Aus der Abteilung Transfusionsmedizin
(PD. Dr. med. J. Riggert)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Etablierung eines Verfahrens zum Nachweis epigenetischer Biomarker
im peripheren Blut zur Stratifizierung der Therapie des Rektumkarzinoms

INAUGURAL DISSERTATION

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

vorgelegt von
Tobias Thormann
aus
Magdeburg

Göttingen 2015

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
I. Berichterstatter/in:	Prof. Dr. med. T. J. Legler
II. Berichterstatter/in:	Priv.-Doz. Dr. med. J. Gaedcke
III. Berichterstatter/in:	
Tag der mündlichen Prüfung:	17. Dezember 2015

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

I. Einleitung	1
I.1 Definition und Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms	1
I.2 Ätiologie und Pathogenese des kolorektalen Karzinoms	2
I.2.1 Genetische Pathomechanismen	3
I.2.2 Epigenetische Pathomechanismen	9
I.2.3 Wachstum, Lokalisation und Metastasierungsverhalten	11
I.3 Klassifikation des kolorektalen Karzinoms nach TNM, UICC und DUKE	12
I.3.1 TNM-Klassifikation des KRK	13
I.3.2 UICC-Stadien und Dukes-Klassifikation des KRK	14
I.3.3 Grading	14
I.4 Symptomatik und diagnostisches Vorgehen	15
I.5 Darmkrebsvorsorge und Früherkennung	17
I.5.1 Endoskopische Verfahren	18
I.5.2 Konventionelle Stuhltests	19
I.5.3 Genetische und epigenetische Stuhltests	20
I.6 Biomarker im peripheren Blut	21
I.6.1 Konventionelle Blutmarker	21
I.6.2 Genetische und epigenetische Blutmarker	21
I.7 Therapie	27
I.7.1 Kurative Therapiekonzepte	27
I.7.2 Palliativtherapie	31
II. Ziele der Arbeit	32
III. Material und Methoden	33
III.1 Studiendesign und Patientenauswahl	33
III.2 Oligonukleotide	34
III.3 DNA-Proben	37
III.3.1 DNA-Kontrollen	37
III.3.2 Isolation von DNA aus Blutspender- und Patientenplasma/-serum	37
III.4 Restriktionsenzyme	38
III.5 Methylierungsspezifische Real-Time-PCR	38
III.5.1 Quantitative Real-Time-PCR	38
III.5.2 Reagenzien und Reaktionsbedingungen	40

III.6 Etablierung des Testverfahrens.....	42
III.6.1 Auswahl geeigneter Gensequenzen und Restriktionsendonukleasen für die methylierungsspezifische Ein-Schritt-Real-Time-PCR	42
III.6.2 Validierung der methylierungsspezifischen Ein-Schritt-Real-Time-PCR.....	42
III.6.3 Vergleich der Testmedien EDTA-Plasma und Serum an ausgewählten Patientenproben	44
III.7 Festlegung eines Ct-Grenzwertes (Cut-Off) für die methylierungsspezifische Ein-Schritt- Real-Time-PCR aus Blutspender- und Patienten-DNA.....	44
III.8 Ermittlung der diagnostischen Spezifität und Sensitivität der Blutspender- und Patienten- DNA aus EDTA-Plasma sowie aus isolierter Tumorgewebe-DNA	45
III.9 Statistische Analyse	46
IV. Ergebnisse	48
IV.1 Alter und Geschlecht von Blutspendern und Rektumkarzinom-Patienten	48
IV.2 Tumorstadium, Therapie und Krankheitsverlauf der Patienten	50
IV.3 Etablierung der enzymbasierten methylierungsspezifischen Ein-Schritt-Real-Time-PCR	51
IV.3.1 Auswahl der Gensequenz anhand der enzymspezifischen Diskrimination zwischen nicht-methylierten und methylierten DNA-Kontrollen	51
IV.3.2 Acil zum Nachweis der methylierten Promotorsequenzen <i>RUNX3</i> , <i>NEUROG1</i> , <i>SEPTIN9</i> , <i>TMEFF2</i> , <i>SDC2</i> und <i>RASSF1A</i>	54
IV.3.3 Validierung der methylierungsspezifischen PCR für <i>RUNX3</i> , <i>NEUROG1</i> , <i>SEPTIN9</i> , <i>TMEFF2</i> , <i>SDC2</i> und <i>RASSF1A</i> sowie für die internen Kontrollen β -Globin und β -Actin.....	56
IV.3.4 Vergleich von EDTA-Plasma und Serum als Ausgangsmaterial für die methylierungsspezifische Ein-Schritt-Real-Time-PCR	59
IV.4 Diagnostische Spezifität und Sensitivität der methylierungsspezifischen Ein-Schritt-Real- Time-PCR aus Blutspender- und Patienten-DNA unter Verwendung interner Kontrollreaktionen	60
IV.4.1 Ermittlung genspezifischer Cut-Off-Ct-Werte für die methylierungsspezifische Ein-Schritt-Real-Time-PCR anhand der DNA gesunder Blutspender	60
IV.4.2 Anwendung genspezifischer Ct-Grenzwerte auf negative und positive RUN-Kontrollen sowie auf die DNA der Tumorzelllinien HT-29 und CACO-2.....	61
IV.4.3 Diagnostische Spezifität und Sensitivität der methylierungsspezifischen Ein-Schritt-Real-Time-PCR.....	63
IV.4.4 Methylierungsspezifische Multiplex-PCR für <i>RUNX3</i>	66
IV.4.5 Methylierungsspezifische Multiplex-PCR für <i>NEUROG1</i>	67
IV.4.6 Methylierungsspezifische Multiplex-PCR für <i>SEPTIN9</i>	68

IV.4.7	Methylierungsspezifische Multiplex-PCR für <i>TMEFF2</i>	69
IV.4.8	Methylierungsspezifische Multiplex-PCR für <i>SDC2</i>	70
IV.4.9	Methylierungsspezifische Multiplex-PCR für <i>RASSF1A</i>	71
IV.4.10	Methylierungsspezifische Multiplex-PCR für das diagnostische Panel aus <i>RUNX3</i> , <i>SEPTIN9</i> und <i>SDC2</i>	72
IV.4.11	Korrelation der Ergebnisse von <i>RUNX3</i> , <i>SEPTIN9</i> und <i>SDC2</i> mit dem Tumorstadium nach Radio-Chemotherapie	73
V.	Diskussion	74
V.1	Alters- und Geschlechtsverteilung in Patienten- und Kontrollgruppe	77
V.2	Tumorstadien und Therapieverlauf.....	78
V.3	Nachweis hypermethylierter Sequenzen in den Promotor-Regionen von <i>RUNX3</i> , <i>NEUROG1</i> , <i>SEPTIN9</i> , <i>TMEFF2</i> , <i>SDC2</i> und <i>RASSF1A</i> in chemisch hypermethylierter DNA sowie an DNA ausgewählter Tumorzelllinien	79
V.4	Acil als geeignete, methylierungssensitive Restriktionsendonuklease.....	83
V.5	EDTA-Plasma als geeignetes Ausgangsmaterial für eine methylierungsspezifische Ein-Schritt-Real-Time-PCR	85
V.6	Einsatz der internen Kontrollen <i>β-Globin</i> und <i>β-Actin</i> in einer methylierungsspezifischen Ein-Schritt-Real-Time-PCR	86
V.7	Diagnostische Spezifität und Sensitivität für <i>RUNX3</i> , <i>NEUROG1</i> , <i>SEPTIN9</i> , <i>TMEFF2</i> , <i>SDC2</i> und <i>RASSF1A</i> im Vergleich zu bisherigen Publikationen.....	88
V.8	Therapiestratifizierung anhand des Markerpanels <i>RUNX3-SEPTIN9-SDC2</i>	102
V.9	Fehlerquellen	104
V.10	Fazit und Ausblick	105
VI.	Zusammenfassung	108
VII.	Literaturverzeichnis.....	110
VIII.	Tabellenverzeichnis	137
IX.	Abbildungsverzeichnis	138

Abkürzungsverzeichnis

AACC	American Association for Clinical Chemistry
Accll	Acinetobacter calcoaceticus
ACF	Aberrant Crypt Focus, mikroskopische Mukosaläsion
Acil	Arthrobacter citreus
AGTR1	Angiotensin-II Receptor-Type 1
APC	Adenomatöses-Polyposis-Coli-Gen
BHQ	Black-Hole-Quencher
BK	Bronchialkarzinom
bp	Basenpaare
BstUI	Bacillus stearothermophilus U458
C	Cytosin
CDH1	Cadherin-1
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
cfDNA	Cell-free DNA
Chr.	Chromosom
CHST11	Carbohydrate Sulfotransferase 11
CIMP	CpG-Island-Methylator-Phenotype
CIN	Chromosomale Instabilität
CNRIP1	Cannabinoid Receptor Interacting Protein 1
COBRA	Combined Bisulfite Restriction Analysis
CT	Computertomografie
Ct	Cycle Threshold
DGHO	Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie

DNA	Desoxyribonucleinacid - Desoxyribonucleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
E	Effizienz
FAM	Fluorophor 6-Carboxyfluorescein
FBN1	Fibrillin 1
FIT	Fäkal-immunochemischer Test
FOBT	Fäkal-okkultter Bluttest
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
5-FU	5-Floururacil
G	Guanin
GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.
GKV	Gesetzliche Krankenversicherung
Gy	Gray, SI-Einheit der Strahlenenergie
HLTF	Helicase-like Transcriptional Factor
IARK	Agency for Research on Cancer
ICF	Immunodeficiency, Centromeric Instability and Facial Abnormalities
IEN	Intraepitheliale Neoplasie
INA	Internexin Neuronal Intermediate Filament-Protein Alpha
IRX 5	Iroquois Homeobox 5
ITGA4	Integrin Alpha 4
KCNA1	Potassium Channel, Voltage Gated Shaker Related Subfamily A, Member 1
KK	Kolonkarzinom
KRK	Kolorektales Karzinom
LK	Lymphknoten

LOH	Loss of Heterozygosity
MAL	Mal T-Cell Differentiation Protein
MGMT	O-6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MGB	Minor-Groove-Binder-Non-Fluorescent-Quencher
MMR	Mismatch-Repair
MRT	Magnetresonanztomografie
MS	Microsatellit
MSI	Microsatelliteninstabilität
MSM 1	Chemagic Magnetic Separation Module 1
MSP	Methylierungsspezifische PCR
NEUROG1	Neurogenin-1
NGFR	N-myc Downstream-regulated Gene 4
NTC	Non Template Control
OG	Onkogen
PCR	Polymerase Chain Reaction – Polymerase-Kettenreaktion
PECA	Plattenepithelkarzinom
PET	Positronen-Emissions-Tomografie
POG	Protoonkogen
RASSF1A	RAS-Association Domain Family 1
RASSF2A	RAS-Association Domain Family 2
RCT	Radiochemotherapie
RK	Rektumkarzinom
RKI	Robert Koch-Institut
RT	Radiotherapie, Radiatio
RUNX3	Runt-Related Transcription Factor 3

SD	Standard Deviation, Standardabweichung
SDC2	Syndecan-2 Transmembranprotein-Gen
SEPTIN9	Septin-9 Transmembranprotein-Gen
SFRP2	Secreted Frizzled-related Protein 2
SIM1	Single-Minded Family BHLH Transcription Factor 1
SLIT2	Slit Homolog-2 Protein
SNCA	Synuclein Alpha
SORCS3	Sortilin-Related VPS10 Domain Containing Receptor 3
SPG20	Spastic Paraplegia 20
TF	Transkriptionsfaktor
TME	Totale mesorektale Exzision
TMEFF2	Transmembrane Protein-containing Epidermal Growth Factor and Follistatin Domain
TSG	Tumorsuppressorgen
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
UMG	Universitätsmedizin Göttingen
VIM	Vimentin
VK	Variationskoeffizient
WHO	World Health Organization
Wif-1	Wnt-Inhibitory Factor 1
WNT2	Wingless-Type Integration-Site Family-Member 2

I. Einleitung

I.1 Definition und Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms

Maligne tumoröse Neubildungen des Epithels der Darmschleimhaut, welche über die gesamte Länge des Kolons, des Sigmoids sowie des Rektums auftreten können, werden unter dem Begriff des kolorektalen Karzinoms (KRK) zusammengefasst. In Abhängigkeit von der Lokalisation wird beim KRK zwischen Kolonkarzinom (KK) und Rektumkarzinom (RK) unterschieden. Die Union Internationale Contre le Cancer (UICC) fasst unter dem Begriff des Kolonkarzinoms isoliert alle Tumoren im Bereich des Sigmoids, des Colon descendens, des Colon transversums sowie des Colon ascendens einschließlich des Bereiches der Ileozökalklappe zusammen. Der Begriff des Rektumkarzinoms (RK) beschreibt hingegen alle Tumoren deren aborale Enden nach Messung mit einem starren Rektoskop 16 cm oder weniger von der Anokutanlinie entfernt sind (Knudson 1993; Wittekind 2010). Ferner wurde durch die UICC im Jahr 2002 eine weitere Unterteilung des Rektumkarzinoms in proximale (12-16 cm ab ano), mittlere (6-11 cm ab ano) und distale Tumoren (< 6 cm ab ano) veröffentlicht (UICC 2002). Abweichend von dieser europäischen Nomenklatur wird in den USA eine Distanz von 12 cm ab Anokutanlinie als Grenze zwischen Kolon- und Rektumkarzinom angenommen (Nelson et al. 2001; NIH 1990; Pox und Schmiegel 2013). Das Adenokarzinom (AC) stellt mit etwa 85 % aller KRK die histologische Hauptentität dar. Lediglich 14 % aller Darmtumoren lassen sich den Plattenepithelkarzinomen (PECA) zuordnen. Weitere Entitäten, wie beispielsweise neuroendokrine Tumoren, Lymphome oder Sarkome stellen mit einer Häufigkeit von etwa einem Prozent eine Rarität dar (Kaatsch et al. 2013). Nach einer Veröffentlichung des Robert Koch-Institutes (RKI) und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID) aus 2013 erkrankten im Jahr 2010 in der Bundesrepublik Deutschland (BRD) circa 28600 Frauen und 33800 Männer an einem Kolon- oder Rektumkarzinom (Kaatsch et al. 2013). Bei den Männern ist das KRK somit nach dem Prostatakarzinom (26,1 %) und dem Bronchialkarzinom (13,9 %) mit 13,4 % die dritthäufigste Krebserkrankung in der BRD. In der weiblichen Bevölkerung belegt das KRK - mit einem prozentualen Anteil von 12,7 % - nach dem Mammakarzinom (31,3 %) den zweiten Platz der am häufigsten vorkommenden Malignome (Kaatsch et al. 2013). Die altersstandardisierte Inzidenz beträgt etwa 58 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner in der männlichen sowie circa 37 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner in der weiblichen Bevölkerung und belegt, dass Männer in der BRD etwa eineinhalbmals häufiger an einem Darm- oder Rektumkarzinom erkranken als Frauen. Betrachtet man den prozentualen Anteil des KRK an allen Krebssterbefällen in Deutschland, so ist dieses Karzinom bei den Männern (11,4 %) die zweithäufigste Todesursache nach dem Bronchialkarzinom (24,9 %). Bei den

Frauen nimmt das KRK nach Mammakarzinom (17,4 %) und Bronchialkarzinom (13,6 %) den dritten Platz ein und ist für circa 12,5 % aller krebsbedingten Todesfälle verantwortlich. Männer erkranken mit durchschnittlich 71 Jahren vier Jahre vor den Frauen, deren mittleres Erkrankungsalter bei 75 Jahren liegt (Kaatsch et al. 2013). Durch die zunehmende Entwicklung diagnostischer Screeningverfahren sowie Neuerungen im Bereich der Frühintervention und Therapie konnte die Prognose des KRK in den letzten Jahren stetig verbessert werden. Dies spiegelt sich vor allem in der Betrachtung der 5-Jahres-Überlebensraten sowie der altersstandardisierten Erkrankungs- und Sterberaten der vergangenen Jahre wider, welche in Deutschland seit dem Jahr 2000 allgemein rückläufig sind (Kaatsch et al. 2013). Unabhängig vom Geschlecht überleben etwa 65 % der diagnostizierten KRK-Patienten fünf Jahre und länger nach Diagnosestellung (Kaatsch et al. 2013). Vergleichbare Zahlen liefern auch Untersuchungen in den Vereinigten Staaten (Siegel et al. 2013). Eine weltweite internationale Studie (GLOBOCAN) der International Agency for Research on Cancer (IARC) und der World Health Organization (WHO) beschreibt einen globalen Rückgang der Inzidenzraten zwischen 2002 und 2012. Dennoch ist das KRK weltweit nach wie vor die zweit - beziehungsweise dritthäufigste maligne Tumorerkrankung bei Frauen und Männern (Bray et al. 2013; Ferlay et al. 2013).

I.2 Ätiologie und Pathogenese des kolorektalen Karzinoms

Die Entstehung eines kolorektalen Karzinoms ist durch multifaktorielle Einflüsse gekennzeichnet. Als Hauptrisikofaktoren gelten vor allem ein erhöhter Tabakkonsum sowie Übergewicht und Fettleibigkeit (Obesitas) infolge hochkalorischer Nutrition und Bewegungsmangel. Weitere Ernährungsgewohnheiten, wie beispielsweise der übermäßige Verzehr roter Fleisch- und Wurstprodukte, ballaststoffarmer Lebensmittel sowie ein gesteigerter Alkoholkonsum sind ebenfalls mit einer vermehrten Entstehung eines KRK assoziiert (Hisamuddin und Yang 2004; Kaatsch et al. 2013; Pox et al. 2013). Neben diesen Faktoren ist für das KRK zudem eine deutliche familiäre Prädisposition beschrieben. Abhängig vom Alter des Darmkrebspatienten bei Diagnosestellung besteht speziell für Verwandte ersten Grades ein erhöhtes Risiko, im Laufe ihres Lebens ebenfalls ein KRK auszubilden (Kaatsch et al. 2013). Nach aktuellem Kenntnisstand kann das kolorektale Karzinom bezüglich seiner Ätiologie und Häufigkeit in die nachfolgenden drei Gruppen eingeteilt werden.

1. sporadisch auftretende KRK (75 %)
2. KRK mit familiärer Prädisposition (15 %)
 - KRK im Rahmen hereditärer Syndrome (9 %)
 - familiäres adenomatöses Polyposis-Syndrom (FAP)
 - hereditäres nicht-polypöses kolorektales Karzinom (HNPCC)
3. KRK bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (1%)

Im Einzelnen liegen diesen Erscheinungsformen unterschiedliche Pathomechanismen zugrunde, welche nachfolgend näher erläutert werden (Hisamuddin und Yang 2004, 2006; Moran et al. 2010).

I.2.1 Genetische Pathomechanismen

Genetische Veränderungen der DNA in Form numerischer und struktureller Mutationen oder Allelverlusten (Loss of Heterozygosity (LOH)) können in Keimzellen sowie somatischen Zellen, durch Beeinflussung interner Zellzyklus-Regulationsprozesse, zu einer Steigerung der Proliferation und/oder zu einer Apoptoseresistenz der Zelle führen. Die betroffene Zelle bildet gegenüber benachbarten, nicht-mutierten Zellen einen Wachstumsvorteil aus (Fearon und Vogelstein 1990; Hisamuddin und Yang 2006; Moran et al. 2010; Worthley et al. 2007). Diese Mechanismen führen zur Ausbildung neoplastischer Gewebhyperplasien im Allgemeinen und sind im Speziellen auf das kolorektale Karzinom übertragbar. Der bekannteste Pathomechanismus, die Adenom-Karzinom-Sequenz, wurde bereits im Jahr 1990 durch Fearon und Vogelstein beschrieben. Diese Theorie basiert auf der schrittweisen Entwicklung eines invasiv-wachsenden Karzinoms aus einer gutartigen Vorläuferläsion (Adenom, ACF), welche durch sporadisch auftretende genetische Veränderungen der zellzyklusregulierenden Tumorsuppressorgene (TSG) sowie Protoonkogene (POG) hervorgerufen wird. Kennzeichnend für TSG ist ihre Eigenschaft, nach Aktivierung und Ausbildung ihrer Genprodukte hemmend auf den Zellzyklus einzuwirken. POG hingegen bilden nach ihrer Aktivierung zu Onkogenen (OG) Proteine, welche einen gegenteilig aktivierenden Effekt auf den Zellzyklus ausüben und damit eine unkontrollierte Proliferation der Zelle begünstigen (Fearon und Vogelstein 1990; Knudson 1993). Im Einzelnen schildert diese auch als *Suppressor-Pathway* oder *Canonical-Pathway* (Moran et al. 2010) bezeichnete Kaskade die Inaktivierung der Tumorsuppressorgene APC (Chr. 5q), DCC (Chr. 18q) und p53 (17p) sowie die Aktivierung der Protoonkogene COX-2 (Chr. 1q) und K-RAS (Chr. 12p) infolge von Mutationen oder LOH (Fearon und Vogelstein 1990; Hisamuddin und Yang 2004; Moran et al. 2010; Worthley et al. 2007). Eine schematische Darstellung des *Suppressor-Pathway* zeigt Abbildung 1.

Abbildung 1: Modifizierte Darstellung des *Suppressor-Pathway* und des *Mutator-Pathway* nach Hisamuddin und Yang (2006, S.54), Moran et al. (2010, S.153) Worthley et al. (2007, S.3785): beteiligte Tumorsuppressorgene (weiß); beteiligte Onkogene (schwarz).

Nach dem Mechanismus von Vogelstein und Fearon lassen sich heute nahezu 80-85 % aller sporadisch vorkommenden Darm- und Rektumkarzinome sowie ein Großteil der FAP-assoziierten KRK beschreiben (Hisamuddin und Yang 2004; Moran et al. 2010; Worthley et al. 2007). Von Bedeutung ist, dass während der Karzinogenese im Rahmen der o.g. Theorie nicht immer alle der in Abbildung 1 dargestellten Mutationen simultan auftreten müssen. So ist beispielsweise die Mutation des Adenomatöse-Polyposis-Coli Gens (*APC*) in nahezu allen frühen FAP-assoziierten dysplastischen Mukosaläsionen (ACF) detektierbar, während die *K-RAS*-Mutation im Rahmen von FAP selten auftritt. Umgekehrt ist eine *K-RAS*-Mutation in sporadisch bedingten ACF nahezu obligat, wohingegen eine Mutation im *APC*-Gen im Frühstadium sporadisch auftretender KRK vergleichsweise selten vorkommt (Worthley et al. 2007). Erst in späteren Stadien der Karzinogenese steigt der Anteil dieser genetischen Veränderung bis auf 80 % an (Worthley et al. 2007). Weiterhin unterliegen die Pathways der einzelnen Gene einer hohen internen Variabilität (Hisamuddin und Yang 2006; Worthley et al. 2007). Ein Beispiel hierfür stellt das *APC*-Gen dar, dessen Signaltransduktion

auf unterschiedlichsten Ebenen durch Mutationen beeinflusst werden kann. Als Bestandteil des Wnt/ β -Catenin-Signalweges - einer Kaskade der Embryo- sowie Karzinogenese (siehe Abbildung 2) - reguliert dieses Multifunktionsgen die Bildung des APC-Proteins, welches in Zellproliferation, Differenzierung sowie Apoptoseprozesse involviert ist (Hisamuddin und Yang 2004, 2006; Worthley et al. 2007). Kommt es zu einer Mutation von APC und somit zur Bildung eines fehlerhaften Proteins, wird das intrazelluläre Onko-Protein β -Catenin nicht phosphoryliert und nachfolgend abgebaut, sondern wandert stattdessen als aktivierter Transkriptionsfaktor (TF) in den Zellkern, um dort als onkogenetischer Promotor weitere Zellregulator-Gene zu aktivieren (Hisamuddin und Yang 2004, 2006; Worthley et al. 2007). Ein alternativer Pathomechanismus mit gleichem Resultat ergibt sich aus der direkten Mutation des POG β -Catenin. Das Protein β -Catenin ist hier aufgrund der Mutation resistent gegenüber dem APC-Regulatorkomplex, entgeht seiner Ubiquitierung und wirkt nachfolgend im Zellkern auf die gleiche Weise (als TF) proliferationssteigernd (Gregorieff und Clevers 2005; Worthley et al. 2007). Beide o.g. Varianten des *Wnt-Pathway* führen letztlich zu einer gesteigerten Zellteilungsrate und werden insbesondere bei Patienten mit FAP beobachtet (Hisamuddin und Yang 2006; Worthley et al. 2007). Darüber hinaus reguliert das APC bestimmte Zytoskelettproteine wie F-Actin oder Mikrotubuli und ist in dieser Funktion für die geregelten Abläufe von Adhäsions-, Migrations- sowie Mitoseprozessen von entscheidender Bedeutung (Hisamuddin und Yang 2006; Worthley et al. 2010). Ein genetischer Defekt des APC-Gens bewirkt folglich - neben fehlerhafter Zelladhäsion - vor allem eine gestörte Segregation sowie nachfolgende Chromosomenaberrationen, was in der Summe zu einer chromosomalen Instabilität (CIN) führt (Worthley et al. 2007). Die Karzinogenese wird somit bereits zu einem frühen Zeitpunkt begünstigend beeinflusst (Hisamuddin und Yang 2006; Worthley et al. 2007). Am Beispiel von APC wird deutlich, dass eine genetische Veränderung in Form einer Genmutation, aber auch infolge eines LOH komplexe Konsequenzen auf zahlreiche zellinterne Regulationsprozesse nach sich zieht. Die Entstehung eines KRK kann somit potentiell durch mehr als einen Signalmechanismus erfolgen (Hisamuddin und Yang 2006; Moran et al. 2010; Worthley et al. 2007). Diese Erkenntnisse sind auf weitere Gene der Adenom-Karzinom-Sequenz übertragbar.

Wnt-1 Canonical Pathway:

Das Wnt-Signalprotein, ein sekretorisches Protein benachbarter Zellen, bindet die Rezeptoren Frizzled und LRP. Es folgt die Aktivierung des inhibitorischen Disheveled-Proteins, welches wiederum zu einer Inaktivierung des regulierenden Proteinkomplex, bestehend aus APC, der Kinase GSK-3β und Axin-1 führt. Dieser Komplex gewährleistet in Abwesenheit eines Wnt-Signals oder einer Mutation von APC/β-Catenin (linkes Bild) die Ubiquitierung des Proteins β-Catenin durch Phosphorylierung. Durch o.g. Wnt-Signal und/oder das Vorliegen einer Mutation (rechtes Bild) wird die Degradation von β-Catenin inhibiert und das Protein fällt vermehrt im Zytoplasma an. Freies β-Catenin wandert in den Zellkern, bindet TCF und wirkt als Transkriptionsfaktor und onkogenetischer Promotor aktivierend auf spezifisch-proliferationssteigernde Zielgene (Hisamuddin und Yang 2006; Kimelman und Xu 2006; Logan und Nusse 2004; Worthley et al. 2007).

Abbildung 2: Darstellung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweges nach Hisamuddin und Yang (2006, S.57; Abdruck mit freundlicher Genehmigung des Springer-Verlags). Bildunterschrift nach Informationen aus Hisamuddin und Yang (2006), Kimelman und Xu (2006), Logan und Nusse (2004), Worthley et al. (2007).

In den zurückliegenden zwei Jahrzehnten konnte neben dem *Suppressor-Pathway* eine weitere Signalkaskade beschrieben werden. Diese auch als *Mutator-Pathway* bezeichnete genetische Veränderung betrifft das Mismatch-Repair (MMR)-System der Zelle und ist ebenfalls in Abbildung 1 dargestellt (Hisamuddin und Yang 2006; Moran et al. 2010; Worthley et al. 2007). Im Detail umfasst dieser Mechanismus sieben Proteine (*hMLH1*, *hMLH3*, *hMSH2*, *hMSH3*, *hMSH6*, *hPMS1*, *hPMS2*), welche im aktiven Zustand jeweils als Heterodimere vorkommen (Worthley et al. 2007). Hierbei sind die Proteine *hMLH1* und *hMSH2* die Basiskomponenten und finden sich in etwa 90 % aller dieser dimeren Proteinpaare wieder (Worthley et al. 2007). Unter physiologischen Voraussetzungen behebt dieses Korrektur-System mögliche, im Anschluss an die Polymerisation der Erbsubstanz, auftretende DNA-Defekte (Moran et al. 2010). Die Pathologie des Mutator-Signalwegs liegt im Einbau zahlreicher Mutationen in kurze, repetitive, nicht-kodierende DNA-Sequenzen während der DNA-Polymerisation, welche als Microsatelliten (MS) bezeichnet werden

(Moran et al. 2010; Worthley et al. 2007). Diese MS führen zu Frameshift-Mutationen, welche wiederum aufgrund bestehender Primärdefekte in den MMR-Genen nicht korrigiert werden können. Es resultiert eine Microsatelliteninstabilität (MSI) (Moran et al. 2010; Worthley et al. 2007). Aufgrund dieser Erkenntnisse gelang die Generierung diverser Testsequenzen (Panel) mit definierten Microsatelliten (Mono- und Dinukleotide), die nachfolgend zu einer Einteilung der kolorektalen Karzinome anhand der bestehenden Microsatelliteninstabilitäten führte (Boland et al. 1998; Moran et al. 2010; Worthley et al. 2007). So unterscheidet man nach Boland et al. (1998), Moran et al. (2010) und Worthley et al. (2007) KRK unter anderem anhand der Anzahl entsprechend mutierter Nukleotide innerhalb dieser Panel (Kombination aus fünf Nukleotiden):

- MSI-High-Tumoren (MSI-H): mindestens zwei von fünf Markern verändert
- MSI-Low-Tumoren (MSI-L): mindestens einer von fünf Markern verändert
- MS-Stabile-Tumoren (MSS): keine Veränderung in Testmarkern (Suppressor-Typ)

Etwa 15-20 % allen sporadisch auftretenden KRK liegt der *Mutator-Pathway* zugrunde (Moran et al. 2010; Worthley et al. 2007). Überdies bildet dieser Pathomechanismus die wesentliche molekulargenetische Grundlage für die Entstehung eines HNPCC (Moran et al. 2010; Worthley et al. 2007). Auffällig bei der Betrachtung dieser Entität ist, dass ihrer Entstehung zwei nacheinander auftretende Veränderungen, so genannte „Hits“ (Knudson 1993, S. 10914), auf Keimbahn- sowie somatischer Zellebene zugrunde liegen. In Anlehnung an das allgemeine Modell zur Karzinogenese nach Knudson (1993) bedingt beim HNPCC eine Keimbahnmutation in einem MMR-Gen - zumeist *hMLH1* oder *hMSH2* - das Vorliegen lediglich einer funktionierenden Genkopie innerhalb der Zelle (Worthley et al. 2007). Folgt dann ein zweiter Hit in Form einer somatischen Mutation des noch aktiven Allels, so führt dies zur vollständigen Inaktivierung des gesamten Gens und letztlich zum Ausfall des MMR-Systems (Worthley et al. 2007). Im Unterschied zum HNPCC, was sich durch Mutationen in allen somatischen Zellen definiert, findet man in sporadisch auftretenden kolorektalen Karzinomen die o.g. Veränderungen nach Knudsons Theorie insgesamt eher selten und wenn, lediglich in einer somatischen Zelllinie (Knudson 1993, 1996). Häufiger liegen den sporadisch vorkommenden Karzinomen, speziell denen vom MSI-H-Typ, epigenetische Veränderungen in Form von Promotor-Hypermethylierungen zugrunde. Diese methylierungsbedingte Sequenzinaktivierung betrifft vornehmlich das MMR-Gen *hMLH1* und bildet eine Schnittstelle mit einem dritten, nachfolgend unter Gliederungspunkt 1.2.2 erläuterten Signalweg, dem *Methylator-Pathway* (Moran et al. 2010; Worthley et al. 2010; Worthley et al. 2007). Insgesamt spricht man den MSI-H-Tumoren, im Vergleich zu MSI-L und MSS, eine längere Überlebenszeit und demnach eine bessere Prognose zu (Moran et al. 2010). Die MSI-L-Tumoren hingegen nehmen molekulargenetisch eine Mittelposition

zwischen MSI-H und MSS ein (Moran et al. 2010; Worthley et al. 2007). Weiterhin besteht ein wesentlicher Unterschied zwischen MSI-L- und MSS-Tumoren im Vorkommen der *K-RAS*-Mutation, welche in MSI-L-Tumoren mit 54 % deutlich häufiger vorliegt als in MSS-Tumoren (27 %) (Jass et al. 1999; Moran et al. 2010; Worthley et al. 2007). Die Gensequenz der O-6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (*MGMT*), ein weiteres DNA-Reparatur-Protein, ist in MSI-L-Karzinomen ebenfalls häufig von einer Promotor-Hypermethylierung betroffen und stellt auch hier eine Interaktion mit dem *Methylator-Pathway* dar (Worthley et al. 2007). Mit 64 % ist der Anteil dieser epigenetischen Veränderung in MSI-L-Tumoren deutlich höher als in MSS (26 %) und MSI-H (13 %) (Whitehall et al. 2001). Die beschriebene Hypermethylierung des *MGMT* lässt sich wiederum vermehrt in sporadisch auftretenden KRK detektieren (Worthley et al. 2007). Eine Übersicht der geschilderten Zusammenhänge wird in Abbildung 3 sowie in Tabelle 1 dargestellt.

Abbildung 3: Modifizierte Darstellung des *Mutator-Pathway* nach Boland und Goel (2010, S.2073).

I.2.2 Epigenetische Pathomechanismen

Ein dritter Pathomechanismus, welcher bereits in 1.2.1 erwähnt wurde, ist der *Methylator-Pathway*. Die epigenetischen Veränderungen umfassen hierbei sowohl Methylierungen tumorrelevanter Gensequenzen als auch die Acetylierung und Deacetylierung von Chromatin-Histonkomplexen (Jones und Baylin 2002; Jones und Takai 2001; Kim et al. 2010; Kondo und Issa 2004; Schwarzenbach et al. 2011). Direkte genetische Veränderungen der Erbsubstanz in Form von Mutationen, wie sie im Rahmen des Suppressor- sowie des Mutator-Signalweg auftreten, bleiben hier jedoch aus (Kondo und Issa 2004). Chemisch erfolgt mittels DNA-Methyltransferasen die Anlagerung einer Methylgruppe ($-\text{CH}_3$) an das fünfte Kohlenstoffatom der Base Cytosin (C) (Summers et al. 2013). Die Bildung eines solchen Methyl-Cytosin wird vornehmlich in bestimmten Bereichen der DNA-Sequenz katalysiert, die als *CpG-Islands* (Bird 1986, S. 209) bezeichnet werden. Kennzeichnend für diese Regionen ist ein erhöhter Anteil von Guanosin (G)-Cytosin (C)-Dinukleotiden von 50 % bis 55 % innerhalb einer Sequenzlänge von mindestens 500 Basenpaaren (bp) (Bird 1986; Bock et al. 2007; Summers et al. 2013). *CpG-Islands* finden sich allgemein in ca. 60 % aller Gene der menschlichen Erbsubstanz wieder und liegen physiologischerweise mehrheitlich unmethyliert vor (Bird 2002). Im Zuge der Tumorgenese kommt es vermehrt in Promotorbereichen bestimmter transkriptionsregulierender Sequenzen, wie beispielsweise TSG oder MMR-Genen, zu einer Hypermethylierung dieser G-C-reichen Regionen. Hierdurch wird die Anlagerung modulierender Transkriptionsfaktoren an die DNA inhibiert. Das so genannte *Gen-Silencing* (Kondo und Issa 2004, S. 31), also die Inaktivierung der Gensequenz ist die Folge. Dieser Mechanismus bedingt letztlich die Hemmung der weiteren Proteinbiosynthese (Bird 1986; Bock et al. 2007; Kim et al. 2010; Kondo und Issa 2004; Schwarzenbach et al. 2011; Summers et al. 2013). Basierend auf diesem Wissen wird heute das KRK nach dem Vorhandensein charakteristischer Methylierungsmuster innerhalb einer definierten Kombination aus fünf KRK-spezifischen Genen (Panel) eingeteilt (Worthley et al. 2007). Diese Klassifizierung nach dem *CpG-Island-Methylator-Phenotype* (CIMP) unterscheidet die Untergruppen CIMP positiv (CIMP+) und CIMP negativ (CIMP-), wobei CIMP-positive KRK mindestens in drei der fünf getesteten Gensequenzen eine erhöhte Methylierungsfrequenz aufweisen müssen (Worthley et al. 2007). Abhängig vom eingesetzten Panel sind somit 24 – 51 % der KRK als CIMP+ einzustufen (Samowitz et al. 2005; Toyota et al. 1999a; van Rijnsoever et al. 2002). Molekulargenetische Betrachtungen von CIMP+ zeigten weiterhin eine deutliche Assoziation mit dem Vorliegen einer *BRAF*-Mutation sowie dem Vorkommen von MSI-L und MSS in sporadischen KRK. Nachfolgende Betrachtungen zeigten darüber hinaus eine deutlich schlechtere Prognose für Karzinome mit CIMP+ in Verbindung mit MSI-L oder MSS gegenüber CIMP+ in Kombination mit MSI-H (Worthley et al. 2007). Zudem wird das MMR-Gen *hMLH1* in bösartigen

Neoplasien mit einem positiven CIMP-Status überdurchschnittlich häufig durch eine epigenetische Methylierung inaktiviert (Toyota et al. 1999a; Worthley et al. 2007). CIMP-negative Tumoren hingegen, welche sich durch eine geringere Methylierungsfrequenz o.g. *CpG-Islands* auszeichnen, entsprechen in ihrer Entwicklungstendenz eher Karzinomen mit CIN, bekannt aus dem Suppressor-Subtyp (Gyparaki et al. 2013; Worthley et al. 2007). Das übrige Genom, einschließlich nicht kodierender Intron-Sequenzen, liegt bei Krebspatienten interessanterweise häufig hypomethyliert vor (Bariol et al. 2003; Kondo und Issa 2004). Betrachtungen weiterer Arbeitsgruppen - zum Beispiel Weisenberger et al. (2006) oder Schulz et al. (2006) - beschreiben wiederum für gesunde Probanden im Vergleich mit Karzinompatienten eine gesteigerte CpG-Hypermethylierung in nicht-kodierenden, repetitiven Sequenzen der DNA. Die Promotorsequenzen liegen hingegen hier oft unmethyliert vor. Exemplarisch sind in diesem Zusammenhang die ALU- sowie die LINE1-Sequenzen anzuführen (Schwarzenbach et al. 2011; Worthley et al. 2007). Resultierend aus diesen Beobachtungen liegt in der Detektion epigenetischer Anomalien, beispielsweise mittels methylierungsspezifischer Real-Time-Polymerase Chain Reaction (PCR), ein breites diagnostisches und therapeutisches Potential. Außerhalb der Karzinogenese finden sich o.g. epigenetische Veränderungen jedoch auch im Rahmen benigner Läsionen oder bei nicht-malignen Entzündungsprozessen. Dieser Umstand limitiert den diagnostischen und therapeutischen Nutzen im Hinblick auf eine ausreichende Sensitivität und Spezifität dieses Testverfahrens (Summers et al. 2013; Worthley et al. 2007). Für den Einsatz eines potentiellen Biomarkers im Rahmen von Tumordiagnostik und stadienabhängiger Therapieevaluation sind somit Eigenschaften wie eine ausreichende Diskriminationsfähigkeit zwischen Gesunden und Kranken sowie die Möglichkeit zur eindeutigen Zuordnung zu einer spezifischen Tumorentität oder einem definierten Tumorstadium von entscheidender Bedeutung. Ein für das KRK in diesem Zusammenhang relevantes Gen ist exemplarisch neben dem *hMLH1* das Septin-9 Transmembranprotein-Gen (*SEPTIN9*), dessen Methylierungseigenschaften bereits in quantitativen diagnostischen Tests aus Blutplasma nachgewiesen werden können (Summers et al. 2013; Worthley et al. 2007). Jedoch auch weitere tumorspezifische Gensequenzen wie der Runt-Related Transcription Factor 3 (*RUNX3*), das Neurogenin-1 (*NEUROG1*), das Syndecan-2 Transmembranprotein-Gen (*SDC2*), der Helicase-like Transcriptional Factor (*HLTF*), das RAS-Association Domain Family 1 (*RASSF1A*) oder das Transmembrane Protein containing Epidermal Growth Factor and two Follistatin-like Domains 2 (*TMEFF2*) haben ein großes diagnostisches Potential in Bezug auf Tumorscreening und Therapie-Stratifizierung (Gyparaki et al. 2013; Kim et al. 2010). Eine abschließende Übersicht der unterschiedlichen Signalwege und deren Charakteristika ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Charakteristik differenter KRK-Signalwege nach Worthley et al. (2007).

Signalweg	MSI vs. CIMP-Status	Lokalisation	Prognose	CIN	BRAF-Mutation	hMLH1-Mutation	MGMT-Mutation
Mutator	MSI-H CIMP-	prox. Kolon	gut	nein	nein	nein	nein
Methylator/ Mutator	MSI-H CIMP+	prox. Kolon	gut	nein	ja	ja	nein
Methylator	nicht-MSI-H* CIMP+	prox. Kolon	schlecht	nein	ja	nein	nein
	MSI-L CIMP+	dist. Kolon/ Rektum	N/A	nein	nein (K-RAS ↑)	nein	ja
Suppressor	nicht-MSI-H* CIMP-	dist. Kolon/ Rektum	intermediär	ja	nein	nein	nein

* nicht-MSI-H entspricht MSI-L und/ oder MSS

I.2.3 Wachstum, Lokalisation und Metastasierungsverhalten

Kolorektale Karzinome entstehen häufig auf Grundlage von vorhandenen Dickdarmpolypen sowie prämaligen, adenomatösen Formationen. Makroskopisch ist der Großteil aller KRK daher distal der linken Kolonflexur lokalisiert. Genauer stellen das Rektum sowie die rektosigmoidale Übergangszone mit zusammen etwa 60 % die Hauptlokalisierung der KRK dar (Boecker et al. 2012). Es folgen mit einem Anteil von circa 20 % die isolierten Sigmakarzinome sowie mit einem Anteil von 10 % die Tumoren des Zökum und des Colon ascendens. Weitere 10 % der KRK verteilen sich auf die übrigen Darmabschnitte (Boecker et al. 2012). Untersuchungen der letzten Jahre bestätigen diese Verteilung und zeigen zudem eine Zunahme der rechtseitigen Darmtumoren mit steigendem Lebensalter (O'Connell et al. 2003; Staeber 2013; Tonus et al. 1996). Speziell das RK weist ein erhöhtes Risiko auf, Nachbarorgane wie die Blase, die Ureteren, die Prostata oder den Uterus zu infiltrieren (Gaedcke et al. 2011).

Aus molekulargenetischer Sicht treten außerdem Karzinome mit einer Mutation des APC-Gens vermehrt im Rektum auf (82 %). Kolonkarzinome (KK) lassen hingegen nur in 60 % der Fälle den Nachweis der o.g. Genveränderung zu (Worthley et al. 2007). Der MSI-H-Tumor als weiteres Beispiel einer genetischen Variation ist wiederum vermehrt bei Frauen im rechten proximalen Kolonabschnitt zu finden. Ein ausgeprägter Lymphknotenbefall und das Vorliegen weniger Fernmetastasen sind zudem Kennzeichen dieser

Tumorentität (Moran et al. 2010). Im Gegensatz zu MSI-H-Tumoren präsentieren sich MSI-L sowie MSS-assoziierte Tumoren (Suppressor-Typ) histopathologisch und anatomisch ähnlich (Laiho et al. 2002; Yearsley et al. 2006). Beide Entitäten sind vermehrt im distalen Kolon lokalisiert (Worthley et al. 2007).

Das Metastasierungsverhalten macht weiterhin eine differenzierte Betrachtung von KK und RK nötig. Für das Kolonkarzinom ist eine späte lymphogene Aussaat in mesenteriale Lymphknotenstationen entlang der großen Gefäße kennzeichnend. Für das Rektumkarzinom hingegen werden analog zur Einteilung in proximales, mittleres und distales Rektumdrittel unterschiedliche lokoregionäre Ausbreitungstendenzen beschrieben. Während die oberen RK sich vornehmlich nach kranial, also ebenfalls in die mesenterialen Lymphknoten (LK) ausbreiten, befallen die RK des mittleren Drittels zusätzlich die lateralen Beckenlymphknoten. Das lymphogene Ausbreitungsmuster der distalen RK umfasst neben den beiden erstgenannten Drainagewegen noch inguinale Lymphknotenstationen (Herold 2012). Die hämatogene Ausbreitung der KRK erfolgt primär über die Vena porta in die Leber und sekundär über die Vena cava in die Lunge (Herold 2012).

I.3 Klassifikation des kolorektalen Karzinoms nach TNM, UICC und Dukes

Für die Stadieneinteilung des KRK existieren mehrere Klassifikationen. Das Tumor-Node-Metastasis System (TNM) orientiert sich hierbei an der anatomischen Lokalisation des Primärtumors (T-Kategorie) sowie der lymphogenen (N-Kategorie) und hämatogenen Metastasierung (M-Kategorie) (Wittekind und Oberschmid 2010). Präfixe wie beispielsweise „u-“ oder „y-“ beschreiben zudem den Zeitpunkt und die Bedingungen der TNM-Klassifikation näher. Eine präinterventionelle, mittels apparativer Diagnostik erhobene Einteilung wird so zum Beispiel als „uTNM“ beschrieben. Ein „yTNM“ beschreibt wiederum die Einteilung nach neoadjuvanter Therapie und anschließender operativer Tumorintervention (Wittekind und Meyer 2010). Durch die Generierung TNM-abhängiger Stadien wurde zudem durch die UICC eine klinische Vergleichbarkeit hergestellt. Ein drittes Klassifikationsschema beschreibt die Einteilung nach Dukes. Die Zuordnung eines mittels klinischer sowie apparativer Diagnostik erhobenen KRK-Befundes zu den einzelnen Klassifikationen wird als Staging bezeichnet. Die Abschätzung des Malignitätsgrades anhand einer histologischen Gewebeanalyse wird als Grading bezeichnet (Wittekind und Oberschmid 2010).

I.3.1 TNM-Klassifikation des KRK

Tabelle 2: TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms nach UICC 2010 (Sobin und Wittekind 2002; Tannapfel und Wittekind 2010; Wittekind und Meyer 2010).

Tumorlokalisation und Ausdehnung des Primärtumors (T-Kategorie)	
T0	kein Anhalt für Primärtumor
Tis	<u>Carcinoma in situ</u> : entspricht intraepithelialer Infiltration der Basalmembran sowie Infiltration der Lamina propria ohne Beteiligung der Lamina muscularis mucosae und der Tunica submucosa
T1	Infiltration der Tunica submucosa
T2	Infiltration der Tunica muscularis propria
T3	Durchbruch der Tunica muscularis propria und Infiltration der Tunica subserosa oder Infiltration von nicht peritonealisiertem, perikolischem oder perirektalem Gewebe
T4	Infiltration von Nachbarorganen/ Strukturen einschließlich anderer kolorektaler Segmente über die Serosa und/oder Perforation des Peritoneum
TX	Beurteilung des Primärtumors nicht möglich
Regionäre Lymphknoten (N-Kategorie) (Biopsie aus mind. 12 LK)	
N0	kein Anhalt für Lymphknotenbefall
N1	1-3 regionär befallene Lymphknoten
	N1c) Tumordeposit (TD) : makroskopische oder mikroskopische Tumorknötchen im perikolischen oder perirektalen Fettgewebe*/**
N2	4 oder mehr regionär befallene Lymphknoten
NX	Lymphknotenbefall nicht beurteilbar
Fernmetastasen (M-Kategorie)	
M0	Kein Anhalt für Fernmetastasen
M1	M1a) Fernmetastasen in einem Organ
	M1b) Fernmetastasen in mehr als einem Organ oder des Peritoneums
MX	Beurteilung von Fernmetastasen nicht möglich
<p>* TD histologisch ohne Anhalt auf lymphatisches Gewebe und fehlende mikroskopische (V1) oder makroskopische (V2) Veneninfiltration wird als N1c gewertet.</p> <p>** Wenn TD einem vollständig durchsetzten LK entspricht oder V1/V2 vorliegt, ist TD als eigenständige Lymphknotenmetastase zu werten.</p>	

I.3.2 UICC-Stadien und Dukes-Klassifikation des KRK

Die Stadieneinteilung der UICC erlaubt es, die einzelnen Bestandteile der TNM-Klassifikation in ihrer Gesamtheit zu beurteilen. Anhand der Patientengruppierung in die jeweiligen Stadien ist eine direktere Risikostratifizierung sowie Prognoseabschätzung für den einzelnen KRK-Patienten möglich. Dies erleichtert nachhaltig die Therapieentscheidung und die Wahl eines geeigneten Behandlungsansatzes (Wittekind und Oberschmid 2010). Eine nochmalige Subsummierung der Stadien anhand des lymphogenen sowie hämatogenen Metastasierungsverhaltens liefert wiederum die Dukes-Einteilung (Sobin und Wittekind 2002; Wittekind und Meyer 2010). Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der dargestellten Zusammenhänge.

Tabelle 3: Stadieneinteilung des KRK nach UICC und Dukes (Sobin und Wittekind 2002; Tannapfel und Wittekind 2010; Wittekind und Meyer 2010).

Stadium	Unterkategorie	T	N	M	Dukes
0	-	Tis	N0	M0	-
I	A	T1	N0	M0	A
	B	T2	N0	M0	
II	A	T3	N0	M0	B
	B	T4	N0	M0	
III	A	T1, T2	N1	M0	C
	B	T3, T4	N1	M0	
	C	jedes T	N2	M0	
IV	-	jedes T	jedes N	M1	D

I.3.3 Grading

Im Rahmen des Grading wird dem KRK nach histologischer Begutachtung ein Malignitätsgrad zugeordnet. Grundlage hierfür sind die Differenzierungseigenschaften der einzelnen Tumorzellen eines Biopsats. Gut differenzierte Tumorzellverbände entwickeln sich langsamer als schlecht differenzierte, was in letztgenannten Karzinomzellen ein aggressiveres Proliferationspotential bedingt. Diese Eigenschaft hat unmittelbare Auswirkungen auf die Prognose (Tabelle 4).

Tabelle 4: Grading (Wittekind und Oberschmid 2010).

Grad	Differenzierung
G1	Gut differenzierte Tumorzellen
G2	Mäßig differenzierte Tumorzellen
G3	Schlecht differenzierte Tumorzellen
G4	Undifferenzierte Tumorzellen
GX	Keine Beurteilung des Differenzierungsgrades möglich

I.4 Symptomatik und diagnostisches Vorgehen

Das kolorektale Karzinom ist durch einen über lange Zeit bestehenden asymptomatischen Krankheitsverlauf sowie das Fehlen klassischer Frühsymptome gekennzeichnet (Eickhoff und Riemann 2000). Bei Verzicht auf die Anwendung etablierter Früherkennungsverfahren, wie beispielsweise die Vorsorgekoloskopie, erfolgt die Diagnosestellung somit nicht selten erst in fortgeschrittenen Krankheitsstadien. Das klinische Leitsymptom des KRK ist die okkulte Blutbeimengung im Stuhl. Mit einer Prävalenz von bis zu 77 % ist es das häufigste Symptom, gefolgt von makroskopisch sichtbaren rektalen Blutungen bei Rektumkarzinomen (58%) oder einer plötzlichen Änderung der Stuhlgewohnheiten (51%) (Majumdar et al. 1999; Staeber 2013). Weitere assoziierbare Symptome sind abdominelle Schmerzen, ein anhaltendes Druck- oder Völlegefühl sowie übel riechende Flatulenzen. In fortgeschrittenen Stadien kommt es aufgrund möglicher Tumorstenosen zudem zum Auftreten paradoxer Diarrhoen, Tenesmen sowie spontaner Stuhlabgänge (Majumdar et al. 1999; Staeber 2013). Neben diesen lokalisierten Symptomen sind auch allgemeine Krankheitszeichen charakteristisch für ein KRK. Häufig leiden die Patienten unter einer deutlichen Leistungsminderung sowie einer ausgeprägten Tumoranämie. Weiterhin typisch sind Gewichtsverlust bis hin zur Tumorkachexie, Fieber und Nachtschweiß im Rahmen der B-Symptomatik (Eickhoff und Riemann 2000). Infolge einer Fernmetastasierung in die Leber kann ein Ikterus resultieren. Absiedlungen in der Lunge führen häufig zu akutem Husten und Dyspnoe.

Besteht der Verdacht auf ein Kolon- oder Rektumkarzinom stützt sich die präoperative Diagnostik nach den aktuellen S3-Leitlinien hauptsächlich auf die Durchführung einer kompletten Koloskopie des Dickdarms einschließlich einer Intubation der Bauhin'schen Klappe sowie die bioptische Gewebeentnahme (Pox und Schmiegel 2013). Ergänzend erfolgt obligatorisch die Durchführung einer digital-rektalen Untersuchung (DRU). Mittels der Spiegelung von Rektum und Kolon ist eine Aussage zur Lokalisation und Ausdehnung des Primarius möglich (T-Stadium). Aus der Biopsie erfolgt weiterhin die histologische Differenzierung im Rahmen des Gradings. Ist bei Vorliegen einer ausgeprägten Darmste-

nose eine direkte Endoskopie nicht möglich, so empfiehlt sich alternativ der Einsatz einer virtuellen Koloskopie auf Grundlage von Computertomografie (CT) oder Magnetresonanztomografie (MRT). Die starre Rektoskopie, ein MRT oder CT des Beckens sowie eine rektale Endosonografie sind dem diagnostischen Vorgehen bei Verdacht auf ein Rektumkarzinom vorbehalten (Gaedcke et al. 2011; Pox und Schmiegel 2013). Speziell die Endosonografie weist hier für die Detektion rektaler T1-Frühestadien sowie die Differenzierung zwischen T2 und T3 im Vergleich zu MRT und CT die höchste Genauigkeit auf (Bipat et al. 2004; Puli et al. 2009). Eine DRU zur möglichen Palpation des Tumors sowie zur Einschätzung des Sphinktertonus ist auch für das RK obligat. Hierdurch können etwa 30-40 % aller Rektumkarzinome klinisch detektiert werden (Gaedcke et al. 2011; Pox und Schmiegel 2013). Da kolorektale Karzinome zum Zeitpunkt der Erstdiagnose in etwa 25 % der Fälle bereits in einem metastasierten Stadium vorliegen, kommt speziell der Ausbreitungsdiagnostik eine große Bedeutung zu (Pox und Schmiegel 2013). Im Zuge dessen ist die Durchführung einer Abdomensonografie mit oder ohne Kontrastmittel zum Ausschluss einer hepatischen Filialisierung indiziert (Pox und Schmiegel 2013). In Studien wird die Sensitivität der Abdomensonografie für die Detektion von Lebermetastasen mit bis zu 86 % und die Spezifität mit 98 % angegeben (Floriani et al. 2010; Mainenti et al. 2010; Quaia et al. 2006; Rafaelsen und Jakobsen 2011). Weiterhin empfiehlt sich bei Verdacht auf eine Primärabsiedlung die Anwendung einer CT- oder MRT-Untersuchung. Mit Sensitivitäten von 93-97 % und Spezifitäten von 95-96 % ist hierbei das CT dem MRT (Sensitivität: 80-88 %, Spezifität 74- 84 %) vorzuziehen (Floriani et al. 2010; Nickel et al. 2010; Quaia et al. 2006; Rafaelsen und Jakobsen 2011). Für den Nachweis möglicher pulmonaler Metastasen ist eine Röntgen-Thorax Aufnahme oder ein CT-Thorax Mittel der Wahl (Pox und Schmiegel 2013). Zur Prognoseevaluation und Rezidivdiagnostik ist zudem die präoperative Bestimmung des Carcinoembryonalen Antigens (CEA) im Blut für beide Entitäten unabdingbar (Fong et al. 1999; Pox und Schmiegel 2013). Insgesamt unbefriedigend ist die Aussagekraft sämtlicher o.g. diagnostischer Verfahren zudem im Bezug auf die Detektion tumorinfiltrierter lokoregionaler Lymphknoten (N-Stadium). Hier werden, unabhängig von der Methode, lediglich Sensitivitäten von 55-73 % und Spezifitäten von 74-78 % erreicht (Bipat et al. 2004; Dighe et al. 2010; Puli et al. 2009). Die Anwendung anderer diagnostischer Methoden wie beispielsweise die Positronen-Emissions-Tomografie (PET) oder eine PET-CT sind lediglich der postoperativen Kontrolle des Resektionsstatus vorbehalten (Pox und Schmiegel 2013). In Zusammenschau aller diagnostischen Befunde sollte - im Rahmen einer interdisziplinären Tumorkonferenz - ein individueller, stadienabhängiger Therapieansatz für den Patienten erarbeitet werden (Pox und Schmiegel 2013).

I.5 Darmkrebsvorsorge und Früherkennung

Mit dem Ziel potentielle Rektum- und Kolonkarzinome möglichst in asymptomatischen Stadien, also bereits als präkanzeröse Läsionen oder als karzinomatöse Frühformen (pT1) zu detektieren, konnte in den vergangenen Jahren ein umfangreiches Früherkennungskonzept etabliert werden. Ein stetiger Rückgang von Mortalität und Inzidenz sind ein wesentliches Resultat dieser Entwicklung (Atkin et al. 2010; Hewitson et al. 2007; Kahi et al. 2009; Winawer et al. 1993; Zauber et al. 2012). Das Vorsorgekonzept umfasst neben primärpräventiven Empfehlungen wie beispielsweise Gewichtsreduktion, Alkohol- und Nikotinverzicht oder Ernährungsumstellung die Anwendung frühinterventioneller Stuhltests und endoskopischer Verfahren. Seit Oktober 2002 ist die Darmkrebsvorsorge eine Regelleistung der gesetzlichen Krankenkassen und als solche für jeden Versicherten ab dem 50. Lebensjahr beanspruchbar (Kolligs 2012; Pox und Schmiegel 2013). Im Detail wird bei fehlender familiärer Prädisposition die jährliche Durchführung eines fäkal-okkulten Bluttests (FOBT) oder alternativ eines fäkal-immunologischen Tests (FIT) zwischen dem 50. und 54. Lebensjahr empfohlen. Mit Erreichen des 55. Lebensjahres ist eine Spiegelung des kompletten Dickdarms in Verbindung mit einer DRU indiziert. Resultiert aus der Koloskopie ein unauffälliger Befund, sollte diese Untersuchung im Intervall von zehn Jahren wiederholt werden, da für die Progression eines KRK aus einem Adenom ein Zeitraum von zehn bis fünfzehn Jahren angenommen wird (Kolligs 2012). Bestehen wiederum Kontraindikationen für eine komplette Darmspiegelung oder wird sie abgelehnt, ist alternativ eine Sigmoidoskopie in Kombination mit einem FOBT im Abstand von 5 Jahren oder eine jährliche Kontrolle mittels alleinigem FOBT durchzuführen. Liefert der Stuhltest ein positives Testergebnis, sollte der Befund durch eine vollständige Koloskopie gesichert werden (Pox et al. 2013).

Nach heutiger Ansicht besteht für die Durchführbarkeit der beschriebenen Vorsorgemaßnahmen keine obere Altersgrenze (Pox und Schmiegel 2013). Vielmehr zeigen Studien, dass die Karzinominzidenz mit steigendem Alter weiter zunimmt, die Endoskopie im Gegenzug aber kein erhöhtes Risiko für ältere Menschen darstellt (Kirchgatterer et al. 2002; Stevens und Burke 2003). Die Betrachtung der 5-Jahres-Überlebensraten von KRK-Patienten über 74 Jahren und Patienten zwischen 50 und 75 Jahren zeigten vergleichbare Daten, so dass der potentielle Nutzen einer Vorsorgeuntersuchung durchaus auch im höheren Alter bestehen bleibt (Zhang et al. 2000). Bei der Entscheidung für oder gegen ein Screening sollten vielmehr individuelle Gesichtspunkte und das biologische Alter der Person berücksichtigt werden (Pox und Schmiegel 2013).

I.5.1 Endoskopische Verfahren

Die komplette Koloskopie ist - analog dem präoperativen diagnostischen Vorgehen - auch für das Darmkrebsvorsorgeprogramm innerhalb der asymptomatischen Bevölkerung der Goldstandard. Dieses Verfahren ist aufgrund der vollständigen Darstellbarkeit des gesamten Kolons sowie der Möglichkeit zur zeitgleichen therapeutischen Polypektomie verdächtiger Läsionen anderen diagnostischen Anwendungen überlegen (Imperiale et al. 2000; Kolligs 2012; Pox et al. 2012; Pox und Schmiegel 2013). Für die ersten acht Jahre nach Beginn des Screeningprogramms ermittelte Brenner et al. (2010), dass mittels Koloskopie und Polypektomie insgesamt etwa 300000 fortgeschrittene Adenome detektiert und eliminiert werden konnten. Weiterhin wurden den Hochrechnungen zufolge circa 50000 KRK in asymptomatischen Stadien diagnostiziert und damit einer frühen therapeutischen Intervention zugänglich gemacht (Brenner et al. 2010). Mit Hilfe der Vorsorgekoloskopie konnten schätzungsweise etwa 100000 invasive Darm- und Rektumkarzinome in der Altersgruppe zwischen 55 – 84 Jahren verhindert werden (Brenner et al. 2010). Eine aktuelle Studie von Zauber et al. (2012) ermittelte überdies für die Kombination aus Koloskopie und Polypektomie eine Reduktion des Darmkrebsrisikos um 53 %. In den Händen erfahrener Untersucher weist die Darmspiegelung außerdem eine sehr geringe Komplikationsrate auf (Kolligs et al. 2011). Dennoch ist bis heute eine mangelnde Compliance in großen Teilen der Bevölkerung feststellbar, was am ehesten der unangenehmen wie gleichfalls belastenden Untersuchungsvorbereitung sowie dem intimen Charakter des Verfahrens geschuldet ist. Da kein anderes Diagnostikum ähnliche Vorteile in der Detektion und Sofortintervention besagter Vorläuferläsionen eines KRK in Verbindung mit einer signifikanten Inzidenz- und Mortalitätssenkung bietet, fehlen bei Ablehnung einer Darmspiegelung adäquate Alternativen. Noch am ehesten erreicht hier die virtuelle CT-Kolonographie vergleichbare Daten, ist aber aufgrund bestehender Strahlenschutzrichtlinien für die Früherkennung nicht beziehungsweise nur in Ausnahmefällen zugelassen (Kolligs 2012; Pox und Schmiegel 2013). Ein weiteres endoskopisches Verfahren, welches nach Studienlage ebenfalls eine signifikante Inzidenz- und Mortalitätsminderung, jedoch nur für distale Karzinome erreicht, ist die Sigmoidoskopie (Atkin et al. 2010). Bei vergleichbarem Risikoprofil ist der Hauptnachteil dieser Methode gegenüber der kompletten Koloskopie die fehlende Darstellbarkeit proximaler Kolonabschnitte. Da etwa ein Drittel der durch Screeningkoloskopie nachgewiesenen Karzinome proximal der linken Kolonflexur lokalisiert ist und darüber hinaus über die Hälfte der Tumoren ohne distale Zweitläsionen auskommen, sind sie folglich einer Sigmoidoskopie nicht zugänglich (Imperiale et al. 2000; Pox et al. 2012). Die Anwendung dieses Verfahrens sollte somit immer in Kombination mit einem Stuhltest erfolgen, um die bestehende Detektionslücke zu schließen (Kato et al. 2009; Pox und Schmiegel 2013).

I.5.2 Konventionelle Stuhltests

Als Bestandteil der Darmkrebsvorsorge ist die Testung auf okkultes Blut im Stuhl ein probates Diagnostikum (Kolligs 2012; Pox und Schmiegel 2013). Die Basis für diese Testform bildet hierbei die Eigenschaft eines KRK, intermittierend zu bluten. Mittels des so genannten fäkal-okkulten Bluttests (FOBT) oder des fäkal-immunochemischen Tests (FIT) ist der Nachweis eben dieser Hämorrhagien möglich. Das Funktionsprinzip des FOBT basiert auf einer chemischen Oxidationsreaktion. Hierbei wird ein guajakbehandeltes Filterpapier mit einer Stuhlprobe versehen. Nach anschließender Benetzung dieser Verbindung mit einer Wasserstoffperoxidlösung kommt es zur Oxidation der Guajakonsäure und einem Farbwechsel von weiß zu blau. Diese Reaktion wird durch die Pseudoperoxidaseaktivität des Hämoglobins enzymatisch katalysiert (Greegor 1971; Kolligs 2012). Verschiedene Studien schreiben dem FOBT bei mindestens dreifacher Wiederholung eine Senkung der karzinombedingten Mortalität von 15-33 % zu (Hardcastle et al. 1996; Hewitson et al. 2007; Hewitson et al. 2008; Kronborg et al. 1996). Die Sensitivität für das Auffinden von Karzinomen und Adenomen ist mit 26-35 % beziehungsweise 15 % jedoch den endoskopischen Verfahren unterlegen (Brenner und Tao 2013; Hewitson et al. 2008; Hol et al. 2010; Kolligs 2012; Pox 2011). Ein entscheidender Nachteil des Tests ist zudem seine Störanfälligkeit gegenüber Nahrungseinflüssen. Dementsprechend kann eine fleischreiche Ernährung durch die Anwesenheit von tierischem Hämoglobin oder Myoglobin zu falsch-positiven Ergebnissen führen (Pox 2011; Pox und Schmiegel 2013). Der entscheidende Vorteil dieses Verfahrens liegt jedoch in der kostengünstigen sowie schnellen Durchführbarkeit (Kolligs 2012).

Ein direkter immunologischer Antikörpernachweis gegen humanes Hämoglobin gelingt mittels des FIT (Pox 2011). Somit ist dieser Test nahrungsunabhängig. In einer Studie von Hundt et al. (2009) konnten für FIT und FOBT ähnliche Sensitivitäten für die Detektion fortgeschrittener Adenome ermittelt werden. Die Spezifität des FIT jedoch lag mit 97 % über der des FOBT (93 %) (Hundt et al. 2009). Neuere Studien der letzten Jahre zeigten hingegen sowohl für die Detektion von Karzinomen als auch für fortgeschrittene Adenome eine Überlegenheit des FIT gegenüber dem FOBT (Brenner und Tao 2013; Hol et al. 2010; van Rossum et al. 2011; Zhu et al. 2010). Aufgrund der noch unzureichenden prospektiven Datenlage wird der vermeintlich leistungsstärkere FIT derzeit jedoch ausschließlich in den europäischen Leitlinien empfohlen (Kolligs 2012). Ein entscheidender Nachteil beider Verfahren besteht in der Tatsache, dass einem positiven Testergebnis stets eine Tumorblutung vorausgehen muss. Dies hat zur Folge, dass weniger blutende Karzinome tendenziell der Detektion entgehen (Kolligs 2012).

I.5.3 Genetische und epigenetische Stuhltests

Genetische Screeningverfahren nutzen anders als konventionelle Tests die kontinuierliche Freisetzung von Tumorzell-DNA aus dem Karzinom. Neben den malignen Zellverbänden geben überdies auch gesunde Schleimhautzellen im Rahmen ihrer Apoptose dauerhaft DNA in den Darm ab. Diese Ansammlungen aus zirkulierender zellfreier DNA (cfDNA) kann nachfolgend aus der Fäzes isoliert werden. Anhand dieser aufgereinigten DNA ist eine detaillierte Analyse tumorspezifischer, genetischer und epigenetischer Veränderungen möglich (Schwarzenbach et al. 2011). Dies bildet die Grundlage für die Durchführung geeigneter Mutationsanalysen sowie sensitiver, methylierungsspezifischer Tests aus Stuhlproben (Ahlquist et al. 2000; Imperiale et al. 2014; Robertson und Dominitz 2014; Traverso et al. 2002). Mit dem Nachweis der tumorspezifischen Mutation des *APC*-Gens in der cfDNA erreichten Traverso et al. (2002) eine Sensitivität von etwa 57 % sowie eine Spezifität von nahezu 100 % für das Auffinden kolorektaler Neoplasien. Weitere Analysen fassten mit der Absicht einer signifikanten Sensitivitätssteigerung unterschiedliche tumorassoziierte Gene in Mutationskomplexen, den so genannten *Multitarget Assays*, (Ahlquist et al. 2000, S.1220) zusammen (Ahlquist et al. 2000; Imperiale et al. 2004; Tagore et al. 2003). Trotz dieser Neuerung wurden in diesen Studien ähnlich schlechte Detektionsraten für das KRK von etwa 45 % bis allenfalls 65 % erreicht (Imperiale et al. 2004; Tagore et al. 2003). Analog dazu lagen in diesen Arbeiten die Sensitivitäten für das Auffinden von Vorläuferläsionen um 40 %. Lediglich Ahlquist et al. (2000) konnten in ihren Untersuchungen mittels *Multitarget Assay* Sensitivitäten von 91 % und 83 % sowie Spezifitäten von 93 % für das Auffinden von KRK und Adenomen erreichen.

Die Gene Vimentin (*VIM*), Secreted Frizzled-related Protein 2 (*SFRP2*), Integrin Alpha 4 (*ITGA4*), N-myc Downstream-regulated Gene 4 (*NGFR*) sowie das bereits erwähnte *MGMT* sind wiederum Beispiele für eine tumorassoziierte Promotorhypermethylierung im Rahmen der Karzinomentstehung und kommen als potentielle epigenetische Stuhl-Screeningmarker für die Darmkrebsvorsorge infrage. Studien zeigten für diese Marker im Einzelnen zwar Sensitivitäten von 65-86 % und Spezifitäten von 80-100 % für die Tumordetektion sowie Detektionsraten für Adenome von 48-69 %, jedoch entspricht auch das nicht den Erwartungen an einen zuverlässigen Screeningmarker, dessen Anwendung eine ernstzunehmende Alternative gegenüber endoskopischen Verfahren darstellt (Ausch et al. 2009; Melotte et al. 2009; Muller et al. 2004; Petko et al. 2005; Shirahata et al. 2009). Vielversprechender ist in diesem Zusammenhang erneut die Generierung epigenetischer Markerpanel aus bis zu sechs Genen. Hier erreichten Studien kombinierte Sensitivitäten von 87-94 % für Karzinome sowie 82-93 % für Adenome bei Spezifitäten zwischen 93-98 % (Ahlquist et al. 2012; Lind et al. 2011). Weitere Studien zeigten außerdem, dass molekulargenetische Tests dem konventionellen FOBT sowie dem FIT in ihrer Aussagekraft

überlegen sind (Ahlquist et al. 2008; Imperiale et al. 2014; Imperiale et al. 2004; Robertson und Dominitz 2014). Dennoch wird derzeit der Einsatz dieser Testverfahren, aufgrund der noch unzureichenden Datenlage sowie den schwankenden Effizienzen im Rahmen des Darmkrebsscreenings, nicht empfohlen (Pox und Schmiegel 2013).

I.6 Biomarker im peripheren Blut

I.6.1 Konventionelle Blutmarker

Wie bereits in Punkt 1.4 erwähnt, konnte das Glykoprotein *CEA* als Verlaufsparmeter für das KRK etablieren werden (Pox und Schmiegel 2013). *CEA*-Erhöhungen sind in 70 % aller KRK-Erstdiagnosepatienten detektierbar, werden jedoch auch im Zuge anderer nicht-maligner Ursachen, wie beispielsweise durch eine Pankreatitis, durch CED oder durch verstärkten Zigarettenkonsum, hervorgerufen (Young et al. 2014). Da außerdem auch andere Tumorentitäten - wie beispielsweise Magen-, Bronchial- oder Mammakarzinome - einen Anstieg des *CEA* bedingen können, ist dieser Marker als Screeningparameter für die Darmkrebsvorsorge ungeeignet (Chen et al. 2010). Für das Therapiemonitoring sowie die Rezidivdiagnostik eines KRK ist das *CEA* jedoch von großer Bedeutung. In diesem Zusammenhang beschreibt eine Metaanalyse von Tan et al. (2009) eine erfolgreiche Detektion eines Lokalrezidivs mittels *CEA* in 64 % der Fälle bei einer Spezifität von 90 %. Sowohl für den genannten Detektor als auch für weitere Marker wie das CA 19-9 und das CA 242 zeigte zudem eine Studie von Levy et al. (2008) signifikante Unterschiede in der entsprechenden Serumkonzentration zwischen nicht metastasierten (I, II, III) und metastasierten (IV) Tumorstadien. Hingegen ist eine zuverlässige Diskrimination zwischen den UICC Stadien II und III durch keinen der getesteten Marker erreicht worden (Levy et al. 2008). Trotz einer weiteren Studie von Chen et al. (2008), in der eine Kombination von *CEA* und CA 19-9 einen besseren Prognosefaktor darstellte, wird in den aktuellen S3-Leitlinien auf die zusätzliche Bestimmung eines weiteren Markers verzichtet (Pox und Schmiegel 2013). Im Rahmen der Tumornachsorge sollte die *CEA*-Untersuchung durch radiologische Verfahren erweitert werden, um das Auftreten von Metastasen mit einer höheren Sensitivität erkennen zu können (Young et al. 2014).

I.6.2 Genetische und epigenetische Blutmarker

Genetische und epigenetische Bluttests basieren, analog zur Stuhldiagnostik, auf der Detektion von Tumor-DNA im Serum und Plasma. Bedingt durch die starke Vaskularisation von Tumorzellverbänden, wird durch vermehrte Apoptose und aktive Sezernierung kontinuierlich cfDNA in die Blutbahn abgegeben. Die Detektion entsprechender Mutationen oder Promotormethylierungen in diesen DNA-Strukturen stellt hierbei ein potentiell Ziel der

Früherkennung sowie prä- und postoperativen Diagnostik dar (Kolligs 2012; Schwarzenbach et al. 2011). Vielversprechende genetische Veränderungen - und damit Inhalt diverser Studien - sind hierbei vor allem die Mutationen von *K-RAS*, *APC* oder *p53*. In einer Studie an 104 Patienten ergaben sich für die genannten Gene Einzeldetektionsraten von 30-35 % mit einer Spezifität von 100% (Wang et al. 2004). Zudem wurde in dieser Arbeit eine signifikante Korrelation der detektierten Mutationen mit dem Auftreten von regionären Lymphknotenmetastasen festgestellt. Andere Autoren heben speziell den Nachweis der *K-RAS*-Mutation in cfDNA als einen wichtigen Marker für die Verlaufskontrolle, Rezidivdiagnostik und postoperativen Prognoseevaluation hervor (Lecomte et al. 2002; Lefebure et al. 2010; Ryan et al. 2003; Trevisiol et al. 2006). In den aufgeführten Studien gelang der Einzelnachweis genannter Mutationen aus dem Blut in 36-41 % der untersuchten Patienten (Ryan et al. 2003; Trevisiol et al. 2006). Eine deutliche Sensitivitätssteigerung auf 48-70 % wurde zudem durch den kombinierten Nachweis der *K-RAS*-Mutation mit einem epigenetischen Marker (*RASSF2A*, *p16*) erreicht (Lecomte et al. 2002; Lefebure et al. 2010). Den letztgenannten methylierungsspezifischen Biomarkern wird derzeit für die Detektion von KRK sowie Darmkrebsvorstufen ein großes Potential zugesprochen. Studien der vergangenen Jahre zeigten zum Teil Nachweisraten entsprechender tumorassoziierter Promotor-Hypermethylierungen diverser Gensequenzen von 50-87 % im Serum oder Plasma von KRK-Patienten (deVos et al. 2009; Grutzmann et al. 2008; Herbst et al. 2011; Lofton-Day et al. 2008; Oh et al. 2013; Tan et al. 2007). In diesen Studien sind vor allem die Promotor-Regionen der Gene *SEPTIN9*, *RUNX3*, *NEUROG1*, *TMEFF2*, *HLTF* sowie *SDC2* für die Früherkennung des KRK, als sensitive Serum- oder Plasmamarker, identifiziert worden. In diesen Arbeiten wurden die genannten Gene zudem als Marker für die peri- und postoperative Verlaufskontrolle vielversprechend eingesetzt. In den dargestellten Arbeiten wurde darüber hinaus das *RASSF1A*-Gen als weiterer epigenetischer Biomarker des KRK diskutiert. Eine Steigerung der Sensitivität kann zudem, wie bereits in 1.2.2 erwähnt, durch Untersuchungen an epigenetische Alterationen in einem Panel (z.B. CIMP) erreicht werden. In den meisten Studien ging einer PCR-basierten Methylierungsanalyse eine Bisulfitbehandlung voraus. Im Rahmen dieses Verfahrens erfolgt im DNA-Extrakt der Austausch aller unmethyliert vorliegenden Cytosin-Basen durch Uracil. Hingegen bleibt methyliertes Cytosin in den *CpG-Islands* von der Umwandlung unbeeinflusst. Durch Verwendung spezifischer Primer und Sonden können somit CpG-reiche, methylierte Genregionen in einer PCR amplifiziert werden (Frommer et al. 1992; Tewari et al. 2013).

RUNX3 (Runt-Related Transcriptional Factor 3)

Das auf Chromosom 1p36 lokalisierte Tumorsuppressorgen *RUNX3* kodiert einen Transkriptionsfaktorkomplex, bestehend aus einem Heterodimer des Proteins und einer Beta-Untereinheit. Dieser TF hat die Fähigkeit, direkt an DNA-Promotorsequenzen zu binden und damit die Transkription aktiv zu regulieren. Im Zuge einer tumorbedingten Hypermethylierung kommt es zur Inaktivierung von *RUNX3* und damit zu einer Proliferationssteigerung der Darm- oder Rektumkarzinomzellen (NCBI 2014e). Darüber hinaus ist *RUNX3*, aufgrund seines zentralen Wirkmechanismus als TSG, in die Karzinogenese zahlreicher weiterer Tumorformen involviert. So wird *RUNX3* beispielsweise als Marker für Prostata-, Mamma-, Magen-, Bronchial-, Blasen- und Nierenzellkarzinome sowie für hepatozelluläre Karzinome diskutiert (Bai et al. 2013; Chen et al. 2013; Cheng et al. 2013; Kim et al. 2004; Lee et al. 2013b; Tan et al. 2007; Wongpaiboonwattana et al. 2013). Zudem scheint das Chemotherapeutikum Vincristin - in der Behandlung von KHK eingesetzt - demethylierend auf den Promotor des *RUNX3* zu wirken (Moon et al. 2014a). Darüber hinaus wird, aufgrund einer methylierungsbedingten Inaktivierung des *RUNX3*-Transkriptionsfaktors in Pankreaskarzinomen, eine Resistenz gegen Gemcitabin diskutiert (Horiguchi et al. 2013). In Studien von Tan et al. (2007), Nishio (2010) und Herbst et al. (2011) wurden Hypermethylierungen des *RUNX3* bei 29-65 % der KHK Patienten sowie Spezifitäten von 86-100 % nachgewiesen. Zudem ließ sich die Sensitivität des *RUNX3*-Tests durch die zusätzliche Untersuchung von *RASSF1A*, *p16* und *CDH1* auf 82 % erhöhen (Tan et al. 2007). Andere Studien untersuchten primär die Methylierungsrate von *RUNX3* aus Tumorsektaten und konnten hier Sensitivitäten zwischen 39-67 % bei Spezifitäten von bis zu 81 % erreichen (Imamura et al. 2005; Moon et al. 2014a; Nishio et al. 2010). Eine andere Arbeit von Subramaniam et al. (2009) verdeutlichte zudem den potentiellen Stellenwert von *RUNX3* als Screeningmarker.

NEUROG1 (Neurogenin 1)

Als Mitglied der Neurogenin-Superfamilie kodiert das auf Chromosom 5q21-q31 gelegene Neurogenin 1-Gen (*NEUROG1*) einen Transkriptionsfaktor des Nervensystems, welcher maßgeblich an der Regulation der neuronalen Differenzierung beteiligt ist (NCBI 2014g). Durch den Einfluss des *NEUROG1* auf die bahnende sowie hemmende Wirkung der Neurotransmitter Glutamat und GABA wird die Entstehung psychiatrischer Krankheiten - wie beispielsweise der Schizophrenie - begünstigt (Aguado-Llera et al. 2010; Fanous et al. 2007; Ho et al. 2008; Rahmig 2012). Außerdem scheint eine Assoziation des Gens mit dem Morbus Möbius, einer kongenitalen okulofazialen Parese, wahrscheinlich (Schroder et al. 2013). In einer Untersuchung von Herbst et al. (2011) konnte *NEUROG1* als potentieller Serum-Screeningmarker für sporadische KHK identifiziert werden. Unabhängig vom UICC-

Tumorstadium zeigte die Studie bei 91,1 % Spezifität eine Sensitivität von 61 % für die Detektion von Hypermethylierungen des *NEUROG1*-Promotors (Herbst et al. 2011). Eine zweite Studie von Han et al. (2013) beschreibt für *NEUROG1* als Bestandteil eines CIMP-Markerpanels einen prognostischen Stellenwert im Bezug auf das Outcome von Patienten nach adjuvanter 5-Fluorouracil-Leukovorin-Oxaliplatin-Therapie (FOLFOX). Patienten mit CIMP-positiven Tumoren, d.h. Hypermethylierungen von *NEUROG1*- und *p16*, zeigten nach 3 Jahren eine signifikant niedrigere krankheitsfreie Überlebensrate als CIMP-negative Tumoren ohne die genannten Promotormethylierungen (Han et al. 2013).

HLTF (Helicase-like Transcriptional Factor)

HLTF - auf Chromosom 3q25.1-q26.1 - ist ein Tumorsuppressorgen (TSG) und kodiert einen Transkriptionsfaktor. *HLTF* gehört der SWI/SNF-Familie an, die eine Zusammenfassung Chromatin-modulatorischer Proteine darstellt. Das *HLTF*-Genprodukt zeichnet sich durch eine direkte Helicase-, ATPase- und Ligase-Aktivität aus und ist an DNA-Reparatur- sowie Apoptoseprozessen beteiligt (Cho et al. 2011; MacKay et al. 2009; NCBI 2014d). Für das hypopharyngeale Plattenepithelkarzinom stellt *HLTF* einen potentiell aussagekräftigen Rezidiv-und Prognosemarker dar (Capouillez et al. 2009). Sandhu et al. (2012) zeigten in einem Tierversuch an Knockout-Mäusen, dass die epigenetische Inaktivierung von *HLTF* die Adenom-Karzinom-Transformation begünstigt. Damit bestätigte die Studie die Bedeutung von *HLTF* als Biomarker für das KRK (Sandhu et al. 2012). Moinova et al. (2002) stellten in ihrer Arbeit kolorektale Tumorzelllinien und Tumorgeweberesektate gegenüber. Hierbei war eine *HLTF*-Promotormethylierung in 44 % der Resektate, jedoch nur in 26 % der Zelllinien detektierbar. Falsch-positive Ergebnisse gab es für die Resektatproben in 11,5 % der Fälle. Für die Tumorzelllinien betrug die Spezifität 100 % (Moinova et al. 2002). Leung et al. (2005), Wallner et al. (2006) sowie Herbst et al. (2011) ermittelten für *HLTF* nach Untersuchungen von Serum Sensitivitäten von 10-32 % sowie Spezifitäten von 92-100 %. Auffällig war in diesem Zusammenhang, dass alle drei Studien sowie die Arbeit von Herbst et al. (2009) *HLTF* eher als Prognose- und Rezidivmarker nach primärer chirurgischer Intervention beurteilten, da in fortgeschrittenen Tumorstadien sowie in Rezidiv-Fällen höhere Methylierungsraten beobachtet wurden. Eine weitere Studie analysierte außerdem *HLTF* im Plasma hinsichtlich tumorassoziiierbarer Promotormethylierungen und konnte hier eine Sensitivität von 41 % und eine Spezifität von 93 % ermitteln (Lee et al. 2009).

SEPTIN9

SEPTIN9 ist auf Chromosom 17q25 lokalisiert. Das Gen kodiert eine Protein-Isoform aus der Septin-Familie, welche an der Regulation des Zellzyklus sowie der Zytokinese beteiligt ist. In seiner Funktion als TSG ist es nach Mutation an der Entstehung von Ovarialzellkarzinomen und myelomonozytären Leukämien beteiligt. Weiterhin besteht eine Assoziation zwischen einer Mutation im *SEPTIN9* und der Ausbildung einer hereditären neuralgischen Schulteramyotrophie (NCBI 2014b). Hierbei handelt es sich um eine akut schmerzhaft, am ehesten autoimmunologisch bedingte Entzündung des Plexus brachialis (Leshinsky-Silver et al. 2013). Der Nutzen einer epigenetischen Diagnostik bei KRK-Patienten ist derzeit für das *SEPTIN9* am besten belegt. Eine Promotormethylierung des *SEPTIN9* konnte in sechs unabhängigen Studien in 60-96 % der KRK-Fälle nach Untersuchung von cfDNA in Plasma nachgewiesen werden (Ahlquist et al. 2012; deVos et al. 2009; Grutzmann et al. 2008; Lofton-Day et al. 2008; Toth et al. 2012; Warren et al. 2011). In diesen Arbeiten lag der relative Anteil falsch-positiver Testergebnisse bei 10-15 %. Lee et al. (2013) erreichten für die Detektion von KRK hingegen lediglich eine Sensitivität von 37 % und eine Spezifität von 91 %. In dieser Studie wurde jedoch die Bedeutung von *SEPTIN9* als Verlaufsmarker nach chirurgischer Therapie hervorgehoben. Seit Oktober 2009 ist der PCR-basierte Nachweis von Hypermethylierungen in der *SEPTIN9*-Sequenz aus dem Blutplasma als kommerzieller Test erhältlich (Ladabaum et al. 2013; Summers et al. 2013).

TMEFF2 (Transmembrane Protein containing EGF and two Follistatin-like Domains 2)

Das - auf Chromosom 2q32.3 lokalisierte Gen - *TMEFF2* kodiert ein Transmembranprotein mit Rezeptorfunktion. Das Protein besitzt sowohl Bindungsstellen für den epidermalen Wachstumsfaktor EGF als auch zwei Follistatin-Domänen. Durch diesen Rezeptor gelingt die extrazelluläre Bindung des Liganden Activin A und dadurch die Regulation von Zellproliferation und Differenzierung (NCBI 2014a; Rahmig 2012; Sonoyama et al. 2000). Zudem ist *TMEFF2* in G-Protein-vermittelte Signalkaskaden involviert (Rahmig 2012). Aufgrund seiner wachstumsregulierenden Funktion wird im Rahmen von Studien der Nachweis einer entsprechenden Promotorhypermethylierung des *TMEFF2* auch beim Magen-, beim Prostata-, beim Blasen- und Gallenblasenkarzinom sowie beim ösophagealen Plattenepithelkarzinom durchgeführt (Ebert et al. 2005; Geddert et al. 2004; Liang et al. 2000; Takahashi et al. 2004). Sowohl Young (2001) als auch Sato (2002) beschreiben ein verstärktes Vorkommen des *TMEFF2*-Proteins (93 %) in nicht-neoplastisch veränderter Darmschleimhaut. Paradoxe Weise ist wiederum der Anteil von *TMEFF2* in Karzinomgewebe (23 %) vergleichsweise gering (Sato et al. 2002; Young et al. 2001). Eben diese Studien sowie eine weitere Arbeit von Ebert et al. (2005) zeigten in Tumorgewebe *TMEFF2*-Hypermethylierungen in 50-84 % der Fälle bei Spezifitäten von 87-100% (Ebert et al. 2005;

Sato et al. 2002; Young et al. 2001). Für die Detektion dieses Methylierungsmarkers in Plasma beziehungsweise Serum beschrieben drei andere Autoren Sensitivitäten von 13 %, 20 % und 65 % bei Spezifitäten von 69-100 % (Herbst et al. 2011; Lofton-Day et al. 2008; Wallner et al. 2006). Vor allem Ebert et. al (2005), Wallner et al. (2006) als auch eine weitere Studie von Herbst et al. (2009) heben die Bedeutung des *TMEFF2* als vielversprechenden Prognose- und Surrogatmarker für fortgeschrittene Tumorstadien und Tumorrezidive nach primärer chirurgischer Therapie hervor.

SDC2 (Syndecan 2)

Das Syndecan 2 Gen (*SDC2*) kodiert ein Transmembranprotein der Syndecan/Proteoglykan-Familie und ist als solches ein Regulator der Zytoskelettorganisation sowie der zellinternen Signaltransduktion. Weiterhin besitzt das Protein eine extrazelluläre Domäne in Form eines Syndecan-Rezeptors. Hierdurch ist *SDC2* an Zelladhäsions- und Migrationsprozessen beteiligt (NCBI 2014c). Für diesen Rezeptor wird in der Literatur eine hohe Bindungsaffinität zu dem HIV-1 Tat-Protein beschrieben, welches seinerseits mit der Entstehung von AIDS-assoziierten Vaskulopathien in Verbindung gebracht wird (Matzen et al. 2004; NCBI 2014c). Außer im Rahmen der KRK-Entstehung wird in einigen Studien die Bedeutung des *SDC2* für Pankreaskarzinome, Melanome, Fibro- und Osteosarkome sowie für HPV-assoziierte Kopf- und Halstumoren diskutiert (De Oliveira et al. 2012; Dieudonne et al. 2012; Mytilinaiou et al. 2013; Worsham et al. 2013). Für die Detektion kolorektaler Karzinome lieferte bisher nur eine Arbeit Detektionsraten aus Serum und Tumorgewebe (Oh et al. 2013). Sie lagen bei 87 % beziehungsweise 97,8 % bei einem Anteil falsch-positiver Ergebnisse von 5 %. Hervorzuheben ist die hohe Sensitivität für den Nachweis einer *SDC2*-Hypermethylierung im Serum von Patienten mit lokalisierten Tumorstadien (I, II). Für das UICC-Stadium I ermittelten Oh et al. (2013) eine Sensitivität von 92,3 % und eine Spezifität von 95,2 %, was *SDC2* als vielversprechenden Früherkennungsmarker ausweist.

RASSF1A (RAS-Association (RalGDS/AF-6) Domain Family Member 1)

Das TSG *RASSF1A* kodiert ein RAS-ähnliches Effektorprotein. Eine genetische sowie epigenetische Inaktivierung dieses Gens kann daher eine Vielzahl diverser Karzinome mit bedingen. *RASSF1A* führt auf molekularer Ebene beispielsweise zum Zellzyklusarrest nach Cyclin-D1-Akkumulation (NCBI 2014f). Kommt es infolge einer Promotorhypermethylierung zum Funktionsverlust des Gens, wird die Proliferationsneigung der Zellen verstärkt. Zudem interagiert das Protein nachweislich mit DNA-Repair-Proteinen (NCBI 2014f). *RASSF1A* stellt einen universellen Marker in der Pränataldiagnostik dar. So wird es beispielsweise im Rahmen der fetalen Rhesusfaktorbestimmung aus dem maternalen Blut eingesetzt (Chan et al. 2006). Neben seiner Funktion als potentieller epigenetischer Gewebemarker für

kolorektale Karzinome, ist *RASSF1A* zudem an der Entstehung von papillären Schilddrüsenkarzinomen, Nebennierenrindenkarzinomen sowie Magenkarzinomen beteiligt (Korah et al. 2013; Kunstman et al. 2013; Shi et al. 2014). Für das KRK beschreiben derzeit Studien von Sakamoto et al. (2004), Brandes et al. (2005) und Frigola et al. (2005) *RASSF1A* als Gewebemarker. In diesen Arbeiten konnten bei einer Spezifität von 51-70 %, in 21-81 % der Fälle Promotorhypermethylierungen aus den Gewebeproben nachgewiesen werden (Brandes et al. 2005; Frigola et al. 2005; Sakamoto et al. 2004). In einer Studie von Tan et al. 2007 wurde das *RASSF1A* zudem an Patientenserum-DNA aus metastasierten Mammakarzinomen, nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen, Magen- und Pankreaskarzinomen, kolorektalen Karzinomen sowie aus hepatozellulären Karzinomen als epigenetischer Marker getestet. Für alle genannten Entitäten konnten *RASSF1A*-Promotormethylierungen mit Sensitivitäten von 34 % und Spezifitäten von 100 % nachgewiesen werden. Speziell für das KRK konnte lediglich in 24 % der Fälle ein positiver Methylierungsnachweis erbracht werden (Tan et al. 2007).

I.7 Therapie

Für die Beschreibung des therapeutischen Vorgehens wird nachfolgend das Hauptaugenmerk auf die Behandlungsstrategien des Rektumkarzinoms gelegt, da in dieser Studie ausschließlich Patienten mit RK Gegenstand der Betrachtungen waren.

I.7.1 Kurative Therapiekonzepte

Für die Tumorstadien I-III besteht nach den aktuellen S3-Leitlinien ein kurativer Behandlungsansatz. Neuere Entwicklungen der letzten Jahre machen zudem eine kurative Therapie im Stadium IV unter der Voraussetzung einer gegebenen Metastasenresektabilität möglich. Die Einstufung des Residualstatus erfolgt anhand der R-Klassifikation (Tabelle 5).

Tabelle 5: R-Klassifikation zur Einteilung von Residualtumoren (Wittekind und Meyer 2010).

R-Stadium	Residuum
R0	kein Residualtumor nachweisbar
R1	mikroskopisch nachweisbarer Residualtumor
R2	makroskopisch nachweisbarer Residualtumor
RX	Beurteilung eines möglichen Residualtumors nicht möglich

I.7.1.1 Lokal begrenzte Tumoren (UICC-Stadium I, T1/T2, N0, M0)

In diese Gruppe sind vor allem T1- und T2-Tumoren einzuordnen. Speziell für die Behandlung niedrigmaligner T1-Karzinome wird derzeit die alleinige lokal-chirurgische Vollwandexzision über einen direkten transanalen Zugang oder mittels der transanal-endoskopische Mikrochirurgie (TEM) empfohlen (Pox und Schmiegel 2013). Für diese alleinige chirurgische Therapie ermittelte eine Studie von Meredith et al. (2009) eine 10-Jahres-Überlebensrate von 84 %. Voraussetzungen zur Anwendung des o.g. Verfahrens sind:

- Durchmesser der Läsion ≤ 3 cm
- G1- oder G2-Differenzierung
- keine Blutgefäßinfiltration (V0)
- keine Infiltration lokoregionaler LK (N0)
- mögliche R0- Resektion.

Für höhermaligne T1-Tumoren sowie die T2-Karzinome ist hingegen eine alleinige Vollwandexzision aufgrund des erhöhten Lokalrezidivrisikos von 26-47 % nicht ausreichend (Meredith et al. 2009). Für Tumoren des unteren und mittleren Rektumdrittels konnte sich in den letzten Jahren die transanale mesorektale Exzision (TME) durchsetzen. Studien zeigten für diese Technik unter Einhaltung der Resektionsgrenzen eine signifikante Senkung des Lokalrezidivrisikos, eine Steigerung des krankheitsfreien Intervalls sowie eine Verbesserung der Langzeitüberlebensraten (Adam et al. 1994; Arbmán et al. 1996; Dahlberg et al. 1999; Porter et al. 1998; Quirke et al. 1986). Kennzeichnend für dieses Verfahren ist eine komplette Entfernung des mesorektalen Fett- und Bindegewebskompartiments einschließlich der enthaltenen Blut- und Lymphgefäße innerhalb der Fascia pelvis visceralis. Diese Faszie sollte im Zuge des Eingriffs möglichst intakt bleiben und gilt als interne Qualitätskontrolle (Heald et al. 1982). Für Karzinome des oberen Rektumdrittels empfiehlt sich die partielle mesorektale Exzision (PME), welche sich durch die Einhaltung eines größeren distalen Sicherheitsabstandes zum Tumor von der TME unterscheidet (Damin und Lazzaron 2014). Alternativverfahren sind die alleinige tiefe anteriore Rektumresektion (TAR) ohne Mitnahme des Mesorektums (vgl. TME) oder die abdomino-perineale Rektumextirpation (APR) (Damin und Lazzaron 2014; Gaedcke et al. 2011). Während die TME und die TAR kontinenzertreu darstellend, ist bei der APR die Entfernung des kompletten Sphinkterapparates obligat (Damin und Lazzaron 2014). Perioperative Behandlungskonzepte in Form von Strahlentherapie oder kombinierter Radio- und Chemotherapie (RKT) werden für die Therapie lokal begrenzter Karzinome derzeit nicht empfohlen (Pox und Schmiegel 2013).

I.7.1.2 Lokal fortgeschrittene Tumoren (UICC-Stadium II und III, T3-4, N0-2, M0)

Das Vorgehen zeichnet sich - speziell für Karzinome des unteren und mittleren Rektumdrittels - durch einen interdisziplinären Behandlungsansatz aus. Neben der chirurgischen Tumoresektion sind hier in erster Linie zwei neoadjuvante Regime von entscheidender Bedeutung. Die erste Variante umfasst die alleinige Kurzzeit-Radiatio (5x5 Gy über eine Woche) in Verbindung mit einer TME in der Folgeweche. Die zweite Variante beschreibt eine kombinierte Radiochemotherapie (RCT), bestehend aus einer präoperativen 5-Floururacil (5-FU)-basierten Chemoapplikation sowie der fraktionierten Bestrahlung bis 50,4 Gray (Gy) über einen Zeitraum von 5 Wochen (Gaedcke et al. 2011). Einem anschließenden therapiefreien Intervall von bis zu acht Wochen folgt ebenfalls eine TME (Pox und Schmiegel 2013). Beide neoadjuvanten Verfahren führen im Vergleich zur alleinigen TME beziehungsweise einer alleinigen adjuvanten RCT zu verbesserten Lokalrezidivraten (Gaedcke et al. 2011; Peeters et al. 2007; Sauer et al. 2012). Zudem wird durch einige Autoren eine Verlängerung des postinterventionellen krankheitsfreien Intervalls beschrieben (Rahbari et al. 2013; Roh et al. 2009). Darüber hinaus wird für die konventionelle RCT gegenüber der alleinigen Kurzzeit-Radiatio - vermutlich bedingt durch die längere Therapiepause bis zur chirurgischen Intervention - ein verbessertes Tumor-Downsizing erreicht. Infolgedessen konnte ein erhöhter Anteil pathologischer Remissionen beschrieben werden (Damin und Lazzaron 2014; Gaedcke et al. 2011; Rahbari et al. 2013). Ob dies wiederum unmittelbar die Wahrscheinlichkeit für eine sphinktererhaltende Resektion erhöht, wird jedoch noch diskutiert (Bujko et al. 2006; Gaedcke et al. 2011; Gerard et al. 2010). Ein nachweislich positiver Effekt auf die Entwicklung der Gesamtüberlebensrate sowie die Ausbildung systemischer Metastasen konnte zudem für die neoadjuvanten Verfahren bisher nicht erbracht werden (Damin und Lazzaron 2014; Gaedcke et al. 2011). Eine medikamentöse Erweiterung der präoperativen 5-FU-basierten RCT um die Zytostatika Oxaliplatin oder Irinotecan war Gegenstand weiterer Studien und zeigte eine nochmalige Verbesserung der pathologischen Tumor-Remissionsrate (Hofheinz et al. 2005; Rodel et al. 2003; Rodel et al. 2007). Die Durchführung adjuvanter Behandlungsverfahren (Radiatio, Chemotherapie, RCT) beim RK im Stadium II oder III wird derzeit nach wie vor diskutiert, jedoch in den aktuellen S3-Leitlinien nicht empfohlen (Gaedcke et al. 2011; Pox und Schmiegel 2013). Lediglich bei fehlender neoadjuvanter Therapie sowie bei Vorliegen eines R1-Zustandes nach TME ist die adjuvante Therapie, etwa vier bis sechs Wochen nach dem chirurgischen Eingriff, indiziert (Pox und Schmiegel 2013). Hingegen besteht für die Therapie von RK im oberen Drittel bis heute kein eindeutiger Konsens. So wird sowohl die perioperative RCT als auch eine adjuvante Therapie analog der Kolonkarzinombehandlung empfohlen (Pox und Schmiegel 2013). Die Abbildung 4 zeigt die stadienadaptierten Therapieoptionen in der Übersicht.

Abbildung 4: Therapiealgorithmus für die Tumorstadien I-III (Hofheinz et al. 2012, S.14, Abdruck mit freundlicher Genehmigung der DGHO).

I.7.1.3 Metastasierte Tumoren (UICC-Stadium IV, T1-4, N0-2, M1)

Wie bereits in Kapitel 1.8 erwähnt, sind Tumoren im Stadium IV nicht mehr ausschließlich als palliativ einzustufen. Für etwa 25 % der Patienten mit synchronen hepatischen Metastasen besteht heute - aufgrund der Möglichkeiten einer fortschrittlichen therapeutischen Intervention - ein kuratives Therapieziel (Alberts 2012; Nordlinger et al. 2009). Karzinome dieser Kategorie werden nach der Resektabilität und Anzahl vorliegender Metastasen nochmals in drei Subgruppen unterteilt (Pox und Schmiegel 2013):

Gruppe I: Patienten mit resektablen Leber- oder Lungenmetastasen

Gruppe II: Patienten mit potentiell resektablen Leber- oder Lungenmetastasen

Gruppe III: multiple Metastasen in Leber und/oder Lunge ohne eine Resektionsoption nach Metastasenrückbildung; ohne Organkomplikationen, Komorbiditäten oder tumorbezogene Symptome.

Mit Hilfe dieser Klassifikation ist ein gruppenspezifischer Therapieentscheid möglich. Unter der Voraussetzung einer R0-Resektion werden für RK in Gruppe I krankheitsfreie 5-Jahres-Überlebensraten von bis zu 40 % nach Lebermetastasen- und 50 % nach Lungenmetastasenresektion erreicht (Fong et al. 1997; Kato et al. 2003; Lee et al. 2007; Pfannschmidt et al. 2003; Saito et al. 2002; Scheele et al. 2001). Hierbei erfolgt die chirurgische Intervention erst nach vorheriger Risikostratifizierung. Generell sollte im Vorfeld der Metastasenexzision aus Leber oder Lunge das Auftreten weiterer extrahepatischer sowie extrapulmonaler Herde ausgeschlossen sein. Zudem sollte für beide Organe nach einer

Resektion ausreichend funktionales Residualgewebe erhalten bleiben. Intraoperativ muss darüber hinaus ein ausreichender Sicherheitsabstand zu Leber- und Lungengefäßen gewahrt werden (Pox und Schmiegel 2013). Neben diesen allgemeinen Aspekten entwickelten Fong et al. (1999) speziell für das Auftreten von Leberfiliae ein Scoring-System zur Risiko-Nutzen-Beurteilung einer chirurgischen Metastasenresektion. Anhand von fünf Parametern (CEA-Konzentration, Nodalstatus, krankheitsfreies Intervall bis zum Auftreten einer Metastase, Anzahl der Filiae in der Bildgebung, Metastasendurchmesser) wird die Langzeitprognose beurteilt und das Verfahren gegenüber einem nicht-chirurgischen Vorgehen abgewogen (Fong et al. 1999). Zu der chirurgischen Intervention wird begleitend eine perioperative Chemotherapie nach dem FOLFOX-Protokoll diskutiert (Nordlinger et al. 2008; Nordlinger et al. 2009; Pox und Schmiegel 2013). Rektumkarzinome der Untergruppe II werden, mit dem Ziel eine sekundäre Metastasenresektabilität durch Tumor-Downsizing zu erreichen, im Vorfeld einer intensivierten chemotherapeutischen Remissionsinduktion zugeführt (Pox und Schmiegel 2013). Durch die Anwendung entsprechender kombinierter Chemotherapieprotokolle (FOLFOX, FOLFIRI, Biologicals) zeigten Studien für bis zu 40 % der Patienten eine sekundäre Resezierbarkeit der Filiae (Falcone et al. 2007; Folprecht et al. 2005). Nach Erreichen der Operabilität sollte die Resektion innerhalb von vier bis sechs Wochen erfolgen, um einen Morbiditätsanstieg -bedingt durch die Hepatotoxizität der Chemotherapeutika in Kombination mit dem operativen Risiko - zu vermeiden. In diesem Stadium ist außerdem ein regelmäßiges Restaging durch bildgebender Diagnostika indiziert (Pox und Schmiegel 2013).

I.7.2 Palliativtherapie

Die Behandlung von Patienten der Gruppe III, von Erkrankten mit fortgeschrittenem Tumorrezidiv oder progredienter Peritonealkarzinose sowie von multimorbiden Patienten mit einem erhöhten Operationsrisiko erfolgt anhand individualisierter Palliativkonzepte. Hierbei sollte die Entscheidung für ein geeignetes Therapieregime patienten- und risikoadaptiert sowie im interdisziplinären Konsens erfolgen. Häufige medikamentöse Bestandteile der Palliation sind die Zytostatika 5-FU, Irinotecan und Oxaliplatin. Im Zuge der Erst-, Zweit- und Drittlinienkombinationstherapie mit den o.g. Präparaten (FOLFOX, FOLFIRI) erfolgt zudem der Einsatz geeigneter EGFR-spezifischer sowie antiangiogenetischer Medikamente (Pox und Schmiegel 2013; Van Cutsem und Geboes 2007; Van Cutsem et al. 2011). Häufig kann im Rahmen einer Palliativsituation der Tumor in situ belassen werden. Lediglich der rektale Kontinuitätserhalt kann ein chirurgisches Vorgehen nötig machen. Neben der tumorspezifischen Therapie sollte eine suffiziente Analgesie sowie eine umfassende psychoonkologische Betreuung Bestandteil des multimodalen Behandlungskonzeptes sein (Pox und Schmiegel 2013).

II. Ziele der Arbeit

Die Behandlung fortgeschrittener Rektumkarzinome verfolgt dank wissenschaftlicher Erkenntnisse der vergangenen Jahre einen differenzierten, interdisziplinären Therapieansatz. Wie eingangs detailliert dargestellt, resultiert die Festlegung einer stadienadaptierten, multimodalen Behandlungsstrategie aus der Zusammenschau relevanter diagnostischer Befunde. Neben einer umfassenden klinischen Untersuchung einschließlich der digital-rektalen Untersuchung, der Durchführung einer Rekto- oder Koloskopie sowie der Anwendung bildgebender Verfahren im Rahmen des Staging ist die Bestimmung klinischer Surrogatmarker mittlerweile ein obligates Mittel zur Verlaufs- und Therapiekontrolle eines RK. Zudem ist auch im Rahmen des Darmkrebsscreenings die Anwendung biologischer Tumormarker als alternative und/oder ergänzende Untersuchungsmethode denkbar und vielversprechend. Speziell das Auffinden epigenetischer Veränderungen während der Karzinogenese birgt ein großes Potential für die Früherkennung und die risikoadaptierte Therapiestratifizierung. Vor diesem Hintergrund wurden im Rahmen dieser Arbeit pseudonymisierte Plasma- und Gewebeproben von 25 Patientinnen und Patienten mit lokal fortgeschrittenem Rektumkarzinom analysiert. Die Detektion der Hypermethylierungen tumorrelevanter Gensequenzen wurde mittels einer quantitativen Ein-Schritt-Real-Time-PCR realisiert. Zur Verfahrensetablierung und Qualitätssicherung erfolgte außerdem die Untersuchung anonymisierter Plasmaproben von 48 Blutspendern, die zuvor der wissenschaftlichen Verwendung ihrer Restblutbestandteile zugestimmt hatten. Zur Etablierung eines geeigneten labormedizinischen Diagnoseverfahrens wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- Sind hypermethylierte Sequenzen in den Promotor-Regionen von *RUNX3*, *NEUROG1*, *HLTF*, *SEPTIN9*, *TMEFF2*, *SDC2* und *RASSF1A* in sowohl chemisch hypermethylierter DNA als auch in DNA ausgewählter Tumorzelllinien spezifisch nachweisbar?
- Welches Restriktionsenzym ist für die enzymbasierte, methylierungsspezifische Ein-Schritt-Real-Time-Polymerase Kettenreaktion (PCR) am besten geeignet?
- Ist im Rahmen der PCR-basierten Methylierungsanalyse an zirkulierenden Nukleinsäuren EDTA-Plasma als Ausgangsmedium besser geeignet als Blutserum?
- Welchen Einfluss haben die internen Kontrollen *β-Globin* und *β-Actin* auf die Sensitivität und Spezifität der methylierungsspezifischen Ein-Schritt-Real-Time-PCR?
- Wie ist die diagnostische Sensitivität und Spezifität der methylierungsspezifischen Ein-Schritt-Real-Time-PCR nach Isolation von DNA aus Plasma und aus Tumorgewebe?
- Erlauben die Ergebnisse der methylierungsspezifischen Ein-Schritt-Real-Time-PCR eine zukünftige Stratifizierung der Therapie des Rektumkarzinoms?

III. Material und Methoden

III.1 Studiendesign und Patientenauswahl

In der vorliegenden Arbeit wurden Methoden zum Nachweis KRK-assoziiertes, hypermethylierter Promotor-Regionen mittels Real-Time-PCR entwickelt. Nach der Methoden-etablierung wurde die Methylierung der Gene *RUNX3*, *NEUROG1*, *HLTF*, *SEPTIN9*, *TMEFF2* und *SDC2* an chemisch extrahierter DNA aus Blut-Proben von insgesamt 25 Patienten mit Rektumkarzinom untersucht. Außerdem erfolgte die methylierungsspezifische Analyse bereits extrahierter und aufgearbeiteter DNA aus Tumorgewebe der gleichen 25 Patienten. Diese Testung wurde durch die Untersuchung von *RASSF1A* - einem weiteren potentiellen Tumormarker - ergänzt.

Das in diesem Zusammenhang eingesetzte Patientenmaterial wurde freundlicherweise von PD Dr. Gaedcke (Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie der Universitätsmedizin Göttingen) in pseudonymisierter Form zur Verfügung gestellt und stammte von Erkrankten mit initial lokal fortgeschrittenem Rektumkarzinom (UICC-Stadien II, III und IV), welche nach prätherapeutischer Biopsie-Entnahme - im Rahmen eines kurativen multimodalen Therapieansatzes - eine neoadjuvante RCT sowie eine Tumoresektion erhielten. Alle Materialien wurden durch Mitglieder der KFO 179 gewonnen, aufgearbeitet und gelagert. Die Patienten erteilten hierzu, nach dem bei der Ethikkommission hinterlegten Studienprotokoll (Antragsnummer 9/8/08), ihre Zustimmung. Sowohl die EDTA-Plasmen und Serum-Proben als auch die Biopsate der Tumoren wurden vor Beginn der multimodalen Therapie gewonnen. Nach der initialen neoadjuvanten Behandlung (RCT und OP) lag - bedingt durch das erreichte Tumordownstaging - ein annähernd ausgeglichenes Verhältnis der postinterventionellen UICC-Stadien I-IV innerhalb des Patientenkollektivs vor. Darüber hinaus ließ sich die Patientengruppe anhand zweier unterschiedlicher neoadjuvanter Vorbehandlungs-Regime unterscheiden. So erhielt etwa die Hälfte der Patienten neben einer herkömmlichen RCT mit 5-FU-Applikation zusätzlich Oxaliplatin im Vorfeld der Operation.

Neben den Patientenproben wurden EDTA-Plasmen und Seren von insgesamt 48 gesunden Blutspenderinnen und Blutspendern, welche im Rahmen der Aufklärung zur Blutspende einer wissenschaftlichen Nutzung ihrer Restblutbestandteile schriftlich zugestimmt hatten, zu Kontrollzwecken untersucht. Unmittelbar nach der Blutentnahme erfolgte die Zentrifugation der Proben für 12 Minuten bei 1350 g. Im nachfolgenden Pipettierschritt konnten aus jeder Blutprobe zwischen 2 bis 4 ml Plasma gewonnen werden. Die anschließende Lagerung der Plasmaproben erfolgte bis zur DNA-Isolation bei -20°C.

Nach der Blutentnahme wurden den Spenderproben, durch Mitarbeiter der Abt. Transfusionsmedizin, entsprechende Informationen zu Alter und Geschlecht zugeordnet.

Unmittelbar danach erfolgte eine Anonymisierung der Proben. Die Zustimmung der Ethikkommission zu diesem Vorgehen wurde mit dem Ethikvotum vom 14.05.2014 erteilt (DOK_42_2014).

III.2 Oligonukleotide

Zur Detektion tumorassoziiierter Hypermethylierungen mittels Real-Time-PCR wurden nach einer Literaturrecherche die epigenetischen Tumormarker *RUNX3*, *NEUROG1*, *HLTF*, *SEPTIN9*, *TMEFF2*, *SDC2* und *RASSF1A* für die experimentelle Untersuchung ausgewählt. Für die stichwortbasierte wissenschaftliche Recherche wurden vornehmlich die Datenbanken PUBMED sowie MEDLINE (National Center for Biotechnology Information, NCBI) im Zeitraum von Oktober 2013 bis Dezember 2013 auf relevante Publikationen durchsucht. Hierbei genutzte Schlagwörter waren: „Epigenetic Biomarkers“, „Real-Time-Quantitativ-PCR“, „Promotor-Methylation“, „Epigenetic-Hypermethylation“, „Colorectal Cancer“, „*RUNX3*“, „*NEUROG1*“, „*HLTF*“, „*SEPTIN9*“, „*TMEFF2*“, „*SDC2*“, „*RASSF1A*“, „Colorectal Cancer Epidemiology“, „CpG-Island“, „Colorectal Cancer Prognosis“. Die genomischen Sequenzen wurden der Gen-Datenbank Ensembl (Project of EMBL-European Bioinformatics Institute and Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge, UK) entnommen. Auf Grundlage publizierter Oligonukleotidsequenzen wurden CG-reiche Promotor-Regionen der einzelnen o.g. Gene visuell dargestellt (Chan et al. 2006; Herbst et al. 2011; Lee et al. 2013b; Lofton-Day et al. 2008; Oh et al. 2013; Wallner et al. 2006; Wasserkort et al. 2013). Die Generierung eigener Primer-Oligonukleotide sowie fluoreszierender SONDENSEQUENZEN erfolgte im Bereich zuvor beschriebener Hypermethylierungen unter Nutzung des Programmes OLIGO Primer Analysis Software 6.7.1 (Molecular Biology Insights, Inc., Cascade, USA). Im Gegensatz zu den Angaben in der oben beschriebenen Literatur, wurde auf eine vorherige Behandlung der DNA mit Natrium-Bisulfit verzichtet, was in der vorliegenden Arbeit zur Etablierung des Begriffs „Ein-Schritt-Real-Time-PCR“ führte. Mittels einer chemischen Bisulfit-Behandlung - wie sie von anderen Autoren beschrieben wurde - werden unmethylierte Cytosinbasen in Uracil überführt (Bundo et al. 2012; Herbst et al. 2011; Lee et al. 2013b; Lofton-Day et al. 2008; Oh et al. 2013; Tetzner et al. 2007; Wallner et al. 2006). Hingegen schützt eine Methylierung der Cytosinbase diese vor einer chemischen Modifikation, was letztlich eine Demaskierung besonders stark methylierter- gegenüber weniger stark methylierten DNA-Abschnitten zur Folge hat (Hayatsu 1976). Mit dieser Methode können tumorbedingt hypermethylierte *CpG-Islands* im Bereich bestimmter transkriptions-regulierender Promotor-Regionen dargestellt werden und sind mittels Real-Time-PCR selektiv amplifizierbar und detektierbar (Bird 1986; Summers et al. 2013). Die Synthese unmodifizierter Oligonukleotide erfolgte durch die Firma Purimex (Gießen, Deutschland), fluoreszenzmarkierte Sonden wurden von Life Technologies (Life

Technologies GmbH, Darmstadt) bezogen (Tabelle 6). Die Lagerung von Primer und Sonden erfolgte nach Zugabe von 1mM TRIS-HCL (Bestell-Nr.: AM9855G, Ambion® Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA) in 20 µl Aliquots in Konzentrationen von 50 pmol/µl (Amplifikationsprimer) beziehungsweise 20 pmol/µl (Sonde) bei -20°C.

Tabelle 6: DNA-Sequenzen der Primer sowie der fluoreszenzmarkierten Sonden für die jeweilige Ein-Schritt-Real-Time-PCR.

Genbezeichnung	Forward-Primersequenz (5'-3')	Reverse-Primersequenz (5'-3')	5'-Reporter-Sondensequenz-3'-Quencher
<i>RUNX3</i>	GCTCGCCTGCGTGGTC	GCAAGATGGGCGAGAACAG	FAM-CGCCCCGGCCCCGAGGT-MGB*
<i>NEUROG1</i>	GTAATTACGGGCACACTCCG	CAGGTCATCCCCGTGCAG	FAM-ATAAATTATGCAAATACCCGGGC-MGB*
<i>HLTF</i>	CGTCGACGTCTGACTGGACT	GAAGCCGGGGACAAATTC	FAM-CCTTTTCAGTCGTGCGCTCCT-MGB*
<i>SEPTIN9</i>	GGCGGCTAGCTCTGCACT	GATGGCTGGTGGGCAGC	FAM-CGGGGGCGCTTCCTCG-MGB*
<i>TMEFF2</i>	CGCGGGATGCTCAGTAGC	CTCCACAGCACCATGACTAG	FAM-CTGTGTTCTCCTCGGAAGCCGTT-MGB*
<i>SDC2</i>	GAGTGCAGAAACCAACAAGTGA	GGCGCTCGCTTCCTCCT	FAM-CGCAGCTGCGGGCGG-MGB*
<i>RASSF1A</i>**	AGCCTGAGCTCATTGAGCTG	GACCAGCTGCCGTGTGG	FAM-CCAACGCGCTGCGCAT-MGB*
<i>β-Actin</i>***	GCGCCGTTCCGAAAGTT	CGGCGGATCGGCAAA	NED-ACCGCCGAGACCGCGTC-BHQ*
<i>β-Globin</i>	GTGCACCTGACTCCTGAGGAGA	CCTTGATACCAACCTGCCCAG	VIC-AGGTGAACGTGGATGAAGTTGGT-BHQ*

* MGB=Minor Groove Binder; FAM= 6-Carboxyfluorescein; BHQ=Black Hole Quencher

** Modifiziert nach Chan et al. (2006)

*** Modifiziert nach Lo et al. (1998)

III.3 DNA-Proben

Die Funktionalität der Primer und Sonden wurde zunächst anhand kommerzieller nicht-methylierter und methylierter Kontroll-DNA (s.u.) sowie an DNA aus den Tumorzelllinien HT-29 und CACO-2 (s.u.) untersucht. Nachfolgend wurden die Sequenzen an DNA-Isolaten aus Blutspenderplasma-, Patientenplasma-, Patientenserum und Patientengewebe-Proben getestet. Die Lagerung der DNA-Testmaterialien erfolgte bis zu ihrem jeweiligen Verbrauch bei -20°C (kommerzielle Proben und Zelllinien-DNA) beziehungsweise -80°C (Blutspender- und Patientenmaterial). Die zu testenden DNA-Proben wurden getrennt von den Real-Time-PCR-Reagenzien gelagert.

III.3.1 DNA-Kontrollen

Neben einer nicht-methylierten, als Negativkontrolle eingesetzten kommerziellen humanen DNA (Human Genomic DNA, Bestell-Nr.: 11691112001, Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim) kam als Positivkontrolle eine chemisch vollständig methylierte DNA (CP Genome™ Human Methylated DNA, Bestell-Nr.: S8001M, Merck Millipore, Darmstadt) zum Einsatz. Sowohl die Positiv- als auch die Negativkontrolle wurden zur Festlegung geeigneter Promotor-Regionen sowie für den Vergleich unterschiedlicher Restriktionsenzyme herangezogen. Außerdem wurden die genannten Kontroll-Materialien in jedem PCR-Lauf mit Blutspender- und/oder Patientenmaterial mitgeführt. Sowohl die unmethylierte Negativkontrolle (Ausgangskonzentration 200 ng/µl) als auch die methylierte Positivkontrolle (Ausgangskonzentration 250 ng/µl) wurde mit Wasser (Ambion®-Nuclease-Free-Water, Bestell-Nr.: 4387936, Ambion® by Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA) bis zu Konzentrationen von 87 pg/µl beziehungsweise 200 pg/µl verdünnt. Die DNA der Zelllinien HT-29 (Bestell-Nr.: 299, Leibniz Institut- DSMZ GmbH, Braunschweig) und CACO-2 (Bestell-Nr.:169, Leibniz Institut- DSMZ GmbH, Braunschweig) entstammen Tumorzellverbänden von Kolon-Adenokarzinom-Patienten. Bei Ausgangskonzentrationen von 55 ng/µl (HT-29) und 45 ng/µl (CACO-2) wurden sie unter Nutzung von 1mM TRIS-HCL Pufferlösung (pH=8,1) (Bestell-Nr.: AM9855G, Ambion® by Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA) auf Konzentrationen von jeweils 200 pg/µl verdünnt.

III.3.2 Isolation von DNA aus Blutspender- und Patientenplasma/-serum

DNA von 48 Blutspendern und 25 Rektumkarzinom-Patienten wurde unmittelbar vor Durchführung der methylierungsspezifischen Ein-Schritt-Real-Time-PCR aus zuvor tiefgefrorenem EDTA-Plasma isoliert. Weiterhin erfolgte bei drei der 25 Patienten zusätzlich eine Untersuchung aus Serum, das zum gleichen Zeitpunkt gewonnen wurde. Die DNA-

Isolation aus Plasma und Serum wurde unter Nutzung des Chemagic Viral DNA/RNA Kit Special (PerkinElmer Chemagen Technologie GmbH, Baesweiler) nach dem Chemagic 1K Protocol (Version 050601) durchgeführt. Hierzu wurde zunächst je ein Milliliter gefrorenes Plasma beziehungsweise Serum erwärmt und einem Ansatz aus 1,2 ml Lysis Buffer, 1,7 µl Poly(A)RNA sowie 10 µl Protease zugefügt. Anschließend erfolgte die Inkubation des Gemisches in einem Wasserbad bei 55°C für 5 Minuten. Im nächsten Schritt wurde dem Mix 50 µl Magnetic Beads Resuspension sowie 4 ml Binding Buffer 2 hinzugefügt. Anschließend erfolgte die Isolation und Aufreinigung des Ansatzes mittels einer magnetischen Separation unter Verwendung des Nukleinsäure-Extraktionsautomaten Chemagic Magnetic Separation Module 1 (MSM1, PerkinElmer Chemagen Technologie GmbH, Baesweiler) in drei automatisierten Schritten über 75 Minuten. Zwei initialen Waschschritten (Wash Buffer 3 und 4) folgte letztlich die Elution von circa 80-100 µl DNA in 100 µl Elution Buffer (10 mM Tris HCl, pH 8). Das MSM1 ermöglichte die zeitgleiche Aufreinigung von 12 Plasma-beziehungsweise Serumproben.

III.4 Restriktionsenzyme

Im Rahmen der Verfahrensetablierung wurden die Restriktionsendonukleasen BstUI (Bestell-Nr.: R0518L, New England Biolabs Inc., Ipswich, USA), Acil (Bestell-Nr.: R0551L, New England Biolabs Inc., Ipswich, USA) und AccII (Bestell-Nr.: 1002A, Takara Bio Inc., Otsu, Japan) verglichen. Es handelt sich hierbei um Enzyme, die aus *Bacillus stearothermophilus* U458 (BstUI), *Arthrobacter citreus* (Acil) und *Acinetobacter calcoaceticus* (AccII) gewonnen wurden (Nishigaki et al. 1985; Polisson und Morgan 1990; Wei et al. 2008). Jedem PCR-Ansatz wurden 14 Units (1,4 µl) BstUI oder Acil hinzugefügt. AccII wurde ausschließlich in Kombination mit Acil getestet. Hierbei wurden von jedem Enzym 10 Units (je 1 µl) eingesetzt. Die optimale Reaktionstemperatur lag für BstUI bei 60°C, für Acil und AccII bei 37°C. Die Lagerung der Enzyme erfolgte bei -20°C.

III.5 Methylierungsspezifische Real-Time-PCR

Dieser Unterpunkt ist in eine kurze Beschreibung der Real-Time-PCR, die Darstellung der eingesetzten Reagenzien und Reaktionsbedingungen sowie die Auswertung der detektierten Messergebnisse gegliedert.

III.5.1 Quantitative Real-Time-PCR

Bei der in dieser Studie eingesetzten Real-Time-TaqManTM-PCR (Applied Biosystems® by Life Technologies, Foster City, USA) handelt es sich um eine modifizierte Form des Standard-PCR-Verfahrens, in dem über eine Fluoreszenzdetektion eine Quantifizierung des

Amplifikates in Echtzeit (pro PCR-Zyklus) möglich ist (Lee et al. 1993). Hierbei werden fluoreszenzmarkierte TaqMan-Sonden eingesetzt, welche an Ihrem 5'-Ende einen Fluorophor-Donor (*Reporter*) und an ihrem 3'-Ende einen Akzeptor (*Quencher*) besitzen (Abbildung 5) (Heid et al. 1996; Lee et al. 1993). Die Sonden lagern sich während der Annealing-Phase der PCR spezifisch in die zu vervielfältigenden Abschnitte der DNA-Einzelstränge ein. Die energetische Anregung des 5'-Reporters bedingt - aufgrund der räumlichen Nähe zum 3'-Akzeptor - einen Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET). Hierbei wird das emittierte Donor-Fluoreszenzsignal durch den *Quencher* absorbiert und damit ein detektierbares Lichtsignal zunächst unterdrückt (Förster 1948). Durch eine zusätzliche 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase erfolgt im Rahmen der Elongation eine Zerkleinerung der Sonde und damit die Entfernung des 5'-*Reporters* vom absorbierenden *Quencher*. Die Freisetzung eines detektierbaren Fluoreszenzsignals ist die Folge (Heid et al. 1996; Holland et al. 1991; Kubista et al. 2006; Lee et al. 1993). Somit besteht ein direkter Zusammenhang zwischen Zunahme des Fluoreszenzsignals und der Menge an DNA-Amplifikaten (Abbildung 5).

1. Sequenzspezifische Anlagerung von TaqMan-Sonde sowie Primern und Beginn der Polymerisation

2. Polymerisation und Entfernung der farbmarkierten Sonde durch Taq-Polymerase (Exonuklease-Aktivität)

3. Freisetzung des Fluoreszenzsignals durch Sondenhydrolyse

4. Vollständige DNA-Synthese und Trennung von Reporter und Quencher

Abbildung 5: Modifizierte schematische Darstellung der Wechselwirkung von 5'-Reporter und 3'-Quencher in einer Real-Time-PCR nach Jacob (2003, S.53) und Yuan et al. (2000, S.25, Abdruck mit freundlicher Genehmigung der AACC).

Zur Messung des Fluoreszenzsignals wurde das 7300 Real-Time-PCR-System (Applied Biosystems® by Life Technologies, Foster City, USA) verwendet. Mittels der zugehörigen Software (7300 System SDS RQ Study Software, Applied Biosystems®) wurde eine Amplifikationskurve erstellt. Die Zunahme des Fluoreszenzsignals, korrigiert um das Fluoreszenzsignal des Referenzfarbstoffs ROX (Delta-Rn), wurde gegen die Anzahl der PCR-Zyklen (Cycle) aufgetragen. Die Überschreitung eines festen Schwellenwerts (*Threshold*) wurde für jede Messung als *Cycle Threshold* (Ct) dokumentiert. Dieser Ct-Wert charakterisierte hierbei den Zyklus, in dem erstmals eine in der Software deutlich sichtbare Signalzunahme von dem Hintergrundsignal der Negativkontrollen abzugrenzen war (Kozera und Rapacz 2013). In Abbildung 6 ist die Bestimmung des Ct-Wertes einer methylierungsspezifischen Real-Time-PCR für einen Multiplex-Ansatz mit *SEPTIN9* und den Kontrollreaktionen für β -Globin und β -Actin an methylierter Kontroll-DNA beispielhaft dargestellt. Der *Threshold* wurde für alle methylierungsspezifischen PCR-Protokolle (*RUNX3*, *NEUROG1*, *HLTF*, *SEPTIN9*, *TMEFF2*, *SDC2*, *RASSF1A*) dieser Studie auf 0,2 festgelegt. Für β -Globin und β -Actin lagen die Schwellenwerte bei 0,1 und 0,03.

Abbildung 6: Amplifikationskurven einer methylierungsspezifischen Multiplex-PCR für *SEPTIN9* an methylierter Kontroll-DNA (CP Genome™ Human Methylated DNA) und einer Non Template Control (NTC).

III.5.2 Reagenzien und Reaktionsbedingungen

Die methylierungsspezifische Ein-Schritt-Real-Time-PCR erfolgte in einem Reaktionsvolumen von 34 μ l. Die Reagenzien wurden in der nachfolgend dargestellten Reihenfolge in 0,2 ml-PCR-Gefäßen (MicroAmp® Optical 8-Tube Strip, Bestell-Nr.:4316567, Life Technologies GmbH, Darmstadt) vorgelegt:

1. 19 µl des TaqMan® Universal PCR Master Mix Kit (Bestell-Nr.:4304437, Applied Biosystems® by Life Technologies, Foster City, USA) bestehend aus AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, Uracil-DNA Glycosylase, dTNPs mit dUTP, ROX™ Passive Reference sowie Pufferlösung
2. 0,20 µl Forward- und 0,20 µl Reverse-Primer für die entsprechende Promotorsequenz in einer Konzentration von jeweils 50 pmol/µl
3. 0,30 µl Forward- und 0,30 µl Reverse-Primer zur Amplifikation einer *β-Actin*-Kontroll-Sequenz in einer Konzentration von jeweils 50 pmol/µl
4. 0,5 µl Forward- und 0,5 µl Reverse-Primer zur Amplifikation einer *β-Globin*-Kontroll-Sequenz in einer Konzentration von jeweils 20 pmol/µl
5. Zugabe von 0,17 µl der jeweiligen TaqMan-Sonde (5'-FAM/3'-MGB) in einer Konzentration von 20 pmol/ µl
6. Zugabe von 0,24 µl der TaqMan-Sonde (5'-NED/3'-BHQ) zum Nachweis von *β-Actin* in einer Konzentration von 20 pmol/ µl
7. Zugabe von 0,17 µl der TaqMan-Sonde zum Nachweis von *β-Globin* (5'-VIC/3'-BHQ) in einer Konzentration von 20 pmol/ µl
8. Substitution von 1,40 µl Restriktionsenzym (BstUI, Acil) beziehungsweise 0,5 µl plus 0,5 µl einer Enzymkombination aus Acil/AccII
9. Zugabe von Ambion®-Nuclease-Free-Water 1,02 µl bei 10 µl eingesetzter Test-DNA oder 3,02 µl bei 8 µl Test-DNA (Verdünnungsreihe) zum Erreichen eines Reaktionsvolumens von 34 µl
10. Je nach Testansatz Zugabe von 10 µl Patientenplasma-, Patientenserum-, Patientengewebe-, Spender-DNA oder RUN-Kontroll-DNA oder 8 µl verdünnter Kontroll-DNA (Verdünnungsreihe).

Der eingesetzte TaqMan® Universal PCR Master Mix wurde bis zum Verbrauch bei +2 bis +8°C gelagert. Nach anschließender Zentrifugation des Multiplex-PCR-Ansatzes bei 12.000 x g für circa 30 Sekunden folgte die Real-Time-PCR-Amplifikation im o.g. Thermocycler. In der Startphase wurde der Cycler auf 50°C für 2 Minuten erwärmt. Im anschließenden Arbeitsschritt - der methylierungsabhängigen Hydrolyse durch die Restriktionsendonukleasen - wurde entsprechend den Arbeitstemperaturbereichen der eingesetzten Enzyme der Cycler für 60 Minuten auf 37°C (Acil, AccII) beziehungsweise auf 60°C (BstUI) eingestellt. Für die nachfolgende erstmalige Denaturierung der Ausgangs-DNA wurde dann die Temperatur auf 95°C für 10 Minuten erhöht. Nachfolgende Denaturierungs- und Annealing-Schritte erfolgten abwechselnd für je 15 Sekunden bei 95°C sowie für 1 Minute bei 60°C in 50 aufeinanderfolgenden Zyklen.

III.6 Etablierung des Testverfahrens

In allen Testläufen zur Etablierung des Verfahrens wurden die genspezifischen Primer-Sonden-Kombinationen an Kontrollproben in Triplikaten untersucht. Im Rahmen einer Multiplex-PCR mit internen Kontrollen wurden den Mastermixansätzen der zu untersuchenden Testsequenzen Reagenzien zum Nachweis der Kontrollgene *β-Globin* sowie *β-Actin* zugefügt. Zum Ausschluss möglicher Kontaminationen der eingesetzten Testreagenzien wurde darüber hinaus in sämtlichen PCR-Experimenten ein Kontrollansatz mit Wasser mitgeführt (sog. Non Template Control, NTC).

III.6.1 Auswahl geeigneter Gensequenzen und Restriktionsendonukleasen für die methylierungsspezifische Ein-Schritt-Real-Time-PCR

Die methylierungsspezifische Diskriminationsfähigkeit der einzelnen Primer-Sonden-Kombinationen wurde zunächst an den kommerziellen methylierten und nicht-methylierten Kontrollproben unter Verwendung von BstUI untersucht. Anschließend wurde die Ein-Schritt-Real-Time-PCR mit den Enzymen Acil sowie mit der Kombination aus Acil/AccII wiederholt (siehe III.4). Durch statistische Aufarbeitung dieser Messdaten gelang für jedes Testgen enzyspezifisch die Beschreibung des Signal/Rausch-Verhältnisses zwischen methylierte und unmethylierte DNA. Im Anschluss daran wurde eine statistische Analyse zur Untersuchung des Einflusses des verwendeten Enzyms durchgeführt. Im Einzelnen wurden hierbei BstUI gegen Acil und die Enzymkombination aus Acil/AccII in einem internen Vergleich sowohl an der nicht-methylierten als auch an der methylierten DNA-Kontrolle getestet.

III.6.2 Validierung der methylierungsspezifischen Ein-Schritt-Real-Time-PCR

Die Festlegung der Promotorsequenzen sowie eines geeigneten Restriktionsenzym (siehe auch III.4, III.6.1) stellt aufgrund mehrfacher nahezu bedingungsgleicher PCR-Wiederholungen gleichfalls ein Maß für die Verfahrensspezifität sowie die Robustheit des Testes dar. Im nächsten Schritt wurden die Messbereiche, die Effizienz (E) sowie die Nachweisgrenzen für die methylierungsspezifische Ein-Schritt-Real-Time-PCR in Triplikaten an drei verschiedenen Tagen (n=9) ermittelt (Bustin et al. 2009). Anhand einer sechsstufigen Verdünnungsreihe erfolgte die Testung eines DNA-Template-Mix aus methylierter und nicht-methylierter Kontroll-DNA. Die methylierte DNA-Positivkontrolle wurde im Verhältnis 1:1, 1:5, 1:25, 1:125, 1:625 sowie 1:3125 aus einer Ausgangskonzentration von 60000 pg/PCR verdünnt. Die Negativkontrolle wurde hingegen in einer konstanten Konzentration von 4000 pg/PCR der jeweiligen Verdünnungsstufe als Background-Signal zugefügt.

Grundlage dieser Überlegung war, dass im Patientenplasma methylierte tumorspezifische DNA immer vor einem Hintergrund nicht-methylierter DNA aus Leukozyten und gesundem Gewebe detektierbar sein muss. Pro PCR-Tube wurden insgesamt 8 µl DNA eingesetzt, welche sich aus 6 µl Positiv- und 2 µl Negativkontrolle zusammensetzten (Tabelle 7). Mittels einer zweiten Titrationsserie aus methylierter DNA mit ebenfalls sechs Verdünnungsstufen à 8 µl im o.g. Verhältnis (Tabelle 8), jedoch ohne die Zugabe der Negativkontrolle, gelang für den Nachweis von β -Globin die Festlegung eines linearen Messbereiches (Bustin et al. 2009).

Tabelle 7: Verdünnungsreihe für *RUNX3*, *NEUROG1*, *SEPTIN9*, *TMEFF2*, *SDC2* und *RASSF1A*.

Verdünnungsstufen	CP Genome™ - Human Methylated DNA [pg/PCR]	Human Genomic DNA [pg/PCR]
1	60000	4000
2	12000	4000
3	2400	4000
4	480	4000
5	96	4000
6	19,2	4000
Kontrolle	-*	4000

* Einsatz von 8 µl H₂O anstelle von methylierter DNA

Tabelle 8: Verdünnungsreihe für β -Globin.

Verdünnungsstufen	CP Genome™ - Human Methylated DNA [pg/PCR]	Human Genomic DNA [pg/PCR]
1	80000	-
2	16000	-
3	3200	-
4	640	-
5	128	-
6	26	-
Kontrolle	-*	-

* Einsatz von 8 µl H₂O; entspricht NTC

Für jede Ein-Schritt-Real-Time-PCR erfolgte die Erstellung von Standardkurven sowie die Ableitung der linearen Messbereiche mittels Regressionsanalyse. Für jede Verdünnungsstufe wurden die Ct-Mittelwerte, die zugehörigen Standardabweichungen (SD) sowie die Variationskoeffizienten (VK) ermittelt. Anhand der Regressionsfunktion jeder Standardkurve $f(x) = mx + n$ ist somit eine direkt-proportionale Zuordnung zwischen einem ermittelten Ct-Wert

und der eingesetzten DNA-Menge innerhalb des linearen Messbereiches möglich. Weiterhin ist das Bestimmtheitsmaß (R^2) ein Gütekriterium der Linearität innerhalb der Messbereichsgrenzen. Anhand der Steigung (m) der linearen Regressionsfunktion konnte über die Formel:

$$E = 10^{-1/m} - 1$$

die Effizienz E jeder einzelnen Ein-Schritt-Real-Time-PCR mittels der Software Microsoft Office Excel 2007 und 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) ermittelt werden.

Auf Grundlage der vorliegenden Daten wurden nachfolgend - durch Anwendung einer Probit-Analyse in SAS Analytics Pro 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, USA) - die genspezifischen 50 % - und 95 % -Nachweisgrenze aus den Messdaten der Verdünnungsreihen für die sechs Testgene ermittelt.

III.6.3 Vergleich der Testmedien EDTA-Plasma und Serum an ausgewählten Patientenproben

Im Hinblick auf die Festlegung eines geeigneten Ausgangsmaterials für die Untersuchungen der isolierten Patienten- und Blutspender-DNA wurden exemplarisch die DNA-Isolate aus Serum- sowie Plasmaproben von drei Patienten verglichen. Ausschlaggebendes Kriterium zur Auswahl geeigneter Patientenproben für diese Testung war das postinterventionelle Tumorstadium. So waren durch die drei Testpersonen die postinterventionellen Tumorstadien I, II und III vertreten. Bedingt durch das nur begrenzt zur Verfügung stehende Eluatvolumen von 80-100µl nach Extraktion aus dem Patientenplasma, wurde die Messung des Methylierungsstatus nur in Einfachbestimmung und nur an fünf der sechs Gensequenzen durchgeführt. Auf die Untersuchung der *RASSF1A*-Promotormethylierung wurde daher mangels ausreichenden Patientenmaterials verzichtet. Die ermittelten Messdaten der fünf Testgene wurden anschließend - hinsichtlich eines relevanten Unterschiedes zwischen Plasma und Serum - einer Signifikanzprüfung mittels T-Test (Statistica 10, Statsoft Europe GmbH, Hamburg) unterzogen.

III.7 Festlegung eines Ct-Grenzwertes (Cut-Off) für die methylierungsspezifische Ein-Schritt-Real-Time-PCR aus Blutspender- und Patienten-DNA

Für eine zuverlässige qualitative Einordnung methylierungsabhängiger, positiver und negativer Ct-Messwerte war die Festlegung eines geeigneten Cut-Off-Wertes für jede potentielle Tumorgensequenz erforderlich. Hierzu wurde DNA aus EDTA-Plasma von gesunden Blutspendern (N=48) mit und ohne Zusatz interner Kontrollen (Duplex- und Multiplex-PCR) auf Promotormethylierungen untersucht. Da auch hier pro angewandter

DNA-Extraktion aus einem Milliliter Blutspenderplasma lediglich ein Eluatvolumen von 80-100 µl verfügbar war, gleichfalls aber für die methylierungsspezifische Testung in Doppelbestimmung jeweils mit und ohne Zugabe der internen Kontrollen 10 µl DNA-Eluat pro PCR-Tube eingesetzt wurden, war eine Analyse aller sechs Testsequenzen an allen 48 Blutspenderproben technisch nicht umsetzbar. Aus diesem Grund wurden an einer extrahierten Blutspender-DNA-Probe maximal vier der sechs Gensequenzen getestet. Für die übrigen beiden Gensequenzen erfolgte dann eine erneute DNA-Isolation aus einer weiteren Probe. Hierdurch konnten letztlich für jede der sechs Promotor-Regionen Duplikate der Ct-Werte - jeweils mit und ohne Referenzkontrollen - für 24 differente Blutspender-DNA-Proben (N=24) generiert werden. Zur Bestimmung der Grenzwerte (Cut-Off) wurden 95 %-Perzentile aus den Mittelwerten der Doppelbestimmungen errechnet (Bustin et al. 2009; Chudy et al. 2003). Ct-Werte oberhalb des Grenzwertes wurden als negativ und darunter liegende Ct-Werte als positiv bewertet. Grenzwerte einer ROC-Analyse der Ct-Mittelwerte aus Blutspender-DNA-Proben und den Ct-Mittelwerten einer Doppelbestimmung an extrahierter Patientengewebe-DNA (N=23) wurde den Grenzwerten der 95%-Perzentil-Methode vergleichend gegenübergestellt. Im nächsten Schritt erfolgte anhand der zuvor festgelegten Grenzwerte eine Bewertung der Messdaten (Ct) einer PCR-Testung an Nukleinsäure-Isolaten der Tumorzellreihen HT-29 und CACO-2. Außerdem wurden die im Zuge der Patienten-und Blutspender-PCR generierten Ct-Messwerte an nicht-methylierten sowie methylierten DNA-Kontrollen (Negativ- und Positivkontrollen) grenzwertabhängig (Cut-Off) als positiv oder negativ bewertet. Während die PCR-Testung der Zelllinien ausschließlich in einer Multiplex-PCR unter Einsatz beider interner Referenzgene (*β-Globin* und *β-Actin*) erfolgte, wurde die Messung der Lauf-Kontrollen jeweils mit (Multiplex-PCR) und ohne *β-Globin* (Duplex-PCR) vergleichend durchgeführt. Ebenso wurde die Untersuchung von DNA aus Patientenplasma sowohl mit als auch ohne interne Kontrollen untersucht, um auch für diese Ansätze auszuschließen, dass die Primer und Sonden der internen Kontrollreaktionen zu einer Inhibition des spezifischen Signals für die betreffende Promotor-Region führen.

III.8 Ermittlung der diagnostischen Spezifität und Sensitivität der Blutspender- und Patienten-DNA aus EDTA-Plasma sowie aus isolierter Tumorgewebe-DNA

Zur Ermittlung der diagnostischen Spezifität der methylierungsabhängigen Real-Time-PCR wurden die unter III.7. genannten Grenzwerte auf die Ct-Messwerte der Blutspender-DNA-Testung angewandt (Summers et al. 2013; Thomas 2012).

Auf Grundlage der methylierungsspezifischen PCR-Messdaten konnten sowohl für die Untersuchung von DNA aus Tumorgewebe als auch für die Untersuchung von Patientenplasma diagnostische Sensitivitäten für die Untersuchung jedes Gens ermittelt

werden (Summers et al. 2013; Thomas 2012). Hierzu wurden die in Doppelbestimmung ermittelten Ct-Einzelwerte (Ct_1 , Ct_2) der Tumorgewebe-Testung in Ct-Mittelwerte zusammengefasst und anschließend durch Anwendung der spezifischen Grenzwerte bewertet. Analog dem Vorgehen in der Analyse der Tumorgewebe-DNA-Testung - jedoch in diesem Fall für zwei Ct-Einzelwerte (aus Duplex- und Multiplex-PCR) - wurden die Ergebnisse der Patientenplasma-DNA-Testung ebenfalls anhand der genspezifischen Cut-Offs qualitativ als positiv oder negativ klassifiziert.

In einer letzten Analyse wurden drei der insgesamt sechs Gensequenzen in einem diagnostischen Markerpanel zusammengefasst. Die erhobenen Ct-Werte aus den PCR-Testungen der Gene *RUNX3*, *SEPTIN9* und *SDC2* an Blutspender- und Patienten-DNA-Proben wurden hier in der Zusammenschau bewertet. Dabei wurde eine Blutspender- sowie eine Patientenprobe jeweils insgesamt als positiv kategorisiert, wenn mindestens eines der drei Panel-Gene für die jeweilige Probe grenzwertabhängig positiv bewertbar war. Hieraus ließen sich für das Panel entsprechende diagnostische Spezifitäten und Sensitivitäten ermitteln. Für das o.g. Panel erfolgte in diesem Zusammenhang ein Vergleich der detektierten, blutbasierten PCR-Hypermethylierungen und dem pathologischen UICC-Stadium nach RCT unter Anwendung eines χ^2 -Tests. Für diese Betrachtung war eine nochmalige Festlegung panelspezifischer Cut-Offs mittels ROC-Analyseverfahren nötig.

III.9 Statistische Analyse

Die deskriptive Auswertung biometrischer Spender- und Patientendaten, sämtliche statistischen Betrachtungen sowie die Erstellung von Tabellen und Diagrammen wurden in Zusammenarbeit mit den Mitarbeitern des Instituts für medizinische Statistik der UMG erstellt. In diesem Zusammenhang wurde statistisch-analytische Software wie Statistica 10.0 (Statsoft Europe GmbH, Hamburg), IBM SPSS Statistics 22.0 (IBM Deutschland GmbH, Ehningen), SAS Analytics Pro 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, USA), R 3.1.2 (R Foundation for statistical Computing, Wien, Österreich) sowie Microsoft Office Excel 2007 und 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) genutzt. Für die Verfahrensetablierung, beschrieben unter Gliederungspunkt III.3, wurde unter Annahme einer Normalverteilung der erhobenen Daten auf parametrische Methoden zurückgegriffen. Eine Signifikanzprüfung der Gensequenzen in Abhängigkeit von der eingesetzten Kontroll-DNA und den drei getesteten Restriktionsenzymen wurde mittels Varianzanalyseverfahren nach dem Abschluss-Test-Prinzip realisiert. Hierbei erfolgte zunächst die Erstellung einer genspezifischen multifaktoriellen ANOVA. Zeigten sich in diesen Analysen signifikante Interaktionen zwischen Gensequenz, eingesetzter DNA und Enzym ($p < 0,05$), so wurden die ermittelten Daten zur Verifizierung direkter Abhängigkeiten einer nochmaligen einfaktoriellen T-Testung ($p < 0,05$) unterzogen. Die nachfolgende Festlegung von Messbereichen für die einzelnen Testse-

quenzen sowie für das interne Kontrollgen *β-Globin* wurde mittels eines linearen Regressionsmodells (Microsoft Excel 2007 und 2010) umgesetzt. Die Ermittlung von genspezifischen Nachweisgrenzen aus den Titrationsverfahren erfolgte anhand einer Probit-Analyse in SAS Analytics Pro 9.3. Für die weiterführende qualitative Beurteilung der erhobenen genabhängigen Messdaten aus Blutspender-, Patientengewebe-, und Patientenplasma-Proben stand im Vordergrund die Festlegung geeigneter genspezifischer Cut-Off-Werte im Mittelpunkt. Die 95 %-Grenzwerte wurden hierbei mittels Quantil-Funktion in Microsoft-Excel 2007 aus den Messdaten der Blutspenderplasma-DNA-PCR errechnet. In einem vergleichenden zweiten Verfahren erfolgte die Cut-Off-Bestimmung außerdem durch ROC-Analyse der PCR-Messdaten an Blutspender- und Patienten-DNA mit Hilfe der Software IBM SPSS Statistics 22.0 und der Software R 3.1.2. Auf Grundlage der festgelegten 95 %-Cut-Offs erfolgte die Ermittlung der diagnostischen Spezifität und Sensitivität der jeweiligen Ein-Schritt-Real-Time-PCR anhand der Ct-Messwerte der Blutspender- und Patienten-DNA-Analyse wiederum in Microsoft Excel 2007 und 2010. Die Prüfung einer Korrelation des PCR-Methylierungsstatus des beschriebenen Markerpanels und den pUICC-Stadien erfolgte unter Anwendung eines χ^2 -Test in Microsoft Excel 2007 und 2010. In einer weiteren Analyse wurden die jeweiligen genspezifischen Grenzwerte auf die Messdaten aus den kommerziellen Tumorzelllinien HT-29 und CACO-2 sowie auf die Ct-Werte der nicht-methylierten und methylierten PCR-RUN-Kontrollen - wiederum unter Nutzung von Microsoft Excel 2007 und 2010 - angewandt. Für die letztgenannte Testung wurde für jedes Gen speziell der Einfluss des internen Referenzgens *β-Globin* (Duplex-versus Multiplex-PCR) mittels eines zweiseitig-gepaarten T-Tests in Statistica 10.0 untersucht. Es folgte - nach Bonferroni-Korrektur des Signifikanzniveaus auf $p < 0,025$ - die Analyse der Messdaten von Duplex- und Multiplex-PCR gegeneinander hinsichtlich eines relevanten Ct-Niveau-Unterschiedes. Damit gelang - genspezifisch für das PCR-Testverfahren - die Beurteilung des Signal-Rausch-Abstandes zwischen den eingesetzten Kontrollen. Der Einfluss einer internen Kontrolle wurde in einem Vergleich der Ct-Messdaten der Ansätze ohne und mit *β-Globin* - an Patientenplasma-DNA - mit Hilfe eines zweiseitig-gepaarten T-Tests (Statistica 10.0) ermittelt. Eine Anpassung des Signifikanzniveaus für diesen Paarvergleich innerhalb der Patientenplasma-DNA-Gruppe erfolgte auch hier durch Bonferroni-Korrektur. Für die Vergleichsgrößen (Ct „mit *β-Globin*“, Ct „ohne *β-Globin*“) wurde daher das Signifikanzniveau von $p < 0,05$ auf $p < 0,025$ gesenkt. Für eine zusammenfassende grafische Darstellung der in Einfach- und Doppelbestimmung detektierten Messwerte aus Blutspender-, Patientenplasma- und Patientengewebe-DNA wurden Statistica 10.0, Microsoft Excel 2007 und 2010 verwendet.

IV. Ergebnisse

IV.1 Alter und Geschlecht von Blutspendern und Rektumkarzinom-Patienten

Das Kontrollkollektiv aus insgesamt 48 Blutspenderinnen und Blutspendern (N=48) setzte sich aus 35 Männern (73 %) und 13 Frauen (27 %) zusammen (Abbildung 7). Das mittlere Alter in der untersuchten Kohorte betrug 38 Jahre (Min.-Max.: 18-66). Das Durchschnittsalter der Frauen lag bei 40 Jahren (22-66). Die Männer waren mit einem mittleren Alter von 37 Jahren (18-65) im Durchschnitt drei Jahre jünger. Eine nochmalige Kategorisierung nach Altersgruppen zeigte, dass 39 der 48 Personen zwischen 21 und 50 Jahren alt waren, was einem relativen Anteil von etwa 81 % entsprach (Tabelle 9). Im Kollektiv der 25 Rektumkarzinom-Patienten waren 15 männlich (60 %) und zehn weiblich (40 %) (Abbildung 7). Das mittlere Erkrankungsalter in dieser Gruppe lag bei 62 Jahren (34-81). Das durchschnittliche Alter der Frauen lag vor Beginn der Therapie bei 65 Jahren. Damit lag das gemittelte Erkrankungsalter hier fünf Jahre über dem der Männer, deren Erstdiagnose durchschnittlich im Alter von 60 Jahre gestellt wurde. Die spezifische Zuordnung der Karzinompatienten zu Altersgruppen zeigte außerdem, dass mit 72 % ein Großteil der Patienten (n=18) im Alter von 51 bis 80 Jahren erkrankte (Tabelle 10). Der Vergleich der Spender- und Patientenkohorte insgesamt zeigte einen signifikanten Altersunterschied ($p < 0,001$, Wilcoxon-Mann-Whitney) (Abbildung 8).

Tabelle 9: Absolute und relative Altersverteilung des Spenderkollektivs nach Geschlecht.

Alter bei Spende	Frauen [n (%)]	Männer [n (%)]	Gesamt [n (%)]
≤ 20 Jahre	0 (0 %)	1 (2,08 %)	1 (2,08 %)
21-30 Jahre	4 (8,33 %)	14 (29,17 %)	18 (37,50 %)
31-40 Jahre	4 (8,33 %)	5 (10,42 %)	9 (18,75 %)
41-50 Jahre	3 (6,25 %)	8 (16,67 %)	11 (22,92 %)
51-60 Jahre	0 (0 %)	5 (10,42 %)	5 (10,42 %)
61-70 Jahre	2 (4,165 %)	2 (4,16 %)	4 (8,33 %)
Gesamt [N (%)]	13 (27,08 %)	35 (72,92 %)	48 (100,00 %)

Tabelle 10: Absolute und relative Altersverteilung des Patientenkollektivs nach Geschlecht.

Erkrankungsalter	Frauen [n (%)]	Männer [n (%)]	Gesamt [n (%)]
≤ 40 Jahre	0 (0 %)	1 (4 %)	1 (4 %)
41-50 Jahre	2 (8 %)	3 (12 %)	5 (20 %)
51-60 Jahre	1 (4 %)	3 (12 %)	4 (16 %)
61-70 Jahre	2 (8 %)	4 (16 %)	6 (24 %)
71-80 Jahre	4 (16 %)	4 (16 %)	8 (32 %)
81-90 Jahre	1 (4 %)	0 (0 %)	1 (4 %)
Gesamt [N (%)]	10 (40 %)	35 (60 %)	25 (100 %)

Abbildung 7: Geschlechtsverteilung in Blutspender- und Patientenkohorte.

Abbildung 8: Altersstrukturen von Blutspendern und Rektumkarzinom-Patienten.

IV.2 Tumorstadium, Therapie und Krankheitsverlauf der Patienten

Innerhalb der Karzinomgruppe konnte nach initialem Staging und damit unmittelbar zum Entnahmezeitpunkt des zu testenden Probenmaterials bei sechs der 25 Patienten ein UICC-Stadium II diagnostiziert werden. Bei weiteren 18 von 25 Patienten (72 %) lag hingegen nach der präoperativen Diagnostik ein UICC-Stadium III vor. Bei einem von 25 Tumorpatienten lag zum Diagnosezeitpunkt bereits eine Fernmetastasierung in der Leber und damit definitionsgemäß ein UICC-Stadium IV vor. Nach Auswertung der vorliegenden Karzinom-spezifischen Patientendaten führte die Anwendung einer neoadjuvanten Radiochemotherapie im Rahmen der Multimodal-Therapie bei insgesamt 18 der 25 Rektumkarzinom-Patienten (72 %) zu einem Tumor-Downstaging und damit zur Reduktion des pUICC-Stadiums (uTNM zu ypTNM). Im Einzelnen konnte in zwei Fällen (N=25) eine Reduktion von Stadium II (uTNM) sowie in einem Fall von Stadium III (uTNM) zu Stadium 0 (ypTNM) erreicht werden. Für weitere Patienten gelang ein Downstaging des vorliegenden Rektumkarzinoms von Stadium III (uTNM) zu II (ypTNM) in sieben Fällen, von II (uTNM) zu I (ypTNM) in drei Fällen sowie von III (uTNM) zu I (ypTNM) in fünf Fällen (N=25). In diesem Zusammenhang erwähnenswert ist die Tatsache, dass mit 12 Patienten etwa die Hälfte des Kollektivs eine konventionelle, neoadjuvante Radiochemotherapie auf Basis einer 5-FU-Applikation erhielt. Den übrigen Studienteilnehmern (n=13) wurde im Rahmen der neoadjuvanten Behandlung neben dem 5-FU zusätzlich Oxaliplatin verabreicht.

Nach der durchgeführten Tumoresektion, welche alle 25 Patienten erhielten, entwickelte lediglich einer der Studienteilnehmer nach circa vier Jahren ein Lokalrezidiv. Drei der 25 Patienten (12 %) bildeten zudem im weiteren Krankheitsverlauf Fernmetastasen in der Leber und/oder der Lunge aus. Davon wies einer der Patienten, wie geschildert, bereits zum Diagnosezeitpunkt eine Fernmetastasierung und damit ein UICC-Stadium IV auf. Nach Abschluss der interdisziplinären, multimodalen Primärtherapie überlebten - anhand der Angaben der Studiengruppe KFO 179 - 19 von 25 Patienten (76 %) fünf Jahre und länger nach Erstdiagnose. Sechs der 25 Patienten (24 %) starben im Beobachtungszeitraum, wobei lediglich in zwei Fällen nachweislich eine tumorbedingte Todesursache vorlag.

IV.3 Etablierung der enzymbasierten methylierungsspezifischen Ein-Schritt-Real-Time-PCR

Die Etablierung des enzymatisch-katalysierten PCR-Testverfahrens umfasste zunächst die Anwendung der sieben Protokolle für *RUNX3*, *NEUROG1*, *HLTF*, *SEPTIN9*, *TMEFF2*, *SDC2* und *RASSF1A* auf kommerzielle Kontroll-DNA. Entscheidend für die Auswahl geeigneter Sequenzen war hierbei die Frage, bei welcher Promotor-Region eine ausreichende methylierungsspezifische Diskrimination zwischen der humanen nicht-methylierten Kontroll-DNA (Negativkontrolle) und der methylierten Kontroll-DNA (Positivkontrolle) unter Verwendung des Restriktionsenzym BstUI beobachtet werden konnte. Um im nächsten Schritt das optimale Restriktionsenzym für die weitere Analyse von Patienten- und Blutspender-DNA zu ermitteln, kamen zusätzlich zum BstUI das Acil sowie eine Enzymkombination aus Acil/AccII zum Einsatz. Die Auswertung des erhobenen Datenmaterials erfolgte anhand von Mittelwert- und Varianzanalysen (ANOVA) sowie mit Hilfe des T-Tests (Tabelle 11).

IV.3.1 Auswahl der Gensequenz anhand der enzymspezifischen Diskrimination zwischen nicht-methylierten und methylierten DNA-Kontrollen

Für die Auswahl geeigneter Promotor-Regionen wurde, wie oben beschrieben, zunächst die Auswirkung des BstUI-Enzyms auf die Entwicklung der genspezifischen Ct-Mittelwerte für die nicht-methylierte und methylierte DNA-Kontrolle betrachtet. In Tabelle 11 sind die Ct-Mittelwerte für unmethylierte und methylierte Kontroll-DNA sowie die entsprechenden Ergebnisse der T-Tests für jedes Gen in Abhängigkeit vom eingesetzten Restriktionsenzym dargestellt. Hierbei zeigten die genspezifischen Untersuchungen an methylierter Kontroll-DNA größtenteils signifikant niedrigere - und damit methylierungs-positive Ct-Werte – im Vergleich zur Testung an nicht-methylierter, negativer Kontroll-DNA. Diese Analyse erbrachte grenzwertabhängig überwiegend signifikant höhere, methylierungs-negative Messergebnisse. Dieser Zusammenhang zwischen Positiv- und Negativkontrolle wurde in der vorliegenden Arbeit als Signal-Rausch-Abstand bezeichnet. Aufgrund der fehlerhaften PCR mit der eingesetzten Enzymkombination aus Acil/AccII für das *RASSF1A* erfolgte die o.g. Analyse für dieses Gen nur für BstUI und Acil.

Tabelle 11: Darstellung von Ct-Mittelwert ($\bar{x}$) $\pm$ Standardabweichung (SD) und T-Test zum Diskriminationsverhalten der Gensequenzen zwischen nicht-methylierter und methylierter DNA in Abhängigkeit von den Restriktionsenzymen BstUI, Acil und Acil/AccII.

Enzym	Promotor-Region	nicht-methylierte DNA Ct-Mittelwert $\pm$ SD **	methylierte DNA Ct-Mittelwert $\pm$ SD **	T-Test p-Wert
BstUI	<i>RUNX3</i>	46,48 $\pm$ 4,15	34,77 $\pm$ 0,51	0,0027*
	<i>NEUROG1</i>	39,89 $\pm$ 0,57	30,85 $\pm$ 0,38	<0,001*
	<i>HLTF</i>	50,00 $\pm$ 0,00	47,67 $\pm$ 3,55	0,1394
	<i>SEPTIN9</i>	48,25 $\pm$ 4,30	32,53 $\pm$ 0,11	0,0027*
	<i>TMEFF2</i>	38,08 $\pm$ 1,35	32,72 $\pm$ 1,11	<0,001*
	<i>SDC2</i>	37,47 $\pm$ 0,98	30,04 $\pm$ 0,11	<0,001*
	<i>RASSF1A</i>	48,03 $\pm$ 1,90	34,71 $\pm$ 0,58	<0,001*
Acil	<i>RUNX3</i>	45,02 $\pm$ 4,33	36,71 $\pm$ 1,33	0,0337*
	<i>NEUROG1</i>	45,39 $\pm$ 2,81	34,43 $\pm$ 2,69	<0,001*
	<i>HLTF</i>	50,00 $\pm$ 0,00	49,36 $\pm$ 1,00	0,3197
	<i>SEPTIN9</i>	50 $\pm$ 0,00	33,29 $\pm$ 2,02	<0,001*
	<i>TMEFF2</i>	45,51 $\pm$ 3,32	33,71 $\pm$ 1,70	<0,001*
	<i>SDC2</i>	45,39 $\pm$ 6,14	32,12 $\pm$ 1,95	0,0017*
	<i>RASSF1A</i>	49,84 $\pm$ 0,28	36,02 $\pm$ 0,38	<0,001*
Acil/AccII	<i>RUNX3</i>	50,00 $\pm$ 0,00	40,27 $\pm$ 3,43	0,0079*
	<i>NEUROG1</i>	46,33 $\pm$ 3,19	38,59 $\pm$ 3,47	0,0466*
	<i>HLTF</i>	48,17 $\pm$ 1,02	48,96 $\pm$ 2,56	0,6325
	<i>SEPTIN9</i>	50,00 $\pm$ 0,00	34,05 $\pm$ 0,81	<0,001*
	<i>TMEFF2</i>	45,40 $\pm$ 4,02	33,66 $\pm$ 0,80	0,0077*
	<i>SDC2</i>	50,00 $\pm$ 0,00	32,51 $\pm$ 0,54	<0,001*
	<i>RASSF1A</i>***	-	-	-

* statistische Signifikanz nachweisbar ($p < 0,05$)

** Mittelwertgenerierung aus N=3-9 Werten für alle Gen- und Enzymanalysen; Mittelwert *HLTF* für BstUI, Acil, Acil/AccII aus N=6-9 Werten

*** Ausfall der Enzymkombination Acil mit AccII für das Gen *RASSF1A*, alleinige Testung von BstUI gegen Acil

Für die PCR-Testung mit BstUI konnten zunächst signifikante Methylierungsunterschiede (nicht-methyliert versus methyliert) für sechs von sieben Gensequenzen gezeigt werden. Hierbei ließen sich für *RUNX3* ($p_{\text{BstUI}}=0,0027$), *NEUROG1* ($p_{\text{BstUI}}<0,001$), *SEPTIN9* ($p_{\text{BstUI}}=0,0027$), *TMEFF2* ($p_{\text{BstUI}}<0,001$), *SDC2* ($p_{\text{BstUI}}<0,001$) und *RASSF1A* ($p_{\text{BstUI}}<0,001$) statistisch signifikante Ct-Wert-Unterschiede zwischen nicht-methylierter und methylierter DNA nachweisen (Tabelle 11). Lediglich für *HLTF* konnte keine signifikante Diskrimination zwischen der Negativ- und Positivkontrolle ermittelt werden ($p_{\text{BstUI}}=0,1394$). Der Einsatz von Acil sowie der Kombination aus Acil/AccII erbrachte nachfolgend vergleichbare Ergebnisse. Signifikante Methylierungsunterschiede (d.h. $p<0,05$) zwischen den DNA-Kontrollen konnten auch hier für *RUNX3* ($p_{\text{Acil}}=0,0337$; $p_{\text{Acil/AccII}}=0,0079$), *NEUROG1* ($p_{\text{Acil}}<0,001$; $p_{\text{Acil/AccII}}=0,0466$), *SEPTIN9* ($p_{\text{Acil}}<0,001$; $p_{\text{Acil/AccII}}<0,001$), *TMEFF2* ($p_{\text{Acil}}<0,001$; $p_{\text{Acil/AccII}}=0,0077$) und *SDC2* ($p_{\text{Acil}}=0,0017$; $p_{\text{Acil/AccII}}<0,001$) in einem T-Test gezeigt werden. Für *RASSF1A* ($p_{\text{Acil}}<0,001$) konnte in Verbindung mit dem Acil eine statistisch signifikante Diskrimination zwischen Negativ- und Positivkontrolle nachgewiesen werden. Hingegen ergab sich auch aus der Betrachtung der Ct-Mittelwerte von *HLTF* unter Verwendung von Acil und Acil/AccII kein signifikanter Unterschied zwischen nicht-methylierter und methylierter DNA. Resultierend aus diesen Ergebnissen wurde die Promotormethylierung von *HLTF* im Blutspender- und Patientenmaterial nicht untersucht (Tabelle 11; Abbildung 9).

Abbildung 9: Ct-Mittelwerte ($\bar{x} \pm 95\%$ KI; N=6-9) zum Nachweis einer Promotormethylierung von *HLTF* nach PCR-Amplifikation methylierter und unmethylierter Kontroll-DNA unter Verwendung der Restriktionsenzyme BstUI, Acil und einer Kombination aus Acil und AccII.

IV.3.2 Acil zum Nachweis der methylierten Promotorsequenzen *RUNX3*, *NEUROG1*, *SEPTIN9*, *TMEFF2*, *SDC2* und *RASSF1A*

Die Festlegung einer geeigneten Restriktionsendonuklease für die weitere methylierungsspezifische Testung der Blutspender- und Patienten-DNA erfolgte ebenfalls anhand der in Tabelle 11 dargestellten Messdaten. In einer multifaktoriellen ANOVA-Analyse wurde der Einfluss von BstUI, Acil und der Kombination Acil mit AccII auf die Ct-Mittelwerte der Negativkontrolle (unmethylierte DNA, DNA-Standard) sowie der Positivkontrolle (methylierte DNA) untersucht. Nach dem Abschluss-Test-Prinzip wurden - zur Beschreibung der Einzelabhängigkeiten der drei Testenzyme untereinander - die signifikanten Ergebnisse der ANOVA-Analyse nachfolgend einem T-Test unterzogen. Aufgrund fehlender Daten für die Enzymkombination aus Acil/AccII für *RASSF1A* erfolgte die o.g. Analyse für dieses Gen ausschließlich für BstUI und Acil. Die hier ermittelten Ergebnisse der multifaktoriellen ANOVA für lediglich zwei der drei Enzymgruppen (BstUI, Acil) entsprechen somit einem T-Test (Abbildung 10; Tabelle 12).

* statistische Signifikanz nachweisbar ($p < 0,05$)

** Ausfall der Enzymkombination Acil mit AccII für das Gen *RASSF1A*

Abbildung 10: Einfluss von BstUI, Acil und Acil/AccII auf die Ct-Mittelwerte nach PCR-Amplifikation methylierter und nicht-methylierter Kontroll-DNA ($\bar{x} \pm 95\%$ KI; $N=3-9$).

Tabelle 12: T-Test der signifikanten ANOVA-Enzyminteraktionen innerhalb der DNA-Kontrollen.

Gensequenz	Enzymkombination (Vergleiche)	nicht-methylierte DNA T-Test p-Wert	methylierte DNA T-Test p-Wert
NEUROG1	BstUI - Acil	0,0011*	0,1358
	BstUI - Acil/AccII	0,0013*	0,0584
	Acil - Acil/AccII	0,6770	0,1038
TMEFF2	BstUI - Acil	<0,001*	0,4903
	BstUI - Acil/AccII	<0,001*	0,3390
	Acil - Acil/AccII	0,9666	0,9666
SDC2	BstUI - Acil	0,0037*	0,2131
	BstUI - Acil/AccII	<0,001*	0,0088*
	Acil - Acil/AccII	0,2551	0,7529
RASSF1A**	BstUI - Acil	0,1791	0,0304*
	BstUI - Acil/AccII	-	-
	Acil - Acil/AccII	-	-
* statistische Signifikanz nachweisbar ($p < 0,05$)			
** Ausfall der Enzymkombination Acil mit AccII für das Gen <i>RASSF1A</i>			

Die ANOVA-Analyse der methylierungsspezifischen Ct-Mittelwerte der Ein-Schritt-Real-Time-PCR für *RUNX3* und *SEPTIN9* ergab sowohl für nicht-methylierte als auch methylierte Kontroll-DNA keine statistisch signifikante Überlegenheit eines der drei getesteten Enzyme (Abbildung 10). Hingegen zeigten sich für die Gensequenzen *NEUROG1* ($p_{\text{nicht-methyliert}}=0,0016$; $p_{\text{methyliert}}=0,0462$), *TMEFF2* ($p_{\text{nicht-methyliert}} < 0,001$), *SDC2* ($p_{\text{nicht-methyliert}} < 0,001$) und *RASSF1* ($p_{\text{methyliert}}=0,0304$) signifikante Messwertunterschiede zwischen BstUI, Acil und Acil/AccII in Abhängigkeit von der eingesetzten DNA-Kontrolle (Abbildung 10). Sowohl für *NEUROG1* ($p_{\text{BstUI-Acil}}=0,0011$; $p_{\text{BstUI-Acil/AccII}}=0,0013$), *TMEFF2* ($p_{\text{BstUI-Acil}} < 0,001$; $p_{\text{BstUI-Acil/AccII}} < 0,001$) als auch für *SDC2* ($p_{\text{BstUI-Acil}}=0,0037$ $p_{\text{BstUI-Acil/AccII}} < 0,001$) zeigte BstUI im T-Test - im Vergleich mit Acil und Acil/AccII - signifikant niedrigere Ct-Mittelwerte an nicht-methylierter DNA ($p < 0,05$). Hingegen war zwischen Acil und der Enzymkombination aus Acil/AccII an nicht-methylierter DNA kein signifikanter Unterschied feststellbar ($p_{\text{Neurog1}}=0,6770$; $p_{\text{TMEFF2}}=0,9666$; $p_{\text{SDC2}}=0,2551$) (Tabelle 12).

In den Experimenten an methylierter DNA zeigte sich für *SDC2* ($p=0,0088$) ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen BstUI und der Kombination aus Acil/AccII. Die Ct-Werte der BstUI-basierten Testung waren hierbei durchschnittlich niedriger als die entsprechenden Werte der Enzymkombination. Ähnliche Ergebnisse an methylierter DNA lieferte der Vergleich zwischen BstUI und Acil für *RASSF1A* ($p=0,0304$). Hierbei lagen die Ct-Mittelwerte für BstUI signifikant unter denen des Acil (Abbildung 10; Tabelle 12).

Die signifikant niedrigeren Ct-Werte unter Verwendung von BstUI - im Vergleich zu Acil mit und ohne AccII - in der Untersuchung an nicht-methylierter Kontroll-DNA für *NEUROG1*, *TMEFF2* und *SDC2* führten zum Ausschluss des BstUI für die weitere Patienten- und Blutspenderuntersuchung. Da der Zusatz von AccII zu Acil - unabhängig von der getesteten Promotor-Region - zu keiner signifikanten Veränderung der Ct-Werte führte, wurde das Restriktionsenzym Acil zur weiteren Testung der Blutspender- und Patienten-DNA ausgewählt.

IV.3.3 Validierung der methylierungsspezifischen PCR für *RUNX3*, *NEUROG1*, *SEPTIN9*, *TMEFF2*, *SDC2* und *RASSF1A* sowie für die internen Kontrollen *β -Globin* und *β -Actin*

Auf Grundlage von Verdünnungsreihen aus methylierter DNA mit bekannten Ausgangskonzentrationen konnten lineare Messbereiche für jede Promotor-Region sowie für die interne Kontrolle festgelegt werden (Abbildung 11; Abbildung 12). Definitionsgemäß war ein Variationskoeffizient (VK) von $> 10\%$ für Konzentrationen außerhalb des linearen Messbereiches charakteristisch. Innerhalb der Grenzen des Messbereiches ist eine direkte Zuordnung der ermittelten Ct-Werte zur Konzentration der eingesetzten DNA-Menge (Log-Template) möglich. Dargestellt in Tabelle 13, zeigten sich für die Gene *RUNX3* ($VK_{\text{Messbereich}} 2,79\text{-}3,62\%$), *NEUROG1* ($VK_{\text{Messbereich}} 3,33\text{-}5,16\%$), *SEPTIN9* ($VK_{\text{Messbereich}} 1,23\text{-}5,56\%$), *TMEFF2* ($VK_{\text{Messbereich}} 0,91\text{-}4,57\%$), *SDC2* ($VK_{\text{Messbereich}} 2,28\text{-}5,40\%$) und *RASSF1A* ($VK_{\text{Messbereich}} 0,68\text{-}6,72\%$) niedrige Variationskoeffizienten von $< 10\%$ und damit eine moderate Abweichung der Messwerte von der linearen Standardkurve. Diese geringe Abweichung anhand des VK konnte auch für die interne Kontrolle *β -Globin* ($VK_{\text{Verdünnungsstufe 2-4}} 0,22\text{-}0,84$) beobachtet werden. Das unmethylierte Referenzgen *β -Actin* als Indikator für eine ausreichende Funktion der Restriktionsenzyme wurde in sämtlichen Testläufen erwartungsgemäß nicht amplifiziert (Ct=50). Anhand der VK ist somit für das PCR-Verfahren genabhängig eine akzeptable Präzision ($VK \leq 10\%$) darstellbar.

Für die tumorspezifischen Promotor-Regionen sowie für *β -Globin* konnten außerdem PCR-Effizienzen von 49-92 % beschrieben werden. Die 50 %- sowie 95 %-Nachweisgrenzen lagen nach Probit-Analyse der Messdaten aus den Verdünnungsreihen bei 34 pg/ μ l und 369 pg/ μ l für *RUNX3*, bei 51 pg/ μ l und 215 pg/ μ l für *NEUROG1*, bei 16 pg/ μ l und 22 pg/ μ l für *SEPTIN9*, bei 20 pg/ μ l und 28 pg/ μ l für *TMEFF2*, bei 14 pg/ μ l und 71 pg/ μ l für *SDC2* sowie bei 3 pg/ μ l und 5 pg/ μ l für *RASSF1A*. Für *β -Globin* konnten aus der zweiten Titration - ohne den Zusatz einer Negativkontrolle - 50 %- und 95 %-Nachweisgrenzen von 15 pg/ μ l und 21 pg/ μ l beschrieben werden.

.

Abbildung 11: Messbereich der methylierungsspezifischen Ein-Schritt-Real-Time-PCR für *β-Globin*.

Abbildung 12: Messbereiche der methylierungsspezifischen Ein-Schritt-Real-Time-PCR für die einzelnen Promotor-Regionen.

Tabelle 13: Variationskoeffizient (VK) zur Ermittlung der genspezifischen Messbereiche.

Gensequenz	DNA Konzentration Messbereich [pg/μl]	DNA Menge Messbereich [pg/PCR]**	VK* für Messbereich in %	untere Grenze Messbereich [pg/PCR]	VK für untere Grenze Messbereich in %	PCR Effizienz $E=10^{-1/m}-1$
<i>RUNX3</i>	80-10000	640-80000	2,79-3,62	640	3,27	71 %
<i>NEUROG1</i>	80-10000	640-80000	3,33-5,16	640	4,91	55 %
<i>SEPTIN9</i>	16-10000	128-80000	1,23-5,56	128	5,56	54 %
<i>TMEFF2</i>	80-10000	640-80000	0,91-4,57	640	4,57	68 %
<i>SDC2</i>	16-10000	128-80000	2,28-5,40	128	5,40	64 %
<i>RASSF1A</i>	3,2-10000	26-80000	0,68-6,72	26	5,72	49 %
<i>β-Globin</i>	3,2-10000	26-80000***	0,22-1,23	26	1,23	93 %

* VK Variationskoeffizient, ausreichende Präzision bei $VK \leq 10\%$

** 8 μl DNA-Template-Mix davon 6 μl methylierte DNA und 2 μl unmethylierte DNA-Kontrolle

*** Verdünnungsreihe für *β-Globin* mit 8 μl methylierter DNA ohne unmethylierte DNA-Kontrolle als Backgroundsignal

IV.3.4 Vergleich von EDTA-Plasma und Serum als Ausgangsmaterial für die methylierungsspezifische Ein-Schritt-Real-Time-PCR

Ein Vergleich der Untersuchungsmaterialien EDTA-Plasma und Serum wurde exemplarisch an drei Plasma- sowie Serum-Patientenproben durchgeführt (siehe Kapitel III.6.3.). Nach Isolation der DNA aus 1 ml Plasma und Serum wurden die Methylierungseigenschaften der Gensequenzen *RUNX3*, *NEUROG1*, *SEPTIN9*, *TMEFF2* und *SDC2* ermittelt. Aufgrund des nur in sehr limitierter Menge verfügbaren Materials erfolgte die methylierungsspezifische Messung in Einfachbestimmung mit interner Kontrolle (Multiplex-PCR) (Abbildung 13).

Abbildung 13: Ct-Mittelwerte ($\bar{x} \pm 95\%$ KI; N=3) der Ein-Schritt-Real-Time-PCR an Patientenplasma und Patientenserum im Vergleich.

Für *NEUROG1* wurden an DNA aus EDTA-Plasma signifikant niedrigere Ct-Werte beobachtet als an DNA aus Serum ($p=0,0381$). Für die übrigen Gene *RUNX3*, *SEPTIN9*, *TMEFF2* sowie *SDC2* konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. Resultierend aus diesen Erkenntnissen wurden weiterführende Untersuchungen an Patienten- und Spenderproben mit DNA-Isolaten aus EDTA-Plasma durchgeführt.

IV.4 Diagnostische Spezifität und Sensitivität der methylierungsspezifischen Ein-Schritt-Real-Time-PCR aus Blutspender- und Patienten-DNA unter Verwendung interner Kontrollreaktionen

Die Ermittlung eines Cut-Off-Ct-Wertes (Grenzwert) für jede Promotor-Region erfolgte anhand von Messdaten aus der PCR an Blutspender-DNA. Anschließend wurden diese Grenzwerte auf die PCR-Messdaten der Tumorzelllinien-DNA HT-29 und CACO-2 sowie auf die Messergebnisse der - in jedem PCR-Lauf der Spender- und Patientenanalyse - eingesetzten RUN-Kontrollen (nicht-methylierte und methylierte DNA) angewandt. Dieses Vorgehen erfolgte, um die Plausibilität der Cut-Off-Ct-Werte an kommerziellen Kontrollproben zu überprüfen (Tabelle 14). In diesem Zusammenhang wurde außerdem der Einfluss des internen Referenzgens *β-Globin* auf die genspezifischen Ct-Messwerte untersucht. Abschließend wurde die Sensitivität und Spezifität der methylierungsspezifischen Ein-Schritt-Real-Time-PCR für jedes Gen an Blutspender- und Patientenproben ermittelt.

IV.4.1 Ermittlung genspezifischer Cut-Off-Ct-Werte für die methylierungsspezifische Ein-Schritt-Real-Time-PCR anhand der DNA gesunder Blutspender

Die Festlegung der methylierungsabhängigen Ct-Grenzwerte für jede Promotor-Region erfolgte unter der Bedingung, dass jede Gensequenz eine möglichst niedrige Anzahl falsch-positiver Messungen und damit eine optimale Spezifität erreicht. Unter dieser Voraussetzung wurde die 95 %-Perzentil-Methode (95 %-Cut-Off) auf die Ct-Mittelwerte einer in Doppelbestimmung durchgeführten Multiplex-PCR an DNA von Blut Spendern (N=24) angewandt. Ct-Werte oberhalb oder gleich dem Grenzwert wurden als negativ, alle Ct-Werte unterhalb des Grenzwertes wurden als positiv gewertet. Eine vergleichende Cut-Off-Bestimmung mittels einer genindividuellen ROC-Analyse war an dieser Stelle, im Hinblick auf eine möglichst hohe diagnostische Spezifität und damit einer möglichst geringen Rate falsch-positiver Messergebnisse, dem 95 %-Cut-Off unterlegen. Im Einzelnen ergaben sich Ct-Grenzwerte für *RUNX3* von 40, für *NEUROG1* von 34, für *SEPTIN9* von 46, für *TMEFF2* und *SDC2* von jeweils 36 und für *RASSF1A* von 45 (siehe III.7; Tabelle 14).

IV.4.2 Anwendung genspezifischer Ct-Grenzwerte auf negative und positive RUN-Kontrollen sowie auf die DNA der Tumorzelllinien HT-29 und CACO-2

Tabelle 14: Methylierungseigenschaften der Gensequenzen auf nicht-methylierte und methylierte DNA in PCR-RUN-Kontrollen sowie auf DNA aus den Tumorzelllinien HT-29 und CACO-2.

Gensequenz	Cut-Off-Ct-Wert und Bewertung des Methylierungsstatus	Negativkontrolle (Human Genomic DNA) [870 µg/PCR]		Positivkontrolle (CP Genome™) [2000 pg/PCR]		HT-29 [2000 pg/PCR]	CACO-2 [2000 pg/PCR]
		mit interner Kontrolle Ct-Mittel ± SD (N _{Ct-Werte} = 23) ¹⁾	ohne interne Kontrolle Ct-Mittel ± SD (N _{Ct-Werte} = 13) ¹⁾	mit interner Kontrolle Ct-Mittel ± SD (N _{Ct-Werte} = 23) ^{1) 2)}	ohne interne Kontrolle Ct-Mittel ± SD (N _{Ct-Werte} = 13) ^{1) 2)}	mit interner Kontrolle Ct-Mittel ± SD (N _{Ct-Werte} = 3)	
RUNX3	40	49,10 ± 2,16	49,07 ± 2,19	39,66 ± 2,73	38,63 ± 0,70	39,93 ± 1,63	48,02 ± 3,42
	Methylierungsstatus*	-	-	+	+	+	-
NEUROG1	34	45,38 ± 2,45	41,35 ± 1,09	35,38 ± 1,53	36,21 ± 0,34	43,09 ± 1,79	42,05 ± 1,76
	Methylierungsstatus*	-	-	-	-	-	-
SEPTIN9	46	49,63 ± 1,78	49,39 ± 2,18	35,00 ± 0,91	35,85 ± 0,39	36,56 ± 0,46	40,02 ± 0,41
	Methylierungsstatus*	-	-	+	+	+	+
TMEFF2	36	45,37 ± 3,08	45,22 ± 3,39	34,35 ± 1,47	35,99 ± 0,90	43,46 ± 4,30	38,66 ± 0,57
	Methylierungsstatus*	-	-	+	+	-	-
SDC2	36	46,47 ± 4,73	45,93 ± 5,40	31,31 ± 1,13	31,88 ± 0,57	36,09 ± 0,10	38,97 ± 1,12
	Methylierungsstatus*	-	-	+	+	-	-
RASSF1A	45	50,00 ± 0,00	50,00 ± 0,00	35,17 ± 0,87	37,26 ± 0,47	50,00 ± 0,00	44,33 ± 2,23
	Methylierungsstatus*	-	-	+	+	-	+

¹⁾ Ct-Mittelwert für *RASSF1A* mit β -Globin-Kontrolle (N = 18) und ohne β -Globin-Kontrolle (N = 8)

²⁾ Ct-Mittelwert für *SEPTIN9* mit β -Globin-Kontrolle (N = 17) und ohne β -Globin-Kontrolle (N = 9)

* "-" nicht-methyliert/ unmethyliert (negativ); "+" methyliert (positiv)

Für die Negativkontrolle konnte unter Berücksichtigung des genindividuellen Grenzwertes und unabhängig vom Einsatz einer internen Kontrolle für keine der Gensequenzen eine Promotormethylierung nachgewiesen werden. Für die Positivkontrolle hingegen wurden, außer für das *NEUROG1*-Gen, methylierungs-positive Ct-Mittelwerte für alle Promotor-Regionen beobachtet. Sowohl die Ct-Mittelwerte der Negativ- als auch der Positivkontrolle - jeweils aus Ansätzen mit und ohne interne Referenz-Kontrolle - wurden einem internen zweiseitig-gepaarten T-Test unterzogen. Für die Negativkontrolle zeigte sich hierbei lediglich für *NEUROG1* ($p < 0,001$) ein signifikant höherer Ct-Mittelwert für den Ansatz mit gegenüber dem Ansatz ohne interne Kontrolle. Für die anderen Promotor-Regionen wurden diesbezüglich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Ansätzen beobachtet ($p < 0,025$, Korrektur nach Bonferroni). Bei den Positivkontrollen waren wiederum für *NEUROG1* ($p < 0,001$), *TMEFF2* ($p < 0,001$), *SDC2* ($p < 0,001$) und *RASSF1A* ($p < 0,01$) die Ct-Mittelwerte mit interner Kontrolle signifikant niedriger als die Ct-Mittelwerte des Ansatzes ohne interne Kontrolle. Für *RUNX3* und *SEPTIN9* konnten hingegen auch für die Positivkontrolle keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Ansätzen beschrieben werden ($p < 0,025$). Auf Grundlage der dargestellten Ergebnisse war festzustellen, dass durch den Einsatz einer internen Kontrolle im Rahmen einer Multiplex-PCR die genspezifischen Ct-Mittelwerte für *NEUROG1*, *TMEFF2*, *SDC2* und *RASSF1A* positiv beeinflusst wurden, da hierdurch der jeweilige Signal-Rausch-Abstand zwischen Negativ- und Positivkontrolle erhöht wurde. Für *RUNX3* und *SEPTIN9* ergab sich darüber hinaus kein Hinweis für eine negative Beeinflussung der Ct-Werte durch den Einsatz einer internen Kontrolle. Somit erfolgte die Verwendung der internen Referenzgen-Kontrolle im Rahmen eines Multiplex-Ansatzes auch für die weitere Analyse der Patientengewebe-DNA.

Die Testung der Gensequenzen an den Tumorzelllinien-DNA HT-29 und CACO-2 erfolgte ausschließlich als Multiplex-PCR unter Einsatz des β -Globin sowie des β -Actin (interne Kontrolle). Die hier erhobenen PCR-Messergebnisse waren hinsichtlich detektierbarer genspezifischer Promotormethylierungen in den Nukleinsäuren der Tumorzelllinien heterogen. So konnte bei HT-29 und CACO-2 unter Berücksichtigung der genindividuellen Cut-Off-Werte, jeweils für vier von sechs Gensequenzen keine Promotormethylierung nachgewiesen werden. Eine Promotormethylierung von *SEPTIN9* war hingegen übereinstimmend in beiden Zelllinien nachweisbar (Tabelle 14).

IV.4.3 Diagnostische Spezifität und Sensitivität der methylierungsspezifischen Ein-Schritt-Real-Time-PCR

Die Ermittlung der diagnostischen Spezifität erfolgte anhand der Daten aus der PCR-Amplifikation der Blutspender-DNA (Tabelle 15; Tabelle 16). Hierzu wurden die Ct-Mittelwerte (Ct₁ und Ct₂) der in Doppelbestimmung durchgeführten methylierungsspezifischen Multiplex-PCR dieser Analyse verwendet. Es erfolgte eine qualitative Bewertung dieser Ct-Mittelwerte - anhand der genspezifischen Grenzwerte - in positive (methylierte) und negative (nicht-methylierte) Messergebnisse (Tabelle 14). Eine zweite qualitative Beurteilung der Messdaten wurde separat für die jeweils erstdetektierten Ct₁-Werte als Modell einer PCR-Einfachbestimmung vorgenommen. Auf diese Weise wurden für jedes Gen zwei Werte für die diagnostische Spezifität des Verfahrens ermittelt.

Die Ermittlung der genspezifischen diagnostischen Sensitivitäten wurde zunächst an Tumorgewebe-DNA in Doppelbestimmung und dann an Patientenplasma-DNA in Einfachbestimmung durchgeführt, da für die genannte Untersuchung an Plasma nicht ausreichend Ausgangsmaterial zur Verfügung stand. Für die Tumorgewebe-Analyse war hingegen die Berechnung zweier Sensitivitäten möglich, welche sich jeweils aus dem Ct-Mittelwert der Doppelbestimmung sowie aus den Ct₁-Einzelwerten ergaben (Tabelle 15).

Tabelle 15: Diagnostische Spezifität und Sensitivität der Ein-Schritt-Real-Time-PCR aus Blutspender- und Tumorgewebe-DNA unter Einsatz einer internen β -Globin-Kontrolle.

Gen		Sensitivität ¹⁾	Spezifität ²⁾	Cut-Off-Ct	N _{positiv} / N _{Patient}	N _{negativ} / N _{Spender}
RUNX3		87 %	100 %	40	20/23	24/24
RUNX3 ³⁾		87 %	96 %	40	20/23	23/24
NEUROG1		9 %	96 %	34	2/23	23/24
NEUROG1 ³⁾		13 %	96 %	34	3/23	23/24
SEPTIN9		100 %	96 %	46	23/23	23/24
SEPTIN9 ³⁾		100 %	92 %	46	23/23	22/24
TMEFF2		91 %	96 %	36	21/23	23/24
TMEFF2 ³⁾		87 %	96 %	36	20/23	23/24
SDC2		87 %	100 %	36	20/23	24/24
SDC2 ³⁾		87 %	92 %	36	20/23	22/24
RASSF1A		35 %	100 %	45	8/23	24/24
RASSF1A ³⁾		35 %	88 %	45	8/23	21/24
Markerpanel	RUNX3 SEPTIN9 SDC2	100 %	96 %	40 46 36	23/23	23/24
	RUNX3 SEPTIN9 SDC2 ³⁾	100 %	79 %	40 46 36	23/23	19/24

¹⁾ DNA aus Tumorgewebeproben von 23 Rektumkarzinom-Patienten

²⁾ DNA aus Plasmaproben von insgesamt 48 Blutspendern

³⁾ Spezifität und Sensitivität aus Ct₁-Werten entsprechend einer PCR-Einfachbestimmung

Die Ein-Schritt-Real-Time-PCR aus Patientenplasma-DNA erfolgte unter der Annahme, dass gegenüber dem Tumorgewebe-Isolat im EDTA-Plasma eine deutlich niedrigere Konzentration potentiell methylierter Tumor-DNA detektierbar ist. Somit musste auch für dieses Material das Risiko einer Beeinflussung der methylierungsspezifischen PCR durch interne Kontrollen abgeschätzt werden, um zwischen Patientenprobe und der Kontrollprobe (Blutspender-DNA) einen günstigen Signal-Rausch-Abstand zu erhalten (siehe IV.4.2). Aus diesem Grund wurde die PCR an Patientenplasma-DNA jeweils in Einfachbestimmung an einem Duplex (ohne β -Globin-Kontrolle)- sowie einem Multiplex-Ansatz (mit β -Globin-Kontrolle) durchgeführt. Diese PCR-Messdaten wurden im Anschluss in einem zweiseitig-gepaarter T-Test miteinander verglichen. Unter Anpassung des Signifikanzniveaus nach Bonferroni auf $p < 0,025$ zeigten sich hier ausschließlich für *RUNX3* ($p = 0,0072$) signifikant höhere Ct-Werte in der Multiplex- gegenüber der Duplex-PCR und damit ein tendenziell geringerer Signal-Rausch-Abstand zur Blutspender-Kontrolle unter Einsatz von β -Globin. Für *NEUROG1* ($p = 0,1206$), *SEPTIN9* ($p = 0,1045$), *TMEFF2* ($p = 0,1850$) und *SDC2* ($p = 0,1131$) ergaben sich hingegen keine signifikanten Ct-Wert-Unterschiede ($p < 0,025$) zwischen den o.g. Ansätzen, so dass insgesamt die Messdaten der Multiplex-PCR unter Einsatz der internen Kontrolle für eine nachfolgende Ermittlung der diagnostischen Sensitivität aus Patientenplasma-DNA herangezogen wurden (Tabelle 16). Gegenüberstellend erfolgte dennoch - neben der Darstellung der Sensitivitäten aus der Multiplex-PCR - die Präsentation der ermittelten genspezifischen Sensitivitäten aus den Ct-Werten der Duplex-PCR ohne interne Kontrolle in Abhängigkeit des zugehörigen Cut-Offs (Tabelle 16). Diese Cut-Off-Ct-Werte sowie die entsprechenden Spezifitäten wurden für jedes Gen aus dem zugehörigen Duplex-Ansatz (ohne β -Globin) der Blutspender-DNA-Testung ermittelt (Tabelle 16). Vergleichend zeigten sich jeweils Sensitivitäten und Spezifitäten aus der Multiplex-PCR und der Duplex-PCR für *RUNX3* von 20 % und 100 % (Multiplex) versus 20 % und 92 % (Duplex), für *NEUROG1* von 12 % und 96 % vs. 28 % und 100 %, für *SEPTIN9* von 53 % und 96 % vs. 27 % und 100 %, für *TMEFF2* von 16 % und 96 % vs. 20 % und 96 % sowie für *SDC2* von 56 % und 100 % vs. 32 % und 100 %.

Nach Betrachtung unterschiedlicher Kombinationen der Methylierungsmarker ergab sich aus der Untersuchung der Tumorgewebe-DNA in Verbindung mit der Blutspenderplasma-DNA für die Kombination von *RUNX3*, *SEPTIN9* und *SDC2* eine Sensitivität von 100 %. Die ermittelte Spezifität des Panels lag in diesem Fall bei > 95 % (Tabelle 15). Für dieses Markerpanel erfolgte daher ebenfalls die Ermittlung der entsprechenden Sensitivität und Spezifität aus der Analyse der Patienten- und Blutspenderplasma-DNA. Dieser Sachverhalt wurde nachfolgend in Tabelle 16 zusammengefasst. Für die Untersuchung dieses diagnostischen Markerpanels wurden erneut Multiplex- und Duplexansätze einander gegenübergestellt (Tabelle 16).

Tabelle 16: Diagnostische Spezifität und Sensitivität der methylierungsspezifischen Ein-Schritt-Real-Time-PCR aus Blutspender- und Patientenplasma-DNA mit und ohne interne β -Globin-Kontrolle.

Gen		Sensitivität ¹⁾	Spezifität ²⁾	Cut-Off-Ct	N _{positiv} / N _{Patient}	N _{negativ} / N _{Spender}
<i>RUNX3</i> ³⁾		20 %	100 %	40	5/25	24/24
<i>RUNX3</i> ⁴⁾		20 %	92 %	39	5/25	22/24
<i>NEUROG1</i> ³⁾		12 %	96 %	34	3/25	23/24
<i>NEUROG1</i> ⁴⁾		28 %	100 %	35	7/25	24/24
<i>SEPTIN9</i> ^{3) 5)}		53 %	96 %	46	8/15	23/24
<i>SEPTIN9</i> ^{4) 5)}		27 %	100 %	45	4/15	24/24
<i>TMEFF2</i> ³⁾		16 %	96 %	36	4/25	23/24
<i>TMEFF2</i> ⁴⁾		20 %	96 %	36	5/25	23/24
<i>SDC2</i> ³⁾		56 %	100 %	36	14/25	24/24
<i>SDC2</i> ⁴⁾		32 %	100 %	35	8/25	24/24
Markerpanel	<i>RUNX3</i> <i>SEPTIN9</i> <i>SDC2</i> ^{3) 5)}	73 %	96 %	40 46 36	11/15	23/24
	<i>RUNX3</i> <i>SEPTIN9</i> <i>SDC2</i> ^{4) 5)}			39 45 35		
		53 %	92 %		8/15	22/24

¹⁾ DNA aus Plasmaproben von 25 Rektumkarzinom-Patienten, Sensitivität aus PCR-Einfachbestimmung

²⁾ DNA aus Plasmaproben von insgesamt 48 Blutspendern, Spezifität aus PCR-Doppelbestimmung

³⁾ Sensitivität und Spezifität aus Multiplex-PCR unter Einsatz der internen Kontrollen β -Globin und β -Actin

⁴⁾ Sensitivität und Spezifität aus Duplex-PCR ohne Einsatz der internen β -Globin-Kontrolle

⁵⁾ keine Werte für 10 Patientenproben aufgrund fehlerhafter *SEPTIN9*-PCR

IV.4.4 Methylierungsspezifische Multiplex-PCR für *RUNX3*

¹⁾ PCR-Doppelbestimmung ²⁾ PCR-Einfachbestimmung

Abbildung 14: Scatterplot der Ct-Messwerte des *RUNX3* für die getesteten DNA-Proben.

Für *RUNX3* ergab die Ct-Mittelwertanalyse der in Doppelbestimmung durchgeführten Multiplex-PCR (mit β -Globin und β -Actin) an Blutspender-DNA-Proben (N=24) eine Spezifität von 100 %, wobei 24 von 24 Proben korrekt als negativ erkannt wurden. In der nachfolgenden Betrachtung der Ct-Werte nach Einfachbestimmung (Ct₁) war eine der 24 Blutspenderproben als falsch-positiv zu werten, was einer Spezifität von 96 % entsprach (Abbildung 14).

Die gleichfalls in Doppelbestimmung durchgeführte methylierungsspezifische PCR des *RUNX3* an Tumorgewebe-DNA zeigte für die Ct-Mittelwerte in 20 von 23 Patientenproben nachweisbare Promotormethylierungen und damit eine Sensitivität von 87 % (Tabelle 15). Die Auswertung der Ct₁-Einfachbestimmung führte zum gleichen Ergebnis. Bei der Untersuchung von Patientenplasma in Einfachbestimmung wurde bei fünf von 25 Patienten eine Hypermethylierung von *RUNX3* nachgewiesen, so dass sich eine diagnostische Sensitivität von 20 % für diesen Biomarker ergab (Tabelle 16).

IV.4.5 Methylierungsspezifische Multiplex-PCR für *NEUROG1*

¹⁾ PCR-Doppelbestimmung ²⁾ PCR-Einfachbestimmung

Abbildung 15: Scatterplot der Ct-Messwerte des *NEUROG1* für die getesteten DNA-Proben.

Für die PCR-Doppelbestimmung von *NEUROG1* an Blutspender-DNA wurden 23 von 24 DNA-Proben anhand des Ct-Mittelwertes als negativ klassifiziert, was einer Spezifität von 96 % entsprach. Für die Einfachbestimmung aus dem jeweils erstgenerierten Ct-Messwert (Ct_1) ergab sich bei einem falsch-positiven Ergebnis ebenfalls eine Spezifität von 96 % (Abbildung 15).

Die für *NEUROG1* in Doppelbestimmung generierten Ct-Mittelwerte der Analyse von Patientengewebe-DNA zeigten insgesamt für zwei der 23 Proben eine Hypermethylierung (Sensitivität 9 %). Die ermittelte Sensitivität aus der Ct_1 -Einfachbestimmung lag mit 13 % - bei detektierten Hypermethylierungen in drei von 23 Patientenproben - geringfügig über der Sensitivität der Doppelbestimmung (Tabelle 15). In der nachfolgend in Einfachbestimmung durchgeführten *NEUROG1*-PCR an Patientenplasma-DNA konnten bei drei von 25 Proben entsprechende Promotormethylierungen nachgewiesen werden (Sensitivität 12 %) (Tabelle 16). Hierbei bestand jedoch keine Übereinstimmung zu den Patienten (zwei von 23), in deren Tumorgewebe-DNA bereits eine Hypermethylierung nachgewiesen werden konnte.

IV.4.6 Methylierungsspezifische Multiplex-PCR für *SEPTIN9*

¹⁾ PCR-Doppelbestimmung ²⁾ PCR-Einfachbestimmung

Abbildung 16: Scatterplot der Ct-Messwerte des *SEPTIN9* für die getesteten DNA-Proben.

Für *SEPTIN9* konnte aus den in Abbildung 16 dargestellten Ct-Mittelwerten der PCR-Doppelbestimmung an Blutspender-DNA eine Spezifität von 96 % bei Vorliegen einer falsch-positiven Probe ermittelt werden. Die Auswertung der PCR-Einfachbestimmung (Ct₁) zeigte hingegen für zwei der 24 Blutspender-Proben falsch-positive Ergebnisse (Spezifität 92 %). Die in Doppelbestimmung durchgeführte methylierungsspezifische *SEPTIN9*-PCR an Tumorgewebe-DNA konnte in 23 von 23 Proben eine Hypermethylierung nachweisen (Sensitivität 100 %). Die Auswertung der Ct₁-Einfachbestimmung an Tumorgewebe-DNA ergab ebenfalls eine Sensitivität von 100% (Tabelle 15). In der Untersuchung der Patientenplasma-DNA zeigten acht von 15 untersuchten Proben eine Hypermethylierung von *SEPTIN9* (Sensitivität 53 %). Bei weiteren zehn der insgesamt 25 Plasma-DNA-Proben konnten hingegen keine validen Untersuchungsergebnisse erzielt werden, da in den diesbezüglichen Testläufen die negativen RUN-Kontrollen auf fehlerhafte Untersuchungsbedingungen hinwiesen und weiteres Material zur Wiederholung des Experimentes nicht zur Verfügung stand (Tabelle 16).

IV.4.7 Methylierungsspezifische Multiplex-PCR für *TMEFF2*

¹⁾ PCR-Doppelbestimmung ²⁾ PCR-Einfachbestimmung

Abbildung 17: Scatterplot der Ct-Messwerte des *TMEFF2* für die getesteten DNA-Proben.

Die in Doppelbestimmung durchgeführte methylierungsspezifische PCR von *TMEFF2* an Blutspender-DNA ergab in 23 von 24 Fällen negative Ergebnisse (Abbildung 17). Dies entsprach einer Spezifität von 96 %. Die Analyse der Einfachbestimmung (Ct₁) zeigte bei einem falsch-positiven Messergebnis ebenfalls eine Spezifität von 96 %.

Aus der PCR-Doppelbestimmung an Tumorgewebe-DNA konnte anhand der CT-Mittelwerte eine Sensitivität von 91 % bei 21 von 23 positiven Proben ermittelt werden. Für die Ct₁-Einfachdetektion an Tumorgewebe-DNA zeigten wiederum 20 von 23 Proben richtig positive Ergebnisse (Sensitivität 87 %) (Tabelle 15). Die PCR-Einfachbestimmung für die Patientenplasma-DNA ergab für vier von 25 Plasma-DNA-Proben einen positiven Methylierungsstatus und damit eine genspezifische Sensitivität von 16 % (Tabelle 16).

IV.4.8 Methylierungsspezifische Multiplex-PCR für *SDC2*

¹⁾ PCR-Doppelbestimmung ²⁾ PCR-Einfachbestimmung

Abbildung 18: Scatterplot der Ct-Messwerte des *SDC2* für die getesteten DNA-Proben.

Die für *SDC2* erfolgte PCR-Doppelbestimmung an Blutspender-DNA-Proben ergab unter Berücksichtigung des genspezifischen Cut-Offs für 24 von 24 Proben ein negatives Testergebnis und damit eine Spezifität von 100 % (Abbildung 18). Für die PCR-Einfachbestimmung aus den Ct₁-Werten waren hingegen zwei von 24 Spenderproben als falsch-positiv einzuordnen, was die Spezifität auf 92 % reduzierte.

Aus den Ct-Mittelwerten der PCR-Doppelbestimmung des *SDC2* an Tumorgewebe-DNA konnte für 20 der 23 Proben ein positives Ergebnis ermittelt werden. Mit 20 von 23 positiven methylierungsspezifischen Ergebnissen zeigte auch die Analyse der Ct₁-Einzelwerte die gleiche Sensitivität von 87% (Tabelle 15). Für die Detektion entsprechender Promotor-hypermethylierungen aus der Patientenplasma-DNA mittels PCR-Einfachbestimmung wurde eine diagnostische Sensitivität von 56 % ermittelt. 14 von 25 Plasmaproben zeigten hierbei ein positives Testergebnis (Tabelle 16).

IV.4.9 Methylierungsspezifische Multiplex-PCR für *RASSF1A*

¹⁾ PCR-Doppelbestimmung ²⁾ PCR-Einfachbestimmung

Abbildung 19: Scatterplot der Ct-Messwerte des *RASSF1A* für die getesteten DNA-Proben.

Für *RASSF1A* ergab die Auswertung der Ct-Mittelwerte der methylierungsspezifischen PCR-Doppelbestimmung anhand des Cut-Off-Ct-Mittelwertes für 24 der 24 Blutspender negative Ergebnisse und damit eine Spezifität von 100 % (Abbildung 19). Dies konnte in der PCR-Einfachbestimmung (Ct_1) nicht bestätigt werden. Hier zeigten drei der 24 Blutspender-Proben falsch-positive Testergebnisse, was einer Spezifität von 88 % entsprach.

Für die PCR-Doppelbestimmung aus Tumorgewebe-DNA lag die Sensitivität von *RASSF1A* bei 35 %, acht von 23 Proben waren hier positiv. Die Auswertung der Ct_1 -Einfachbestimmung an Tumorgewebe-DNA zeigte das gleiche Ergebnis (Sensitivität 35 %) (Tabelle 15). Auf die Durchführung einer methylierungsspezifischen Ein-Schritt-Real-Time-PCR von *RASSF1A* an Patientenplasma-DNA wurde im Rahmen dieser Studie verzichtet. Die geringere Rate detektierbarer Hypermethylierungen von *RASSF1A* im Tumorgewebe sowie die begrenzte Menge an verfügbarem DNA-Material waren die Gründe für diese Entscheidung. Vergleichbare Studien wiesen *RASSF1A* darüber hinaus als primären epigenetischen Gewebemarker aus, wodurch sich der Verzicht auf eine *RASSF1A*-PCR an Blutplasma zusätzlich begründen ließ (Brandes et al. 2005; Frigola et al. 2005; Sakamoto et al. 2004).

IV.4.10 Methylierungsspezifische Multiplex-PCR für das diagnostische Panel aus *RUNX3*, *SEPTIN9* und *SDC2*

Abschließend wurden die Ct-Messwerte der Gensequenzen *RUNX3*, *SEPTIN9* und *SDC2* an der Blutspender-, der Tumorgewebe-, sowie der Patientenplasma-DNA in Zusammenschau eines diagnostischen Markerpanels ausgewertet. Für die Analyse der Blutspender- sowie der Patientenplasma-DNA erfolgte zunächst die qualitative Einordnung der Ct-Mittel- und Ct-Einzelwerte - für jedes Gen separat und entsprechend den genspezifischen Grenzwerten - in positive und negative Messdaten. Anschließend wurde jede einzelne Patientenplasma-DNA-Probe entsprechend dem detektierten Methylierungsstatus jedes Panel-Gens bewertet. Dabei wurde eine Patientenprobe als positiv gewertet, wenn sie anhand mindestens einer der drei getesteten Gensequenzen des Panels positiv war. Somit ergab sich für das genannte Plasma-DNA-Markerpanel aus den Ct-Mittelwerten der Blutspender-DNA eine Spezifität von 96 %. Lediglich eine von 24 Proben war hierbei als falsch-positiv zu bewerten (Tabelle 16). Betrachtet man wiederum - analog dem Vorgehen bei den Einzelgenanalysen - nur die Ct₁-Werte im Sinne einer Einfachbestimmung, so zeigte sich eine verminderte Spezifität für das genannte Panel von 79 % bei fünf von 24 falsch-positiven Proben. Die diagnostische Sensitivität für die Panel-PCR in Doppel- sowie in Einfachbestimmung aus 23 Patientengewebe-DNA-Proben betrug 100 % (Tabelle 15). Unter Berücksichtigung des jeweiligen genspezifischen Cut-Offs zeigte die methylierungsspezifische PCR-Einfachbestimmung für das genannte Markerpanel an Patientenplasma-DNA für elf von insgesamt 15 Proben ein positives Ergebnis. Somit ergab sich eine diagnostische Sensitivität von 73 % (Tabelle 15; Tabelle 16). Zehn Patientenplasmaproben konnten hingegen aufgrund fehlerhafter Untersuchungsbedingungen in der *SEPTIN9*-PCR auch für *RUNX3* und *SDC2* nicht berücksichtigt werden (siehe IV.4.6).

IV.4.11 Korrelation der Ergebnisse von *RUNX3*, *SEPTIN9* und *SDC2* mit dem Tumorstadium nach Radio-Chemotherapie

Bei 15 Patienten lagen Messergebnisse für *RUNX3*, *SEPTIN9* und *SDC2* vor. Nach Abschluss der neoadjuvanten Radio-Chemotherapie konnte anhand vorliegender Informationen der KFO 179 für sechs dieser Patienten ein pUICC-Stadium I festgestellt werden. Den übrigen neun Patienten wurde nach RCT ein pUICC-Stadium II-IV zugeordnet. Die an prätherapeutischen Patientenplasmaanalysen erhobenen Grenzwerte für die Prognose eines Stadium I - welche durch ROC-Analyse ermittelt und auf den nächsten ganzzahligen Ct-Wert abgerundet wurden - lagen bei 40 (*RUNX3*), 42 (*SEPTIN9*) und 36 (*SDC2*) (Abbildung 20). Die Korrelation einer Überschreitung dieser Grenzwerte bei allen Panel-Markern und dem Vorliegen eines UICC-Stadiums I nach RCT war dabei statistisch signifikant ($p=0,025$, χ^2 -Test) (Tabelle 17).

Abbildung 20: Vergleich prätherapeutisch erhobener Ct-Werte für *RUNX3*, *SEPTIN9* und *SDC2* in Abhängigkeit vom pUICC-Stadium nach RCT.

Tabelle 17: Methylierungsstatus des Biomarker-Panel *RUNX3-SEPTIN9-SDC2* in Abhängigkeit vom pUICC-Stadium nach RCT.

pUICC-Stadium	<i>RUNX3-SEPTIN9-SDC2</i>	
	positiv	negativ
pUICC I	2	4
pUICC II-IV	8	1

V. Diskussion

Kolorektale Karzinome - und speziell die Tumoren des Rektums mit 60 % die Hauptlokalisation – gehören zu den häufigsten Krebsarten weltweit (Bray et al. 2013; Ferlay et al. 2013). Etwa 25 % der Ersterkrankten werden aufgrund fehlender Frühsymptome erst in einem bereits fortgeschrittenen beziehungsweise metastasierten Tumorstadium diagnostiziert (Majumdar et al. 1999; Staeber 2013). Dennoch konnte zwischen 2000 und 2012 weltweit ein stetiger Rückgang der Inzidenz- und Sterberaten des KRK verzeichnet werden (Bray et al. 2013; Ferlay et al. 2013; Kaatsch et al. 2013; Siegel et al. 2013). Diese Entwicklung scheint unmittelbar mit der Einführung effektiver Vorsorge- und Screening-Programme in Verbindung zu stehen. So zeigte eine Studie von Brenner et al. (2010), dass bereits acht Jahre nach Etablierung der Darmkrebsvorsorge als Krankenversicherungsregelleistung in Deutschland etwa 300.000 präkanzeröse Adenome sowie 50.000 asymptomatische Frühstadien eines KRK diagnostiziert werden konnten. Zudem wurde durch die Vorsorgemaßnahmen für etwa 100.000 Patienten zwischen 55-84 Jahren eine frühzeitige Detektion des Tumors in einem noch lokalisierten Stadium erreicht und damit letztlich eine Karzinominvasion verhindert (Brenner et al. 2010). Den Schwerpunkt des Darmkrebs-Screenings bildet hierbei die vollständige Koloskopie des Dickdarms einschließlich einer Biopsie-Entnahme. Dieses als derzeitiger Goldstandard deklarierte Diagnoseverfahren weist gegenüber anderen Methoden eine deutlich höhere Sensitivität und Spezifität für die Detektion sowohl prämaligener Läsionen als auch bereits maligner Frühstadien auf und bietet darüber hinaus die Möglichkeit einer direkten Polypektomie-Intervention verdächtiger Dickdarmpolypen (Imperiale et al. 2000; Kolligs 2012; Rex et al. 1997; Winawer et al. 2006). Weitere Studien beschrieben überdies allein durch die Darmspiegelung eine deutliche Reduktion des Erkrankungsrisikos sowie einen klar assoziierbaren Rückgang von Inzidenz und Mortalität (Atkin et al. 2010; Hewitson et al. 2007; Kahi et al. 2009; Winawer et al. 1993; Zauber et al. 2012). Trotz der nachweislich geringen Komplikationsrate, wie sie durch Veröffentlichungen von Crispin et al. (2009), Kirchgatterer et al. (2002) und Kolligs et al. (2011) dargestellt werden konnte, verhindert bis heute eine geringe bevölkerungsweite Akzeptanz einen größeren Erfolg dieser Primärintervention. Diese Tatsache lässt sich durch verfahrensbedingte Nachteile, wie beispielsweise die körperliche Belastung im Rahmen einer vorbereitenden Kolonlavage, die Angst vor Schmerzen und Komplikationen durch die Untersuchung selbst sowie nicht zuletzt durch ein erhebliches Schamgefühl begründen (Gupta et al. 2008; Hart et al. 1995; Inadomi 2008). So nahmen beispielsweise im Jahr 1996 lediglich 11 % der Männer sowie 27 % der Frauen die Möglichkeit einer Vorsorgekoloskopie wahr. Zu diesem Zeitpunkt war das Verfahren noch kein Bestandteil der Regelleistungen gesetzlicher Krankenversicherungen (GKV) (Eickhoff und Riemann 2000). Nach einer neuerlichen Erhebung von Schaefer et al. (2012)

konnte jedoch die Teilnahmerate in den letzten Jahren nicht entscheidend verbessert werden. Trotz Kostenübernahme durch die GKV sowie einer zunehmenden medialen Bewerbung des Darmkrebs-Screenings nahmen bis 2010 nur 18,3 % der Männer und 20,1 % der Frauen eine Vorsorgekoloskopie in Anspruch (Schaefer et al. 2012). Ein Ziel aktueller wissenschaftlicher Betrachtungen sollte daher die Etablierung alternativer und insgesamt schonenderer Frühdiagnose- aber auch Therapiestratifizierungs-Verfahren sein, welche in ihrer diagnostischen Sensitivität und Spezifität mit einem interventionell-endoskopischen Vorgehen vergleichbar sind. So wird bereits seit einigen Jahren die Bestimmung des Glykoprotein-Tumormarkers *CEA* aus dem Patientenplasma durch die S3-Leitlinien zur Diagnostik und Therapieevaluation bei KRK empfohlen (Pox und Schmiegeler 2013). Das *CEA* stellt hierbei jedoch einen eher unspezifischen und damit ungeeigneten Screening-Marker des KRK dar und ist daher der Verlaufskontrolle sowie Prognoseevaluation von primär therapierten Karzinomen des Kolorektums vorbehalten (Bombardieri et al. 1985; Carpelan-Holmstrom et al. 2002; Louhimo et al. 2002; Safi et al. 1988). In der Lokalrezidiv- und Metastasen-Diagnostik lieferte der genannte Marker jedoch durchaus beachtliche Sensitivitäten von 64-80 % sowie Spezifitäten von etwa 70-90 % (Duffy 2001; Tan et al. 2009). Andere diagnostische Verfahren an Stuhlproben, wie beispielsweise der FOBT oder der dem FOBT überlegene FIT, standen in ihrer Aussagekraft und diagnostischen Sensitivität von 26-74 % sowie Spezifitäten von 80-96 % deutlich hinter der Koloskopie zurück. Diese Methoden stellten daher keine nennenswerten Alternativen für die Detektion und Therapiestratifizierung kolorektaler Karzinome dar (Brenner und Tao 2013; Hewitson et al. 2008; Hol et al. 2010; Imperiale et al. 2014; van Rossum et al. 2011; Zhu et al. 2010). Neuere wissenschaftliche Ansätze der vergangenen Jahre verfolgten wiederum das Ziel, freie zirkulierende Nukleinsäuren (cfDNA) im Stuhl oder Blut mit Hilfe von PCR-Verfahrenstechniken nachzuweisen, um einen geeigneten genetischen oder epigenetischen Tumormarker zu etablieren (Ahlquist et al. 2000; Imperiale et al. 2014; Robertson und Dominitz 2014; Schwarzenbach et al. 2011; Traverso et al. 2002). Während im Rahmen genetischer Betrachtungen an zellfreier DNA aus Blut oder Stuhl vornehmlich der Nachweis von Mutationen des *APC*, des *K-RAS* oder des *p53* tumorspezifische Aussagekraft besitzt, zielen die epigenetischen Ansätze auf die Detektion von Promotorhypermethylierungen in tumorassoziierbaren, transkriptionsregulierenden Gensequenzen ab (Lecomte et al. 2002; Lefebure et al. 2010; Wang et al. 2004). So rückten als potentielle Stuhlmarker *VIMENTIN*, *SFRP2*, *ITGA4*, *NGFR* sowie *MGMT* in den Fokus (Ausch et al. 2009; Melotte et al. 2009; Muller et al. 2014; Petko et al. 2005; Shirahata et al. 2009). Weitere vielversprechende epigenetische Tumormarker des Blutes und damit Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind die Promotor-Regionen für Runt-Related Transcription Factor 3 (*RUNX3*), Neurogenin-1 (*NEUROG1*), Helicase-like Transcriptional Factor (*HLTF*), Septin-9 Transmembranprotein (*SEPTIN9*), Transmembrane Protein-containing Epidermal

Growth Factor and Follistatin Domain (*TMEFF2*), Syndecan-2 Transmembranprotein-Gen (*SDC2*) sowie RAS-Association Domain Family 1 (*RASSF1A*) (deVos et al. 2009; Grutzmann et al. 2008; Gyparaki et al. 2013; Herbst et al. 2011; Kim et al. 2010; Lee et al. 2013a; Leung et al. 2005; Lofton-Day et al. 2008; Nishio et al. 2010; Oh et al. 2013; Sakamoto et al. 2004; Tan et al. 2007; Toth et al. 2012; Wallner et al. 2006; Warren et al. 2011). Die vorliegende Studie verfolgte primär das Ziel mittels enzymbasierter, automatisierter Ein-Schritt-Real-Time-PCR einen aussagekräftigen epigenetischen Biomarker für das Rektumkarzinom zur risikoadaptierten Therapiestratifizierung nach initialer neoadjuvanter RCT zu etablieren. Ein solcher Marker sollte idealerweise eine Aussage zum Remissionsstatus nach RCT zulassen und damit die Notwendigkeit einer chirurgischen Intervention nach RCT abschätzbar machen. Das angewandte Real-Time-Verfahren bot dabei im Vergleich zur quantitativen Standard-PCR einige Vorteile, welche die Entscheidung zur Anwendung dieser Methode für die methylierungsspezifischen Untersuchungen nachhaltig beeinflusste. So ist - neben Aspekten der schnellen und kosteneffizienten Durchführbarkeit dieser Real-Time-PCR - vor allem das verminderte Kontaminationsrisiko der zu amplifizierenden Mastermix-Proben zu nennen (Dijkstra et al. 2014; Heid et al. 1996). Dieses Risiko konnte aufgrund der Messungen innerhalb eines geschlossenen Systems und der Möglichkeit zur zeitgleichen Auswertung der Messdaten im Thermocycler deutlich minimiert werden. Im Vergleich zu einer quantitativen DNA-Messungen mittels Post-PCR-Gelelektrophorese war bei der angewandten Methode eine zwischenzeitliche Eröffnung der PCR-Tubes nicht nötig. Ein weiterer nennenswerter Vorteil des angewandten PCR-Verfahrens war die Möglichkeit zur quantitativen Bestimmung der DNA-Amplifikatmenge in Echtzeit. Hieraus resultierte eine deutliche Zeitersparnis gegenüber anderen PCR-Verfahren. Zudem war durch die Real-Time-PCR eine zeitgleiche Messung mehrerer Gensequenzen an der jeweils eingesetzten DNA-Probe möglich. Im Rahmen von Multiplex-Ansätzen konnten somit - zusätzlich zu den tumorassoziierten Promotor-Regionen - die internen Kontrollen *β-Globin* und *β-Actin* mituntersucht werden (Dijkstra et al. 2014; Heid et al. 1996). Im Vergleich zur aktuellen Literatur lag eine Besonderheit des Versuchsaufbaus im Verzicht auf eine Vorbehandlung der jeweiligen DNA mit Natrium-Bisulfit. Arbeitsgruppen beschrieben beispielsweise den Verlust entsprechend zu amplifizierender DNA-Fragmente nach Anwendung der Natrium-Bisulfit-Methode und damit eine massive chemische Beeinflussung der zu testenden Nukleinsäuren (Bundo et al. 2012; Tetzner et al. 2007). Die Anwendung dieser Bisulfit-Behandlung wurde in der hier vorliegenden Studie durch ein neues Primerdesign sowie durch den Einsatz einer methylierungsabhängigen Restriktionsendonuklease für die Ein-Schritt-Real-Time-PCR vermieden. Das Temperaturprofil der PCR wurde dabei so ausgewählt, dass alle Nachweisreaktionen für hypermethylierte Promotorsequenzen in einem Testlauf aus der gleichen Nukleinsäure-Extraktion durchgeführt werden konnten.

V.1 Alters- und Geschlechtsverteilung in Patienten- und Kontrollgruppe

Das mittlere Erkrankungsalter der 25 Rektumkarzinom-Patientinnen und Patienten - aus deren Blut- und Tumorgewebeproben jeweils eine DNA-Isolation durchgeführt wurde - lag bei 62 Jahren und entsprach damit der Altersgruppe, die an einer Darmkrebsvorsorgeuntersuchung teilnimmt. Die Karzinomdiagnose wurde bei den männlichen Patienten (n=15) durchschnittlich mit 60 Jahren bei den Frauen (n=10) mit 65 Jahren gestellt. Somit lag das Erkrankungsalter der untersuchten Patienten, im Gegensatz zur Altersverteilung der KRK-Patienten innerhalb der Gesamtbevölkerung, deutlich niedriger. Im Vergleich ergaben epidemiologische Studien für die Frauen ein durchschnittliches Erkrankungsalter von 75 Jahren und für Männer von 71 Jahren (Kaatsch et al. 2013; Siegel et al. 2013). In möglichen Folgestudien sollte daher das Altersmatching als potentieller Ein- bzw. Ausschlussfaktor in die Überlegungen einbezogen werden, um prospektiv möglichst repräsentative Sensitivitäten und Spezifitäten für die entsprechenden Biomarker ermitteln zu können.

Im Vergleich mit publizierten Studien zur Untersuchung von Sensitivitäten und Spezifitäten ähnlicher Biomarker standen in dieser ersten Evaluation eines neuen Testverfahrens nur 25 Plasmaproben zur Verfügung. In der Arbeit von Herbst et al. (2011) wurden beispielsweise 137 Patientenproben und 45 Kontrollproben gesunder Probanden auf ihre Methylierungseigenschaften untersucht. Ähnlich wie in der vorliegenden Studie legten auch Herbst et al. die Versuchsbedingungen in einem sogenannten *Trainings-Set* an 15 Patienten und 32 gesunden Probanden fest, um anschließend eine Validierungsstudie (sog. *Test-Set*) zur Bestimmung von Sensitivität und Spezifität durchzuführen. Die Patienten dieser Studie waren zwischen 23 und 81 Jahre alt (Herbst et al. 2011). Das Durchschnittsalter lag je nach *Test-Set* und betrachteter Patientengruppe zwischen 58 und 68 Jahren und war damit durchaus mit der Altersverteilung der hier vorliegenden Analyse vergleichbar. Insgesamt wiesen die Mehrzahl der Studien (z.B. Herbst et al. 2009, Wallner et al. 2006, Lofton-Day et al. 2008, Grutzmann et al. 2008 oder De Vos et al. 2009) deutlich höhere Patientenzahlen bei ähnlicher Altersverteilung der Patienten auf. Hingegen waren die Studien von Ebert et al. (2005) oder Tan et al. (2007) hinsichtlich der untersuchten Patientenzahl wiederum mit der vorliegenden Arbeit vergleichbar.

Die in der vorliegenden Untersuchung als Negativkontrollen eingesetzten DNA-Isolate stammten von 48 Blutspendern beider Geschlechter im Durchschnittsalter von 38 Jahren. Hierbei war aufgrund einer klinischen Voruntersuchung, der Kontrolle der Vitalparameter sowie regelmäßiger Blutbildtestungen im Rahmen der Blutspende, die physiologische Gesundheit der Spender vorauszusetzen. Da eine obere Altersgrenze der Blutspende in Deutschland heute aufgrund des zunehmenden biologischen Alters der Spenderinnen und Spender aufgehoben wurde und die Beurteilung der Spendefähigkeit vornehmlich durch den Blutspende-Arzt erfolgt, wäre für nachfolgende Studien auch hier eine altersstrukturelle

Anpassung der Kontrollgruppe zur entsprechenden Patientengruppe möglich. Eine Orientierung hierfür lieferten beispielsweise Lofton-Day et al. (2008). In dieser Studie wurde ein entsprechendes Altersmatching zwischen KRK-Patienten und gesunden Probanden - denen periphere Blutlymphozyten und Gewebeproben entnommen wurden - durchgeführt.

V.2 Tumorstadien und Therapieverlauf

Die in dieser Studie durchgeführten methylierungsspezifischen PCR-Untersuchungen an isolierter DNA aus Tumorgewebe, Plasma und Serum erfolgten an Patienten mit lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinomen der Tumorstadien II und III. Lediglich bei einem der 25 Rektumkarzinom-Patienten lag bei Blutentnahme bereits ein metastasiertes Tumorstadium vor. Jedoch war - bedingt durch die hier anzunehmende Metastasenresektabilität einer vorliegenden hepatischen Absiedlung - in diesem Fall dennoch ein kurativer Behandlungsansatz gegeben, so dass die zugehörigen Proben des Probanden in die Testungen einbezogen werden konnten (Nordlinger et al. 2009). Aufgrund dieser vorselektierten Patientenproben aus lokal fortgeschrittenen RK war eine Aussage zu potentiellen Promotormethylierungen in prämaligen Läsionen nicht möglich. Ebenso konnte für die frühen, noch begrenzten Tumorstadien (I und II) vor Therapiebeginn - wie das in zahlreichen anderen Studien aus Plasma, Serum und Tumorgewebe untersucht wurde - keine Aussage für die ausgewählten Gensequenzen getroffen werden (deVos et al. 2009; Grutzmann et al. 2008; Herbst et al. 2011; Lee et al. 2013a; Lofton-Day et al. 2008; Oh et al. 2013; Wallner et al. 2006). Somit muss die Etablierung eines Screening- und Frühdetektionsmarker auf Grundlage der hier etablierten Ein-Schritt-Real-Time-PCR Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein. Hingegen war anhand der Untersuchung des Markerpanels aus *RUNX3*, *SEPTIN9* und *SDC2* an prätherapeutisch entnommenen Patientenplasma, eine quantitative Aussage zu Prognose- und Therapiestratifizierungseigenschaften dieser Biomarker für eine begrenzte Anzahl von 15 Patienten möglich (siehe IV.4.11 und V.8). In dieser Analyse wurden die detektierten Hypermethylierungen des Panels den pathologischen UICC-Stadien (pUICC) nach RCT gegenübergestellt.

Generell stand zunächst für jede untersuchte Promotor-Region eine qualitative Bewertung der ermittelten Ct-Messwerte in „hypermethyliert/krank“ und „nicht-methyliert/gesund“ anhand eines genindividuellen Grenzwertes im Vordergrund. Ziel war die Etablierung eines validen, möglicherweise prognostisch relevanten Blutbiomarkers. Ein solcher epigenetischer Stratifizierungsmarker sollte nach abgeschlossener neoadjuvanter RCT idealerweise zur Einschätzung des klinischen Remissionsstatus beitragen können, um für den Karzinompatienten die Notwendigkeit einer radikalen chirurgischen Intervention evaluieren zu können (Gaedcke et al. 2011; Glynne-Jones und Hughes 2012; Grade et al. 2012; Habr-Gama et al. 1998; Habr-Gama et al. 2006). Denkbar wäre der Einsatz eines solchen epigenetischen

Therapiestratifizierungsmarkern auch zur Beurteilung der Therapie-Response-Rate eines multimodalen Regimes und der damit verbundenen Abschätzung der Notwendigkeit einer adjuvanten Chemotherapie nach Abschluss der neoadjuvanten und chirurgischen Primärtherapie (Grade et al. 2012). In diesem Zusammenhang wird die Effektivität adjuvanter Chemotherapie-Applikationen bis heute kontrovers diskutiert jedoch deren Einsatz durch die aktuellen S3-Leitlinien für lokal fortgeschrittene Rektumkarzinome lediglich im Rahmen klinischer Studien empfohlen (Bosset et al. 2006; Gaedcke et al. 2011; Gerard et al. 2006; Glimelius und Oliveira 2009; Pox und Schmiegel 2013; Sauer et al. 2004). Darüber hinaus könnte der hier gewählte Versuchsansatz zur Etablierung potentieller epigenetischer Prognosemarker für die Einschätzung des Therapieverlaufs im Allgemeinen sowie zur Ermittlung der rezidiv- und metastasenfreien Überlebenszeit nach dem Prinzip anderer konventioneller Biomarker - wie beispielsweise dem CEA - beitragen (Levy et al. 2008; Louhimo et al. 2002; Tan et al. 2009). Voraussetzung hierfür wäre die einmalige oder wiederholte Blutentnahme zu definierten Zeitpunkten während und vor allem nach Beendigung der Primärtherapie im Rahmen der Tumornachsorge. Alle hier diskutierten Einsatzmöglichkeiten epigenetischer Marker liefern wiederum Ansätze für weitere Studien. Für alle potentiellen PCR-Biomarker gilt hierbei, dass eine stadienabhängige Evaluation und Verlaufskontrolle mit der Höhe der Ct-Werte und damit direkt mit dem quantitativ detektierten Methylierungsstatus korrelieren sollte. Auf Grundlage dieser Überlegung müssten mit steigendem Tumorstadium daher vermehrt Promotormethylierungen feststellbar sein, was sich wiederum indirekt proportional in der Abnahme des Ct-Niveaus äußern sollte.

V.3 Nachweis hypermethylierter Sequenzen in den Promotor-Regionen von *RUNX3*, *NEUROG1*, *SEPTIN9*, *TMEFF2*, *SDC2* und *RASSF1A* in chemisch hypermethylierter DNA sowie an DNA ausgewählter Tumorzelllinien

Nach umfassender Literaturrecherche erfolgte die Vorauswahl der Gensequenzen *RUNX3*, *NEUROG1*, *HLTF*, *SEPTIN9*, *TMEFF2*, *SDC2* sowie *RASSF1A* für die in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen. Bei den ausgewählten Genen handelte es sich um assoziierbare Tumorsuppressorgene (TSG), Proto-Onkogene, Transmembranprotein-codierende Sequenzen sowie Transkriptionsfaktor-Gene, für die bereits epigenetische Veränderungen im Zusammenhang mit dem kolorektalen Karzinom beschrieben wurden (siehe I.6.2). Hierbei wurde für jede Tumortestsequenz anhand eines spezifischen Cut-Off-Wertes ein ausreichendes Diskriminationsverhalten zwischen „hypermethyliert/krank“ und „nicht-methyliert/gesund“ vorausgesetzt und im Vorfeld der Patientenuntersuchung an kommerziellen DNA-Kontrollen überprüft. Die hier verwendete chemisch komplett methylierte DNA CP Genome™ wurde auch in anderen Studien als methylierte Positivkontrolle eingesetzt (Herbst et al. 2011; Leung et al. 2005; Lofton-Day et al. 2008; Tan et al. 2007; Wallner et al.

2006). Als Negativkontrolle wurde von mehreren Autoren die nicht-methylierte DNA CP Genome™ von Merck Millipore (CpGenome™, Human Non-Methylated DNA, Bestell-Nr: S8001U) ausgewählt. Das in dieser Arbeit verwendete Produkt der Firma Roche (Human Genomic DNA, Negativkontrolle) kam auch in der Studie von Lofton-Day et al. (2008) zum Einsatz.

Aufgrund eines fehlenden signifikanten Diskriminationsunterschieds zwischen methylierter und unmethylierter Kontroll-DNA des Ein-Schritt-Real-Time-PCR-Protokolls für methyliertes *HLTF* wurde eine der sieben ausgewählten Promotor-Regionen von den weiteren Methylierungsanalysen an Patienten- und Blutspender-DNA ausgeschlossen ($p_{\text{BstUI}} = 0,1394$, $p_{\text{Acil}} = 0,3197$, $p_{\text{Acil/AccII}} = 0,6325$) (siehe Tabelle 11). Im Gegensatz dazu konnten Leung et al. (2005) für methyliertes *HLTF* einen signifikanten Unterschied zwischen 48 Karzinompatienten und 41 gesunden Kontrollproben ($p = 0,015$) zeigen. Auch Wallner et al. (2006) stellten an DNA-Serumproben von 24 Patienten mit lokal fortgeschrittenem KRK, an 14 Patienten in einem metastasierten Stadium sowie an 20 gesunden Kontrollpersonen *HLTF* als signifikanten Methylierungsmarker dar. Darüber hinaus publizierten Herbst et al. (2009) *HLTF* als vielversprechenden Rezidivmarker für das KRK und wiesen eine deutliche Unterscheidung hypermethylierter gegenüber nicht-methylierten Promotorbereichen nach (Herbst et al. 2009).

Für die übrigen Promotor-Regionen - *RUNX3*, *NEUROG1*, *SEPTIN9*, *TMEFF2*, *SDC2* und *RASSF1A* - zeigte die PCR-Analyse an den kommerziellen Negativ- sowie Positivkontrollen einen statistisch signifikanten Diskriminationsunterschied (Tabelle 11). Im Widerspruch hierzu schlossen Herbst et al. (2011) - neben 12 weiteren Markern - unter anderem *RUNX3* in einem *Trainings-Set* an Testseren von 32 gesunden Kontrollen sowie 15 Karzinompatienten von einer weiteren Analyse aus. Für die Beschreibung eines Frühdetektionsmarkers wurden in dieser Studie anhand definierter Grenzwerte entsprechende Auswahlbedingungen festgelegt, wonach ein Marker mindestens 50 % der Karzinome eines *Trainings-Sets* bei einer Spezifität > 90 % erkennen musste. Diese Voraussetzungen konnten für *RUNX3* in weiteren Analysen dieser Studie nicht erfüllt werden (Herbst et al. 2011). Aus vergleichbarem Grund schlossen Wallner et al. (2006) unter anderem *RASSF1A* in dem bereits angesprochenen *Evaluation-Set* (14 Patienten UICC IV und 20 gesunde Kontrollen) aus. Weiterhin ist der Publikation von Lofton-Day et al. (2008) zu entnehmen, dass auch hier eine Vorauswahl geeigneter Gensequenzen aus insgesamt 56 potentiellen Markern stattfand. Hierzu wurde in dieser Studie ebenfalls ein Restriktionsenzym-Verdau eingesetzt und das Diskriminationsverhalten an DNA-Gewebeproben untersucht. In diesem Zusammenhang konnten im Vorfeld beispielsweise *NEUROG1* und *TMEFF2* aufgrund zu weniger Promotormethylierungen sowie fehlerhafter Detektionen an Negativkontrollen von den nachfolgenden Untersuchungen ausgeschlossen werden (Lofton-Day et al. 2008). Auch in der Arbeit von Oh et al. (2013)

erfolgte eine Vorauswahl des *SDC2*-Testmarkers aus insgesamt 32 Markern anhand des methylierungsspezifischen Detektionsverhaltens durch eine CpG-DNA-Micro-Array-Analyse an 12 KRK-DNA-Gewebeproben sowie an 12 DNA-Kontrollproben.

Im Rahmen der Validierung des methylierungsspezifischen PCR-Verfahrens erfolgte für die nunmehr sechs Promotor-Regionen *RUNX3*, *NEUROG1*, *SEPTIN9*, *TMEFF2*, *SDC2* und *RASSF1A* sowie für die interne Referenzkontrolle *β -Globin* eine Bestimmung der Nachweisgrenzen und Messbereiche an unmethylierter und methylierter Kontroll-DNA. Ähnlich dem Vorgehen von Lofton-Day et al. (2008) wurden diese Nachweisgrenzen und Messbereiche in der vorliegenden Arbeit über eine sechsstufige 1:5-Verdünnungsreihe eines DNA-Template-Mixes aus Positiv- und Negativkontrolle - wie in Kapitel IV.3.3 beschrieben - ermittelt. Insbesondere in den gen- und methylierungsspezifischen Testungen der Titrationsreihe des DNA-Template-Mixes zeigten sich Auffälligkeiten. So konnte in einem Kontrollansatz mit unmethylierter Kontroll-DNA (Background) eine positive PCR-Detektion im Sinne eines Methylierungsnachweises für fünf von sechs Gensequenzen erbracht werden. Lediglich die Untersuchung von *RASSF1A* zeigte hier die erwarteten Ct-Werte (Ct=50), welche eine potentielle Methylierung ausschlossen. Diese, wenn auch anhand des genspezifischen Grenzwertes als negativ zu klassifizierenden Ct-Messwerte, deuteten darauf hin, dass die als Negativkontrolle eingesetzte DNA der Firma Roche nicht vollständig unmethyliert vorlag. Damit wäre möglicherweise die in anderen Studien verwendete unmethylierte Form der Kontroll-DNA CP Genome™ der Firma Merck Millipore als entsprechende Negativkontrolle besser geeignet gewesen (Herbst et al. 2011; Leung et al. 2005; Tan et al. 2007; Wallner et al. 2006). Besonders grenzwertnahe und damit potentiell am ehesten methylierungs-positive Ct-Messwerte zeigte hierbei das *SDC2*-Gen im Vergleich zu den übrigen fünf Gensequenzen, was möglicherweise damit zu erklären ist, dass es sich bei *SDC2* um ein Multi-Copy-Gen handeln könnte. Entsprechende Beschreibungen sind der aktuellen Literatur jedoch nicht zu entnehmen, so dass eine Analyse des *SDC2* hinsichtlich einer solchen Eigenschaft aussteht. Ob außerdem Lofton-Day et al. (2008) in ihren Untersuchungen ähnliche Feststellungen beim Einsatz der Human Genomic DNA von Roche als Negativkontrolle machten, geht aus der Publikation nicht hervor.

Im weiteren Verlauf wurden die anhand der o.g. genspezifischen Evaluation infrage kommenden Sequenzen *RUNX3*, *NEUROG1*, *SEPTIN9*, *TMEFF2*, *SDC2* und *RASSF1A* im Anschluss an die Testung zur Festlegung eines geeigneten Restriktionsenzym (siehe V.4) an isolierten DNA-Positivkontrollen aus den KRK-Zellreihen HT-29 und CACO-2 getestet. Der Einsatz von Tumorzelllinien als methylierungssensitive Positivkontrollen fand zudem Anwendung in den Studien von Toyota et al. (1999b), Moon et al. (2014) und Oh et al. (2013). Außerdem beschrieben zwei weitere Arbeiten für genau diese beiden Zellreihen einen Zusammenhang mit dem Proteinliganden Activin A (siehe I.6.2), welcher wahrscheinlich aktiv

an Zellproliferations- und Differenzierungsvorgängen im Rahmen der kolorektalen Karzinogenese beteiligt ist (Pholnukulkit et al. 2003; Sonoyama et al. 2003). Während die Zelllinie HT-29 einem niedrigmalignen Primärtumor einer 44-jährigen Frau kaukasischer Herkunft aus dem Jahr 1964 entstammt, wurde die CACO-2-Zelllinie aus einem fortgeschrittenen Primärtumor des Kolons eines 72-jährigen Kaukasiers im Jahr 1974 entnommen und kultiviert. Die grenzwertabhängige Bewertung der ermittelten Gen-Ct-Messwerte an HT-29- sowie CACO-2-DNA in positiv-hypermethyliert und negativ-unmethyliert zeigte insgesamt - je nach eingesetzter Sequenz-DNA-Kombination - eine starke Heterogenität (siehe IV.4.2). Im Detail waren für HT-29-DNA nur *RUNX3* und *SEPTIN9* hypermethyliert, während an CACO-2-DNA ein positiver Methylierungsnachweis nur für *SEPTIN9* und *RASSF1A* erbracht werden konnte. Das lässt vermuten, dass es sich ausschließlich bei *SEPTIN9* um einen universalen Marker für das Rektum- und Kolonkarzinom handelt. Es kann darüber hinaus sogar angenommen werden, dass in nachfolgenden Analysen eine striktere Trennung nach Rektum- und Kolonkarzinom erfolgen sollte, um für beide Lokalisationen separate Tumormarker zu etablieren. Gestützt wird diese These durch drei Studien, wonach für die proximalen Kolonkarzinomen im Vergleich zu den Rektumkarzinomen ein vermehrter Nachweis von *RUNX3*-, *TMEFF2*- sowie *HLTF*-Promotorhypermethylierungen aus cfDNA beschrieben wurde (Ebert et al. 2005; Moinova et al. 2002; Moon et al. 2014a). In diesem Zusammenhang wichtige Informationen über die genaue Tumorlokalisation sowie eine Unterscheidung von Rektum- und Kolonkarzinomen konnte jedoch vielen Publikationen mehrheitlich nicht entnommen werden. Stattdessen beschränkten sich die klinischen Angaben vergleichbarer Studien meist auf das Tumorstadium, den Karzinom-Differenzierungsgrad, den Nodalstatus sowie weitere klinisch-pathologische Informationen (deVos et al. 2009; Grutzmann et al. 2008; Imamura et al. 2005; Lofton-Day et al. 2008; Oh et al. 2013; Sato et al. 2002; Young et al. 2001). Wiederum unterschieden Wallner et al. (2008), Warren et al. (2011), Toth et al. (2012), Nishio et al. (2010), Subramaniam et al. (2009), Herbst et al. (2011) sowie Lind et al. (2011) in ihren Publikationen zwischen prämaligen und malignen Läsionen des Kolons und Rektums.

Ein weiterer Erklärungsansatz für den fehlenden Methylierungsnachweis einiger Gensequenzen an Zelllinien-DNA könnte, zumindest für HT-29, der niedrigmaligne Tumorstatus dieser Zelllinie sein. Dieser Aspekt ließ die Schlussfolgerung zu, dass zum einen entsprechende Promotormethylierungen nicht in allen tumorassoziierten Gensequenzen simultan auftreten und zum anderen die Wahrscheinlichkeit einer nachweisbaren Promotormethylierung in fortgeschrittenen Tumorstadien zunimmt. In diesem Zusammenhang zeigten Oh et al. (2013) für die Zelllinien-DNA aus CACO-2 und aus HCT-111 einen mit der vorliegenden Studie vergleichbaren Testansatz. Hier wurden für die Gene *CHST11*, *KCNA1*, *IRX5*, *SIM1* und *SORCS3* eine Hypermethylierung für beide Zelllinien beschrieben. Interessanterweise

konnte jedoch auch in dieser Studie kein Nachweis einer Promotormethylierung des *SDC2* an der CACO-2-DNA erbracht werden, wohingegen für HCT-116 ein Methylierungsnachweis für *SDC2* erfolgte. Dies deutet darauf hin, dass möglicherweise die Zelllinien-DNA aus CACO-2 keine geeignete Kontrolle für die hier eingesetzten Gene im Zusammenhang mit einer methylierungsspezifischen Ein-Schritt-Real-Time-PCR darstellte.

Im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit beschriebenen Versuchsaufbau basierte ein Großteil der Studien - wie beispielsweise Oh et al. (2013) - auf einer Bisulfit-Konversion der Zelllinien-DNA, wonach ein Austausch sämtlicher unmethylierter Cytosinbasen gegen Uracil stattfand. Dieses Vorgehen bedeutete letztlich eine erhebliche Beeinflussung der zu testenden DNA (Bundo et al. 2012). Weitere Erklärungsansätze für die größtenteils fehlende Hypermethylierung der getesteten Promotor-Regionen an DNA aus HT-29 und CACO-2 könnten zudem fehlerhafte Zellkultivierungsprozesse des Herstellers sowie lagerungs- und verarbeitungsbedingte DNA-Modifikationen im Rahmen der methylierungsspezifischen Ein-Schritt-Real-Time-PCR sein. Ungeachtet dieser Beobachtungen wurden nach der Testung an Tumorzelllinien-DNA dennoch alle sechs Promotor-Regionen in der methylierungsspezifischen Ein-Schritt-Real-Time-PCR an Patienten- und Blutspender-DNA untersucht.

V.4 Acil als geeignete, methylierungssensitive Restriktionsendonuklease

Beim Vergleich unterschiedlicher Enzyme und Enzymkombinationen wies Acil - nach den in Kapitel IV.3.2 beschriebenen Ergebnissen - den besten Signal-Rausch-Abstand auf. Im Detail zeigten insbesondere die *NEUROG1*-, *TMEFF2*-, *SDC2*- sowie die *RASSF1A*-PCR ein signifikant günstigeres Signal-Rausch-Verhältnis für Acil im Vergleich mit BstUI, zwischen methylierter und nicht-methylierter DNA-Kontrolle. Die Enzymkombination aus Acil und AccII wiederum zeigte keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Diskriminationsverhaltens im Vergleich mit Acil alleine. Hier gab letztlich die weniger aufwendige Vorbereitung der genspezifischen Mastermixe sowie eine kostengünstigere Umsetzung der PCR den entscheidenden Ausschlag für den alleinigen Einsatz der Restriktionsendonuklease Acil für die weitere methylierungsspezifische Testung an Patienten- und Blutspender-DNA.

Zur Untersuchung einer Hypermethylierung sind in der Literatur unterschiedliche enzymbasierte Verfahren beschrieben, die wiederum nicht ausschließlich auf die Karzinomdiagnostik beschränkt sind (Brunet et al. 1989; Casarino et al. 1992; Chan et al. 2006; Knowlton et al. 1986; Kondo et al. 2000; Korah et al. 2013; Saiki et al. 1985, 1992; Toyota et al. 1999b). In diesem Zusammenhang beschrieben Chan et al. (2006) den Einsatz einer Restriktionsendonuklease für die methylierungsspezifische Analyse des *RASSF1A*-Gen als Biomarker der pränatalen Rhesus-D-Diagnostik in mütterlichem Plasma. In dieser Arbeit wurde jedoch in zwei Schritten vorgegangen: Im ersten Schritt wurde ein Mastermix für den Enzymverdau angesetzt. Im zweiten Schritt wurde ein Teil des Materials für eine

nachfolgende Real-Time-PCR verwendet (Chan et al. 2006). Auch Kondo et al. (2000) griffen für ihre epigenetischen Analysen des ICF-Syndroms (Immunodeficiency, Centromeric Instability and Facial Abnormalities) auf ein enzymbasiertes Verfahren zurück. Beispiele für die Nutzung entsprechender restriktionssensitiver Verfahren im Rahmen der Karzinomdiagnostik im Allgemeinen lieferten außerdem Korah et al. 2013, Kunstman et al. 2013 sowie Takahashi et al. 2004. In den zwei erstgenannten Studien wurden Hypermethylierungsanalysen des *RASSF1A* an Gewebe-DNA des adrenokortikalen Karzinoms sowie des papillären Schilddrüsenkarzinoms durchgeführt (Korah et al. 2013; Kunstman et al. 2013). Eine restriktionssensitive PCR-Analyse zum Nachweis von Promotormethylierungen in Gallenblasenkarzinomen - unter anderem für *RUNX3* und *TMEFF2* - zeigte wiederum die letztgenannte Studie (Takahashi et al. 2004). Diesen Darstellungen war zu entnehmen, dass, wie erwähnt, der Einsatz von Restriktionsenzym-Verfahren in der molekulargenetischen Forschung eine weitverbreitete Methode ist. Hingegen stellt der Einsatz von Restriktionsenzym und DNA-Polymerase im Rahmen einer Ein-Schritt-Real-Time-PCR ein neues, kombiniertes Verfahren dar. Damit wird deutlich, dass die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zukünftig auch für die Untersuchung anderer Tumorentitäten genutzt werden sollten. Speziell eine vergleichende Betrachtung dreier Restriktionsenzyme untereinander, wie sie in der vorliegenden methylierungsspezifischen PCR-Untersuchung zur Diagnostik und Therapiestratifizierung des RK durchgeführt wurde, ist in dieser Form in der Literatur nicht vorbeschrieben. Zwar nutzten beispielsweise auch Lofton-Day et al. (2008) in diesem Zusammenhang Restriktionsendonukleasen für die PCR-Methylierungsanalyse, in späteren Testungen an isolierter Patienten-Plasma-DNA wurde jedoch auch hier im Vorfeld eine Bisulfit-Behandlung angewandt (Lofton-Day et al. 2008).

In der vorliegenden *proof-of-concept*-Studie lagen die Sensitivitäten und Spezifitäten in einem Bereich vergleichbarer Zahlen aus Studien, in denen ausschließlich eine Bisulfit-Konversion im Vorfeld der PCR-Analyse durchgeführt wurde oder auf eine Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) zurückgriffen wurde. Damit wird die alleinige Anwendung eines Restriktionsenzym-Verfahren in zukünftigen Studien gegenüber anderen Vorgehensweisen gerechtfertigt (Herbst et al. 2011; Lee et al. 2013a; Leung et al. 2005; Nishio et al. 2010; Oh et al. 2013; Tan et al. 2007; Wallner et al. 2006; Young et al. 2001). Unterstützt wird dieser Ansatz durch Tetzner et al. (2007), die in ihrer Publikation den Einsatz von Restriktionsenzymen anstelle einer Bisulfit-Konversion als DNA-schonende Alternative bestätigten. Trotz beschriebener Vorteile der alleinigen Anwendung eines Enzymverfahrens bestand grundsätzlich die Möglichkeit eines fehlerhaften enzymatischen Verdaus hypermethylierter Sequenzen, was zu einer Reduktion der Sensitivität beigetragen haben könnte. Dies muss als potentielle Fehlerquelle berücksichtigt werden und zukünftig durch den Vergleich mit der Bisulfit-Methode untersucht werden.

V.5 EDTA-Plasma als geeignetes Ausgangsmaterial für eine methylierungsspezifische Ein-Schritt-Real-Time-PCR

Im Vorfeld der patienten- und blutspenderbezogenen Methylierungsanalyse erfolgte bei drei Patienten der Vergleich von EDTA-Plasma- und Serum zur Bestimmung des geeigneten Ausgangsmaterials. Für die potentiellen Biomarker *RUNX3*, *SEPTIN9*, *TMEFF2* und *SDC2* ließen sich hierbei keine signifikanten Methylierungsunterschiede zwischen den extrahierten Nukleinsäuren der beiden Testmedien feststellen (IV.3.4; Abbildung 13). Jedoch führte eine Hypermethylierung des *NEUROG1*-Promotors in der Ein-Schritt-Real-Time-PCR zu signifikant niedrigeren Ct-Werten in der Untersuchung von EDTA-Plasma im Vergleich zur Testung an Blutserum ($p=0,0381$).

Für die Untersuchung hypermethylierter zirkulierender Nukleinsäuren nutzen insgesamt acht von 18 betrachteten Studien Blutplasma als Ausgangsmaterial (deVos et al. 2009; Grutzmann et al. 2008; Jensen et al. 2008; Lee et al. 2013a; Lofton-Day et al. 2008; Miotto et al. 2004; Toth et al. 2012; Warren et al. 2011). Hingegen führten zehn Autoren ihre Analyse an Serum-DNA durch (Ebert et al. 2006; Grady et al. 2001; Herbst et al. 2011; Herbst et al. 2009; Leung et al. 2005; Nishio et al. 2010; Oh et al. 2013; Tan et al. 2007; Wallner et al. 2006; Wu et al. 2011). Insbesondere die Arbeitsgruppe um Herbst et al. (2011) beschrieben in ihren Publikationen sowie in einer medizinischen Dissertationsschrift von Rahmig (2012) eine Überlegenheit des Serums gegenüber dem Plasma als Ausgangsmedium für die Isolation zirkulierender Tumor-DNA. Argumente, wonach Studien an Plasma-DNA im Vergleich zu Serum verminderte diagnostische Sensitivitäten für den Nachweis entsprechender Promotormethylierungen der analysierten Testgene zeigten, begründeten ihre These (Lofton-Day et al. 2008; Rahmig 2012). Eine weitere Publikation beschrieb in diesem Zusammenhang ein sechsfach höheres Vorkommen von cfDNA in Serum gegenüber dem Plasma (Umetani et al. 2006). Aufgrund fehlender signifikanter Unterschiede der Ct-Werte zwischen Plasma und Serum für *RUNX3*, *SEPTIN9*, *TMEFF2* und *SDC2* in der o.g. Untersuchung sowie der Tatsache, dass *NEUROG1* aus dem EDTA-Plasma signifikant niedrigere und damit tendenziell positivere Ct-Werte lieferte, wurde für die weitere Analyse der Blutspender- und Patientenproben DNA aus EDTA-Plasma isoliert.

V.6 Einsatz der internen Kontrollen β -Globin und β -Actin in einer methylierungsspezifischen Ein-Schritt-Real-Time-PCR

Im Rahmen der methylierungsspezifischen PCR-Untersuchungen an Blutspender- sowie Patientenplasma-DNA wurden in jeder PCR-Amplifikation eine negative sowie positive RUN-Kontrolle an nicht-methylierter sowie methylierter DNA durchgeführt. Analog dem Vorgehen an Spender- und Patientenplasma-DNA-Proben erfolgten auch für die RUN-Kontrollen - jeweils im Vergleich - Messungen an Duplex- und Multiplex-Ansätzen. Dies bedeutete, dass in einem Duplex-Ansatz - neben Oligonukleotiden für die tumorspezifische Sequenz - Oligonukleotide für β -Actin enthalten waren. β -Actin enthält eine Schnittstelle für BstUI, Acil und AccII und sollte daher - als unmethylierte Kontrollsequenz - mit Ct-Werten nahe 50 ein negatives Ergebnis anzeigen. Auf diese Weise konnte die Funktionalität der Restriktionsenzyme in jedem Reaktionsgefäß überprüft werden. Eine Kompetition um Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP) und Polymerase war nicht zu erwarten, da β -Actin zu Beginn der PCR bereits in verdauter Form vorlag. Multiplex-Mastermixe enthielten hingegen neben dem negativen Referenzgen β -Actin noch das β -Globin-Gen, welches hier als interne Positivkontrolle eingesetzt wurde. Im Bereich der amplifizierten Sequenz von β -Globin befindet sich keine Schnittstelle für die eingesetzten Restriktionsenzyme. Deshalb war unabhängig von jeglicher Methylierung ein positives Ergebnis der internen Kontrolle zu erwarten. Referenzgene - auch genannt Housekeeping-Gene - sind in diesem Zusammenhang Gensequenzen, welche dem PCR-Ansatz als interne, unabhängige und nicht durch die Reaktion der eigentlichen Testgene beeinflussbare Kontrolle hinzugefügt werden (Kozera und Rapacz 2013). Sie zeigen unabhängig von der eingesetzten DNA sowie den Testgen-Primern und Sequenzen in jeder PCR eine minimale Variabilität, was das β -Globin für die vorliegende Studie exemplarisch verdeutlichte (Abbildung 11). Anhand dieses Vorgehens wäre ein interner Vergleich sowie die Normalisierung der ermittelten Ct-Werte der Testsequenzen in Relation zu den Ct-Werten einer beziehungsweise zweier internen Kontrollen möglich. Auf diese Weise lässt sich insgesamt die Effizienz des Verfahrens erhöhen sowie die Variabilität der PCR-Methode korrigierbar machen (Bustin et al. 2013; Bustin et al. 2009; Dijkstra et al. 2014; Kozera und Rapacz 2013). Dies ist nach Reviews von Dijkstra et al. (2014) sowie Kozera und Rapacz (2013) Grundvoraussetzung methylierungsspezifischer PCR-Testungen auch wenn in ihren Publikationen hauptsächlich die Analyse von miRNA bzw. RNA anstelle von DNA im Vordergrund stand. Weiterhin war für einen Großteil der methylierungsspezifischen Studien, aufgrund von zum Teil gravierenden Verfahrensunterschieden und Dokumentationslücken in der Präsentation und Interpretation der erhobenen Ergebnisse, eine Vergleichbarkeit untereinander nicht gegeben. Nach Dijkstra et al. (2014) nutzten in der Zeit zwischen 2006 bis 2013 insgesamt 179 Studien eine methylierungsspezifische quantitative PCR an miRNA sowie RNA im Rahmen

der Tumordiagnostik und Therapiestratifizierung. Lediglich acht dieser Studien griffen dabei - wie in der vorliegenden Arbeit an DNA erfolgt - auf den Einsatz von jeweils zwei Referenzgenen für die Detektion von Hypermethylierungen in den getesteten RNA-Proben zurück, was die Aussagekraft entsprechend erhöhte (Dijkstra et al. 2014; Kozera und Rapacz 2013). Weiterhin wiesen ein Großteil der durch Dijkstra et al. (2014) analysierten Studien keine Effizienzen des Verfahrens aus, was eine Einschätzung von Validität, Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit des Verfahrens maßgeblich erschwerte und letztlich zu insuffizienten Darstellungen führte (Dijkstra et al. 2014). Trotz der Tatsache, dass in der letztgenannten Publikation anstelle von DNA miRNA sowie RNA Gegenstand der Betrachtungen waren, ist meiner Ansicht nach eine Übertragbarkeit allgemeiner Verfahrensgrundsätze hinsichtlich der PCR-Validierung durchaus gegeben (Dijkstra et al. 2014). Eine anerkannte Orientierung für den Umfang einer PCR-Validierung lieferten die von Bustin et al. (2009) definierten MIQE-Richtlinien, wonach entsprechende Verfahrensgütekriterien Grundvoraussetzung einer externen Vergleichbarkeit darstellten. Trotz dieser Empfehlungen muss für eine sensitive PCR, welche Zielmoleküle in geringster Konzentration detektieren soll, eine Kompetition der internen Kontrollen mit der Folge einer reduzierten Sensitivität ausgeschlossen werden. Hierzu ist eine Gegenüberstellung der Ergebnisse aus den Untersuchungen mit und ohne interne Kontrolle essenziell. Dieser beschriebene Vergleich der Ct-Werte o.g. Duplex- sowie Multiplex-PCR-Experimente zeigte in diesem Zusammenhang keine statistisch signifikanten negativen Effekte auf die Höhe der genspezifischen Ct-Werte. Für die Promotor-Regionen *NEUROG1*, *TMEFF2*, *SDC2* sowie *RASSF1A* wurde sogar mit interner Kontrolle ein signifikant günstigeres Signal-Rausch-Verhältnis beobachtet als ohne interne Kontrolle.

In vergleichbaren Methylierungsstudien anderer Autoren kam oftmals lediglich ein Referenzgen zum Einsatz. In den Studien von Herbst et al. (2011) und Lind et al. (2011) handelte es sich dabei um das ALU-C4-Gen, einer repetitiven, oftmals hypermethylierten Intron-Sequenz, welche als Multi-Copy-Gen trotz potentieller tumorbedingter DNA-Veränderungen eine hohe Amplifikationswahrscheinlichkeit aufweist (Alix-Panabieres et al. 2012; Weisenberger et al. 2005; Weisenberger et al. 2004). Weitere Referenzgene, die im Rahmen methylierungsspezifischer PCR-Verfahren zur Anwendung kamen, waren *GSTP1* (Leung et al. 2005; Lofton-Day et al. 2008) und *β -Actin* (Ebert et al. 2006; Ebert et al. 2005; Lee et al. 2013a; Moon et al. 2014b; Oh et al. 2013; Sato et al. 2002; Toth et al. 2012; Wallner et al. 2006; Warren et al. 2011; Young et al. 2001; Zou et al. 2012). Einige Publikationen enthielten wiederum keine Angaben zu einer internen Kontrolle (Imamura et al. 2005; Miotto et al. 2004; Moinova et al. 2002). Eine weitere Schwierigkeit - welche auch für zukünftige Analysen zu beachten ist - war die fehlende allgemeine Anwendbarkeit der Referenzgene auf unterschiedliche Tumorentitäten. Hiernach war jede eingesetzte interne

Kontrollsequenz für die Testung diverser Tumorentitäten und Karzinomstadien unterschiedlich gut geeignet (Andersen et al. 2004; Chari et al. 2010; Chervoneva et al. 2010). Unter Berücksichtigung der MIQE-Richtlinien, den hier dargestellten Anforderungen an ein Referenzgen sowie unter Einbeziehung der o.g. Ergebnisse zum Einfluss der internen Kontrollen auf das Ct-Niveau der jeweiligen Testsequenzen ist der Einsatz von β -Globin in Kombination mit β -Actin (Multiplex-Ansatz) in zukünftigen Studien zur methylierungsspezifischen Ein-Schritt-Real-Time-PCR begründet.

V.7 Diagnostische Spezifität und Sensitivität für *RUNX3*, *NEUROG1*, *SEPTIN9*, *TMEFF2*, *SDC2* und *RASSF1A* im Vergleich zu bisherigen Publikationen

Die Tabellen 18, 19 und 20 liefern in Abhängigkeit vom Ausgangsmaterial (Plasma oder Serum) einen Überblick zur Wertigkeit einer Analyse der Promotor-Regionen von *RUNX3*, *NEUROG1*, *SEPTIN9*, *TMEFF2*, *SDC2* und *RASSF1A* im Vergleich zu den bisher publizierten Arbeiten. Neben den genindividuellen Einzelergebnissen erfolgte abschließend die Betrachtung ermittelter Sensitivitäten und Spezifitäten für ein Markerpanel aus *RUNX3*, *SEPTIN9* und *SDC2*. Die Angaben in den Tabellen müssen dabei mit Zurückhaltung verglichen werden, da die Methoden und Auswahlkriterien für den Einschluss von Patienten sehr unterschiedlich waren. In den nachfolgenden Betrachtungen wurde dieser Aspekt, wenn nötig, berücksichtigt und entsprechend beschrieben.

Zur Beantwortung der Fragestellungen nach dem geeigneten Ausgangsmaterial und dem Einfluss einer internen Kontrolle konnte in der vorliegenden Dissertation die Sensitivität aus nur einem Messwert pro Probe ermittelt werden. Dies ist für einen molekulargenetischen Test, der eine höchstmögliche Sensitivität aufweisen soll, unüblich. Hingegen kann eine Analyse von Replikaten Fehler, die durch die Messung einer zu kleinen Stichprobe bedingt sind, teilweise ausgleichen. Für eine adäquate Beurteilung der Testgenauigkeit wurde die Spezifität aus Einzelwerten ermittelt. Da bei der Analyse der Blutspenderproben die Materialmenge nicht wie bei den Patientenproben limitiert war und in zukünftigen Studien Replikate der Ein-Schritt-Real-Time-PCR eingeplant werden sollten, wurde in den o.g. Tabellen zusätzlich die Spezifität nach Messung von Duplikaten angegeben.

Im Vergleich hierzu führten beispielsweise Herbst et al. (2012), Lofton-Day et al. (2008) sowie Moon et al. (2014) ihre Untersuchungen an Duplikaten durch. DeVos et al. (2009), Warren et al. (2011), Toth et al. (2012), Lee et al. (2013), Oh et al. (2013) sowie Lind et al. (2011) nutzten für ihre PCR sogar Triplikate zur Ermittlung der genspezifischen Spezifitäten und Sensitivitäten.

Tabelle 18: Diagnostische Sensitivitäten und Spezifitäten der methylierungsspezifischen Real-Time-PCR an Plasma-DNA im Vergleich

Gen		Studie	Jahr	Material *	Tumorstadium	Sensitivität	Spezifität	detektierte KRK [n _{KRK} / N _{KRK}]	Falsch-Positiv [n _{falsch-positiv} / N _{HD}] ^{**}
RUNX3		eigene Studie ¹⁾	2015	P	I-IV	20%	96%	5/25	1/24
		eigene Studie ²⁾	2015	P	I-IV	20%	100%	5/25	0/24
		Tan et al.	2007	S	I-IV	65%	100%	11/17	0/10
		Nishio et al.	2010	S	I-IV	29%	n.a.	100/344	n.a.
		Herbst et al.	2011	S	IV	40%	87%	6/15	2/15
NEUROG1		eigene Studie ¹⁾	2015	P	I-IV	12%	96%	3/25	1/24
		eigene Studie ²⁾	2015	P	I-IV	12%	96%	3/25	1/24
		Herbst et al.	2011	S	I-IV	66%	91%	63/95	4/45
SEPTIN9		eigene Studie ¹⁾	2015	P	I-IV	53%	92%	8/15 ³⁾	2/24
		eigene Studie ²⁾	2015	P	I-IV	53%	96%	8/15 ³⁾	1/24
		Lofton-Day et al.	2008	P	I-IV	69%	86%	92/133	25/179
		DeVos et al.	2009	P	I-IV	73%	93%	71/97	12/172
		Grutzmann et al.	2008	P	I-IV	72%	90%	90/125	19/183
		Warren et al.	2011	P	I-IV	90%	88%	45/50	11/94
		Toth et al.	2012	P	I-IV	96%	85%	88/92	14/92
		Lee et al.	2013	P	I-IV	37%	91%	37/101	9/96
		Ahlquist et al.	2012	P	I-IV	60%	73%	18/30	13/49
TMEFF2		eigene Studie ¹⁾	2015	P	I-IV	16%	96%	4/25	1/24
		eigene Studie ²⁾	2015	P	I-IV	16%	96%	4/25	1/24
		Lofton-Day et al.	2008	P	I-IV	65%	69%	87/133	56/179
		Wallner et al.	2006	S	I-IV	13%	100%	13/103	0/20
		Herbst et al.	2011	S	I-IV	20%	n.a.	19/95	n.a.
SDC2		eigene Studie ¹⁾	2015	P	I-IV	56%	92%	14/25	2/24
		eigene Studie ²⁾	2015	P	I-IV	56%	100%	14/25	0/24
		Oh et al.	2013	S	I-IV	87%	95%	114/131	6/125
Marker-Panel	RUNX3 SEPTIN9 SDC2	eigene Studie ¹⁾	2015	P	I-IV	73%	79%	11/15 ³⁾	5/24
	RUNX3 SEPTIN9 SDC2	eigene Studie ²⁾	2015	P	I-IV	73%	96%	11/15 ³⁾	1/24
	RUNX3 p16 RASSF1A CDH1	Tan et al.	2007	S	I-IV	82%	100%	14/17	0/10
	APC MGMT RASSF2A Wif-1	Lee et al.	2009	P	I-II	87%	92%	211/243	22/276

* P = Plasma, S = Serum **N_{HD} = Anzahl gesunder Kontrollen (Health-Donors)

¹⁾ Spezifität und Sensitivität aus Ct₁-Werten entsprechend einer PCR-Einfachbestimmung

²⁾ Spezifität aus Ct-Mittelwerten einer PCR-Doppelbestimmung, Sensitivität aus PCR-Einfachbestimmung (Ct₁)

³⁾ keine Werte für 10 Patientenproben aufgrund fehlerhafter SEPTIN9-PCR

Tabelle 19: Diagnostische Sensitivitäten und Spezifitäten der methylierungsspezifischen Real-Time-PCR an Tumorgewebe-DNA im Vergleich

Gen		Studie	Jahr	Material *	Tumorstadium	Sensitivität	Spezifität	detektierte KRK [n _{KRK} /N _{KRK}]	Falsch-Positiv [n _{falsch-positiv} /N _{HD}]**
RUNX3	eigene Studie ¹⁾	2015	T	I-IV	87%	100%	20/23	0/24	
	Nishio et al.	2010	T	I-IV	39%	n.a.	47/119	n.a.	
	Imamura et al.	2005	T	Dukes A-D	34%	n.a.	31/92	n.a.	
	Moon et al.	2014	T	I-IV	67%	82%	70/105	2/11	
NEUROG1	eigene Studie ¹⁾	2015	T	I-IV	9%	96%	2/23	1/24	
SEPTIN9	eigene Studie ¹⁾	2015	T	I-IV	100%	96%	23/23	1/24	
TMEFF2	eigene Studie ¹⁾	2015	T	I-IV	91%	96%	21/23	1/24	
	Young et al.	2001	T	I-IV	84%	87%	46/55	7/15	
	Ebert et al.	2005	T	I-IV	77%	95%	36/47	1/21	
	Sato et al.	2002	T	AC (CU***)	50%	100%	24/48	0/5	
SDC2	eigene Studie ¹⁾	2015	T	I-IV	87%	100%	20/23	0/24	
	Oh et al.	2013	T	I-IV	98%	95%	136/139	7/139	
RASSF1	eigene Studie ¹⁾	2015	T	I-IV	35%	100%	8/23	24/24	
	Sakamoto et al.	2004	T	Frühstadien	81%	51%	39/48	19/39	
	Brandes et al.	2005	T	I-IV	21%	n.a.	14/64	n.a.	
	Frigola et al.	2005	T	I-IV	52%	70%	16/31	6/20	
Marker-Panel	RUNX3 SEPTIN9 SDC2	eigene Studie ¹⁾	2015	T	I-IV	100%	96%	23/23	1/24
	APC MGMT RASSF2A Wif-1	Lee et al.	2009	T	I-II	91%	92%	211/243	22/276
	AGTR1 WNT2 SLIT2	Carmona et al.	2013	T	I-IV	95%	89%	57/60	4/38
	CNRIP1 FBN1 INA MAL SNCA SPG20	Lind et al.	2011	T	I-IV	99%	98%	73/74	1/51

* T = Gewebe (Tissue) ** N_{ID} = Anzahl gesunder Kontrollen (Health-Donors) *** CU = Colitis Ulcerosa

¹⁾ Sensitivität und Spezifität aus Ct-Mittelwerten (Ct₁ und Ct₂) einer PCR-Doppelbestimmung

Tabelle 20: Diagnostische Sensitivitäten und Spezifitäten methylierungsspezifischer Markerpanel im Vergleich

Gen		Studie	Jahr	Material *	Tumorstadium	Sensitivität	Spezifität	detektierte KRK [N_{KRK}/N_{KRK}]	Falsch-Positiv [$n_{falsch-positiv}/N_{HD}$] **
Marker-Panel	RUNX3	eigene Studie ¹⁾	2015	T	I-IV	100%	79%	23/23	5/24
	SEPTIN9	eigene Studie ²⁾	2015	T	I-IV	100%	96%	23/23	1/24
	SDC2	eigene Studie ¹⁾	2015	P	I-IV	73%	79%	11/15 ³⁾	5/24
		eigene Studie ³⁾	2015	P	I-IV	73%	96%	11/15 ³⁾	1/24
	AGTR1	Carmona et al.	2013	Stuhl	I-IV	78%	89%	50/64	4/38
	WNT2								
	SLIT2								
	sDNA-Test	Ahlquist et al.	2012	Stuhl	I-IV	87%	93%	36/30	7/46
CNRIP1	Lind et al.	2011	Stuhl	I-IV	94%	98%	168/179	2/110	
FBN1									
INA									
MAL									
SNCA									
SPG20									

* T = Gewebe (Tissue), P = Plasma ** N_{HD} = Anzahl gesunder Kontrollen (Health-Donors)

¹⁾ Spezifität und Sensitivität aus Ct_1 -Werten entsprechend einer PCR-Einfachbestimmung

²⁾ Sensitivität und Spezifität aus Ct -Mittelwerten (Ct_1 und Ct_2) einer PCR-Doppelbestimmung

³⁾ Spezifität aus Ct -Mittelwerten einer PCR-Doppelbestimmung, Sensitivität aus PCR-Einfachbestimmung (Ct_1)

⁴⁾ sDNA-Test: Multi-Target-Methylierungsanalyse an BMP3, NDRG4, Vimentin, TFP12, K-RAS-Mutation, Beta-Actin, Quantifikation von Hämoglobin

RUNX3

Für *RUNX3* wurde bei einer Einfachbestimmung und einem Cut-Off- Ct von 40 an isolierter Patientenplasma-DNA eine Sensitivität von 20 % ermittelt. Die Spezifität lag unter Berücksichtigung der ersterhobenen Ct_1 -Werte bei 96%. Für die Ct -Mittelwerte der Doppelbestimmung (Ct_1 und Ct_2) ergab sich eine Spezifität von 100 %. Vergleichbare Studien, in denen die Hypermethylierung des *RUNX3*-Promotors getestet wurden, publizierten mit 40-65 % deutlich höhere Sensitivitäten bei vergleichbaren Spezifitäten von 87-100 % (Herbst et al. 2011; Rahmig 2012; Tan et al. 2007). Tan et al. (2007) untersuchten neben dem *RUNX3* zudem *p16*, *RASSF1A* oder *CDH1* einzeln und in Kombination auf entsprechend tumorassoziiere Promotormethylierungen an Serum-DNA diverser Karzinomentitäten sowie an zehn gesunden Serumkontrollen. Die insgesamt 70 Serum-DNA-

Proben setzten sich hierbei aus 17 kolorektalen Karzinomen, aus 19 Mamma-Karzinomen, aus 20 nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen, aus vier Magen-, zwei Pankreaskarzinomen sowie aus acht hepatozellulären Karzinomen zusammen. Für all diese Tumorentitäten wurde ein hypermethylierter *RUNX3*-Promotor mit einer Sensitivität von 62 % und einer Spezifität von 100 % nachgewiesen (Tan et al. 2007). Allein für das KRK beobachteten die Autoren dieser Arbeit für *RUNX3* eine Hypermethylierung bei elf von 17 Patienten (Sensitivität 65 %) sowie eine Hypomethylierung bei zehn von zehn Kontrollpersonen (Spezifität 100 %). Es bleibt jedoch festzuhalten, dass die methylierungsspezifischen PCR-Untersuchungen in dieser Arbeit nicht mittels eines Real-Time-PCR-Verfahrens umgesetzt wurden, sondern die Quantifizierung der DNA nach PCR-Amplifikation über eine Gelelektrophorese erfolgte (MSP). In der zweiten Studie von Herbst et al. (2012) wurde *RUNX3* in einem Trainingsset aufgrund der nicht ausreichenden Sensitivität von 40 % sowie einer Spezifität von 87 % von den weiteren PCR-Analysen der Studie ausgeschlossen. Hierbei wurde der Methylierungsstatus über eine Real-Time-PCR nach Bisulfit-Vorbehandlung erfasst. Nishio et al. 2010 beschrieben - nach Bisulfit-Vorbehandlung und Real-Time-PCR - für nur 100 von insgesamt 344 Serum-DNA-Proben eine Promotormethylierung des *RUNX3*, was einer Sensitivität von 29 % entsprach. Unter Berücksichtigung der getesteten Fallzahlen zeigten die insgesamt ermittelten Sensitivitäten für nachweisbare *RUNX3*-Promotormethylierungen an peripherem Blut - mit Ausnahme der Arbeit von Tan et al. (2007) - dass der Einsatz von *RUNX3* als alleiniger Serum- oder Plasma-Marker eines KRK in zukünftigen Studien infrage gestellt werden muss.

Die vorliegende Analyse von *RUNX3* an DNA aus Tumorgewebe ergab hingegen Detektionsraten von 87 % bei Spezifitäten von 96 % und 100 % aus den jeweiligen Einzel- und Mittelwertanalysen. Nishio et al. (2010) beobachteten in einer vergleichbaren Studie eine Sensitivität von 39 % bei insgesamt 119 DNA-Proben aus Tumorgewebe. Zwei weitere Arbeiten zeigten für 92 beziehungsweise 105 Gewebeproben wiederum Sensitivitäten von 34 % und 67 % (Imamura et al. 2005; Moon et al. 2014a). Aus der Arbeit von Moon et al. (2014) ging zudem eine Spezifität von 82 % mit zwei von 11 falsch-positiven Ergebnissen hervor. Die Autoren nutzten hierbei sowohl MSP als auch Real-Time-PCR. Hinsichtlich des Nachweises einer Hypermethylierung von *RUNX3* in DNA aus Tumorgewebe zeigte die vorliegende Arbeit im Vergleich zu anderen Publikationen eine höhere Sensitivität (87 %). Einschränkend war jedoch - wie bei den Untersuchungen an Patientenplasma - die Anzahl der Karzinom- und Kontrollproben im Vergleich zu den Angaben in der Literatur gering, was die Aussagekraft dieser Beobachtung relativiert.

NEUROG1

Für *NEUROG1* wurde auch in den Kontrollproben eine Methylierung des Promotors beobachtet. Der Anspruch an eine hohe Spezifität des Testverfahrens erforderte die Festlegung eines vergleichsweise niedrigen Cut-Off-Ct von 34. In der Folge wurde eine Sensitivität von 12 % bei einer Spezifität von 96 % aus Einfach- und Doppelbestimmung ermittelt. Herbst et al. (2011) beschrieben *NEUROG1* als vielversprechenden Marker für die Früherkennung eines KRK. Speziell für die UICC-Tumorstadien I und II erreichten die Autoren Sensitivitäten von 52 % beziehungsweise 71 %. Prämaligne Läsionen wurden aus dem Serum hingegen nur mit einer Sensitivität von etwa 8 % detektiert. Über alle UICC-Stadien lag die Sensitivität der Analyse einer *NEUROG1*-Hypermethylierung bei 66 %. Die Spezifität betrug hierbei 91 %. In dieser Studie wurde Material von insgesamt 95 KRK-Patienten sowie von 45 gesunden Kontrollpersonen mittels einer Real-Time-PCR nach Bisulfit-Vorbehandlung untersucht (Herbst et al. 2011; Rahmig 2012).

Die Ein-Schritt-Real-Time-PCR für *NEUROG1* zum Nachweis entsprechender Promotormethylierungen an Tumorgewebe-DNA lieferte Sensitivitäten von 13 % und 9 % aus Einfach- sowie Doppelbestimmung und lag damit im Bereich der Sensitivität aus der Plasma-Untersuchung. Die ermittelten Spezifitäten betrugen hierbei jeweils 96 % für die Einzel- und Mittelwert-Analyse. Vergleichbare Daten zum Methylierungsstatus von *NEUROG1* in Tumorgewebe von KRK-Patienten waren der aktuellen Literatur in diesem Zusammenhang nicht zu entnehmen. Für *NEUROG1* war letztlich festzustellen, dass die vielversprechenden Daten von Herbst et al. (2011) und Rahmig (2012) zur KRK-Diagnostik anhand einer nachweisbaren Hypermethylierung des *NEUROG1*-Promotors in der vorliegenden Arbeit nicht reproduziert werden konnten.

SEPTIN9

Für *SEPTIN9* zeigte die vorliegende Arbeit an Plasma-DNA eine Sensitivität von 53 % sowie Spezifitäten von 92 % beziehungsweise 96 % aus Einfach- und Doppeldetektion. Der Methylierungsnachweis von *SEPTIN9* mittels Real-Time-PCR-Methode ist bereits seit Oktober 2009 kommerziell erhältlich, was die Verfügbarkeit vieler Studiendaten für diesen epigenetischen Tumormarker erklärt (Ahlquist et al. 2012; deVos et al. 2009; Grutzmann et al. 2008; Lee et al. 2013a; Lofton-Day et al. 2008; Toth et al. 2012; Warren et al. 2011). Dennoch schwanken die Angaben zu Sensitivität und Spezifität dieses Biomarker in der Literatur stark. Bisher wurden hier insgesamt Sensitivitäten von 37-96 % und Spezifitäten von 73-93 % beschrieben (Ahlquist et al. 2012; deVos et al. 2009; Grutzmann et al. 2008; Lee et al. 2013a; Lofton-Day et al. 2008; Toth et al. 2012; Warren et al. 2011). Vor allem die Arbeiten von Warren et al. (2011) sowie von Toth et al. (2012) publizierten mit 90-96 % Sensitivität und

85-88 % Spezifität die aktuell höchsten Detektionsraten. Positive Methylierungsnachweise an KRK-Patientenproben waren in diesen Studien in 45 von 50 beziehungsweise 88 von 92 Fällen nachweisbar. Falsch-positive Ergebnisse lagen in elf von 94 und 14 von 92 gesunden Probandenproben vor. Toth et al. (2012) nutzten hierbei den kommerziellen Test der Firma Epigenomics Epi proColon Kit 2.0 (Epigenomics AG, Berlin, Deutschland) im Vergleich zu einem konventionellen FOBT sowie zur CEA-Konzentration im Blut. Sie konnten eine Überlegenheit des *SEPTIN9*-Tests gegenüber den anderen beiden Methoden speziell für rechtsseitige und damit proximal lokalisierte KRK zeigen. Warren et al. (2011) beschrieben außerdem eine Sensitivität von 87 % für eine Detektion der Tumorstadien I und II und bestätigten damit *SEPTIN9* als vielversprechenden Screeningmarker. Die Studien von Lofton-Day et al. (2008) sowie von Ahlquist et al. (2012) erreichten wiederum Sensitivitäten von 60-69 % und lagen damit im Bereich der hier dargestellten Ergebnisse. Die Arbeitsgruppe um Lofton-Day et al. (2008) untersuchte *SEPTIN9* an der größten Patientenzahl (N=133). Eine Gegenüberstellung dieser Studie war hinsichtlich des Vorgehens und des Versuchsaufbaus mit der hier vorliegenden Arbeit möglich. So war beispielsweise die Festlegung genspezifischer Messbereiche und Nachweisgrenzen mit der Vorgehensweise in dieser Studie vergleichbar (Lofton-Day et al. 2008). Zudem wurde auch in dieser Arbeit eine enzymatisch katalysierte Verdauungsreaktion durch Einsatz einer Restriktionsendonuklease durchgeführt. In einer Micro-Array-Analyse und einer anschließenden PCR an DNA aus Tumorgewebe, tumorfreiem Gewebe sowie an peripheren Blutlymphozyten wurden neben *SEPTIN9* das *NGFR*-sowie das *TMEFF2*-Gen aus 56 potentiellen Testgenen ausgewählt. Diese vorselektierten Marker wurden anschließend in einer Real-Time-PCR an Plasma-DNA auf nachweisbare Hypermethylierungen getestet (Lofton-Day et al. 2008). Unter diesen drei Sequenzen zeigte sich *SEPTIN9* am sensitivsten in der Detektion von Promotormethylierungen über alle UICC-Tumorstadien. Dieser Marker erreichte darüber hinaus - für eine vorausgesetzte Mindestspezifität von 95 % - Frühdetektionssensitivitäten von 30-56 % für die UICC-Stadien 0 bis II. Ahlquist et al. (2012) testeten *SEPTIN9* in Plasma im Vergleich zu einem Stuhl-DNA-Markerpanel. Hier konnte an DNA aus insgesamt 30 KRK-Patienten und 49 gesunden - Kontrollpersonen eine Sensitivität von 60 % sowie eine Spezifität von 73 % ermittelt werden (Ahlquist et al. 2012). Im Gegensatz zu den bisher dargestellten Arbeiten beschrieben Lee et al. (2013a) für *SEPTIN9* mit nur 37 % eine deutlich niedrigere Sensitivität bei einer Spezifität von 91 %.

Bei der Betrachtung der Studien zu *SEPTIN9* fiel auf, dass Plasma dem Serum als Ausgangsmaterial vorgezogen wurde. Auch in der vorliegenden Arbeit waren die 9 Ct-Werte aus 3 Patientenplasmaproben tendenziell niedriger (Mittelwert=41,51) als bei der Untersuchung von Serum aus der gleichen Blutentnahme (Mittelwert=47,49). Dieser Unterschied war jedoch lediglich für *NEUROG1* statistisch signifikant. Hingegen ergab der Vergleich der Ct-

Werte aus Plasma und Serum für *RUNX3*, *SEPTIN9*, *TMEFF2* und *SDC2* in diesem Zusammenhang keine statistische Signifikanz (Abbildung 13). Hinsichtlich der eingesetzten Fallzahlen waren die dargestellten Ergebnisse am ehesten mit den Daten von Ahlquist et al. (2012) vergleichbar. Alle weiteren Studien führten wiederum methylierungsspezifische Untersuchungen an deutlich mehr Patienten durch. Die überwiegende Zahl der Studien betrachteten in ihren Untersuchungen an RK *SEPTIN9* nicht differenziert. Vor diesem Hintergrund und dem Aspekt der vergleichsweise hohen Sensitivität der *SEPTIN9*-Untersuchung sollte das Ein-Schritt-Real-Time-PCR-Verfahren bei einer größeren Patientengruppe unter Berücksichtigung unterschiedlicher Tumorstadien untersucht werden. Die in dieser Arbeit ermittelten Sensitivitäten und Spezifitäten erforderten die Festlegung eines vergleichsweise hohen Cut-Off-Ct von 46. Damit stieg das Risiko falsch-positiver Messergebnisse deutlich. Für einige Patientenproben ergaben sich jedoch Ct-Werte von 41-44, so dass zukünftig die Effizienz der *SEPTIN9*-PCR verbessert werden muss.

In der vorliegenden Arbeit war *SEPTIN9* in DNA aus Tumorgewebe in 23 von 23 Fällen hypermethyliert, was Sensitivitäten von 100% für Einfach- und Doppelbestimmungen entsprach. Die für *SEPTIN9* ermittelten Spezifitäten betrugen 92 % (Einfachbestimmung) und 96 % (Doppelbestimmung) bei zwei beziehungsweise einer falsch-positiven Detektion. Lofton-Day et al. (2008) beschrieben Promotormethylierungen für *SEPTIN9* an Tumorgewebe-DNA in mehr als der Hälfte der getesteten KRK-Patienten (N=114). Damit wird von dieser Arbeitsgruppe sogar eine geringere Sensitivität beschrieben als für die Untersuchung von Patientenplasma, was sich nur durch die Freisetzung von hypermethyliertem *SEPTIN9* aus gesundem Gewebe erklären lässt. Unter Berücksichtigung der in dieser Arbeit erzielten vielversprechenden Detektionsraten sowie der geringen Anzahl vergleichbarer Publikationen ist eine nachfolgende Real-Time-PCR-Analyse von *SEPTIN9* an Tumorgewebe-DNA prospektiv und an einer größeren Fallzahl zu empfehlen.

TMEFF2

Für *TMEFF2* konnte in der hier durchgeführten Analyse an Plasma-DNA von 25 KRK-Patienten sowie 24 Blutspendern eine Sensitivität von 16 % aus der Einzelwertanalyse sowie Spezifitäten von jeweils 96 % aus der Einfach- und Doppelbestimmung erzielt werden. Die Sensitivität ist daher mit den Daten von Wallner et al. (2006) sowie Herbst et al. (2011) vergleichbar, welche in ihren Methylierungsanalysen von *TMEFF2* an Serum-DNA Sensitivitäten von 13 % beziehungsweise 20 % ermitteln konnten. Allerdings erfolgte in beiden Studien der Nachweis entsprechender Promotormethylierungen an insgesamt 103 sowie 95 Patientinnen und Patienten und damit an deutlich größeren Patientengruppen im Vergleich zu der hier vorliegenden Arbeit. Wallner et al. (2006) beschrieben wiederum eine Spezifität von 100 %

bei 20 gesunden Kontrollproben. Damit ist hinsichtlich der Anzahl der Kontrollproben eine direkte Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen dieser Arbeit gegeben. In der Studie von Lofton-Day et al. (2008) war *TMEFF2* mit 65 % deutlich häufiger hypermethyliert als in anderen Studien. Die Autoren nahmen hierfür jedoch eine reduzierte Spezifität in Kauf. So ergab sich für 179 gesunde Probanden eine Spezifität von nur 69 % (Lofton-Day et al. 2008). Dieser Vergleich unterstreicht die Bedeutung des Cut-Off für die Bestimmung von Sensitivität und Spezifität eines Diagnoseverfahrens. Für einen Tumormarker sollte die Spezifität in der Nähe von 95 % liegen, da ansonsten die Wertigkeit in klinischen Behandlungspfaden deutlich infrage gestellt werden muss.

Für die durchgeführte PCR-Analyse von *TMEFF2* an Tumorgewebe-DNA waren mit 87 % und 91 % aus Einzel- beziehungsweise Mittelwertanalyse wiederum deutlich höhere Sensitivitäten im Vergleich zur Plasma-DNA-Untersuchung zu beobachten. Die Spezifitäten lagen für beide Analysevarianten bei 96 %. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet. Ebert et al. (2005) sowie Young et al. (2001) beschrieben für die methylierungsspezifischen PCR-Testungen an Gewebe-DNA Sensitivitäten von 77 % und 84 % sowie Spezifitäten von 95 % und 87 %. In den genannten Studien wurden jeweils 47 beziehungsweise 55 Patientenproben sowie 21 beziehungsweise 15 Kontrollproben untersucht. Insbesondere Ebert et al. (2005) beschrieb das *TMEFF2* als Marker fortgeschrittener Tumorstadien. Auch die Arbeitsgruppe um Sato et al. (2002) untersuchte mittels Real-Time-PCR-Verfahren DNA-Proben aus 48 Adenokarzinom-Patienten sowie fünf gesunde DNA-Kontrollen auf *TMEFF2*-Promotormethylierungen. Hierbei konnte eine Sensitivität von 50 % und eine Spezifität von 100 % ermittelt werden. Einschränkend ist jedoch anzuführen, dass bei dieser Studie ausschließlich DNA-Proben aus Colitis-assoziierten Karzinomen berücksichtigt wurden und daher eine Vergleichbarkeit aufgrund der Pathophysiologie nur eingeschränkt gegeben war (Sato et al. 2002).

In Zusammenschau der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse sowie den Daten der angeführten Studien kann *TMEFF2* als Gewebemarker für ein KRK in fortgeschrittenen Tumorstadien verwendet werden. Hingegen ergaben sich aus der Plasma- sowie Serumdetektion in vier von fünf Untersuchungen vergleichsweise niedrige Sensitivitäten, wonach *TMEFF2* als potentieller Blut-Biomarker - speziell für das RK - ungeeignet erscheint. Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang, dass eine Methylierungsanalyse dieses Tumormarkers möglicherweise für den Nachweis weiterer Karzinomentitäten, wie beispielsweise für Ösophagus-, Kardia-, distale Magenkarzinome oder Gallenblasentumoren, geeignet sein könnte, was Arbeiten von Geddert et al. und Takahashi et al. aus dem Jahr 2004 nahelegen. Hier konnten - ebenfalls mittels methylierungsspezifischer PCR - Methylierungsraten für *TMEFF2* von 64 %, 38 %, 54 % und 20 % für Ösophagus-, Kardia-, Magen-, sowie Gallenblasenkarzinome aufgezeigt werden (Geddert et al. 2004; Takahashi et al. 2004). Hinsicht-

lich einer Anwendung von *TMEFF2* als Biomarker dieser genannten Entitäten bedarf es jedoch weiterer prospektiver Untersuchungen an ausreichend großen Patientengruppen.

SDC2

Für *SDC2* wurde in dieser Arbeit an 25 Plasma-DNA-Proben der Tumorstadien II und III eine diagnostische Sensitivität von 56 % aus einer PCR-Einfachbestimmung ermittelt. Aus der Untersuchung von 24 gesunden DNA-Kontrollproben aus Blutspender-Plasma gingen wiederum Spezifitäten von 92 % und 100 % aus Einfach- und Doppelbestimmung hervor.

In der Arbeit von Oh et al. (2013) erfolgte eine methylierungssensitive PCR-Detektion aus Serum an 114 von 131 KRK-Patientenproben, was einer Sensitivität von 87 % entsprach. Bei 125 Kontrollproben lag die diagnostische Spezifität hier bei 95 %. Darüber hinaus konnte diese Arbeit bemerkenswerte Sensitivitäten von 92 % (24 von 26 positiv), 82 % (47 von 57 positiv) und 92 % (11 aus 12 positiv) für die Detektion der KRK-Tumorstadien I, II und III erreichen (Oh et al. 2013), so dass das *SDC2* durch die Autoren als vielversprechender Screening-Marker dargestellt wurde. Insgesamt konnten in der vorliegenden Arbeit durch Ein-Schritt-Real-Time-PCR-Analyse an Plasma-DNA die hohen Sensitivitäten von Oh et al. nicht bestätigt werden. *SDC2* sollte jedoch - bei Methylierungsraten von über 50 % - an größeren Fallzahlen sowie im Rahmen der Testung eines diagnostischen Markerpanels aus dem peripheren Blut weiter untersucht werden. Unter Berücksichtigung der deutlich geringeren Anzahl untersuchter Proben lagen die dargestellten Spezifitäten für *SDC2* im Bereich der Beobachtungen von Oh et al. (2013).

SDC2 in Tumorgewebe-DNA war in 87 % der Fälle hypermethyliert. Die Spezifitäten lagen bei 92 % und 100 % ermittelt aus Einfach- und Doppelbestimmungen an Blutspender-DNA. Vergleichend hierzu beschrieben Oh et al. (2013) für insgesamt 139 getestete Tumorgewebeproben und 139 tumorfreie Gewebeproben eine Sensitivität von 98 % sowie eine Spezifität von 95 %. Für weiterführende Methylierungsanalysen des *SDC2* an isolierter Gewebe-DNA ist daher, neben einer größeren Anzahl zu untersuchender Gewebe- und Kontrollproben, der Einsatz von DNA aus gesundem Kontroll-Gewebe des gleichen Probanden im Sinne eines Matching empfehlenswert. In dieser Arbeit konnte letztlich das Potential von *SDC2* als epigenetischer Biomarker, welches durch Oh et al. (2013) beschrieben wurde, durchaus bestätigt werden. Es empfiehlt sich jedoch auch für diese Gensequenz die Durchführung weiterer prospektiver Fall-Kontroll-Studien, um die Bedeutung dieses Markers für die Krankenversorgung ausreichend beurteilen zu können.

RASSF1A

Die methylierungssensitive PCR-Testung des *RASSF1A* erfolgte in der vorliegenden Arbeit ausschließlich an isolierter DNA aus den verfügbaren Tumorgewebeproben (siehe IV.4.9). Eine Untersuchung von DNA aus Patientenplasma konnte nicht für alle infrage kommenden Promotor-Regionen vorgenommen werden, da hierfür das verfügbare Volumen von 1 ml nicht ausreichte. Die Sensitivitäten zum Nachweis einer Hypermethylierung von *RASSF1A* in Tumorgewebe lagen bei 35 % für die Einzel- und Mittelwertanalyse. Die an Blutspenderplasma-DNA ermittelten Spezifitäten lagen bei 88 % beziehungsweise 100 %.

Die Angaben in der Literatur zur Hypermethylierung von *RASSF1A* in Gewebe-DNA von KRK-Patienten reichen von 21 bis 81 % Sensitivität (Brandes et al. 2005; Frigola et al. 2005; Sakamoto et al. 2004). Insbesondere die Arbeiten von Frigola et al. (2005) und Sakamoto et al. (2004) beschrieben Sensitivitäten von 52 % und 81 % für 31 und 48 Tumorgewebeproben sowie Spezifitäten von 70 % und 51 % für 20 und 39 gesunde Kontrollproben. Die Studie von Sakamoto et al. (2004) beschrieb hierbei *RASSF1A* als sensitiven Frühdetektions-Gewebe-marker, da hier lediglich flache Frühkarzinome sowie intramukosale High-Grade-Dysplasien untersucht wurden. Insgesamt lagen damit die Detektionsraten in beiden Studien - bei vergleichbaren Fallzahlen - höher als in der vorliegenden Arbeit. Hingegen waren im Vergleich zur dargestellten Studie die Spezifitäten in Frigola et al. (2005) und Sakamoto et al. (2004) geringer. Brandes et al. (2005) beschrieben außerdem mit 21 % eine noch deutlich geringere Sensitivität als die der vorliegenden Ein-Schritt-Real-Time-PCR. In dieser Studie konnten lediglich für 14 von 64 Tumor-DNA-Proben ein positiver Methylierungsnachweis mittels PCR-Verfahren erbracht werden (Brandes et al. 2005). Im Rahmen von Plasma-beziehungsweise Serum-spezifischen Methylierungsanalysen fand *RASSF1A* hingegen nur Anwendung in einem diagnostischen Markerpanel von Tan et al. (2007).

Zusammenfassend konnten für *RASSF1A* die Ergebnisse der Studien von Frigola et al. (2005) sowie Sakamoto et al. (2004) nicht bestätigt werden, wodurch der Einsatz des *RASSF1A* als therapiestratifizierender Tumorgewebe-Marker bei KRK und speziell bei RK nicht empfohlen werden kann. Vielversprechender zeigte sich dieser potentielle Methylierungsmarker jedoch bisher in der Detektion und Prognoseevaluation anderer Karzinomentitäten, wie beispielsweise dem Prostatakarzinom, dem adrenokortikalen Karzinom, dem Magenkarzinom oder dem papillären Schilddrüsenkarzinom (Kang et al. 2004; Korah et al. 2013; Kunstman et al. 2013; Shi et al. 2014). Insbesondere für die letztgenannte Entität konnten Kunstman et al. (2013) mittels PCR-Restriktionsenzymverdau - in einem Vergleich von DNA-Proben aus 41 papillären Schilddrüsenkarzinomen sowie 18 DNA-Proben aus gesundem Schilddrüsen-gewebe - Hypermethylierungen in nahezu allen Karzinomproben

feststellen. Vor diesem Kontext empfiehlt sich für *RASSF1A* daher die Durchführung weiterer prospektiver Studien an Plasma- sowie Gewebe-DNA für verschiedene Karzinomentitäten.

RUNX3, *SEPTIN9* und *SDC2* als diagnostisches Markerpanel

Im Rahmen der genspezifischen PCR-Methylierungsanalyse an Patienten- und Blutspenderplasma-DNA sowie an Tumorgewebe-DNA erfolgte die Zusammenfassung der Gensequenzen *RUNX3*, *SEPTIN9* und *SDC2* in einem diagnostischen Markerpanel. In Einfachdetektion an Patientenplasma-DNA wurde hier für die drei Gensequenzen in Kombination eine Sensitivität von 73 % ermittelt. Die Spezifitäten aus Einfach- und Doppelbestimmung an Blutspenderplasma-DNA betrugen 79 % und 96 %.

Aus der Literatur konnten zwei Studien identifiziert werden, in denen vergleichbare Panel-Methylierungsanalysen an isolierter DNA aus Plasma- oder Serum von KRK-Patienten sowie an gesunden Kontrollen durchgeführt wurden (Lee et al. 2009; Tan et al. 2007). In einer retrospektiven Studie von Lee et al. (2009) wurden für ein Methylierungspanel aus *APC*, *MGMT*, *RASSF2A* (RAS-Association Domain Family 2) sowie für *Wif-1* (Wnt-Inhibitory Factor 1) an Plasma-DNA-Proben der Tumorstadien I und II eine Sensitivität von 87 % sowie eine Spezifität von 92 % beschrieben. Hierbei wurden insgesamt 211 von 243 DNA-Proben als korrekt methylierungs-positiv klassifiziert. Lediglich 22 der 276 gesunden Kontrollproben wiesen ein falsch-positives Testergebnis auf. Zusätzlich wurden in dieser Arbeit noch 48 von 64 Plasma-DNA-Proben von Adenom-Patienten als richtig methylierungs-positiv getestet. Für die Erkennung eines Adenoms ergab sich somit eine Sensitivität von 75 %. In einem weiteren von Tan et al. (2007) beschriebenen ausschließlich epigenetischen Panel kam eine Kombination der Gensequenzen *RUNX3*, *p16*, *RASSF1A* und *CDH1* (Cadherin-1) zum Einsatz. Insgesamt ergab sich in dieser Studie für die Detektion von Promotormethylierungen des o.g. Panels über alle Karzinomentitäten (N=70) eine Sensitivität von 89 % bei 62 von 70 korrekt methylierungs-positiven Reaktionen. Dies machte deutlich, dass für die getestete Genkombination gegebenenfalls eine Anwendbarkeit für weitere Karzinomentitäten bestehen könnte. Für das KRK konnte in dieser Arbeit durch das genannte Panel eine Sensitivität von 82 % sowie eine Spezifität von 100 % für 17 Karzinomserum-Proben und 10 Kontrollproben beobachtet werden (Tan et al. 2007). Betrachtet man insbesondere die Analyse der 17 KRK-Proben der genannten Studie, so bestand hinsichtlich der Anzahl der getesteten Proben sowie den erreichten Ergebnissen eine gewisse Vergleichbarkeit mit der vorliegenden Einzelschritt-Real-Time-PCR. Hier wurde das Panels aus *RUNX3*, *SEPTIN9* und *SDC2* an 15 Patientenproben sowie 24 gesunden Kontrollen getestet. Im Gegensatz zur dargestellten Arbeit verwendeten jedoch sowohl Tan et al. (2007) als auch die Studie von Lee et al. (2009) in ihrem Panel vier anstelle von drei Methylierungsmarkern, wodurch sich möglicherweise die

besseren diagnostischen Sensitivitäten von 82 % (Tan et al. 2007) und 87 % (Lee et al. 2009) erklären lassen. Im Hinblick auf die Etablierung eines klinischen Tests nach dem Vorbild des kommerziellen *SEPTIN9*-Methylierungsnachweises könnte sich ein zusätzlicher Methylierungsmarker jedoch gleichfalls negativ auf die Spezifität auswirken. Die Ergebnisse von Lee et al. (2009) (92 % Spezifität) an einer deutlich größeren Patientengruppe weisen auf diesen Aspekt hin. Zudem sollte das Erreichen einer höheren diagnostischen Sensitivität und Spezifität gegen den zeitlichen sowie finanziellen Mehraufwand abgewogen werden, welcher aus dem Einsatz eines zusätzlichen Markers zwangsläufig resultiert. Beispielsweise ließe sich die Kosteneffizienz durch eine Automatisierung des PCR-Ansatzes weiter steigern. Es bedarf daher weiterer prospektiver Studien um die ermittelten Sensitivitäten und Spezifitäten zu bestätigen, die Evidenz zu verbessern und einen möglichen Nutzen für den klinischen Alltag einschätzen zu können.

Für die Testung des epigenetischen Markerpanels an Tumorgewebe-DNA-Proben ergaben sich in der vorliegenden Arbeit Sensitivitäten von jeweils 100 % aus Einfach- und Doppelbestimmung. Die Spezifitäten wurden analog den Einzelgenanalysen ebenfalls in Einfach- und Doppelbestimmung an Plasma-DNA gesunder Blutspender getestet. Hier konnten Spezifitäten von 79 % beziehungsweise 96 % ermittelt werden. Diese Analyse unterstreicht den Nutzen einer Ein-Schritt-Real-Time-PCR-Testung in Duplikaten, da somit die Spezifität des Experimentes deutlich verbessert werden kann.

Die erzielten Ergebnisse sind mit den Daten dreier weiterer Arbeiten vergleichbar, welche mit einem Untersuchungspanel Sensitivitäten zwischen 91-99 % beschrieben (Carmona et al. 2013; Lee et al. 2009; Lind et al. 2011). Wie bereits für die Detektion an Patientenplasma dargestellt, beschränkte sich die Studie von Lee et al. (2009) überwiegend auf die Testung der frühen Tumorstadien I und II. Die Autoren erzielten hier für eine Kombination aus *APC*, *MGMT*, *RASSF2A* und *Wif-1* an Tumorgewebe-DNA eine Sensitivität und Spezifität von 91 % und 92 %. Insgesamt wurden in dieser Arbeit 211 von 243 Patientenproben als positiv sowie 22 von 276 gesunden Kontrollen als falsch-positiv detektiert. Hierbei zeigte sich deutlich, dass der Umfang dieser Studie die Probenanzahl der in der vorliegenden Arbeit verfügbaren Gewebe-DNA-Proben bei weitem überstieg, was eine direkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse erschwerte. Lee et al. (2009) untersuchten ausschließlich frühe KRK-Stadien, während in der vorliegenden Arbeit ausschließlich DNA aus RK zum Einsatz kam. Eine größere Vergleichbarkeit hinsichtlich der Sensitivität bestand zu den Arbeiten von Carmona et al. (2013) sowie zu Lind et al. (2011), welche ihre Panel-Untersuchung an Tumorgewebe-DNA von insgesamt 60 beziehungsweise 74 KRK-Patienten durchführten. So konnten Carmona et al. (2013) für ein Panel aus *AGTR1* (Angiotensin-II Receptor-Type 1), *WNT2* (Wingless-Type Integration-Site Family-Member 2) und *SLIT2* (Slit Homolog 2 Protein) eine Sensitivität von 95 % sowie eine Spezifität von 89 % beobachten. Ein wesentlicher Unter-

schied zur vorliegenden Studie bestand hier im Einsatz von DNA aus gesundem Darmgewebe anstelle von Plasma-Proben gesunder Probanden zur Ermittlung der diagnostischen Spezifität. Ähnlich wie für den Vergleich mit Oh et al. (2013) war dadurch auch für diese Studie eine direkte vergleichende Betrachtung in diesem Punkt erschwert. Hingegen war die Anzahl der eingesetzten epigenetischen Marker (N=3) im Vergleich zur eigenen Studie identisch. Die Arbeitsgruppe um Lind et al. (2011) wiederum beschrieb für ein Panel aus den sechs epigenetischen Markern *CNRIP1* (Cannabinoid Receptor Interacting Protein 1), *FBN1* (Fibrillin 1), *INA* (Internexin Neuronal Intermediate Filament-Protein Alpha), *MAL* (Mal T-Cell Differentiation Protein), *SNCA* (Synuclein Alpha) und *SPG20* (Spastic Paraplegia 20) eine Sensitivität von 99 % sowie eine Spezifität von 98 %, wobei hier für mindestens zwei der sechs Marker ein positiver Gen-Methylierungsnachweis erbracht werden musste. Bei der Ermittlung der Spezifität kamen auch in dieser Studie DNA-Isolate aus gesundem Darmgewebe zum Einsatz, was wiederum ein wesentlicher Unterschied zur vorliegenden Arbeit war. In Zusammenhang mit der CAO/ARO/AIO-94 und -04 Studie nutzten außerdem Jo et al. (2012) die methylierungsspezifischen Marker *RUNX3* und *NEUROG1* in Kombination mit weiteren Markern (N=5) im Rahmen einer CIMP-Panel-Analyse an Tumorgewebe. Unter Beteiligung dieser beiden Gensequenzen in dem angesprochenen Panel wurden insgesamt 150 Patienten-Gewebeproben getestet, wovon letztlich 90 % der Karzinome als CIMP- (135 von 150 Serumproben) und 10 % der Karzinome als CIMP+ eingestuft werden konnten (Jo et al. 2012). In der Zusammenschau von Plasma- und Gewebedetektionsanalysen ist festzuhalten, dass in mehreren Publikationen einschließlich der vorliegenden Arbeit eine Erhöhung der Sensitivität durch den Einsatz diagnostischer Markerpanel - im Vergleich zu den Einzelgendetektionen - zu erreichen war. Dieser Effekt kann nur erzielt werden, wenn für die einzelnen Reaktionen eine hohe Spezifität gefordert wird, da sich sonst durch eine Anhäufung falsch-positiver Ergebnisse in verschiedenen Einzelanalysen die Spezifität deutlich verschlechtern kann. Vergleichbare epigenetische Panel-Untersuchungen von Biomarkern aus dem Stuhl zeigten Sensitivitäten von 78-94 % bei Spezifitäten von 89-98 % (Ahlquist et al. 2000; Ahlquist et al. 2012; Carmona et al. 2013; Lind et al. 2011). Diese Zahlen deuten darauf hin, dass durch Stuhlanalysen im Vergleich mit den in dieser Arbeit durchgeführten Bluttests keine wesentlichen Vorteile zu erwarten sind. Ahlquist et al. (2012) testeten zwar an einer vergleichbaren Anzahl isolierter Stuhlproben von Karzinompatienten (N=30) und ermittelten hierfür eine Sensitivität von eben 87 % sowie eine Spezifität von 93 %, jedoch wurde auch hier - mit insgesamt sieben Methylierungsmarkern - die Anzahl der in der eigenen Panel-Analyse eingesetzten Tumormarker deutlich überschritten (Ahlquist et al. 2012). Sowohl Lind et al. (2011) als auch Carmona et al. (2013), welche in ihren Arbeiten jeweils Methylierungsraten aus Stuhl- und Tumorgewebe-DNA miteinander verglichen, konnten eine Überlegenheit der PCR-Analyse an DNA aus Karzinomgewebe aufzeigen.

Zudem wurde für die Stuhlanalyse in weiteren Arbeiten eine - im Vergleich zum Plasma oder Serum - geringere sowie unregelmäßigere Freisetzung von zellfreier Tumor-DNA in die Fäzes diskutiert, was sich unmittelbar auf die Detektionsraten sowie Spezifitäten auswirken würde. Dieser Aspekt könnte wiederum die Wahl eines geeigneten diagnostischen sowie prognostischen, epigenetischen Methylierungstests entscheidend beeinflussen (Alix-Panabieres et al. 2012; Schwarzenbach et al. 2011). Andere Autoren beschrieben in ihren Arbeiten überdies eine gegenüber der Blut-Analyse aufwendigere Aufarbeitung der DNA-Proben aus dem Stuhl, eine erhöhte Fehleranfälligkeit der Testungen durch die residente Darmflora oder durch das Vorliegen einer CED sowie eine Irritation der Tests durch Tumorentitäten proximal des Kolons (Hundt et al. 2007; Osborn und Ahlquist 2005). All diese Aspekte sprechen eher für die Anwendung und Weiterentwicklung von Marker-basierten epigenetischen Diagnoseverfahren aus dem Blut und nicht aus dem Stuhl.

Insgesamt bestand auch für die Panel-Analysen eine nicht unerhebliche methodische Heterogenität der einzelnen Studien untereinander, was eine Vergleichbarkeit oftmals erschwerte. Durch die Festlegung einheitlicher Richtlinien zur Durchführung, Auswertung und Publikation von Methylierungsanalysen könnte auch in nachfolgende Panel-Studien eine Verbesserung der Aussagekraft erreicht werden.

V.8 Therapiestratifizierung anhand des Markerpanels *RUNX3-SEPTIN9-SDC2*

Aus den unter Gliederungspunkt IV.4.11 dargestellten Ergebnissen für das in dieser Arbeit getestete Markerpanel *RUNX3-SEPTIN9-SDC2* ging außerdem hervor, dass eine signifikante Korrelation ($p=0,025$, χ^2 -Test) zwischen detektierten Promotormethylierungen an dem prätherapeutisch entnommenen Patientenplasma und dem pathologischen UICC-Stadium nach neoadjuvanter RCT bestand. Genauer zeigten vier von sechs Patienten, welchen nach RCT ein pUICC-Stadium I zugeordnet werden konnte, in der Ein-Schritt-Real-Time-PCR grenzwertabhängig keine nachweisbaren Hypermethylierungen. Hingegen waren Promotormethylierungen des Markerpanels bei acht von neun Patienten mit einem pUICC II-IV nach RCT nachweisbar.

Vergleichbare Untersuchungen machten Wallner et al. (2008), die ihre Ergebnisse mit klinisch-pathologischen Eigenschaften wie beispielsweise dem UICC-Stadium, der Tumorgroße und Lokalisation, dem Auftreten von regionären und/oder Fernmetastasen, dem Grading sowie dem Auftreten eines Karzinomrezidivs korrelierten. Hierdurch gelang dieser Arbeitsgruppe eine Analyse des prognostischen Potentials der untersuchten epigenetischen Biomarker. Genauer zeigte diese Studie an 104 Patienten eine signifikante Zunahme detektierbarer Hypermethylierungen von *HLTF* und *TMEFF2* bei zunehmender Tumormasse ($p_{HLTF}=0,021$; $p_{TMEFF2}=0,03$) sowie in höheren pUICC-Stadien ($p_{HLTF}=0,042$; $p_{TMEFF2}<0,001$). Ebenso publizierten die Autoren für das Auftreten von Hypermethylierungen der *HLTF*- sowie

der *TMEFF2*-Promotor-Region ein statistisch signifikant erhöhtes Rezidivrisiko ($p=0,009$). Lee et al. (2013a) zeigten an 83 kolorektalen Karzinomen ebenfalls signifikant erhöhte Methylierungsraten von *SEPTIN9* bei Patienten mit einer größeren Tumormasse sowie beim Vorliegen von Fernmetastasen ($p_{\text{Tumormasse}}=0,04$; $p_{\text{Fernmetastasen}}=0,044$). Auch Lofton-Day et al. (2008) beschrieben eine eindeutige Zunahme der detektierbaren Hypermethylierungen für *TMEFF2* und *SEPTIN9* in höheren Tumorstadien ($p<0,05$). In der Studie von Oh et al. (2013) konnten hingegen keine signifikanten Zusammenhänge zwischen dem Methylierungsstatus und dem Tumorstadium aufgezeigt werden.

Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die getesteten Biomarker *RUNX3*, *SEPTIN9* und *SDC2* eine prognostische Aussagekraft im Hinblick auf das zu erwartende Ausmaß eines Tumordownstaging mittels neoadjuvanter RCT besitzen und damit eine Therapiestratifizierung ermöglichen. Zur Bestätigung dieses Ergebnisses sollte daher eine prospektive Studie an einer größeren Fallzahl durchgeführt werden.

V.9 Fehlerquellen

Für die Anwendung eines mehrstufigen experimentellen Versuchsaufbaus bestand ein nicht unerhebliches Fehlerpotential im Rahmen der Gewinnung, Lagerung und Aufbereitung des zu testenden DNA-Probematerials sowie hinsichtlich möglicher DNA-Veränderungen im Zuge der Ein-Schritt-Real-Time PCR. All diese Faktoren könnten sich nachteilig auf die ermittelten Sensitivitäten und Spezifitäten ausgewirkt haben. So beschrieben beispielsweise zwei Arbeiten bereits 1990 und 1991 eine mögliche Beeinflussung der PCR-Qualität durch die Antikoagulantien EDTA, Citrat und Heparin in Zusammenhang mit beeinflussenden Ionenaustauschprozessen und Enzyminaktivierungen (Beutler et al. 1990; Holodniy et al. 1991; Rahmig 2012). Da auch in dem hier dargestellten experimentellen Setting EDTA im Rahmen der Blutentnahmen von Patienten und Blutspendern Verwendung fand, ist eine mögliche Beeinflussung der erzielten PCR-Ergebnisse durch den o.g. Zusatz denkbar. Im Vergleich zur Untersuchung an Serum ließ sich ein solcher Einfluss jedoch nicht darstellen. Weiterhin könnte eine partielle Denaturierung der DNA durch die angewandte Kryokonservierung sowie den nachfolgenden Auftau-Schritt des Ausgangsmaterials stattgefunden haben. Dieser Aspekt wurde beispielsweise durch zwei Arbeiten an Keimzell-DNA-Proben beschrieben und nahm in diesen Studien Einfluss auf die ermittelten Detektionsraten (Hu et al. 2008; Kader et al. 2009).

Darüber hinaus konnten andere Autoren eine hohe Variabilität der Konzentration an zirkulierender Tumor-DNA im peripheren Blut in Abhängigkeit vom vordiagnostizierten Tumorstadium feststellen, was speziell Rahmig (2012) in ihrer Dissertationsschrift zusammenfasste. Hierbei zeigte sich das gerade in Adenom- sowie Frühkarzinom-Stadien, im Vergleich zu fortgeschrittenen Tumorstadien, von einer deutlich niedrigeren DNA-Konzentration ausgegangen werden muss (Herbst et al. 2011; Rahmig 2012). Zudem ist die DNA-Konzentration von der direkten Tumormorphologie abhängig, was wiederum Wharton et al. (1999) beschrieben. Diese Arbeitsgruppe ging aufgrund von Tumorverkalkungs- und Nekrotisierungsprozessen von einer heterogenen DNA-Freisetzung in die Blutbahn aus, was wiederum Einfluss auf die diagnostische Sensitivität und Spezifität ihrer Versuche nahm (Wharton et al. 1999). Diese Aspekte könnten auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit einen nicht unerheblichen Einfluss auf die ermittelten Ergebnisse gehabt haben, da auch hier Proben aus unterschiedlichen Rektumkarzinom-Stadien eingesetzt wurden.

Weiterhin erfolgte in der vorliegenden Arbeit die DNA-Isolation aus nur einer Plasma- sowie Gewebeprobe der jeweiligen Tumorpatienten und Blutspender, was unter Berücksichtigung der o.g. Konzentrationsunterschiede an cfDNA im Ausgangsmaterial, die Wahrscheinlichkeit falsch negativer Nachweisreaktionen erhöhte. Um außerdem experimentellen Mess-Ungeauigkeiten zu begegnen, erfolgte die Untersuchung der DNA wenn möglich in Mehrfachbestimmung. Für den Methylierungsnachweis an Plasma-DNA der Karzinompatienten war

aufgrund der geringen Materialmenge lediglich eine Einfachbestimmung möglich. Hieraus resultierten Mess-Abweichungen, welche bei der Gegenüberstellung der ermittelten Sensitivitäten und Spezifitäten mit Ergebnissen anderer Arbeiten zu berücksichtigen sind. Zudem war aufgrund der vergleichsweise geringen Gesamtanzahl getesteter Proben von einer erhöhten statistischen Ungenauigkeit auszugehen, was wiederum einer belastbaren, repräsentativen Aussage entgegensteht. Eine weitere Fehlerquelle, welche nachweislich zu einer Modifikation der zu amplifizierenden DNA-Proben hätte führen können, wurde hingegen durch den Verzicht auf eine vorherige Bisulfit-Behandlung der Plasma-DNA-Proben im Vorfeld ausgeschlossen (Bundo et al. 2012; Tetzner et al. 2007). Durch gewissenhafte und standardisierte Verfahrensabläufe wurde weiterhin das Risiko für potentielle Pipettier- und Ansatzfehler weitestgehend minimiert. Dennoch war auch hierbei eine mögliche Kontamination der PCR-Mastermixe, trotz aller Sorgfalt, nicht vollständig auszuschließen und könnte in Konsequenz zu einer möglichen Verfälschung der ermittelten Ergebnisse geführt haben.

V.10 Fazit und Ausblick

Trotz fortschrittlicher Entwicklungen in den Bereichen des Screenings als auch in der Etablierung effektiver Therapie-Regime in den zurückliegenden Jahren, bleibt das kolorektale Karzinom und speziell das Rektumkarzinom - aufgrund der immer noch hohen Inzidenz- und Mortalitätsraten - bis heute im Mittelpunkt wissenschaftlicher Betrachtungen. Hierbei ist es vornehmlich das Fehlen klinischer Frühsymptome, was die Etablierung neuer, epigenetischer Biomarker in den Fokus molekulargenetischer Betrachtungen rücken lässt. So konnte mit dem in dieser Arbeit dargestellten Versuchsansatz durchaus ein Beitrag zur Entwicklung eines blutbasierten PCR-Methylierungsnachweises geliefert werden. Entscheidende Vorteile zum kommerziell verfügbaren *SEPTIN9*-Test bestanden dabei, wie mehrfach dargestellt, in dem Verzicht auf eine vorherige aufwändige Bisulfit-Behandlung der zu testenden DNA-Proben. Stattdessen erfolgte mit dem alleinigen Einsatz der Restriktionsendonuklease AclI in die Ein-Schritt-Real-Time-PCR von *RUNX3*, *NEUROG1*, *SEPTIN9*, *TMEFF2*, *SDC2* und *RASSF1A* die Etablierung eines alternativen und effizienten Verfahrens. Durch Verwendung der Real-Time-PCR-Methode wurde ein automatisiertes und damit schnelles Analyseverfahren angewandt, was eine qualitative Auswertung der Messungen in Echtzeit ermöglichte. Darüber hinaus konnte das Kontaminationsrisiko der Testansätze - aufgrund der Versuchsdurchführung in einem geschlossenen System - gegenüber einer konventionellen PCR mit nachfolgender Gelelektrophorese minimiert werden.

Orientierend an den MIQE-Qualitätskriterien gelang außerdem die erfolgreiche Amplifikation der tumorassoziierten Sequenzen in Kombination mit den internen Kontrollen *β-Actin* und *β-Globin*, was letztlich die Darstellung methodisch valider und reproduzierbarer Ergebnisse

erlaubte. Aufgrund der selektierten DNA-Proben, welche ausschließlich Rektumkarzinom-Patienten der initial-intermediären Tumorstadien II und III entstammten, war jedoch keine Aussage zur Sensitivität der Ein-Schritt-Real-Time-PCR als Screeningmethode möglich. Vielmehr zielte die hier vorliegende Arbeit darauf ab einen prädiktiven Therapiestratifizierungsmarker für das RK zu identifizieren, dessen Einsatz der Beurteilung des Karzinom-Remissionsstatus, der Therapie-Response-Rate sowie der Einschätzung der Prognose dienlich sein sollte. Speziell für das *SDC2*- und *SEPTIN9*-Gen konnten mit der Ein-Schritt-Real-Time-PCR Einzelgen-Sensitivitäten von über 50 % sowie Spezifitäten zwischen 80-100 % erreicht werden. Dieser Aspekt lässt meiner Meinung nach eine weitere Testung dieser Sequenzen mit dem dargestellten Verfahren in prospektiven Studien lohnenswert erscheinen. Hingegen konnten die Ergebnisse für *RUNX3*, *NEUROG1*, *TMEFF2* sowie *RASSF1A* als methylierungssensitive Plasma-Marker für das Rektumkarzinom nicht überzeugen. Ein Einsatz dieser Gensequenzen ist nach den hier vorliegenden Daten allenfalls in einem diagnostischen Blut-Markerpanel zu überdenken, wie dies beispielhaft für *RUNX3* erfolgte. In Kombination von *RUNX3* mit *SEPTIN9* und *SDC2* konnten eine Sensitivität von 73 % und Spezifitäten von bis zu 96 % erzielt werden, welche die Ergebnisse der Einzelgen-Analysen übertrafen. Das prognostische Potential des getesteten Markerpanels könnte überdies - im Hinblick auf die Therapiestratifizierung - zur Beantwortung weiterer Fragestellungen wie sie Publikationen von Gaedcke et al. (2014), Habr-Gama et al. (1998 und 2006) und Grade et al. (2012) aufwerfen, beitragen. Hiernach ist für eine zukünftig stärker individualisierte Therapieplanung eine bessere Stratifizierung und Reevaluation der Tumorentwicklung (Tumor-Response) nach neoadjuvanter Vorbehandlung nötig. Ein valider epigenetischer Biomarker, welcher im Verlauf unmittelbar vor und nach neoadjuvanter Primärtherapie aus dem Patientenplasma evaluiert wird, könnte somit beispielsweise eine Effektbeurteilung der RCT erlauben. Dies könnte wiederum die Entscheidung für eine nachfolgende chirurgische Intervention oder - sollte eine Operation unumgänglich sein - für eine adjuvanten Chemotherapie erleichtern.

RUNX3, *SEPTIN9*, *TMEFF2* und *SDC2* konnten außerdem als vielversprechende Gewebemarkers mit Einzelgen-Sensitivitäten zwischen 87 und 100 % sowie Spezifitäten von 90-100 % identifiziert werden. Hingegen stellten sich *NEUROG1* und *RASSF1A* als ungeeignete Gewebemarkers für das Rektumkarzinom heraus. Für die Analyse des genannten diagnostischen Markerpanels (*RUNX3*, *SEPTIN9* und *SDC2*) an Tumorgewebe-DNA konnte eine Sensitivität von 100 % bei einer Spezifität von 96 % erreicht werden. Diese Ergebnisse gilt es zukünftig in repräsentativen Fall-Kontroll-Studien zu bestätigen. Hierfür sollten jedoch nachfolgende Untersuchungen Aspekte des Alters-Matching zwischen Fall- und Kontrollgruppe berücksichtigen. Eine ausreichende Anzahl zu testender Proben aus dem peripheren Blut und/oder dem Tumorgewebe ist hierbei außerdem Grundvoraussetzung für eine reprä-

sentative und übertragbare Aussage zu den Detektionseigenschaften möglicher Testmarker des Rektumkarzinoms. Weiterführende Studien sollten darüber hinaus bei Einsatz des hier dargestellten PCR-Verfahrens eine vergleichbare Verteilung und Anzahl entsprechender DNA-Testproben der Tumorstadien I-IV anstreben. Hierdurch könnte ein potentieller Zusammenhang zwischen der Zunahme quantitativ-detektierbarer Promotormethylierungen und einem steigenden Tumorstadium näher untersucht werden. Zudem ist eine methylierungssensitive Testung einer ausreichenden Anzahl von Plasma-DNA-Proben der prätherapeutischen Tumorstadien 0 bis II empfehlenswert, um die Screening-Eigenschaften der hier eingesetzten Testsequenzen detaillierter zu beleuchten und gegebenenfalls einen Frühdetektionsmarker etablieren zu können. Die Anwendung der dargestellten Ein-Schritt-Real-Time-PCR für die getesteten Einzelgene - allen voran für *TMEFF2* und *RASSF1A* - empfiehlt sich weiterhin für Testungen an DNA anderer Karzinomentitäten, wie dies beispielhaft bereits durch andere Autoren erfolgte (Korah et al. 2013; Kunstman et al. 2013; Tan et al. 2007). Die Umsetzung dieser Aspekte unter Berücksichtigung einheitlicher, methodischer Standards ist demnach notwendig, um letztlich eine ausreichende, gen-individuelle Evidenz für die hier dargestellte, methylierungsspezifische Real-Time-PCR-Methode zu erreichen. Nur auf diesem Weg ist eine klinische Etablierung solcher epigenetischer Therapiestratifizierungsmarker denkbar und realistisch.

VI. Zusammenfassung

In wissenschaftlichen Studien der letzten 10 Jahre rückten genetische und epigenetische Biomarker als Diagnostikum der Früherkennung und Therapiestratifizierung eines kolorektalen Karzinoms in den Mittelpunkt der Betrachtungen. Vor diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Arbeit mit *RUNX3*, *NEUROG1*, *HLTF*, *SEPTIN9*, *TMEFF2*, *SDC2* und *RASSF1A* sieben Gensequenzen auf das Vorliegen einer potentiell tumorassoziierten Hypermethylierung ihrer Promotorbereiche mittels einer neuen automatisierten Ein-Schritt-Real-Time-PCR-Methode untersucht. Besonderheiten des Versuchsprotokolls waren dabei der Verzicht auf eine Behandlung der DNA mit Natrium-Bisulfit sowie die Verwendung einer methylierungsabhängigen Restriktionsendonuklease im Reaktionsgemisch der Ein-Schritt-Real-Time-PCR.

Ein signifikanter Unterschied der Messergebnisse zwischen methylierter und nicht-methylierter Kontroll-DNA wurde bei der Untersuchung der Promotorbereiche der Gene *RUNX3*, *NEUROG1*, *SEPTIN9*, *TMEFF2*, *SDC2* und *RASSF1A* beobachtet. Vergleichbare Unterschiede waren für *HLTF* nicht nachweisbar, so dass für diesen Marker keine Untersuchungen an Patientenmaterial durchgeführt wurden. Nach einem Vergleich der Restriktionsenzyme *Acil*, *BstUI* und einer Enzymkombination aus *Acil* und *AccII* wurde *Acil* aufgrund des höchsten Signal-Rausch-Abstandes für die weiteren Experimente der Studie ausgewählt. Eine weitere Subanalyse an Patientenplasma- und Patientenserumproben im Vergleich (n=3) ergab für *NEUROG1* eine signifikante Überlegenheit des EDTA-Plasmas gegenüber dem Blutserum (p=0,0381). Ein vergleichbarer Unterschied war bei der Untersuchung von *RUNX3*, *SEPTIN9*, *TMEFF2* und *SDC2* nicht zu beobachten. Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde EDTA-Plasma als Ausgangsmaterial für die weiterführenden Untersuchungen dieser Studie ausgewählt.

Für eine erste Bewertung des Testverfahrens standen jeweils 1ml EDTA-Plasma sowie isolierte DNA aus Tumorgewebeproben von 25 Rektumkarzinom-Patienten im Stadium II-IV (UICC) sowie Plasma-DNA-Proben von 48 gesunden Blutspendern zur Verfügung. Ein Ziel dieser Arbeit war, den Einfluss der Amplifikation interner Kontrollgene (*β -Globin* und *β -Actin*) in einer Multiplex-PCR auf die Sensitivität und Spezifität der methylierungsspezifischen Real-Time-PCR zu ermitteln. Es konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von *β -Globin* und *β -Actin* die Sensitivität der *NEUROG1*-, *TMEFF2*-, *SDC2*- und *RASSF1A*-PCR für die Detektion von Promotormethylierungen positiv beeinflusst. Die Sensitivität der *RUNX3*- und *SEPTIN9*-PCR wurde darüber hinaus durch den Einsatz der o.g. Kontroll-Gene nicht signifikant verschlechtert.

Nach Etablierung des Verfahrens wurde die diagnostische Sensitivität und Spezifität von *RUNX3*, *NEUROG1*, *SEPTIN9*, *TMEFF2*, *SDC2* und *RASSF1A* für die Detektion von

Hypermethylierungen an Plasma- und Tumorgewebe-DNA-Proben der Patienten sowie an Plasma-DNA der Blutspender untersucht. Hierbei lag die Sensitivität (Einfachbestimmung) und Spezifität (Doppelbestimmung) der jeweiligen Multiplex-PCR in der Untersuchung von Plasma für *RUNX3* bei 20 % und 100 %, für *NEUROG1* bei 12 % und 96 %, für *SEPTIN9* bei 53 % und 96 %, für *TMEFF2* bei 16 % und 96 % und für *SDC2* bei 56 % und 100 %. Vergleichend ergab sich aus der PCR-Doppelbestimmung von Tumorgewebe-DNA bei gleicher Spezifität (ermittelt aus Blutspender-Plasma) eine diagnostische Sensitivität von 87 % (*RUNX3*), 9 % (*NEUROG1*), 100 % (*SEPTIN9*), 91 % (*TMEFF2*) und 87 % (*SDC2*). Im Rahmen der Untersuchung an Tumorgewebe-DNA erfolgte zusätzlich eine Methylierungsanalyse für *RASSF1A*. Für diesen Marker wurde eine Sensitivität von 35 % und eine Spezifität von 100 % aus Doppelbestimmung beobachtet.

Auf Grundlage der ermittelten Einzel-Sensitivitäten und Spezifitäten aus der PCR-Plasma- und Tumorgewebe-Analyse wurden *RUNX3*, *SEPTIN9* und *SDC2* für ein diagnostisches Markerpanel ausgewählt. Hierbei ergab sich unter der Voraussetzung, dass mindestens eine der drei Panel-Sequenzen eine grenzwertabhängige Hypermethylierung in der untersuchten Patientenplasma-DNA aufweist, eine Sensitivität von 73 % (aus Einfachbestimmung) bei einer Spezifität von 96 % (aus Doppelbestimmung). Für die Testung des o.g. Markerpanels an Tumorgewebe-DNA betrugen Sensitivität und Spezifität aus PCR-Doppelbestimmung 100 % und 96 %.

Es konnte zudem eine signifikante Korrelation zwischen prätherapeutisch ermittelten Hypermethylierungen des Biomarkerpanels aus *RUNX3*, *SEPTIN9* und *SDC2* in Patientenplasma und dem pathologischen UICC-Tumorstadium nach Radio-Chemotherapie gezeigt werden ($p=0,025$, χ^2 -Test, $n=15$). Hiernach waren Promotormethylierungen vermehrt bei den Patienten zu finden, welche nach RCT ein Tumorstadium II-IV aufwiesen, während Patienten mit einem Tumorstadium I nach RCT wiederum signifikant weniger Hypermethylierungen zeigten.

Anhand der hier erzielten Ergebnisse an Proben von Patienten mit intermediärem Tumorstadium des Rektumkarzinoms wurde gezeigt, dass die automatisierte, methylierungsspezifische Ein-Schritt-Real-Time-PCR ein vielversprechendes Verfahren der Tumordiagnostik zu sein scheint. Der klinische Nutzen dieses Verfahrens sollte gerade im Hinblick auf die Verlaufsbeurteilung, Therapiestratifizierung und Prognoseevaluation in prospektiven Folgestudien an einer ausreichend großen Patientengruppe eingesetzt und weiter beurteilt werden. Für einen möglichen Einsatz des hier dargestellten Testverfahrens im Rahmen des Darmkrebs-Screenings bedarf es darüber hinaus einer Verbesserung der Evidenz durch entsprechende Studien mit Rektum- und Kolonkarzinom-Patienten, welche ein frühes Tumorstadium aufweisen.

VII. Literaturverzeichnis

Adam IJ, Mohamdee MO, Martin IG, Scott N, Finan PJ, Johnston D, Dixon MF, Quirke P (1994): Role of circumferential margin involvement in the local recurrence of rectal cancer. *Lancet* 344(8924): 707-711.

Aguado-Llera D, Goormaghtigh E, de Geest N, Quan XJ, Prieto A, Hassan BA, Gomez J, Neira JL (2010): The basic helix-loop-helix region of human neurogenin 1 is a monomeric natively unfolded protein which forms a "fuzzy" complex upon DNA binding. *Biochemistry* 49(8): 1577-1589.

Ahlquist DA, Skoletsky JE, Boynton KA, Harrington JJ, Mahoney DW, Pierceall WE, Thibodeau SN, Shuber AP (2000): Colorectal cancer screening by detection of altered human DNA in stool: feasibility of a multitarget assay panel. *Gastroenterology* 119(5): 1219-1227.

Ahlquist DA, Sargent DJ, Loprinzi CL, Levin TR, Rex DK, Ahnen DJ, Knigge K, Lance MP, Burgart LJ, Hamilton SR et al. (2008): Stool DNA and occult blood testing for screen detection of colorectal neoplasia. *Ann Intern Med* 149(7): 441-450, W481.

Ahlquist DA, Taylor WR, Mahoney DW, Zou H, Domanico M, Thibodeau SN, Boardman LA, Berger BM, Lidgard GP (2012): The stool DNA test is more accurate than the plasma septin 9 test in detecting colorectal neoplasia. *Clin Gastroenterol Hepatol* 10(3): 272-277 e271.

Alberts SR (2012): Update on the optimal management of patients with colorectal liver metastases. *Crit Rev Oncol Hematol* 84(1): 59-70.

Alix-Panabieres C, Schwarzenbach H, Pantel K (2012): Circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Annu Rev Med* 63: 199-215.

Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF (2004): Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 64(15): 5245-5250.

Arbman G, Nilsson E, Hallbook O, Sjodahl R (1996): Local recurrence following total mesorectal excision for rectal cancer. *Br J Surg* 83(3): 375-379.

- Atkin WS, Edwards R, Kralj-Hans I, Wooldrage K, Hart AR, Northover JM, Parkin DM, Wardle J, Duffy SW, Cuzick J (2010): Once-only flexible sigmoidoscopy screening in prevention of colorectal cancer: a multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 375(9726): 1624-1633.
- Ausch C, Kim YH, Tsuchiya KD, Dzieciatkowski S, Washington MK, Paraskeva C, Radich J, Grady WM (2009): Comparative analysis of PCR-based biomarker assay methods for colorectal polyp detection from fecal DNA. *Clin Chem* 55(8): 1559-1563.
- Bai J, Yong HM, Chen FF, Song WB, Li C, Liu H, Zheng JN (2013): *RUNX3* is a prognostic marker and potential therapeutic target in human breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 139(11): 1813-1823.
- Bariol C, Suter C, Cheong K, Ku SL, Meagher A, Hawkins N, Ward R (2003): The relationship between hypomethylation and CpG island methylation in colorectal neoplasia. *Am J Pathol* 162(4): 1361-1371.
- Beutler E, Gelbart T, Kuhl W (1990): Interference of heparin with the polymerase chain reaction. *Biotechniques* 9(2): 166.
- Bipat S, Glas AS, Slors FJ, Zwinderman AH, Bossuyt PM, Stoker J (2004): Rectal cancer: local staging and assessment of lymph node involvement with endoluminal US, CT, and MR imaging--a meta-analysis. *Radiology* 232(3): 773-783.
- Bird A (2002): DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16(1): 6-21.
- Bird AP (1986): CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321(6067): 209-213.
- Bock C, Walter J, Paulsen M, Lengauer T (2007): CpG island mapping by epigenome prediction. *PLoS Comput Biol* 3(6): e110.
- Boecker W, Denk H, Heitz U, Moch H, Hoefler G (2012): *Pathologie*, 5. Auflage; Elsevier-Urban und Fischer, München 2012.
- Boland CR, Goel A (2010): Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* 138(6): 2073-2087 e2073.
- Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN et al. (1998): A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 58(22): 5248-5257.

Bombardieri E, Jotti GS, Cocciolo MG, Mori M, Rusconi A, Rusca M, Seregini E, Becchi G, Fontanesi M, Tardini A et al. (1985): Tissue polypeptide antigen and carcinoembryonic antigen in colon tumors: serum levels and immunohistochemical localization. *Cancer Detect Prev* 8(1-2): 219-226.

Bosset JF, Collette L, Calais G, Mineur L, Maingon P, Radosevic-Jelic L, Daban A, Bardet E, Beny A, Ollier JC (2006): Chemotherapy with preoperative radiotherapy in rectal cancer. *N Engl J Med* 355(11): 1114-1123.

Brandes JC, van Engeland M, Wouters KA, Weijenberg MP, Herman JG (2005): CHFR promoter hypermethylation in colon cancer correlates with the microsatellite instability phenotype. *Carcinogenesis* 26(6): 1152-1156.

Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J (2013): Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer* 132(5): 1133-1145.

Brenner H, Tao S (2013): Superior diagnostic performance of faecal immunochemical tests for haemoglobin in a head-to-head comparison with guaiac based faecal occult blood test among 2235 participants of screening colonoscopy. *Eur J Cancer* 49(14): 3049-3054.

Brenner H, Altenhofen L, Hoffmeister M (2010): Eight years of colonoscopic bowel cancer screening in Germany: initial findings and projections. *Dtsch Arztebl Int* 107(43): 753-759.

Brunet S, Casals T, Madoz P, Aventin A, Muniz E, Baiget M (1989): [DNA polymorphisms as implant markers in allogeneic bone marrow transplantation. Preliminary evaluation]. *Med Clin (Barc)* 93(20): 765-771.

Bujko K, Kepka L, Michalski W, Nowacki MP (2006): Does rectal cancer shrinkage induced by preoperative radio(chemo)therapy increase the likelihood of anterior resection? A systematic review of randomised trials. *Radiother Oncol* 80(1): 4-12.

Bundo M, Sunaga F, Ueda J, Kasai K, Kato T, Iwamoto K (2012): A systematic evaluation of whole genome amplification of bisulfite-modified DNA. *Clin Epigenetics* 4(1): 22.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL et al. (2009): The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55(4): 611-622.

Bustin SA, Benes V, Garson J, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley G et al. (2013): The need for transparency and good practices in the qPCR literature. *Nat Methods* 10(11): 1063-1067.

- Capouillez A, Debauxe G, Decaestecker C, Filleul O, Chevalier D, Mortuaire G, Coppee F, Leroy X, Belayew A, Saussez S (2009): The helicase-like transcription factor is a strong predictor of recurrence in hypopharyngeal but not in laryngeal squamous cell carcinomas. *Histopathology* 55(1): 77-90.
- Carmona FJ, Azuara D, Berenguer-Llargo A, Fernandez AF, Biondo S, de Oca J, Rodriguez-Moranta F, Salazar R, Villanueva A, Fraga MF et al. (2013): DNA methylation biomarkers for noninvasive diagnosis of colorectal cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* 6(7): 656-665.
- Carpelan-Holmstrom M, Louhimo J, Stenman UH, Alfthan H, Haglund C (2002): CEA, CA 19-9 and CA 72-4 improve the diagnostic accuracy in gastrointestinal cancers. *Anticancer Res* 22(4): 2311-2316.
- Casarino L, Carbone C, Capucci MA, Izzi T, Ferrara GB (1992): Analysis of chimerism after bone marrow transplantation using specific oligonucleotide probes. *Bone Marrow Transplant* 10(2): 165-170.
- Chan KC, Ding C, Gerovassili A, Yeung SW, Chiu RW, Leung TN, Lau TK, Chim SS, Chung GT, Nicolaides KH et al. (2006): Hypermethylated *RASSF1A* in maternal plasma: A universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis. *Clin Chem* 52(12): 2211-2218.
- Chari R, Lonergan KM, Pikor LA, Coe BP, Zhu CQ, Chan TH, MacAulay CE, Tsao MS, Lam S, Ng RT et al. (2010): A sequence-based approach to identify reference genes for gene expression analysis. *BMC Med Genomics* 3: 32.
- Chen CH, Hsieh MC, Lai CC, Yeh CY, Chen JS, Hsieh PS, Chiang JM, Tsai WS, Tang R, Changchien CR et al. (2010): Lead time of carcinoembryonic antigen elevation in the postoperative follow-up of colorectal cancer did not affect the survival rate after recurrence. *Int J Colorectal Dis* 25(5): 567-571.
- Chen F, Bai J, Li W, Mei P, Liu H, Li L, Pan Z, Wu Y, Zheng J (2013): *RUNX3* suppresses migration, invasion and angiogenesis of human renal cell carcinoma. *PLoS One* 8(2): e56241.
- Cheng HC, Liu YP, Shan YS, Huang CY, Lin FC, Lin LC, Lee L, Tsai CH, Hsiao M, Lu PJ (2013): Loss of *RUNX3* increases osteopontin expression and promotes cell migration in gastric cancer. *Carcinogenesis* 34(11): 2452-2459.
- Chervoneva I, Li Y, Schulz S, Croker S, Wilson C, Waldman SA, Hyslop T (2010): Selection of optimal reference genes for normalization in quantitative RT-PCR. *BMC Bioinformatics* 11: 253.

- Cho S, Cinghu S, Yu JR, Park WY (2011): Helicase-like transcription factor confers radiation resistance in cervical cancer through enhancing the DNA damage repair capacity. *J Cancer Res Clin Oncol* 137(4): 629-637.
- Chudy M, Hewlett I, Saldanha J, Bianco C, Conrad AJ, Gierman T, Heldebrant C, Rautmann GG, Roth WK, Stramer S et al. (2003): Technical considerations for the performance of Nucleic acid Amplification Technology (NAT). The NAT Task Force Group. *Biologicals* 31(3): 153-159.
- Crispin A, Birkner B, Munte A, Nusko G, Mansmann U (2009): Process quality and incidence of acute complications in a series of more than 230,000 outpatient colonoscopies. *Endoscopy* 41(12): 1018-1025.
- Dahlberg M, Glimelius B, Pahlman L (1999): Changing strategy for rectal cancer is associated with improved outcome. *Br J Surg* 86(3): 379-384.
- Damin DC, Lazzaron AR (2014): Evolving treatment strategies for colorectal cancer: a critical review of current therapeutic options. *World J Gastroenterol* 20(4): 877-887.
- De Oliveira T, Abiatari I, Raulefs S, Sauliunaite D, Erkan M, Kong B, Friess H, Michalski CW, Kleeff J (2012): Syndecan-2 promotes perineural invasion and cooperates with K-ras to induce an invasive pancreatic cancer cell phenotype. *Mol Cancer* 11: 19.
- deVos T, Tetzner R, Model F, Weiss G, Schuster M, Distler J, Steiger KV, Grutzmann R, Pilarsky C, Habermann JK et al. (2009): Circulating methylated SEPT9 DNA in plasma is a biomarker for colorectal cancer. *Clin Chem* 55(7): 1337-1346.
- Dieudonne FX, Marion A, Marie PJ, Modrowski D (2012): Targeted inhibition of T-cell factor activity promotes syndecan-2 expression and sensitization to doxorubicin in osteosarcoma cells and bone tumors in mice. *J Bone Miner Res* 27(10): 2118-2129.
- Dighe S, Purkayastha S, Swift I, Tekkis PP, Darzi A, A'Hern R, Brown G (2010): Diagnostic precision of CT in local staging of colon cancers: a meta-analysis. *Clin Radiol* 65(9): 708-719.
- Dijkstra JR, van Kempen LC, Nagtegaal ID, Bustin SA (2014): Critical appraisal of quantitative PCR results in colorectal cancer research: can we rely on published qPCR results? *Mol Oncol* 8(4): 813-818.
- Ding M, Bullotta A, Caruso L, Gupta P, Rinaldo CR, Chen Y (2011): An optimized sensitive method for quantitation of DNA/RNA viruses in heparinized and cryopreserved plasma. *J Virol Methods* 176(1-2): 1-8.

Duffy MJ (2001): Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful? Clin Chem 47(4): 624-630.

Ebert MP, Mooney SH, Tonnes-Priddy L, Lograsso J, Hoffmann J, Chen J, Rocken C, Schulz HU, Malfertheiner P, Lofton-Day C (2005): Hypermethylation of the TPEF/HPP1 gene in primary and metastatic colorectal cancers. Neoplasia 7(8): 771-778.

Ebert MP, Model F, Mooney S, Hale K, Lograsso J, Tonnes-Priddy L, Hoffmann J, Csepregi A, Rocken C, Molnar B et al. (2006): Aristaless-like homeobox-4 gene methylation is a potential marker for colorectal adenocarcinomas. Gastroenterology 131(5): 1418-1430.

Eickhoff A, Riemann JF (2000): [Colon carcinoma: early detection and endoscopic prevention]. Internist (Berl) 41(9): 860-867.

Falcone A, Ricci S, Brunetti I, Pfanner E, Allegrini G, Barbara C, Crino L, Benedetti G, Evangelista W, Fanchini L et al. (2007): Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nord Ovest. J Clin Oncol 25(13): 1670-1676.

Fanous AH, Chen X, Wang X, Amdur RL, O'Neill FA, Walsh D, Kendler KS (2007): Association between the 5q31.1 gene neurogenin1 and schizophrenia. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 144B(2): 207-214.

Fearon ER, Vogelstein B (1990): A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 61(5): 759-767.

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F (2013). GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France, International Agency for Research on Cancer (IARC). 2013: Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on day/month/year (abgerufen am 30.06.2015).

Floriani I, Torri V, Rulli E, Garavaglia D, Compagnoni A, Salvolini L, Giovagnoni A (2010): Performance of imaging modalities in diagnosis of liver metastases from colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. J Magn Reson Imaging 31(1): 19-31.

Folprecht G, Grothey A, Alberts S, Raab HR, Kohne CH (2005): Neoadjuvant treatment of unresectable colorectal liver metastases: correlation between tumour response and resection rates. Ann Oncol 16(8): 1311-1319.

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): 938-946.

Fong Y, Fortner J, Sun RL, Brennan MF, Blumgart LH (1999): Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases. *Ann Surg* 230(3): 309-318; discussion 318-321.

Förster T (1948): Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik* 437(1-2): 55-75.

Frigola J, Munoz M, Clark SJ, Moreno V, Capella G, Peinado MA (2005): Hypermethylation of the prostacyclin synthase (PTGIS) promoter is a frequent event in colorectal cancer and associated with aneuploidy. *Oncogene* 24(49): 7320-7326.

Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL (1992): A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(5): 1827-1831.

Gaedcke J, Liersch T, Hess C, Becker H, Rodel C, Ghadimi BM (2011): [Rectal cancer: current status of multimodal therapy--when and how?]. *Zentralbl Chir* 136(4): 334-342.

Gaedcke J, Leha A, Claus R, Weichenhan D, Jung K, Kitz J, Grade M, Wolff HA, Jo P, Doyen J et al. (2014): Identification of a DNA methylation signature to predict disease-free survival in locally advanced rectal cancer. *Oncotarget*.

Geddert H, Kiel S, Iskender E, Florl AR, Krieg T, Vossen S, Gabbert HE, Sarbia M (2004): Correlation of hMLH1 and HPP1 hypermethylation in gastric, but not in esophageal and cardiac adenocarcinoma. *Int J Cancer* 110(2): 208-211.

Gerard JP, Conroy T, Bonnetain F, Bouche O, Chapet O, Closon-Dejardin MT, Untereiner M, Leduc B, Francois E, Maurel J et al. (2006): Preoperative radiotherapy with or without concurrent fluorouracil and leucovorin in T3-4 rectal cancers: results of FFCD 9203. *J Clin Oncol* 24(28): 4620-4625.

Gerard JP, Azria D, Gourgou-Bourgade S, Martel-Laffay I, Hennequin C, Etienne PL, Vendrely V, Francois E, de La Roche G, Bouche O et al. (2010): Comparison of two neoadjuvant chemoradiotherapy regimens for locally advanced rectal cancer: results of the phase III trial ACCORD 12/0405-Prodige 2. *J Clin Oncol* 28(10): 1638-1644.

Glimelius B, Oliveira J (2009): Rectal cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 20 Suppl 4: 54-56.

- Glynne-Jones R, Hughes R (2012): Critical appraisal of the 'wait and see' approach in rectal cancer for clinical complete responders after chemoradiation. *Br J Surg* 99(7): 897-909.
- Grade M, Wolff HA, Gaedcke J, Ghadimi BM (2012): The molecular basis of chemoradiosensitivity in rectal cancer: implications for personalized therapies. *Langenbecks Arch Surg* 397(4): 543-555.
- Grady WM, Rajput A, Lutterbaugh JD, Markowitz SD (2001): Detection of aberrantly methylated hMLH1 promoter DNA in the serum of patients with microsatellite unstable colon cancer. *Cancer Res* 61(3): 900-902.
- Greggor DH (1971): Occult blood testing for detection of asymptomatic colon cancer. *Cancer* 28(1): 131-134.
- Gregorieff A, Clevers H (2005): Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes Dev* 19(8): 877-890.
- Grutzmann R, Molnar B, Pilarsky C, Habermann JK, Schlag PM, Saeger HD, Miehlike S, Stolz T, Model F, Roblick UJ et al. (2008): Sensitive detection of colorectal cancer in peripheral blood by septin 9 DNA methylation assay. *PLoS One* 3(11): e3759.
- Gupta AK, Brenner DE, Turgeon DK (2008): Early detection of colon cancer: new tests on the horizon. *Mol Diagn Ther* 12(2): 77-85.
- Gyparaki MT, Basdra EK, Papavassiliou AG (2013): DNA methylation biomarkers as diagnostic and prognostic tools in colorectal cancer. *J Mol Med (Berl)*.
- Habr-Gama A, de Souza PM, Ribeiro U, Jr., Nadalin W, Gansl R, Sousa AH, Jr., Campos FG, Gama-Rodrigues J (1998): Low rectal cancer: impact of radiation and chemotherapy on surgical treatment. *Dis Colon Rectum* 41(9): 1087-1096.
- Habr-Gama A, Perez RO, Proscurshim I, Campos FG, Nadalin W, Kiss D, Gama-Rodrigues J (2006): Patterns of failure and survival for nonoperative treatment of stage c0 distal rectal cancer following neoadjuvant chemoradiation therapy. *J Gastrointest Surg* 10(10): 1319-1328; discussion 1328-1319.
- Han SW, Lee HJ, Bae JM, Cho NY, Lee KH, Kim TY, Oh DY, Im SA, Bang YJ, Jeong SY et al. (2013): Methylation and microsatellite status and recurrence following adjuvant FOLFOX in colorectal cancer. *Int J Cancer* 132(9): 2209-2216.
- Hardcastle JD, Chamberlain JO, Robinson MH, Moss SM, Amar SS, Balfour TW, James PD, Mangham CM (1996): Randomised controlled trial of faecal-occult-blood screening for colorectal cancer. *Lancet* 348(9040): 1472-1477.

- Hart AR, Wicks AC, Mayberry JF (1995): Colorectal cancer screening in asymptomatic populations. *Gut* 36(4): 590-598.
- Hayatsu H (1976): Bisulfite modification of nucleic acids and their constituents. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 16: 75-124.
- Heald RJ, Husband EM, Ryall RD (1982): The mesorectum in rectal cancer surgery--the clue to pelvic recurrence? *Br J Surg* 69(10): 613-616.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996): Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6(10): 986-994.
- Herbst A, Wallner M, Rahmig K, Stieber P, Crispin A, Lamerz R, Kolligs FT (2009): Methylation of helicase-like transcription factor in serum of patients with colorectal cancer is an independent predictor of disease recurrence. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 21(5): 565-569.
- Herbst A, Rahmig K, Stieber P, Philipp A, Jung A, Ofner A, Crispin A, Neumann J, Lamerz R, Kolligs FT (2011): Methylation of *NEUROG1* in serum is a sensitive marker for the detection of early colorectal cancer. *Am J Gastroenterol* 106(6): 1110-1118.
- Hewitson P, Glasziou P, Irwig L, Towler B, Watson E (2007): Screening for colorectal cancer using the faecal occult blood test, Hemoccult. *Cochrane Database Syst Rev*(1): CD001216.
- Hewitson P, Glasziou P, Watson E, Towler B, Irwig L (2008): Cochrane systematic review of colorectal cancer screening using the fecal occult blood test (hemoccult): an update. *Am J Gastroenterol* 103(6): 1541-1549.
- Hisamuddin IM, Yang VW (2004): Genetics of colorectal cancer. *MedGenMed* 6(3): 13.
- Hisamuddin IM, Yang VW (2006): Molecular Genetics of Colorectal Cancer: An Overview. *Curr Colorectal Cancer Rep* 2(2): 53-59. (Abdruck von Fig.2 mit freundlicher Genehmigung des Springer-Verlags vom 29.06.2015, Lizenznummer: 3658240937286)
- Ho BC, Epping E, Wang K, Andreasen NC, Librant A, Wassink TH (2008): Basic helix-loop-helix transcription factor *NEUROG1* and schizophrenia: effects on illness susceptibility, MRI brain morphometry and cognitive abilities. *Schizophr Res* 106(2-3): 192-199.
- Hofheinz RD, von Gerstenberg-Helldorf B, Wenz F, Gnad U, Kraus-Tiefenbacher U, Muldner A, Hehlmann R, Post S, Hochhaus A, Willeke F (2005): Phase I trial of capecitabine and weekly irinotecan in combination with radiotherapy for neoadjuvant therapy of rectal cancer. *J Clin Oncol* 23(7): 1350-1357.

Hofheinz RD, Arnold D, Borner M, Folprecht G, Ghadimi M, Graeven U, Hebart H, Hegewisch-Becker S, Meybier T, Rodel C et al. (2012a): Rektumkarzinom; <https://www.dgho-onkopedia.de/de/onkopedia/leitlinien/rektumkarzinom#links> (abgerufen am 30.06.2015, Abdruck von Abb. 3 mit freundlicher Genehmigung der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie-DGHO vom 30.06.2015).

Hofheinz RD, Wenz F, Post S, Matzdorff A, Laechelt S, Hartmann JT, Muller L, Link H, Moehler M, Kettner E et al. (2012b): Chemoradiotherapy with capecitabine versus fluorouracil for locally advanced rectal cancer: a randomised, multicentre, non-inferiority, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 13(6): 579-588.

Hol L, van Leerdam ME, van Ballegooijen M, van Vuuren AJ, van Dekken H, Reijerink JC, van der Togt AC, Habbema JD, Kuipers EJ (2010): Screening for colorectal cancer: randomised trial comparing guaiac-based and immunochemical faecal occult blood testing and flexible sigmoidoscopy. *Gut* 59(1): 62-68.

Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH (1991): Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(16): 7276-7280.

Holodniy M, Kim S, Katzenstein D, Konrad M, Groves E, Merigan TC (1991): Inhibition of human immunodeficiency virus gene amplification by heparin. *J Clin Microbiol* 29(4): 676-679.

Horiguchi S, Shiraha H, Nagahara T, Kataoka J, Iwamuro M, Matsubara M, Nishina S, Kato H, Takaki A, Nouse K et al. (2013): Loss of runt-related transcription factor 3 induces gemcitabine resistance in pancreatic cancer. *Mol Oncol* 7(4): 840-849.

Hu JH, Li QW, Jiang ZL, Li WY (2008): Effects of different extenders on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing-thawing. *Cryobiology* 57(3): 257-262.

Hundt S, Haug U, Brenner H (2007): Blood markers for early detection of colorectal cancer: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16(10): 1935-1953.

Hundt S, Haug U, Brenner H (2009): Comparative evaluation of immunochemical fecal occult blood tests for colorectal adenoma detection. *Ann Intern Med* 150(3): 162-169.

Imamura Y, Hibi K, Koike M, Fujiwara M, Kodera Y, Ito K, Nakao A (2005): *RUNX3* promoter region is specifically methylated in poorly-differentiated colorectal cancer. *Anticancer Res* 25(4): 2627-2630.

Imperiale TF, Wagner DR, Lin CY, Larkin GN, Rogge JD, Ransohoff DF (2000): Risk of advanced proximal neoplasms in asymptomatic adults according to the distal colorectal findings. *N Engl J Med* 343(3): 169-174.

Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, Turnbull BA, Ross ME (2004): Fecal DNA versus fecal occult blood for colorectal-cancer screening in an average-risk population. *N Engl J Med* 351(26): 2704-2714.

Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, Levin TR, Lavin P, Lidgard GP, Ahlquist DA, Berger BM (2014): Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening. *N Engl J Med* 370(14): 1287-1297.

Inadomi JM (2008): Taishotoyama Symposium Barriers to colorectal cancer screening: economics, capacity and adherence. *J Gastroenterol Hepatol* 23 Suppl 2: S198-204.

Jacob D (2003): Erkennung von Regulationssequenzen für die Transkription in heterologen Systemen. Med. Diss. Berlin 2003 [<http://edoc.rki.de/documents/dissertationen/jacob-daniela-2003-07-15/PDF/jacob.pdf> (abgerufen am 21.09.2014)].

Jass JR, Biden KG, Cummings MC, Simms LA, Walsh M, Schoch E, Meltzer SJ, Wright C, Searle J, Young J et al. (1999): Characterisation of a subtype of colorectal cancer combining features of the suppressor and mild mutator pathways. *J Clin Pathol* 52(6): 455-460.

Jensen LH, Lindebjerg J, Byriel L, Kolvraa S, Cruger DG (2008): Strategy in clinical practice for classification of unselected colorectal tumours based on mismatch repair deficiency. *Colorectal Dis* 10(5): 490-497.

Jo P, Jung K, Grade M, Conradi LC, Wolff HA, Kitz J, Becker H, Ruschoff J, Hartmann A, Beissbarth T et al. (2012): CpG island methylator phenotype infers a poor disease-free survival in locally advanced rectal cancer. *Surgery* 151(4): 564-570.

Jones PA, Takai D (2001): The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* 293(5532): 1068-1070.

Jones PA, Baylin SB (2002): The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3(6): 415-428.

Kaatsch P, Spix C, Hentschel S, Katalinic A, Luttmann S, Stegmaier C, Caspritz S, Cernaj J, Ernst A, Folkerts J et al. (2013). *Krebs in Deutschland 2009/2010*. Berlin, Robert Koch-Institut.

- Kader A, Agarwal A, Abdelrazik H, Sharma RK, Ahmady A, Falcone T (2009): Evaluation of post-thaw DNA integrity of mouse blastocysts after ultrarapid and slow freezing. *Fertil Steril* 91(5 Suppl): 2087-2094.
- Kahi CJ, Imperiale TF, Juliar BE, Rex DK (2009): Effect of screening colonoscopy on colorectal cancer incidence and mortality. *Clin Gastroenterol Hepatol* 7(7): 770-775; quiz 711.
- Kang GH, Lee S, Lee HJ, Hwang KS (2004): Aberrant CpG island hypermethylation of multiple genes in prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia. *J Pathol* 202(2): 233-240.
- Kato J, Morikawa T, Kuriyama M, Yamaji Y, Wada R, Mitsushima T, Yamamoto K (2009): Combination of sigmoidoscopy and a fecal immunochemical test to detect proximal colon neoplasia. *Clin Gastroenterol Hepatol* 7(12): 1341-1346.
- Kato T, Yasui K, Hirai T, Kanemitsu Y, Mori T, Sugihara K, Mochizuki H, Yamamoto J (2003): Therapeutic results for hepatic metastasis of colorectal cancer with special reference to effectiveness of hepatectomy: analysis of prognostic factors for 763 cases recorded at 18 institutions. *Dis Colon Rectum* 46(10 Suppl): S22-31.
- Kim MS, Lee J, Sidransky D (2010): DNA methylation markers in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 29(1): 181-206.
- Kim TY, Lee HJ, Hwang KS, Lee M, Kim JW, Bang YJ, Kang GH (2004): Methylation of *RUNX3* in various types of human cancers and premalignant stages of gastric carcinoma. *Lab Invest* 84(4): 479-484.
- Kimelman D, Xu W (2006): beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene* 25(57): 7482-7491.
- Kirchgatterer A, Hubner D, Aschl G, Hinterreiter M, Stadler B, Knoflach P (2002): [Colonoscopy and sigmoidoscopy in patients aged eighty years or older]. *Z Gastroenterol* 40(12): 951-956.
- Knowlton RG, Brown VA, Braman JC, Barker D, Schumm JW, Murray C, Takvorian T, Ritz J, Donis-Keller H (1986): Use of highly polymorphic DNA probes for genotypic analysis following bone marrow transplantation. *Blood* 68(2): 378-385.
- Knudson AG (1993): Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(23): 10914-10921.

- Knudson AG (1996): Hereditary cancer: two hits revisited. *J Cancer Res Clin Oncol* 122(3): 135-140.
- Kolligs FT (2012): [Screening for colorectal cancer. Current evidence and novel developments]. *Radiologe* 52(6): 504-510.
- Kolligs FT, Crispin A, Munte A, Wagner A, Mansmann U, Goke B (2011): Risk of advanced colorectal neoplasia according to age and gender. *PLoS One* 6(5): e20076.
- Kondo T, Bobek MP, Kuick R, Lamb B, Zhu X, Narayan A, Bourc'his D, Viegas-Pequignot E, Ehrlich M, Hanash SM (2000): Whole-genome methylation scan in ICF syndrome: hypomethylation of non-satellite DNA repeats D4Z4 and NBL2. *Hum Mol Genet* 9(4): 597-604.
- Kondo Y, Issa JP (2004): Epigenetic changes in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 23(1-2): 29-39.
- Korah R, Healy JM, Kunstman JW, Fonseca AL, Ameri AH, Prasad ML, Carling T (2013): Epigenetic silencing of *RASSF1A* deregulates cytoskeleton and promotes malignant behavior of adrenocortical carcinoma. *Mol Cancer* 12: 87.
- Kozera B, Rapacz M (2013): Reference genes in real-time PCR. *J Appl Genet* 54(4): 391-406.
- Kronborg O, Fenger C, Olsen J, Jorgensen OD, Sondergaard O (1996): Randomised study of screening for colorectal cancer with faecal-occult-blood test. *Lancet* 348(9040): 1467-1471.
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjogreen B, Strombom L et al. (2006): The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 27(2-3): 95-125.
- Kunstman JW, Korah R, Healy JM, Prasad M, Carling T (2013): Quantitative assessment of *RASSF1A* methylation as a putative molecular marker in papillary thyroid carcinoma. *Surgery* 154(6): 1255-1261; discussion 1261-1252.
- Ladabaum U, Allen J, Wandell M, Ramsey S (2013): Colorectal Cancer Screening with Blood-Based Biomarkers: Cost-Effectiveness of Methylated Septin 9 DNA versus Current Strategies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 22(9): 1567-1576.
- Laiho P, Launonen V, Lahermo P, Esteller M, Guo M, Herman JG, Mecklin JP, Jarvinen H, Sistonen P, Kim KM et al. (2002): Low-level microsatellite instability in most colorectal carcinomas. *Cancer Res* 62(4): 1166-1170.

- Lecomte T, Berger A, Zinzindohoue F, Micard S, Landi B, Blons H, Beaune P, Cugnenc PH, Laurent-Puig P (2002): Detection of free-circulating tumor-associated DNA in plasma of colorectal cancer patients and its association with prognosis. *Int J Cancer* 100(5): 542-548.
- Lee BB, Lee EJ, Jung EH, Chun HK, Chang DK, Song SY, Park J, Kim DH (2009): Aberrant methylation of APC, MGMT, RASSF2A, and Wif-1 genes in plasma as a biomarker for early detection of colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 15(19): 6185-6191.
- Lee HS, Hwang SM, Kim TS, Kim DW, Park do J, Kang SB, Kim HH, Park KU (2013a): Circulating methylated septin 9 nucleic Acid in the plasma of patients with gastrointestinal cancer in the stomach and colon. *Transl Oncol* 6(3): 290-296.
- Lee LG, Connell CR, Bloch W (1993): Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res* 21(16): 3761-3766.
- Lee WS, Yun SH, Chun HK, Lee WY, Yun HR, Kim J, Kim K, Shim YM (2007): Pulmonary resection for metastases from colorectal cancer: prognostic factors and survival. *Int J Colorectal Dis* 22(6): 699-704.
- Lee YS, Lee JW, Jang JW, Chi XZ, Kim JH, Li YH, Kim MK, Kim DM, Choi BS, Kim EG et al. (2013b): Runx3 inactivation is a crucial early event in the development of lung adenocarcinoma. *Cancer Cell* 24(5): 603-616.
- Lefebure B, Charbonnier F, Di Fiore F, Tuech JJ, Le Pessot F, Michot F, Michel P, Frebourg T (2010): Prognostic value of circulating mutant DNA in unresectable metastatic colorectal cancer. *Ann Surg* 251(2): 275-280.
- Leshinsky-Silver E, Ginzberg M, Dabby R, Sadeh M, Lev D, Lerman-Sagie T (2013): Neonatal vocal cord paralysis-an early presentation of hereditary neuralgic amyotrophy due to a mutation in the SEPT9 gene. *Eur J Paediatr Neurol* 17(1): 64-67.
- Leung WK, To KF, Man EP, Chan MW, Bai AH, Hui AJ, Chan FK, Sung JJ (2005): Quantitative detection of promoter hypermethylation in multiple genes in the serum of patients with colorectal cancer. *Am J Gastroenterol* 100(10): 2274-2279.
- Levy M, Visokai V, Lipska L, Topolcan O (2008): Tumor markers in staging and prognosis of colorectal carcinoma. *Neoplasma* 55(2): 138-142.
- Liang G, Robertson KD, Talmadge C, Sumegi J, Jones PA (2000): The gene for a novel transmembrane protein containing epidermal growth factor and follistatin domains is frequently hypermethylated in human tumor cells. *Cancer Res* 60(17): 4907-4912.

- Lind GE, Danielsen SA, Ahlquist T, Merok MA, Andresen K, Skotheim RI, Hektoen M, Rognum TO, Meling GI, Hoff G et al. (2011): Identification of an epigenetic biomarker panel with high sensitivity and specificity for colorectal cancer and adenomas. *Mol Cancer* 10: 85.
- Lo YM, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, Wainscoat JS, Johnson PJ, Chang AM, Hjelm NM (1998): Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 62(4): 768-775.
- Lofton-Day C, Model F, Devos T, Tetzner R, Distler J, Schuster M, Song X, Lesche R, Liebenberg V, Ebert M et al. (2008): DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening. *Clin Chem* 54(2): 414-423.
- Logan CY, Nusse R (2004): The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 781-810.
- Louhimo J, Carpelan-Holmstrom M, Alfthan H, Stenman UH, Jarvinen HJ, Haglund C (2002): Serum HCG beta, CA 72-4 and CEA are independent prognostic factors in colorectal cancer. *Int J Cancer* 101(6): 545-548.
- MacKay C, Toth R, Rouse J (2009): Biochemical characterisation of the SWI/SNF family member *HLTF*. *Biochem Biophys Res Commun* 390(2): 187-191.
- Mainenti PP, Mancini M, Mainolfi C, Camera L, Maurea S, Manchia A, Tanga M, Persico F, Addeo P, D'Antonio D et al. (2010): Detection of colo-rectal liver metastases: prospective comparison of contrast enhanced US, multidetector CT, PET/CT, and 1.5 Tesla MR with extracellular and reticulo-endothelial cell specific contrast agents. *Abdom Imaging* 35(5): 511-521.
- Majumdar SR, Fletcher RH, Evans AT (1999): How does colorectal cancer present? Symptoms, duration, and clues to location. *Am J Gastroenterol* 94(10): 3039-3045.
- Matzen K, Dirkx AE, oude Egbrink MG, Speth C, Gotte M, Ascherl G, Grimm T, Griffioen AW, Sturzl M (2004): HIV-1 Tat increases the adhesion of monocytes and T-cells to the endothelium in vitro and in vivo: implications for AIDS-associated vasculopathy. *Virus Res* 104(2): 145-155.
- Melotte V, Lentjes MH, van den Bosch SM, Hellebrekers DM, de Hoon JP, Wouters KA, Daenen KL, Partouns-Hendriks IE, Stessels F, Louwagie J et al. (2009): N-Myc downstream-regulated gene 4 (NDRG4): a candidate tumor suppressor gene and potential biomarker for colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 101(13): 916-927.

- Meredith KL, Hoffe SE, Shibata D (2009): The multidisciplinary management of rectal cancer. *Surg Clin North Am* 89(1): 177-215, ix-x.
- Miotto E, Sabbioni S, Veronese A, Calin GA, Gullini S, Liboni A, Gramantieri L, Bolondi L, Ferrazzi E, Gafa R et al. (2004): Frequent aberrant methylation of the CDH4 gene promoter in human colorectal and gastric cancer. *Cancer Res* 64(22): 8156-8159.
- Moinova HR, Chen WD, Shen L, Smiraglia D, Olechnowicz J, Ravi L, Kasturi L, Myeroff L, Plass C, Parsons R et al. (2002): *HLTF* gene silencing in human colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(7): 4562-4567.
- Moon JW, Lee SK, Lee JO, Kim JH, Kim N, Kim J, Kim HS, Park SH (2014a): Demethylation of *RUNX3* by vincristine in colorectal adenocarcinoma cells. *Anticancer Res* 34(1): 133-140.
- Moon JW, Lee SK, Lee JO, Kim N, Lee YW, Kim SJ, Kang HJ, Kim J, Kim HS, Park SH (2014b): Identification of novel hypermethylated genes and demethylating effect of vincristine in colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 33: 4.
- Moran A, Ortega P, de Juan C, Fernandez-Marcelo T, Frias C, Sanchez-Pernaute A, Torres AJ, Diaz-Rubio E, Iniesta P, Benito M (2010): Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance. *World J Gastrointest Oncol* 2(3): 151-158.
- Muller HM, Oberwalder M, Fiegl H, Morandell M, Goebel G, Zitt M, Muhlthaler M, Ofner D, Margreiter R, Widschwendter M (2004): Methylation changes in faecal DNA: a marker for colorectal cancer screening? *Lancet* 363(9417): 1283-1285.
- Muller SA, Mehrabi A, Rahbari NN, Warschkow R, Elbers H, Leowardi C, Fonouni H, Tarantino I, Schemmer P, Schmied BM et al. (2014): Allogeneic blood transfusion does not affect outcome after curative resection for advanced cholangiocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 21(1): 155-164.
- Mullis KB (1994). *The Polymerase Chain Reaction*. 1. Auflage; Birkhäuser-Verlag, Boston 1994.
- Mytilinaiou M, Bano A, Nikitovic D, Berdiaki A, Voudouri K, Kalogeraki A, Karamanos NK, Tzanakakis GN (2013): Syndecan-2 is a key regulator of transforming growth factor beta 2/Smad2-mediated adhesion in fibrosarcoma cells. *IUBMB Life* 65(2): 134-143.
- NCBI (2014a): *HLTF*-Helicase-like Transcription Factor (Homo sapiens, human); Geninformation unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6596> (abgerufen am 28.05.2014).
- NCBI (2014b): SEPT9-Septin 9 (Homo sapiens, human); Geninformation unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10801> (abgerufen am 25.05.2014).

NCBI (2014c): RASSF1-Ras-Association (RalGDS/AF-6) Domain Family Member 1 (Homo sapiens, human); Geninformation unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/11186> (abgerufen am 30.05.2014).

NCBI (2014d): *SDC2*-Syndecan 2 (Homo sapiens, human); Geninformation unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6383> (abgerufen am 30.05.2014).

NCBI (2014e): *RUNX3*-Runt-related Transcription Factor 3 (Homo sapiens, human); Geninformation unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/864> (abgerufen am 25.05.2014).

NCBI (2014f): *NEUROG1*-Neurogenin 1 (Homo sapiens, human); Geninformation unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4762> (abgerufen am 26.05.2014).

NCBI (2014g): *TMEFF2*-Transmembrane Protein with EGF-like and two Follistatin-like Domains 2 (Homo sapiens, human); Geninformation unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/23671> (abgerufen am 27.05.2014).

Nelson H, Petrelli N, Carlin A, Couture J, Fleshman J, Guillem J, Miedema B, Ota D, Sargent D (2001): Guidelines 2000 for colon and rectal cancer surgery. J Natl Cancer Inst 93(8): 583-596.

Nielke MC, Bipat S, Stoker J (2010): Diagnostic imaging of colorectal liver metastases with CT, MR imaging, FDG PET, and/or FDG PET/CT: a meta-analysis of prospective studies including patients who have not previously undergone treatment. Radiology 257(3): 674-684.

NIH (1990). NIH consensus conference: Adjuvant therapy for patients with colon and rectal cancer. JAMA, NIH. 264: 1444-1450.

Nishigaki K, Kaneko Y, Wakuda H, Husimi Y, Tanaka T (1985): Type II restriction endonucleases cleave single-stranded DNAs in general. Nucleic Acids Res 13(16): 5747-5760.

Nishio M, Sakakura C, Nagata T, Komiyama S, Miyashita A, Hamada T, Kuryu Y, Ikoma H, Kubota T, Kimura A et al. (2010): *RUNX3* promoter methylation in colorectal cancer: its relationship with microsatellite instability and its suitability as a novel serum tumor marker. Anticancer Res 30(7): 2673-2682.

Nordlinger B, Sorbye H, Glimelius B, Poston GJ, Schlag PM, Rougier P, Bechstein WO, Primrose JN, Walpole ET, Finch-Jones M et al. (2008): Perioperative chemotherapy with FOLFOX4 and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC Intergroup trial 40983): a randomised controlled trial. Lancet 371(9617): 1007-1016.

Nordlinger B, Van Cutsem E, Gruenberger T, Glimelius B, Poston G, Rougier P, Sobrero A, Ychou M (2009): Combination of surgery and chemotherapy and the role of targeted agents in the treatment of patients with colorectal liver metastases: recommendations from an expert panel. *Ann Oncol* 20(6): 985-992.

O'Connell JB, Maggard MA, Liu JH, Etzioni DA, Livingston EH, Ko CY (2003): Rates of colon and rectal cancers are increasing in young adults. *Am Surg* 69(10): 866-872.

Oh T, Kim N, Moon Y, Kim MS, Hoehn BD, Park CH, Kim TS, Kim NK, Chung HC, An S (2013): Genome-wide identification and validation of a novel methylation biomarker, *SDC2*, for blood-based detection of colorectal cancer. *J Mol Diagn* 15(4): 498-507.

Osborn NK, Ahlquist DA (2005): Stool screening for colorectal cancer: molecular approaches. *Gastroenterology* 128(1): 192-206.

Peeters KC, Marijnen CA, Nagtegaal ID, Kranenbarg EK, Putter H, Wiggers T, Rutten H, Pahlman L, Glimelius B, Leer JW et al. (2007): The TME trial after a median follow-up of 6 years: increased local control but no survival benefit in irradiated patients with resectable rectal carcinoma. *Ann Surg* 246(5): 693-701.

Petko Z, Ghiassi M, Shuber A, Gorham J, Smalley W, Washington MK, Schultenover S, Gautam S, Markowitz SD, Grady WM (2005): Aberrantly methylated CDKN2A, MGMT, and MLH1 in colon polyps and in fecal DNA from patients with colorectal polyps. *Clin Cancer Res* 11(3): 1203-1209.

Pfannschmidt J, Muley T, Hoffmann H, Dienemann H (2003): Prognostic factors and survival after complete resection of pulmonary metastases from colorectal carcinoma: experiences in 167 patients. *J Thorac Cardiovasc Surg* 126(3): 732-739.

Pholnukulkit P, Sonoyama K, Kawabata J (2003): Activin A induces phosphorylation of Smad2 but not complex formation of Smad2 with Smad4 in human colon cancer cell line HT-29. *Biosci Biotechnol Biochem* 67(9): 2042-2044.

Polisson C, Morgan RD (1990): Acil, a unique restriction endonuclease from *Arthrobacter citreus* which recognizes 5' CCGC 3'. *Nucleic Acids Res* 18(19): 5911.

Porter GA, Soskolne CL, Yakimets WW, Newman SC (1998): Surgeon-related factors and outcome in rectal cancer. *Ann Surg* 227(2): 157-167.

Pox C (2011): Colon cancer screening: which non-invasive filter tests? *Dig Dis* 29 Suppl 1: 56-59.

Pox CP, Schmiegel W (2013): [German S3-guideline colorectal carcinoma]. Dtsch Med Wochenschr 138(49): 2545.

Pox CP, Altenhofen L, Brenner H, Theilmeier A, Von Stillfried D, Schmiegel W (2012): Efficacy of a nationwide screening colonoscopy program for colorectal cancer. Gastroenterology 142(7): 1460-1467 e1462.

Pox C, Aretz S, Bischoff SC, Graeven U, Hass M, Heussner P, Hohenberger W, Holstege A, Hubner J, Kolligs F et al. (2013): [S3-guideline colorectal cancer version 1.0]. Z Gastroenterol 51(8): 753-854.

Pschyrembel (2014): Klinisches Wörterbuch. 265. Auflage; De Gruyter Verlag, Berlin 2014.

Puli SR, Reddy JB, Bechtold ML, Choudhary A, Antillon MR, Brugge WR (2009): Accuracy of endoscopic ultrasound to diagnose nodal invasion by rectal cancers: a meta-analysis and systematic review. Ann Surg Oncol 16(5): 1255-1265.

Quaia E, D'Onofrio M, Palumbo A, Rossi S, Bruni S, Cova M (2006): Comparison of contrast-enhanced ultrasonography versus baseline ultrasound and contrast-enhanced computed tomography in metastatic disease of the liver: diagnostic performance and confidence. Eur Radiol 16(7): 1599-1609.

Quirke P, Durdey P, Dixon MF, Williams NS (1986): Local recurrence of rectal adenocarcinoma due to inadequate surgical resection. Histopathological study of lateral tumour spread and surgical excision. Lancet 2(8514): 996-999.

Rafaelsen SR, Jakobsen A (2011): Contrast-enhanced ultrasound vs multidetector-computed tomography for detecting liver metastases in colorectal cancer: a prospective, blinded, patient-by-patient analysis. Colorectal Dis 13(4): 420-425.

Rahbari NN, Elbers H, Askoxylakis V, Mutschall E, Bork U, Buchler MW, Weitz J, Koch M (2013): Neoadjuvant radiotherapy for rectal cancer: meta-analysis of randomized controlled trials. Ann Surg Oncol 20(13): 4169-4182.

Rahmig K (2012): Die Methylierung von NEUROG-1 ist ein diagnostischer Marker im Serum von Patienten mit kolorektalen Karzinomen. Med. Diss. München 2012.

Rex DK, Rahmani EY, Haseman JH, Lemmel GT, Kaster S, Buckley JS (1997): Relative sensitivity of colonoscopy and barium enema for detection of colorectal cancer in clinical practice. Gastroenterology 112(1): 17-23.

Roberts RJ, Belfort M, Bestor T, Bhagwat AS, Bickle TA, Bitinaite J, Blumenthal RM, Degtyarev S, Dryden DT, Dybvig K et al. (2003): A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic Acids Res* 31(7): 1805-1812.

Robertson DJ, Dominitz JA (2014): Stool DNA and colorectal-cancer screening. *N Engl J Med* 370(14): 1350-1351.

Rodel C, Grabenbauer GG, Papadopoulos T, Hohenberger W, Schmoll HJ, Sauer R (2003): Phase I/II trial of capecitabine, oxaliplatin, and radiation for rectal cancer. *J Clin Oncol* 21(16): 3098-3104.

Rodel C, Liersch T, Hermann RM, Arnold D, Reese T, Hipp M, Furst A, Schwella N, Bieker M, Hellmich G et al. (2007): Multicenter phase II trial of chemoradiation with oxaliplatin for rectal cancer. *J Clin Oncol* 25(1): 110-117.

Roh MS, Colangelo LH, O'Connell MJ, Yothers G, Deutsch M, Allegra CJ, Kahlenberg MS, Baez-Diaz L, Ursiny CS, Petrelli NJ et al. (2009): Preoperative multimodality therapy improves disease-free survival in patients with carcinoma of the rectum: NSABP R-03. *J Clin Oncol* 27(31): 5124-5130.

Ryan BM, Lefort F, McManus R, Daly J, Keeling PW, Weir DG, Kelleher D (2003): A prospective study of circulating mutant KRAS2 in the serum of patients with colorectal neoplasia: strong prognostic indicator in postoperative follow up. *Gut* 52(1): 101-108.

Safi F, Roscher R, Bittner R, Beger HG (1988): The clinical relevance of tumor marker CEA, CA 19-9 in regional chemotherapy of hepatic metastases of colorectal carcinoma. *Int J Biol Markers* 3(2): 101-106.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230(4732): 1350-1354.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1992): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. 1985. *Biotechnology* 24: 476-480.

Saito Y, Omiya H, Kohno K, Kobayashi T, Itoi K, Teramachi M, Sasaki M, Suzuki H, Takao H, Nakade M (2002): Pulmonary metastasectomy for 165 patients with colorectal carcinoma: A prognostic assessment. *J Thorac Cardiovasc Surg* 124(5): 1007-1013.

- Sakamoto N, Terai T, Ajioka Y, Abe S, Kobayasi O, Hirai S, Hino O, Watanabe H, Sato N, Shimoda T et al. (2004): Frequent hypermethylation of *RASSF1A* in early flat-type colorectal tumors. *Oncogene* 23(55): 8900-8907.
- Samowitz WS, Albertsen H, Herrick J, Levin TR, Sweeney C, Murtaugh MA, Wolff RK, Slattery ML (2005): Evaluation of a large, population-based sample supports a CpG island methylator phenotype in colon cancer. *Gastroenterology* 129(3): 837-845.
- Sandhu S, Wu X, Nabi Z, Rastegar M, Kung S, Mai S, Ding H (2012): Loss of *HLTF* function promotes intestinal carcinogenesis. *Mol Cancer* 11: 18.
- Sato F, Shibata D, Harpaz N, Xu Y, Yin J, Mori Y, Wang S, Olaru A, Deacu E, Selaru FM et al. (2002): Aberrant methylation of the HPP1 gene in ulcerative colitis-associated colorectal carcinoma. *Cancer Res* 62(23): 6820-6822.
- Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rodel 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.
- Sauer R, Liersch T, Merkel S, Fietkau R, Hohenberger W, Hess C, Becker H, Raab HR, Villanueva MT, Witzigmann H et al. (2012): Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer: results of the German CAO/ARO/AIO-94 randomized phase III trial after a median follow-up of 11 years. *J Clin Oncol* 30(16): 1926-1933.
- Schaefer M, Altenhofen L, Stillfried D (2012): Darmkrebsprävention: Teilnahmeraten stagnieren- mehr Information erforderlich. *Dtsch Arztebl Int* 109(11): 528-530.
- Scheele J, Altendorf-Hofmann A, Grube T, Hohenberger W, Stangl R, Schmidt K (2001): [Resection of colorectal liver metastases. What prognostic factors determine patient selection?]. *Chirurg* 72(5): 547-560.
- Schroder JC, Lassig AK, Galetzka D, Peters A, Castle JC, Diederich S, Zechner U, Muller-Forell W, Keilmann A, Bartsch O (2013): A boy with homozygous microdeletion of *NEUROG1* presents with a congenital cranial dysinnervation disorder [Moebius syndrome variant]. *Behav Brain Funct* 9: 7.
- Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K (2011): Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 11(6): 426-437.
- Shi DT, Han M, Gao N, Tian W, Chen W (2014): Association of *RASSF1A* promoter methylation with gastric cancer risk: a meta-analysis. *Tumour Biol* 35(2): 943-948.

- Shirahata A, Sakata M, Sakuraba K, Goto T, Mizukami H, Saito M, Ishibashi K, Kigawa G, Nemoto H, Sanada Y et al. (2009): Vimentin methylation as a marker for advanced colorectal carcinoma. *Anticancer Res* 29(1): 279-281.
- Siegel R, Naishadham D, Jemal A (2013): Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 63(1): 11-30.
- Sobin LH, Wittekind C (2002). *TNM Classification of Malignant Tumours*. 6th Edition; hrsg. UICC, John Wiley & Sons, New York 2002.
- Sonoyama K, Rutatip S, Kasai T (2000): Gene expression of activin, activin receptors, and follistatin in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278(1): G89-97.
- Sonoyama K, Pholnukulit P, Toyoda M, Rutatip S, Kasai T (2003): Upregulation of activin A gene by butyrate in human colon cancer cell lines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284(6): G989-995.
- Staeber S (2013): Vergleichende Analyse prädiktiver und prognostischer Faktoren zwischen Patienten ≤ 50 Jahre versus > 50 Jahre mit kolorektalem Karzinom. Med. Diss. Erlangen-Nürnberg 2013.
- Stevens T, Burke CA (2003): Colonoscopy screening in the elderly: when to stop? *Am J Gastroenterol* 98(8): 1881-1885.
- Subramaniam MM, Chan JY, Soong R, Ito K, Yeoh KG, Wong R, Guenther T, Will O, Chen CL, Kumarasinghe MP et al. (2009): *RUNX3* inactivation in colorectal polyps arising through different pathways of colonic carcinogenesis. *Am J Gastroenterol* 104(2): 426-436.
- Summers T, Langan RC, Nissan A, Brucher BL, Bilchik AJ, Protic M, Daumer M, Avital I, Stojadinovic A (2013): Serum-based DNA methylation biomarkers in colorectal cancer: potential for screening and early detection. *J Cancer* 4(3): 210-216.
- Tagore KS, Lawson MJ, Yucitis JA, Gage R, Orr T, Shuber AP, Ross ME (2003): Sensitivity and specificity of a stool DNA multitarget assay panel for the detection of advanced colorectal neoplasia. *Clin Colorectal Cancer* 3(1): 47-53.
- Takahashi T, Shivapurkar N, Riquelme E, Shigematsu H, Reddy J, Suzuki M, Miyajima K, Zhou X, Bekele BN, Gazdar AF et al. (2004): Aberrant promoter hypermethylation of multiple genes in gallbladder carcinoma and chronic cholecystitis. *Clin Cancer Res* 10(18 Pt 1): 6126-6133.

- Tan E, Gouvas N, Nicholls RJ, Ziprin P, Xynos E, Tekkis PP (2009): Diagnostic precision of carcinoembryonic antigen in the detection of recurrence of colorectal cancer. *Surg Oncol* 18(1): 15-24.
- Tan SH, Ida H, Lau QC, Goh BC, Chieng WS, Loh M, Ito Y (2007): Detection of promoter hypermethylation in serum samples of cancer patients by methylation-specific polymerase chain reaction for tumour suppressor genes including *RUNX3*. *Oncol Rep* 18(5): 1225-1230.
- Tannapfel A, Wittekind C (2010): [The current TNM system for gastrointestinal tumors part II]. *Pathologe* 31(5): 348-352.
- Tetzner R, Dietrich D, Distler J (2007): Control of carry-over contamination for PCR-based DNA methylation quantification using bisulfite treated DNA. *Nucleic Acids Res* 35(1): e4.
- Tewari S, Bhatia V, Goel MM, Yadu A, Agarwal B, Kumar S, Goel SK (2013): Performance characteristics of bisulfite conversion and SYBR green based quantitative PCR for DNA methylation analysis. *J Environ Biol* 34(4): 667-671.
- Thomas L (2012). *Labor und Diagnose*, 8. Auflage; TH-Books Verlagsgesellschaft, Frankfurt 2012.
- Tonus C, Keller O, Kropp R, Nier H (1996): [Colorectal carcinoma. Which factors are decisive for development of postoperative complications?]. *Langenbecks Arch Chir* 381(5): 251-257.
- Toth K, Sipos F, Kalmar A, Patai AV, Wichmann B, Stoehr R, Golcher H, Schellerer V, Tulassay Z, Molnar B (2012): Detection of methylated SEPT9 in plasma is a reliable screening method for both left- and right-sided colon cancers. *PLoS One* 7(9): e46000.
- Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP (1999a): CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(15): 8681-8686.
- Toyota M, Ho C, Ahuja N, Jair KW, Li Q, Ohe-Toyota M, Baylin SB, Issa JP (1999b): Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification. *Cancer Res* 59(10): 2307-2312.
- Traverso G, Shuber A, Levin B, Johnson C, Olsson L, Schoetz DJ, Jr., Hamilton SR, Boynton K, Kinzler KW, Vogelstein B (2002): Detection of APC mutations in fecal DNA from patients with colorectal tumors. *N Engl J Med* 346(5): 311-320.
- Trevisiol C, Di Fabio F, Nascimbeni R, Peloso L, Salbe C, Ferruzzi E, Salerni B, Gion M (2006): Prognostic value of circulating KRAS2 gene mutations in colorectal cancer with distant metastases. *Int J Biol Markers* 21(4): 223-228.

UICC (2002). TNM Classification of Malignant Tumours. 6th Edition; hrsg. Sobin LH, Wittekind C, John Wiley & Sons, New York 2002.

Umetani N, Hiramatsu S, Hoon DS (2006): Higher amount of free circulating DNA in serum than in plasma is not mainly caused by contaminated extraneous DNA during separation. *Ann N Y Acad Sci* 1075: 299-307.

Van Cutsem E, Geboes K (2007): The multidisciplinary management of gastrointestinal cancer. The integration of cytotoxics and biologicals in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 21(6): 1089-1108.

Van Cutsem E, Kohne CH, Lang I, Folprecht G, Nowacki MP, Cascinu S, Shchepotin I, Maurel J, Cunningham D, Tejpar S et al. (2011): Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol* 29(15): 2011-2019.

van Rijnsoever M, Grieu F, Elsaleh H, Joseph D, Iacopetta B (2002): Characterisation of colorectal cancers showing hypermethylation at multiple CpG islands. *Gut* 51(6): 797-802.

van Rossum LG, van Rijn AF, Verbeek AL, van Oijen MG, Laheij RJ, Fockens P, Jansen JB, Adang EM, Dekker E (2011): Colorectal cancer screening comparing no screening, immunochemical and guaiac fecal occult blood tests: a cost-effectiveness analysis. *Int J Cancer* 128(8): 1908-1917.

Wallner M, Herbst A, Behrens A, Crispin A, Stieber P, Goke B, Lamerz R, Kolligs FT (2006): Methylation of serum DNA is an independent prognostic marker in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 12(24): 7347-7352.

Wang JY, Hsieh JS, Chang MY, Huang TJ, Chen FM, Cheng TL, Alexandersen K, Huang YS, Tzou WS, Lin SR (2004): Molecular detection of APC, K- ras, and p53 mutations in the serum of colorectal cancer patients as circulating biomarkers. *World J Surg* 28(7): 721-726.

Warren JD, Xiong W, Bunker AM, Vaughn CP, Furtado LV, Roberts WL, Fang JC, Samowitz WS, Heichman KA (2011): Septin 9 methylated DNA is a sensitive and specific blood test for colorectal cancer. *BMC Med* 9: 133.

Wasserkort R, Kalmar A, Valcz G, Spisak S, Krispin M, Toth K, Tulassay Z, Sledziewski AZ, Molnar B (2013): Aberrant septin 9 DNA methylation in colorectal cancer is restricted to a single CpG island. *BMC Cancer* 13: 398.

Wei H, Therrien C, Blanchard A, Guan S, Zhu Z (2008): The Fidelity Index provides a systematic quantitation of star activity of DNA restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res* 36(9): e50.

Weisenberger DJ, Velicescu M, Cheng JC, Gonzales FA, Liang G, Jones PA (2004): Role of the DNA methyltransferase variant DNMT3b3 in DNA methylation. *Mol Cancer Res* 2(1): 62-72.

Weisenberger DJ, Campan M, Long TI, Kim M, Woods C, Fiala E, Ehrlich M, Laird PW (2005): Analysis of repetitive element DNA methylation by MethyLight. *Nucleic Acids Res* 33(21): 6823-6836.

Wharton RQ, Jonas SK, Glover C, Khan ZA, Klokouzas A, Quinn H, Henry M, Allen-Mersh TG (1999): Increased detection of circulating tumor cells in the blood of colorectal carcinoma patients using two reverse transcription-PCR assays and multiple blood samples. *Clin Cancer Res* 5(12): 4158-4163.

Whitehall VL, Walsh MD, Young J, Leggett BA, Jass JR (2001): Methylation of O-6-methylguanine DNA methyltransferase characterizes a subset of colorectal cancer with low-level DNA microsatellite instability. *Cancer Res* 61(3): 827-830.

Wikipedia-Enzyklopädie (2014). Polymerasekettenreaktion; Darstellung von Enzyklop, lizenziert unter Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 über Wikimedia Commons ; Abbildung unter:
<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Polymerasekettenreaktion.svg#mediaviewer/File:Polymerasekettenreaktion.svg> (abgerufen am 19.09.2014).

Winawer SJ, Flehinger BJ, Schottenfeld D, Miller DG (1993): Screening for colorectal cancer with fecal occult blood testing and sigmoidoscopy. *J Natl Cancer Inst* 85(16): 1311-1318.

Winawer SJ, Zauber AG, Fletcher RH, Stillman JS, O'Brien M J, Levin B, Smith RA, Lieberman DA, Burt RW, Levin TR et al. (2006): Guidelines for colonoscopy surveillance after polypectomy: a consensus update by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer and the American Cancer Society. *CA Cancer J Clin* 56(3): 143-159; quiz 184-145.

Wittekind C (2010): [2010 TNM system: on the 7th edition of TNM classification of malignant tumors]. *Pathologe* 31(5): 331-332.

Wittekind C, Meyer HJ (2010). *TNM Klassifikation maligner Tumoren*. 7. Auflage; Wiley-VCH, Weinheim 2010.

- Wittekind C, Oberschmid B (2010): [TNM classification of malignant tumors 2010: General aspects and amendments in the general section]. *Pathologe* 31(5): 333-334, 336-338.
- Wongpaiboonwattana W, Tosukhowong P, Dissayabutra T, Mutirangura A, Boonla C (2013): Oxidative stress induces hypomethylation of LINE-1 and hypermethylation of the *RUNX3* promoter in a bladder cancer cell line. *Asian Pac J Cancer Prev* 14(6): 3773-3778.
- Worsham MJ, Chen KM, Ghanem T, Stephen JK, Divine G (2013): Epigenetic modulation of signal transduction pathways in HPV-associated HNSCC. *Otolaryngol Head Neck Surg* 149(3): 409-416.
- Worthley DL, Whitehall VL, Spring KJ, Leggett BA (2007): Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer. *World J Gastroenterol* 13(28): 3784-3791.
- Worthley DL, Whitehall VL, Buttenshaw RL, Irahara N, Greco SA, Ramsnes I, Mallitt KA, Le Leu RK, Winter J, Hu Y et al. (2010): DNA methylation within the normal colorectal mucosa is associated with pathway-specific predisposition to cancer. *Oncogene* 29(11): 1653-1662.
- Wu PP, Zou JH, Tang RN, Yao Y, You CZ (2011): Detection and Clinical Significance of DLC1 Gene Methylation in Serum DNA from Colorectal Cancer Patients. *Chin J Cancer Res* 23(4): 283-287.
- Yearsley M, Hampel H, Lehman A, Nakagawa H, de la Chapelle A, Frankel WL (2006): Histologic features distinguish microsatellite-high from microsatellite-low and microsatellite-stable colorectal carcinomas, but do not differentiate germline mutations from methylation of the MLH1 promoter. *Hum Pathol* 37(7): 831-838.
- Young J, Biden KG, Simms LA, Huggard P, Karamatic R, Eyre HJ, Sutherland GR, Herath N, Barker M, Anderson GJ et al. (2001): HPP1: a transmembrane protein-encoding gene commonly methylated in colorectal polyps and cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(1): 265-270.
- Young PE, Womeldorph CM, Johnson EK, Maykel JA, Brucher B, Stojadinovic A, Avital I, Nissan A, Steele SR (2014): Early Detection of Colorectal Cancer Recurrence in Patients Undergoing Surgery with Curative Intent: Current Status and Challenges. *J Cancer* 5(4): 262-271.
- Yuan CC, Peterson RJ, Wang CD, Goodsaid F, Waters DJ (2000): 5' Nuclease assays for the loci CCR5-+/Delta32, CCR2-V64I, and SDF1-G801A related to pathogenesis of AIDS. *Clin Chem* 46(1): 24-30. (Abdruck von Fig.1 mit freundlicher Genehmigung der American Association for Clinical Chemistry-AACC vom 30.06.2015, Lizenznummer: 3658831161825)

Zauber AG, Winawer SJ, O'Brien MJ, Lansdorp-Vogelaar I, van Ballegooijen M, Hankey BF, Shi W, Bond JH, Schapiro M, Panish JF et al. (2012): Colonoscopic polypectomy and long-term prevention of colorectal-cancer deaths. *N Engl J Med* 366(8): 687-696.

Zhang B, Fattah A, Nakama H (2000): Characteristics and survival rate of elderly patients with colorectal cancer detected by immunochemical occult blood screening. *Hepatogastroenterology* 47(32): 414-418.

Zhu MM, Xu XT, Nie F, Tong JL, Xiao SD, Ran ZH (2010): Comparison of immunochemical and guaiac-based fecal occult blood test in screening and surveillance for advanced colorectal neoplasms: a meta-analysis. *J Dig Dis* 11(3): 148-160.

Zou H, Allawi H, Cao X, Domanico M, Harrington J, Taylor WR, Yab T, Ahlquist DA, Lidgard G (2012): Quantification of methylated markers with a multiplex methylation-specific technology. *Clin Chem* 58(2): 375-383.

VIII. Tabellenverzeichnis

<u>Tabelle 1:</u> Charakteristik differenter KRK-Signalwege.	11
<u>Tabelle 2:</u> TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms	13
<u>Tabelle 3:</u> Stadieneinteilung des KRK nach UICC und Dukes.	14
<u>Tabelle 4:</u> Grading.....	15
<u>Tabelle 5:</u> R-Klassifikation zur Einteilung von Residualtumoren.	27
<u>Tabelle 6:</u> DNA-Sequenzen der Primer sowie der fluoreszenzmarkierten Sonden für die jeweilige Ein-Schritt-Real-Time-PCR.....	36
<u>Tabelle 7:</u> Verdünnungsreihe für RUNX3, NEUROG1, SEPTIN9, TMEFF2, SDC2 und RASSF1A.	43
<u>Tabelle 8:</u> Verdünnungsreihe für β -Globin.....	43
<u>Tabelle 9:</u> Absolute und relative Altersverteilung des Spenderkollektivs nach Geschlecht.	48
<u>Tabelle 10:</u> Absolute und relative Altersverteilung des Patientenkollektivs nach Geschlecht. ...	48
<u>Tabelle 11:</u> Darstellung von Ct-Mittelwert $\pm$ SD und T-Test zum Diskriminationsverhalten der Gensequenzen zwischen nicht-methylierter und methylierter DNA in Abhängigkeit von den Restriktionsenzymen BstUI, Acil und Acil/AccII.	52
<u>Tabelle 12:</u> T-Test der signifik. ANOVA-Enzyminteraktionen innerhalb der DNA-Kontrollen....	55
<u>Tabelle 13:</u> Variationskoeffizient zur Ermittlung der genspezifischen Messbereiche.....	58
<u>Tabelle 14:</u> Methylierungseigenschaften der Gensequenzen auf nicht-methylierte und methylierte DNA in PCR-RUN-Kontrollen sowie auf DNA aus den Tumorzelllinien HT-29 und CACO-2.	61
<u>Tabelle 15:</u> Diagnostische Spezifität und Sensitivität der Ein-Schritt-Real-Time-PCR aus Blutspender- und Tumorgewebe-DNA unter Einsatz einer internen β -Globin- Kontrolle.	63
<u>Tabelle 16:</u> Diagnostische Spezifität und Sensitivität der methylierungsspezifischen Ein-Schritt- Real-Time-PCR aus Blutspender- und Patientenplasma-DNA mit und ohne interne β -Globin-Kontrolle.	65
<u>Tabelle 17:</u> Methylierungsstatus des Biomarker-Panel RUNX3-SEPTIN9-SDC2 in Abhängigkeit vom pUICC-Stadium nach RCT.....	73
<u>Tabelle 18:</u> Diagnostische Sensitivitäten und Spezifitäten der methylierungsspezifischen Real-Time-PCR an Plasma-DNA im Vergleich.....	89
<u>Tabelle 19:</u> Diagnostische Sensitivitäten und Spezifitäten der methylierungsspezifischen RealTime-PCR an Tumorgewebe-DNA im Vergleich	90
<u>Tabelle 20:</u> Diagnostische Sensitivitäten und Spezifitäten methylierungsspezifischer Markerpanel im Vergleich	91

IX. Abbildungsverzeichnis

<u>Abbildung 1:</u> Modifizierte Darstellung des Suppressor-Pathway und des Mutator-Pathway.....	4
<u>Abbildung 2:</u> Darstellung des Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionsweges.....	6
<u>Abbildung 3:</u> Modifizierte Darstellung des Mutator-Pathway.....	8
<u>Abbildung 4:</u> Therapiealgorithmus für die Tumorstadien I-III	30
<u>Abbildung 5:</u> Modifizierte schematische Darstellung der Wechselwirkung von 5'-Reporter und 3'-Quencher in einer Real-Time-PCR	39
<u>Abbildung 6:</u> Amplifikationskurven einer methylierungsspezifischen Multiplex-PCR für SEPTIN9 an methylierter Kontroll-DNA und einer Non Template Control	40
<u>Abbildung 7:</u> Geschlechtsverteilung in Blutspender- und Patientenkohorte	49
<u>Abbildung 8:</u> Altersstrukturen von Blutspendern und Rektumkarzinom-Patienten	49
<u>Abbildung 9:</u> Ct-Mittelwerte zum Nachweis einer Promotormethylierung von HLTF nach PCR-Amplifikation methylierter und unmethylierter Kontroll-DNA unter Verwendung der Restriktionsenzyme BstUI, Acil und einer Kombination aus Acil und AccII ..	53
<u>Abbildung 10:</u> Einfluss von BstUI, Acil und Acil/AccII auf die Ct-Mittelwerte nach PCR-Amplifikation methylierter und nicht-methylierter Kontroll-DNA	54
<u>Abbildung 11:</u> Messbereich der methylierungsspezifischen Ein-Schritt-Real-Time-PCR für β -Globin	57
<u>Abbildung 12:</u> Messbereiche der methylierungsspezifischen Ein-Schritt-Real-Time-PCR für die einzelnen Promotor-Regionen.....	57
<u>Abbildung 13:</u> Ct-Mittelwerte der Ein-Schritt-Real-Time-PCR an Patientenplasma und Patientenserum im Vergleich.....	59
<u>Abbildung 14:</u> Scatterplot der Ct-Messwerte des RUNX3 für die getesteten DNA-Proben.....	66
<u>Abbildung 15:</u> Scatterplot der Ct-Messwerte des NEUROG1 für die getesteten DNA-Proben ..	67
<u>Abbildung 16:</u> Scatterplot der Ct-Messwerte des SEPTIN9 für die getesteten DNA-Proben....	68
<u>Abbildung 17:</u> Scatterplot der Ct-Messwerte des TMEFF2 für die getesteten DNA-Proben.....	69
<u>Abbildung 18:</u> Scatterplot der Ct-Messwerte des SDC2 für die getesteten DNA-Proben	70
<u>Abbildung 19:</u> Scatterplot der Ct-Messwerte des RASSF1A für die getesteten DNA-Proben ..	71
<u>Abbildung 20:</u> Vergleich prätherapeutisch erhobener Ct-Werte für RUNX3, SEPTIN9 und SDC2 in Abhängigkeit vom pUICC-Stadium nach RCT	73

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. T. Legler gilt an dieser Stelle mein besonderer Dank für die Möglichkeit der Erstellung einer experimentellen Doktorarbeit in der Abteilung Transfusionsmedizin der UMG. Dank seiner hervorragenden, umfassenden und konstruktiven Betreuung war ein erfolgreicher Abschluss dieser Arbeit möglich. Herrn Priv.-Doz. Dr. med. J. Gaedcke sowie der klinischen Forschungsgruppe KFO 179 danke ich an dieser Stelle für die Bereitstellung der hier verwendeten Patientenproben. Weiterhin möchte ich mich bei Frau S. Lührig - wissenschaftliche Mitarbeiterin der Abteilung Transfusionsmedizin - für ihre tatkräftige und umfangreiche Unterstützung im Rahmen der Literaturrecherche sowie der Erarbeitung passender Primer- und Sonden-Sequenzen der hier zur Anwendung gekommenen Testgene bedanken. Ein besonderes Dankeschön gilt außerdem den medizinisch-technischen Assistentinnen des PCR- und HLA-Labors der Transfusionsmedizin, wobei ich insbesondere Frau K. Quentin-Perkaus für ihre geduldige und umfassende Unterstützung bei der praktischen Durchführung der Experimente sowie der Auswertung und Interpretation der erzielten Ergebnisse danke. Frau Dr. med M. Strüber sowie Frau K.A. Haase gilt mein Dank für Ihre konstruktive Kritik und die formale Korrektur der hier vorliegenden Arbeit. Ich möchte mich außerdem bei allen Patientinnen und Patienten sowie den Blutspenderinnen und Blutspendern für ihre Zustimmung zur wissenschaftlichen Verwendung ihrer Blutbestandteile bedanken. Durch ihre Bereitschaft wurde die hier vorliegende Arbeit erst möglich.

Lebenslauf

Am 02. Januar 1987 wurde ich als Kind des Diplomlehrers Ralph Thormann und seiner Ehefrau Bärbel Thormann, geb. Engelbrecht, ebenfalls Diplomlehrerin, in Magdeburg geboren. Nach Abschluss Ihres Hochschulstudiums in Leipzig verlegte sich der Wohnsitz meiner Eltern nach Sondershausen, Thüringen. Dort besuchte ich von 1993 bis 1997 die Grundschule „Käthe Kollwitz“. Nach Beendigung der Grundschule besuchte ich von 1997 bis 2001 sowie von 2002 bis 2004 das Gymnasium „Geschwister Scholl“ in Sondershausen. In der Zeit von 2001-2002 besuchte ich das Sportgymnasium Magdeburg. Im Jahr 2004 wechselte ich dann an das berufliche Gymnasium Sondershausen, wo ich im Jahr 2006 erfolgreich das Abitur ablegte. Im Oktober 2006 nahm ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität zu Göttingen auf, welches ich - nach dem bestandenen Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung im Jahr 2009 - dann im Jahr 2013 mit dem bestandenen Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung erfolgreich abschloss. Nach Erhalt der ärztlichen Approbation begann ich im Oktober des Jahres 2013 eine Assistenzarztstelle in Teilzeit in der Abteilung Transfusionsmedizin der UMG. Zeitgleich nahm ich im November des genannten Jahres die experimentelle Arbeit zu der hier vorliegenden Dissertationsschrift auf. Seit Oktober 2014 habe ich nunmehr eine Vollzeit-Weiterbildungsstelle als Arzt der Klinik für Anästhesiologie der Universitätsmedizin Göttingen inne.