberleben besser war und begründeten ihre Beobachtung mit der Erklärung, dass ein instabiles Genom einen Überlebensvorteil darstellt.

Interessant war die Beobachtung, dass in der vorliegenden Arbeit von den insgesamt 9 KRK, die keine chromosomalen Aberrationen aufwiesen, lediglich 1 Fall einen Progress zeigte. Dies führt zur Annahme, dass ein instabiles Genom zwar im Gesamtüberleben einen Vorteil darstellen kann (Rooney et al. 2001) aber keinen Einfluss auf das rezidivfreie Überleben hat.

Es wird deutlich, dass nicht nur bestimmte chromosomale Veränderungen sondern auch die Anzahl der Veränderungen je nach Lokalisation des Tumors (proximal versus distal) die Prognose beeinflussen können.

4.2.2 Veränderungen an 4q und 1p und die prognostische Bedeutung

Die KRK, die Lymphknotenmetastasen aufwiesen und in einem schlechteren klinischen Stadium diagnostiziert waren assoziiert mit Verlusten an den Chromosomenarmen 4q und 1p. Diese Beobachtungen sind in der Literatur bekannt; Knösel et al. (Knösel et al. 2002), Al-Mulla et al. (Al-Mulla et al. 1999) und Korn et al. (Korn et al. 1999) zeigten bereits, dass ein Verlust an 4q häufiger in den Metastasen zu finden ist als in dem Primärtumor; der Pathomechanismus scheint eine reduzierte Apoptoserate bei einem Verlust an Chromosom 4 zu sein (Al-Mulla et al. 2006, De Angelis et al. 1999). De Angelis et al. (De Angelis et al. 2001) beobachteten, dass das Gesamtüberleben bei einem Verlust an 1p und 4q kürzer war als ohne diese Veränderungen im Tumorgenom, und Knösel et al. (Knösel et al. 2003) stellten fest, dass KRK, die Verluste an 4q und 1p im Genom zeigten, mit einem schlechteren rezidivfreien Überleben einhergehen. Die vorliegende Arbeit bestätigte, dass ein Verlust an 1p mit einem schlechten rezidivfreien Überleben assoziiert ist. Es ist bereits bekannt, dass ein Verlust an 1p mit einer schlechten Prognose und mit Fernmetastasen einhergeht (Ghadimi et al. 2006, Kambara et al. 2004, Ogunbiyi et al. 1997). Anhand der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass Veränderungen an den Chromosomen 4q und 1p beim KRK mit einer schlechten Prognose einhergehen.

4.2.3 Veränderungen an 12p und die prognostische Bedeutung

Zusätzlich wurde beobachtet, dass bei einem Zugewinn an 12p das Gesamtüberleben kürzer ist als ohne diese Veränderung im Tumorgenom. Diese Aussage korreliert mit der von Diep et al (Diep et al. 2004) festgestellten Beobachtung, dass ein Zugewinn an 12p mit einer

Peritonealkarzinose beim KRK assoziiert ist. Culliford et al. (Culliford et al. 2001) und Sadeghi et al. (Sadeghi et al. 2000) zeigten, dass eine Peritonealkarzinose fast immer ein nicht-kuratives Tumorstadium darstellt. Demzufolge ist ein Zugewinn an 12p beim KRK mit einer schlechten Prognose assoziiert; diese Aussage konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

4.2.4 Veränderungen an 20q, 18q, 15q sowie 14q und die prognostische Bedeutung

Weiterhin konnte festgestellt werden, dass ein Zugewinn an 20q sowie Verluste an 18q, 15q und 14q vermehrt im distalen KRK zu beobachten waren. Diese Beobachtung wurde in der Literatur noch nicht beschrieben. Es wurde lediglich beschrieben, dass +20q, -15q und -18q mit einem Progress (Hermsen et al. 2002) und +20q, -18q und -14q mit einer schlechteren Prognose assoziiert waren (Aragane et al. 2001, De Angelis et al. 2001, Liu et al. 2007) sowie +20q und -18q in einem Spätstadium der Tumorerkrankung oder in der Metastase des Primarius auftreten (Al-Mulla et al. 1999, Aragane et al. 2001, Aust et al. 2000, Diep et al. 2004, Knösel et al. 2002, Liu et al. 2007, Nakao et al. 2000, Vogelstein et al. 1989). Nakao et al. (Nakao et al. 2000) stellten sogar die Hypothese auf, dass anhand chromosomaler Aberrationen eine Einteilung der Tumore in Bezug auf die Metastasierung in low- und high-grade Gruppen erfolgen und dementsprechend eine Therapie eingeleitet werden kann. Diese Aussage muss mit Vorsicht betrachtet werden, weil die Sensitivität und Spezifität der CGH unklar ist. In der vorliegenden Arbeit gab es 27 Patienten, die zwar einen Zugewinn an 20q im Tumorgenom zeigten aber klinisch keine Metastasen hatten, auf der anderen Seite sah man acht Patienten, die diese Veränderung nicht hatten aber dennoch Metastasen aufwiesen.

Knösel et al. (Knösel et al. 2003) und Ried et al. (Ried et al. 1996) widerlegten zum Teil die oben angegebenen Literaturnachweise. Ried et al. beschrieben ein Zugewinn an 20q als ein frühes Ereignis in der Tumorigenese des KRK und Knösel et al. fanden heraus, dass ein Zugewinn an 20q und ein Verlust an 18q mit einem längeren tumorspezifischen Gesamtüberleben einherging. Zudem erklärten sie, dass chromosomale Veränderungen, die eine Tumorentstehung induzieren wie ein Zugewinn 20q eine geringere prognostische Relevanz haben als spätere Veränderungen der Tumorigenese, die mit einem Tumorprogress assoziiert sind (Knösel et al. 2003). Anhand der bekannten Literatur kann vermutet werden, dass die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Veränderungen, die vermehrt im Rektum zu beobachten waren, prognostisch schlecht sind obwohl kein Zusammenhang zwischen einem Zugewinn an 20q und Verlusten an 18q, 15q sowie 14q und dem Gesamtüberleben beobachtet werden konnte.

4.2.5 Veränderungen an 20p, 6p, 14q, 4p sowie 18p und die prognostische Bedeutung

Weitere lokalisationsabhängige Ergebnisse dieser Arbeit waren Zugewinne an 20p und 6p sowie Verluste an 14q, 4p und 18p. Man beobachtete dass, bei diesen Veränderungen die proximalen KRK keinen Progress zeigten. Trotz fehlender Literaturnachweise geben diese Beobachtungen Grund zur Annahme, dass bestimmte chromosomale Aberrationen, die im proximal lokalisierten KRK auftreten mit einem prognostisch günstigen Krankheitsverlauf assoziiert sind. Es ist bereits bekannt, dass MSI- assoziierte und demnach eher proximale KRK genomische Veränderungen an den Chromosomen 5q, 12p und 17p zeigen. Huang et al. (Huang et al. 1996) stellten 1996 fest, dass bei MSI-Tumoren ebenfalls Mutationen im APC-Gen (5q), K-ras-Gen (12p) und im p53-Gen (17p) auftreten. Die Arbeiten von Al-Mulla et al. (Al-Mulla et al. 1999) und Knösel et al. (Knösel et al. 2002) untersuchten Veränderungen beim Primärtumor und den Metastasen. Sie zeigten, dass ein Zugewinn an 6p (Al-Mulla et al. 1999) und ein Verlust an 4p (Knösel et al. 2002) mit einem metastasierten KRK (Dukes' D) assoziiert waren; es wurde jedoch keine Unterscheidung zwischen distal versus proximal aufgeführt. Es stellt sich die Frage ob bei einer Unterscheidung zwischen distalen und proximalen KRK, die proximal lokalisierte KRK trotz Metastasierung eine bessere Prognose gezeigt hätten. Aufgrund der fehlenden Literatur kann die Frage hier nicht beantwortet werden.

4.2.6 Veränderungen an 17q und die prognostische Bedeutung

Eine weitere lokalisationsabhängige Veränderung war ein Zugewinn an 17q. Die distal lokalisierten KRK mit dieser Aberration zeigten keinen Progress. Korn et al. und Al-Mulla et al. erklärten 1999 jedoch, dass ein Zugewinn an 17q bei Tumoren im Stadium IV oder bei Dukes' D-Tumoren, demnach im metastasierten Tumorstadium, zu beobachten ist (Al-Mulla et al. 1999, Korn et al. 1999). Aust et al. bestätigten diese Aussage im Jahre 2000 (Aust et al. 2000). Knösel et al. sprechen von einem aggressiven Tumorphänotyp bei einem Zugewinn von 17q im Genom (Knösel et al. 2002). Diese Arbeiten haben jedoch die Veränderung an 17q nicht lokalisationsabhängig untersucht; deswegen ist es wohl eine berechtigte Überlegung ob diese Veränderung abhängig von der Lokalisation des Tumors (proximal versus distal) mit einer unterschiedlichen Prognose assoziiert ist. Dies sind jedoch Vermutungen, die bis dato nicht belegt werden konnten. Darüber hinaus wird diese Veränderung an 17q beim KRK als kontrovers diskutiert (McLeod und Murray 1999).

5. Zusammenfassung

Epidemiologische und morphologische Unterschiede zwischen proximalen und distalen kolorektalen Karzinomen basieren teilweise auf der unterschiedlichen Lokalisation. Beim KRK wurden zwei pathogenetisch unterschiedliche Entstehungsmuster beschrieben, welche mit der Lokalisation (proximal versus distal) assoziiert sind. Es wurde bereits gezeigt, dass die proximalen KRK häufiger mit einer Mikrosatelliteninstabilität (MSI) einhergehen und dass bei den distalen KRK vorwiegend eine chromosomale Instabilität (CIN) vorliegt.

Das Ziel dieser Arbeit war es mögliche Unterschiede in chromosomalen Mustern und die daraus resultierende Prognose zwischen 26 proximalen und 49 distalen KRK mit einem pT3-Tumorstadium mittels komparativer genomischer Hybridisierung (CGH) zu ermitteln.

Die Ergebnisse zeigten deutliche Unterschiede zwischen den distalen und proximalen KRK; der Grad der Fernmetastasierung sowie unterschiedliche chromosomale Veränderungen und die daraus resultierende Prognose sind dabei hervorzuheben. Dabei zeigten die Patienten mit einem proximal lokalisierten pM0-Tumor durchschnittlich ein zehn Monate (52,2 Monate) längeres Gesamtüberleben als diejenigen mit einem distalen pM0-Tumor (41,6 Monate). 31% der Patienten (8/26) mit einem proximalen pT3-Tumor hatten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose Fernmetastasen, wohingegen lediglich 9% (4/49) der Patienten mit einem distal lokalisierten Tumor synchrone Fernmetastasen aufwiesen. Im Wesentlichen konnten die in der Literatur bekannten Ergebnisse bestätigt werden; es wurden aber auch neue Erkenntnisse gewonnen. Abhängig von der Lokalisation gingen bestimmte Veränderungen mit unterschiedlicher Prognose einher.

Neue Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass die Veränderungen **+20q, -18q, -15q und -14q** vermehrt im Rektum zu beobachten waren; diese Veränderungen gehen nach der Literatur mit einer schlechten Prognose einher.

Weiterhin konnte anhand der vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit belegt werden, dass die Veränderungen **+20p, +6p, -14q, -4p und -18p** mit einer Lokalisation im proximalen Kolon nicht mit einem erhöhten Progress assoziiert waren.

Auf der anderen Seite sah man bei dem hier untersuchten Kollektiv, dass bei einem Zugewinn an **17q** die distalen KRK keinen Progress aufwiesen.

Hier wird deutlich, dass die vorliegende Arbeit bestimmte chromosomale Veränderungen aufzeigen konnte, die je nach Lokalisation mit einer unterschiedlichen Prognose einhergehen können.

Zusätzlich unterstützen die vorliegenden Ergebnisse das Konzept, dass die distalen KRK eine höhere Tendenz zur chromosomalen Instabilität aufweisen, weil sie mehr chromosomale Imbalancen sowie mehr Bruchpunkte als die proximalen KRK im Genom aufwiesen.

Zusammenfassend lenken die oben aufgeführten Beobachtungen die Aufmerksamkeit beim KRK auf eine lokalisationspezifische Evaluierung molekularer Marker, die eventuell das biologische Verhalten und somit die Prognose in proximalen und distalen KRK prognostizieren können. Aus diesem Grund sind größere prospektive Studien denkbar, die die seitenspezifische Wertigkeit von zytogenetischen und molekularen Markern untersuchen können.

6. Literaturverzeichnis

- Aaltonen LA, Peltomaki P, Jukka-Pekka M, Jarvinen H, Jass JR, Green JS, Lynch HT, Watson P, Tallqvist G, Juhola M (1994): Replication error in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Cancer Res* 54, 1645–1648
- Aaltonen LA, Salovaara R, Kristo P, Canzian F, Hemminki A, Peltomaki P, Chadwick RB, Kaariainen H, Eskelinen M, Jarvinen H (1998): Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J Med* 338, 1481–1487
- Alcock HE, Stephenson, Royds JA, Hammond DW (2003): Analysis of colorectal tumor progression by microdissection and comparative genomic hybridisation. *Genes Chromosomes Cancer* 37(4), 369-80
- Al- Mulla F, Keith WN, Pickford IR, Going JJ, Birnie GD (1999): Comparative Genomic Hybridization Analysis of Primary Colorectal Carcinomas and Their Synchronous Metastases. *Genes Chromosomes Cancer* 24, 306-314
- Al-Mulla F, Behbehani AI, Bitar MS, Varadharaj G, Going JJ (2006): Genetic profiling of stage I and II colorectal cancer may predict metastatic relapse. *Mol Pathol* 19, 648-658
- Aprigliano I: Neoadjuvante versus adjuvante Therapie des Rektumkarzinoms. Vortrag gehalten am 10.11.2004 in Göttingen
- Aragane H, Sakakura C, Nakanishi M, Yasuoka R, Fujita Y, Taniguchi H, Hagiwara A, Yamaguchi T, Abe T (2001): Chromosomal Abberations in Colorectal Cancer and Liver metastasis by comparative genomic hybridization. *Int J Cancer* 94, 623-629
- Arends JW (2000): Molecular interactions in the Vogelstein model of colorectal carcinoma. *J Pathol* 190, 412-416

- Arzimanoglou II, Gilbert F, Barber HR (1998): Microsatellite Instability in Human Solid Tumors. *Cancer (Phila.)* 82(10), 1808–1820
- Atkin WS, Morson BC, Cuzick J (1992): Long- term risk of colorectal cancer after excision of rectosigmoid adenomas. *N Engl J Med* 326, 658-662
- Aust DE, Willenbacher RF, Terdiman JP, Ferrel LD, Chang CG, Moore II DH, Molinaro-Clark A, Baretton GB, Loehrs U, Waldmann FM (2000): Chromosomal Alterations in Ulcerative Colitis-Related and Sporadic Colorectal Cancers by Comparative Genomic Hybridization. *Hum Pathol* 31, 109-114
- Bernstein CN, Blanchard JF, Kliewer E, Wajda A (2001): Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Cancer* 91, 854-862
- Binder V, Hendriksen C, Kreiner S (1985): Prognosis in Crohn's disease- based on results from a regional patient group from the county of Copenhagen. *Gut* 26, 146-150
- Birkenkamp- Demtroder K, Olesen SH, Sorensen FB, Laurberg S, Laiho P, Aaltonen LA, Orntoft TF (2005): Differential gene expression in colon cancer of the caecum versus the sigmoid and rectosigmoid. *Gut* 54, 374-384
- Bodmer W, Bishop T, Karran P (1994): Genetic steps in colorectal cancer. *Nat Genet* 6, 217-219
- Bramhall SR, Gur U, Coldham C, Gunson BK, Mayer AD, McMaster P, Candinas D, Buckles JA, Mirza DF (2003): Liver resection for colorectal metastases. *Ann R Coll Surg Engl* 85(5), 334-9
- Breivik J, Gaudernack G (1999): Genomic instability, DNA methylation, and natural selection in colorectal carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* 9, 245-254

- Brierley JD, D'Souza N, Cummings BJ, Ringash J, Kim J.-H. J, Catton PA, Wong R K.S, Moore MJ, Pintilie M, Wong CS (2004): Outcome and Toxicity of Postoperative Short Course Adjuvant Radiation and Chemotherapy following Resection of Adenocarcinoma of the Rectum. *Acta Oncol* 43, 576-570
- Cedermark B, Dahlberg M, Glimelius B, Pahlmann L, Rutqvist LE, Wilking N (1997): Improved Survival with Preoperative Radiotherapy in Resectable Rectal Cancer. *N Engl J Med* 336(14), 980-987
- Culliford AT, Brooks AD, Sharma S, Saltz LB, Schwartz GK, O'Reilly EM, Ilson DH, Kemeny NE, Kelsen DP, Guillem JG (2001): Surgical debulking and intraperitoneal chemotherapy for established peritoneal metastases from colon and appendix cancer. *Ann Surg Oncol* 8, 787-795
- Cummings LC, Payes JD, Cooper GS (2007): Survival after hepatic resection in metastatic colorectal cancer: a population based study. *Cancer* 109, 718-126
- De Angelis PM, Clausen OPF, Schjolberg A, Stokke T (1999): Chromosomal gains and losses in primary colorectal carcinomas detected by CGH and their associations with tumour DNA ploidy, genotypes and phenotypes. *Br J Cancer* 80(3/4), 526-535
- De Angelis PM, Stokke T, Beigi M, Mjaland O, Clausen OPF (2001): Prognostic significance of recurrent chromosomal aberrations detected by comparative genomic hybridization in sporadic colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 16, 38-45
- Diep CB, Teixeira MR, Thorstensen L, Wiig JN, Eknaes M, Nesland JM, Giercksky KE, Johansson B, Lothe RA (2004): Genome characteristics of primary carcinomas, local recurrences, carcinomatoses, and liver metastasis from colorectal cancer patients. *Mol Cancer* 3, 1-9
- Ekbohm A, Helmick C, Zack M, Adami HO (1990a): Increased risk of large-bowel cancer in Crohn's disease with colonic involvement. *Lancet* 336, 357-359

- Ek bom A, Helmick C, Zack M, Adami HO (1990b): Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med* 323, 1228-1233
- Fearon ER, Vogelstein B (1990): A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell* 61, 759-767
- Fong Y, Cohen AM, Fortner JG, Enker WE, Turnbull AD, Coit DG, Marrero AM, Prasad M, Blumgart LH, Brennan MF (1997): Liver resection for colorectal metastases. *J Clin Oncol* 15(3), 938-46
- Forster S, Sattler HP, Hack M, Romanakis K, Rohde V, Seitz G, Wullich B (1998): Microsatellite instability in sporadic carcinomas of the proximal colon: association with diploid DNA content, negative protein expression of p53, and distinct histomorphologic features. *Surgery* 123, 13-18
- Foulkes WD (1995): A tale of four syndromes: familial adenomatous polyposis, Gardner syndrome, attenuated APC and Turcot syndrome. *QJM* 88, 853-863
- Frykholm GJ, Glimelius B, Pahlman L (1993): Preoperative or postoperative irradiation in adenocarcinoma of the rectum: final treatment results of a randomized trial and an evaluation of late secondary effects. *Dis Colon Rectum* 36(6), 564-572
- Ghadimi BM, Grade M, Monkemeyer 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, 273-81
- Greenstein AJ, Sachar DB, Smith H (1981): A comparison of cancer risk in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Cancer* 48, 2742-2745
- Gyde SN, Prior P, Allan RN, Stevens A, Jewell DP, Truelove SC, Lofberg R, Broström O, Hellers G (1988): Colorectal cancer in ulcerative colitis: a cohort study of primary referrals from three centres. *Gut* 29, 206-217

- Habr-Gama A, Perez RO, Kiss DR, Rawet V, Scanavini A, Santinho PM, Nadalin W (2004): Preoperative Chemoradiation Therapy for Low Rectal Cancer. Impact on Downstaging and Sphincter- saving Operations. *Hepato-Gastroenterology* 51, 1703-1707
- Hauser H (2004): Das KKK- Teil 1: Epidemiologie, Präkanzerosen, Primär- und Sekundärprävention. *J Gastroenterol Hepatol Erkr* 2(4), 6-11
- Haydon AM, Jass JR (2002): Emerging pathways in colorectal-cancer development. *Lancet Oncol* 3, 83-88
- Hermesen M, Postma C, Baak J, Weiss M, Rapallo A, Sciutto A, Roemen G, Arends JW, Williams R, Giaretti W (2002): Colorectal Adenoma to Carcinoma Progression Follows Multiple Pathways of Chromosomal Instability. *Gastroenterology* 123, 1109-111
- Huang J, Papadopoulos N, McKinley AJ, Farrington SM, Curtis LJ, Wyllie AH, Zheng S, Willson JKV, Markowitz SD, Morin P et al (1996): APC mutations in colorectal cancer tumors with mismatch repair deficiency. *Proc Natl Acad Sci* 93, 9049-9054
- Hughes S, Williams RD, Webb E, Houlston RS (2006): Meta- analysis and pooled re-analysis of copy number changes in colorectal cancer detected by comparative genomic hybridisation. *Anticancer Res* 26(5A), 3439-44
- Iino H, Simms LA, Young J, Arnold J, Winship IM, Webb SI, Furlong KL, Leggett B, Jass JR (2000): DNA microsatellite instability and mismatch repair protein loss in adenomas presenting in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Gut* 47, 37-42
- International Union Against Cancer (UICC) (1997 5th edition) TNM classification of the tumours of the colon and rectum. In: *TNM classification of malignant tumours* (eds Sobin LH, Wittekind CH). Wiley-Liss Inc, New York, 59-62
- Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M (1993): Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature (Lond)* 363, 558-561

- Ishimaru G, Adachi J, Shiseki M, Yamaguchi N, Muto T, Yokota J (1995): Microsatellite instability in primary and metastatic colorectal cancers. *Int J Cancer* 64, 153–157
- Kahlenberg MS, Stoler DL, Basik M, Petrelli NJ, Rodriguez-Bigas M, Anderson GR (1996): p53 tumor suppressor gene status and the degree of genomic instability in sporadic colorectal cancers. *J Natl Cancer Inst* 88, 1665–1670
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutowitz D, Gray JW, Waldmann F, Pinkel D (1992): Comparative Genomic Hybridization for Molecular Cytogenetic Analysis of Solid Tumors. *Science* 258, 818-820
- Kambara T, Sharp GB, Nagasaka T, Takeda M, Sasamoto H, Nakagawa H, Isozaki H, MacPhee DG, Jass JR, Tanaka N et al. (2004): Allelic loss of a common microsatellite marker MYCL1: a useful prognostic factor of poor outcomes in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 10, 1758-1763
- Kapiteijn E, M.D., Marijnen C, M.D., Nagtegaal DI, M.D., Putter H, Ph.D., Steup WH, M.D., Ph.D., Wiggers T, M.D., Ph.D., van Krieken J Han JM, M.D., Ph.D., Leer J WH, M.D., Ph.D., van de Velde C JH, M.D., Ph.D. (2001): Preoperative Radiotherapy Combined with Total Mesorectal Excision for Resectable Rectal Cancer. *N Engl J Med* 345(9), 638-646
- Kim H, Jen J, Vogelstein B, Hamilton SR (1994): Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am J Pathol* 145, 148-156
- Kinoshita H MD, Watanabe T MD, PhD, Yanagisawa A MD, PhD, Nagawa H MD, PhD, Kato Y MD, PhD, Muto T MD, PhD (2004): Pathological Changes of Advanced Lower- Rectal Cancer by Preoperative Radiotherapy. *Hepato- Gastroenterology* 51, 1362-1366
- Kinzler KW, Vogelstein B (1997): Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 386, 623-627

- Klump B, Nehls O, Okech T, Hsieh CJ, Gaco V, Gittinger FS, Sarbia M, Borchard F, Greschniok A, Gruenagel HH (2004): Molecular lesions in colorectal cancer: impact on prognosis?. *Int J Colorectal Dis* 19, 23-42
- Knösel T, Peterson S, Schwabe H, Schlüns K, Stein U, Schlag PM, Dietel M, Petersen I (2002): Incidence of chromosomal imbalances in advanced colorectal carcinomas and their metastases. *Virchows Arch* 440, 187-194
- Knösel T, Schluns K, Stein U, Schwabe H, Schlag PM, Dietel M, Petersen I (2003): Genetic imbalances with impact on survival in colorectal cancer patients. *Histopathology* 43(4), 323-31
- Korn WM, Yasutake T, Kuo WL, Warren RS, Collins C, Tomita M, Gray J, Waldmann FM (1999): Chromosome arm 20q gains and other genomic alterations in colorectal cancer metastatic to liver, as analyzed by comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 25(2), 82-90
- Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (2005). *Ann Oncol* 16, 20-21
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1997): Genetic instability in colorectal cancer. *Nature* 386, 623-7
- Lindblom A (2001): Different mechanisms in the tumorigenesis of proximal and distal colon cancers. *Cancer Biol* 13, 63-69
- Liu XP, Kawauchi S, Oga A, Sato T, Ikemoto K, Ikeda E, Sasaki K (2007): Chromosomal aberrations detected by comparative genomic hybridisation predict outcome in patients with colorectal carcinoma. *Oncol Rep* 17(1), 261-7
- Lothe RA, Peltomaki P, Meling GI, Aaltonen L. A, Nystrom-Lahti M, Pylkkanen L, Heimdal K, Andersen TI, Møller P, Rognum RO (1993): Genomic instability in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables and family history. *Cancer Res* 53, 5849–5852

- Madoff RD, M.D. (2004): Chemoradiotherapy for Rectal Cancer- When, Why, and How?.
N Engl J Med 351(17), 1790-92
- Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan RS, Zborowska E, Kinzler KW, Vogelstein B et al (1995): Inactivation of the type II TGF- β receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. Science 268, 1336-1338
- Mc Leod, Murray GI (1999): Tumor markers of prognosis in colorectal cancer. Review. Br J Cancer 79, 191-203
- Meijer GA, Hermsen M A J A, Baak J P A, van Diest PJ, Meuwissen S G M, Belien J A M, Hoovers J M N, Joenje H, Snijders P J F, Walboomers J M M (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
- Nagashima I, Takada T, Nagawa H, Muto T, Okinaga K (2006): Proposal of a new and simple staging system of colorectal liver metastasis. World J Gastroenterol 12(43), 6961-6965
- Nakao K, Shibusawa M, Tsunoda A, Yoshizawa H, Murakami M, Kusano M, Uesugi N, Sasaki K (1998): Genetic Changes in Primary Colorectal Cancer by Comparative Genomic Hybridization. Surg Today 28, 567-569
- Nakao K, Shibusawa M, Ishihara A, Yoshizawa H, Tsunoda A, Kusano M, Kurose a, Makita T, Sasaki K (2000): Genetic Changes in Colorectal Carcinoma Tumors with Liver Metastases Analyzed by Comparative Genomic Hybridization and DNA Ploidy. Cancer 91, 721-726
- Nordlinger B, Quilichini MA, Parc R, Hannoun L, Delva E, Huguet C (1987): Hepatic resection for colorectal liver metastases. Influence on survival of preoperative factors and surgery for recurrences in 80 patients. Ann Surg 205(3), 256-263
- Ogunbiyi OA, Goodfellow PJ, Gagliardi G, Swanson PE, Birnbaum EH, Fleshman JW, Kodner IJ, Moley JF (1997): Prognostic value of chromosome 1p allelic loss in colon cancer. Gastroenterology 113(3), 761-766

- Olschwang S, Hamelin R, Laurent-Puig P, Thuille B, de Rycke Y, Li YJ, Muzeau F, Girodet J, Salmon RJ, Thomas G (1997): Alternative genetic pathways in colorectal carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci. USA* 94, 12122– 12127
- Persson PG, Karlen P, Bernell O, Leijinmarck CE, Broström O, Ahlbom A, Hellers G (1994): Crohn's disease and cancer: a population-based cohort study. *Gastroenterology* 107, 1675-1679
- Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC, Persucho M (1997): Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 275, 967-969
- Reutzel D, Mende M, Naumann S, Störkel S, Brenner W, Zabel B, Decker J (2001): Genomic imbalances in 61 renal cancers from the proximal tubulus detected by comparative genomic hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 93, 221-227
- 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
- Rodriguez- Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, Henson DE, Jass JJ, Khan PM, Lynch H, Perucho M, Smyrk T, Sobin L, et al. (1997): A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst* 89, 1758-1762
- Risio M, Reato G, di Celle PF, Fizzotti M, Rossini FP, Foa R (1996): Microsatellite instability is associated with the histologic features of the tumor in nonfamilial colorectal cancer. *Cancer Res* 56, 5470–5474
- Rooney PH, Boonsong A, McKay JA, Marsh S, Stevenson DAJ, Murray GI, Curran S, Haites NE, Cassidy J, McLeod HL (2001): Colorectal cancer genomics: evidence for multiple genotypes which influence survival. *Br J Cancer* 85(10), 1492-1498

- Sadeghi B, Arvieux C, Glehen O, Beaujard AC, Rivoire M, Baulieux J, Fontaumard E, Brachet A, Caillot JL, Faure JL (2000): Peritoneal carcinomatosis from non gynecologic malignancies: results of the EVOCAPE I multicentric prospective study. *Cancer* 88, 358-363
- Salahshor S, Kressner U, Pahlmann L, Glimelius B, Lindmark G, Lindblom A (1999): Colorectal cancer with and without microsatellite instability involves different genes. *Cancer* 26, 247-252
- Samowitz WS, Slattery ML, Kerber RA (1995): Microsatellite instability in human colonic cancer is not a useful clinical indicator of familial colorectal cancer. *Gastroenterology* 109, 1765–1771
- Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rödel C, Wittekind C, Fietkau R, Martus P, Tschmelitsch J, Hager E, Hess CF, et al. (2004): Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med* 351(17), 1731–1740
- Scheele J, Stang R, Altendorf-Hofmann, Paul M (1995): Resection of colorectal liver metastases. *World J Surg* 19(1), 59-71
- Schmiegel W, Adler G, Frühmorgen P (2000): Kolorektales Karzinom: Prävention und Früherkennung in der symptomatischen Bevölkerung - Vorsorge bei Risikopatienten – Endoskopische Diagnostik, Therapie und Nachsorge von Polypen und Karzinomen. *Z Gastroenterol* 38, 49-81
- Schmiegel W, Selbmann HK, Adler G, Riemann JF, Fölsch UR, Kühlbacher T, Pox C, Propping P, Sauerbruch T, Frühmorgen P (2004): Leitlinienkonferenz „Kolorektales Karzinom“ 2004. Informationszentrum für Standards in der Onkologie, Deutsche Krebsgesellschaft E.V., o.O. 2004
- Schmiegel W, Pox C, Reinacher-Schick A, Adler G, Fleig W, Fölsch UR, Frühmorgen P, Graeven U, Hohenberger W, Holstege A, Junginger T, et al. (2008): S3- Leitlinie „, Kolorektales Karzinom“. *Z Gastroenterol* 46, 1-73

- Shih IM, Zhou W, Goodman SN, Lengauer C, Kinzler KW and Vogelstein B (2001): Evidence That Genetic Instability Occurs at an Early Stage of Colorectal Tumorigenesis. *Can Res* 61, 818-822
- Souza RF, Appel R, Yin J, Wang S, Smolinski KN, Abraham JN, Zou TT, Shi YQ, Lei J, Cottrell J (1996): The insulin-like growth factor II receptor gene is a target of microsatellite in human gastrointestinal tumours. *Nat Genet* 14(3), 255-257
- Sugihara K, Hojo K, Moriya Y, Yamasaki S, Kosuge T, Takayama T (1993): Pattern of recurrence after hepatic resection for colorectal metastases. *Br J Surg* 80(8), 1032-1035
- Taniai N, Yoshida H, Mamada Y, Matsumoto S, Mizuuchi Y, Suzuki H, Furukawa K, Akimaru K, Tajiri T (2006): Outcome of surgical treatment of synchronous liver metastases from colorectal cancer. *J Nippon Med Sch* 73, 82-88
- Thibodeau SN, Bren G, Schaid D (1993): Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science (Wash. DC)* 260, 816-819
- Tominaga T, M.D., Sakabe T, M.D., Koyama Y, M.D., Hamano K, M.D., Yasutomi M, M.D., Takahashi T, M.D., Kodaira S, M.D., Kato T, M.D., Ogawa N, M.D. (1996): Prognostic Factors for Patients with Colon or Rectal Carcinoma Treated with Resection only. *Cancer* 78, 403-408
- Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Rüschoff J, Fishel R, Lindor NM, Burqart LJ, Hamelin R et al (2004): Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 96, 261-268
- Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT (1991): The International Collaborative Group on Hereditary Non- Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 34(5), 424-425

- Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT (1999): New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC; Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 116, 1453-1456
- Vogelstein B, Fearon ER, Stanley BA, Hamilton R, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AMM (1988): Genetic Alterations During Colorectal-Tumor Development. *N Eng J Med* 319(9), 525-532
- Vogelstein B, Fearon ER, Kern SE, Hamilton SR, Preisinger AC, Nakayama Y, et al (1989): Allelotype in colorectal carcinomas. *Science* 244, 207-11
- Wang X, Hershman DL, Abrams JA, Feingold D, Grann VR, Jacobson JS, Neugut AL (2007): Predictors of survival after hepatic resection among patients with colorectal liver metastasis. *Br J Cancer* 97, 1606-1612
- Yagci T, Göksel S, Dogan Ö, Öztürk M, Yurdusev N (1996): Genomic instability in colorectal cancers in Turkey. *Int J Cancer* 68, 291–294
- Zakaria S, Donohue JH, Que FG, Farnell MB, Schleck CD, Ilstrup DM, Nagorney DM (2007): Hepatic Resection for Colorectal Metastases. *Ann Surg* 246(2), 183-191

Lebenslauf

Mein Name ist Meliha Cakir und ich wurde am 28. Dezember 1982 in Mönchengladbach geboren.

1989 wurde ich in die Grundschule-Mülfort in Mönchengladbach eingeschult.

Diese besuchte ich bis 1993, bis ich auf die Realschule-Mülfort in Mönchengladbach wechselte.

Ich beendete die Realschule im Jahre 1999 mit dem erfolgreichen Erwerb der Fachoberschulreife mit Qualifikation.

Von 1999 bis 2002 besuchte ich das Franz – Meyers – Gymnasium in Mönchengladbach und verließ dieses mit der Allgemeinen Hochschulreife (Leistungskurse: Französisch und Mathematik).

Mein Studium der Humanmedizin begann ich nach dem Abitur in Göttingen, an der Georg-August- Universität im Jahre 2002 und beendete die Vorklinik im September 2004 mit dem Erwerb des Ersten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung.

Danach widmete ich mich ab Oktober 2005 zunächst der Durchführung des experimentellen Teils meiner Dissertationsarbeit im wissenschaftlichen Labor der Abteilung Gastroenteropathologie am Universitätsklinikum Göttingen unter der Leitung von Herrn Prof. Füzesi.

Das Studium der Humanmedizin setzte ich im März 2005 an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel fort.

Das Praktische Jahr begann ich mit dem ersten Tertial von Februar bis Juni 2008 in der Pathologie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel. Im zweiten Tertial war ich von Juni bis Oktober 2008 in der Chirurgie ebenfalls am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel. Das dritte Tertial absolvierte ich in der Inneren Medizin der Segeberger Kliniken in Bad Segeberg.

Ich konnte das Studium erfolgreich abschließen und erhielt die Approbation als Ärztin im Juli 2009.

Während meines Hochschulstudiums arbeitete ich zunächst von Oktober 2003 bis März 2004 im ambulanten Pflegedienst des Stifts am Klausberg in Göttingen und von November 2006 bis Oktober 2008 im ambulanten Pflegedienst des Kieler Stadtklosters in Kiel als studentische Aushilfe.

Seit dem 1. September 2009 arbeite ich als Assistenzärztin in der II. Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, wo sich zurzeit auch mein Wohnsitz befindet.

Kiel, den 03. Februar 2010

Meliha Cakir