

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

**Genomische Aberrationen von synchron hepatisch metastasierten
kolorektalen Karzinomen**

INAUGURAL – DISSERTATION

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

vorgelegt von
Carsten Thomas Mönkemeyer
aus Uelzen

Göttingen 2011

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatterin Prof. Dr. med. Müller-Dornieden

II. Berichterstatter Prof. Dr. rer. nat. Reiss

III. Berichterstatter Prof. Dr. med. Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 29.11.2011

1. Einleitung:

1.1	Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms	3
1.2	Ätiologie und Pathogenese	3
1.3	Prognostik – Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms	3
1.4	Tumorbiologie des kolorektalen Karzinoms	6
1.5	Genetische Instabilität des kolorektalen Karzinoms: Chromosomale Instabilität, Mikrosatelliten-Instabilität und Methylator Pathway (Methylierungs-Signalweg)	7
1.6	Adenom-Karzinom-Sequenz und genetisches Progressionsmodell des kolorektalen Karzinoms	9
1.7	Chromosomale Veränderungen des kolorektalen Karzinoms	13
1.8	Klinische Problematik	14
1.9	Fragestellung der Arbeit	16

2. Material

2.1	Tumorgewebe	17
2.2	Referenzgewebe	17

3. Methoden

3.1	Komparative genomische Hybridisierung	17
3.2	DNS-Extraktion aus Gefriergewebe	19
3.3	DNS-Gelelektrophorese	20
3.4	Photometerauswertung der DNS	21
3.5	Metaphasen	22
3.6	Pepsin-Verdau der Metaphasenpräparate	23
3.7	Denaturierung der Metaphasenpräparate	24
3.8	Nicktranslation	25
3.9	Sondenansatz	27
3.10	Denaturierung und Hybridisierung des Sondenansatzes	27
3.11	Detektion der Hybridisierung	28
3.12	Bildaufnahme	31
3.13	Auswertung	32

4. Ergebnisse	
4.1 Klinische Daten	35
4.2 Einzelne Betrachtungen der beiden Kollektive	37
4.2.1 Ergebnisse: Kollektiv M0	37
4.2.2 Ergebnisse: Kollektiv M1	40
4.3 Vergleich von Kollektiv M0 mit Kollektiv M1	43
4.3.1 Auswertung Kollektiv M0 und Kollektiv M1	43
4.4 Zusammenfassung	45
5. Diskussion	
5.1 Überblick	46
5.2 Allgemeine Betrachtung der detektierten chromosomalen Veränderungen	47
5.3 Zunahme der genetischen Instabilität beim Vergleich von M0- mit M1-Tumoren	47
5.4 Zunahme der genetischen Instabilität – bedingt durch chromosomale Verluste	49
5.5 Spezifische chromosomale Verluste als prädiktiver Marker	51
5.5.1 Chromosom 1p	51
5.5.2 Chromosom 9q	53
5.5.3 Chromosom 19	53
5.6 Kombinierter Verlust von 1p32-pter, 9q33-qter und 19q – Aggressiver Genotyp eines Primärtumors?	55
6. Zusammenfassung	57
7. Abkürzungen	59
8. Literaturverzeichnis	61
Danksagung	76
Lebenslauf	77

1. Einleitung:

1.1 Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms

Das kolorektale Karzinom ist der häufigste Tumor des Gastrointestinaltraktes und die zweithäufigste Malignomart bei Männern und Frauen. Bei über 70 000 jährlichen Neuerkrankungen in Deutschland liegt das Lebenszeitrisko, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken, bei ca. 6%. Frauen und Männer erkranken ungefähr gleich häufig. Das mittlere Erkrankungsalter wird mit 75 Jahren für Frauen und mit 69 Jahren für Männer angegeben (Robert-Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. Berlin, 2008).

1.2 Ätiologie und Pathogenese

Die Ursachen für das Auftreten eines kolorektalen Karzinoms sind bisher nicht eindeutig geklärt. Es werden exogene Risikofaktoren, wie hoher Fleisch- und Fettkonsum, langsame Stuhlpassage sowie Kanzerogene wie Asbest und Nikotin diskutiert. Als endogene Risikofaktoren werden genetische Dispositionen (vor allem: die familiäre adenomatöse Polyposis und das hereditäre nicht-Polyposis-assoziierte kolorektale Karzinom-Syndrom), chronisch entzündliche Darmerkrankungen (Colitis ulcerosa und vermutlich auch M. Crohn), familiäre Belastungen und das Vorliegen von Polypen im Kolonrahmen angesehen (Hermanek und Wittekind 1996).

1.3 Prognostik – Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms

Für die Prognose eines erkrankten Patienten wird die Fünf-Jahres-Überlebensrate herangezogen. Sie zeigt sich abhängig von dem UICC-Stadium eines Tumors. Tumore, die nach der histopathologischen Aufarbeitung dieselbe TNM-Klassifikation zeigen, werden demselben UICC-Stadium zugeordnet. Die TNM-Klassifikation eines Tumors beruht auf der histopathologischen Aufarbeitung des Tumors nach der chirurgischen Resektion. Hierbei werden die lokale Tumorausdehnung (T-Stadium),

eine mögliche lymphogene Metastasierung (N-Stadium) und das Vorhandensein von Fernmetastasen (M-Stadium) beurteilt.

Die folgenden Tabellen zeigen die histopathologische Einteilung (TNM-Klassifikation) sowie die resultierende UICC-Klassifikation.

pT-Klassifikation	
pTx	Primärtumor kann histopathologisch nicht beurteilt werden
pT0	Kein Anhalt für Primärtumor
pTis	Tumor infiltriert nur Mukosa
pT1	Tumor infiltriert Submukosa
pT2	Tumor infiltriert Muscularis propria
pT3	Tumor infiltriert durch die Muscularis propria in die Subserosa oder in nicht peritonealisiertes perikolisches oder perirektales Gewebe
pT4	Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen und /oder perforiert das viszerale Peritoneum

pN-Klassifikation	
pNx	Regionäre Lymphknoten können nicht untersucht werden
pN0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
pN1	Metastase(n) in 1-3 regionären Lymphknoten
pN2	Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten

pM-Klassifikation	
pMx	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
pM0	keine Fernmetastasen
pM1	Fernmetastasen

Tabelle 1.3.1: TNM-Klassifikation Kolon und Rektum (nach der 7. Auflage der TNM-Klassifikation 2010, Seite 94-99).

UICC-Stadium	TNM-Stadium	UICC-Stadium	Fünf-Jahres-Überlebensrate
0	Tis pN0 M0	0	100%
I	pT1-2 pN0 M0	I	ca. 80-95%
IIa	pT3 pN0 M0	IIa	ca. 72-75%
IIb	pT4 pN0 M0	IIb	ca. 65-66%
III	pT1-4 pN1-2 M0	III	ca. 25-60%
IV	pT1-4 pN0-2 pM1	IV	ca. 0-7%

Tabelle 1.3.2: UICC/TNM-Stadien und Fünf-Jahres-Überlebensrate (nach Weitz et al. 2005, Seite 157).

Trotz der herausragenden Bedeutung des TNM-Systems wird die Prognose für einen Tumorpatienten von einer Vielzahl weiterer Faktoren beeinflusst. Hierzu gehören patientenassoziierte Faktoren (Alter, Leistungsfähigkeit, Komorbidität etc.), tumorassoziierte Faktoren (histologischer Typ, Differenzierungsgrad, Rezeptorstatus etc.) und behandlungsassoziierte Faktoren (z. B. Qualität der chirurgischen Technik). Zu den letzteren Faktoren gehört daher die R-Klassifikation, die den Tumorstatus nach Behandlung widerspiegelt. Nur Patienten, deren Tumor R0 reseziert worden ist, d. h. es ist kein Residualtumor mehr nachweisbar, wurden kurativ behandelt. Beim kolorektalen Karzinom ist damit die R-Klassifikation der wichtigste prognostische Faktor.

Neben der pathologischen Klassifikation wird heute eine prätherapeutische TNM-Klassifikation (dann als cT/N/M, „c“ für „clinical“) des kolorektalen Karzinoms durchgeführt. Diese stützt sich auf Ergebnisse spezieller diagnostischer Verfahren: Ultraschall-Untersuchung, Endoskopie-Untersuchung, Computertomographie, Kernspintomographie.

Beim Rektumkarzinom ist die prätherapeutische Klassifikation heute bereits entscheidend bezüglich der weiteren Therapieplanung. So werden fortgeschrittene Tumore (cT3/cT4 und/oder cNpos) heute mit einer neoadjuvanten Radiochemotherapie behandelt (Liersch et al. 2007).

1.4 Tumorbiologie des kolorektalen Karzinoms

Die Entstehung des sporadischen kolorektalen Karzinoms (= Karzinogenese) geht von einer Zelle aus, die genetische Veränderungen hinzugewinnt. Diese statten sie mit Vorteilen gegenüber ihren Nachbarzellen aus. Im Einzelnen werden wenigstens sechs Veränderungen in der Zellphysiologie der Tumorzelle postuliert:

1. Selbstversorgung mit Wachstumsstimuli.
2. Unempfindlichkeit gegenüber Wachstumsinhibitoren.
3. Inaktivierung des programmierten Zelltodes (Apoptose).
4. Unbegrenzte Teilungsfähigkeit.
5. Initiierung von Neoangiogenese.
6. Gewebsinvasion und Metastasenbildung (Hanahan und Weinberg 2007).

Der Erwerb dieser sechs Tumor-Charakteristika beruht auf genetischen Veränderungen in den Tumorzellen. Die genomische Integrität einer Zelle unterliegt jedoch einer Vielzahl an Sicherheitsmechanismen, so dass ein selektives Mutationsmuster, wie es zum Erreichen obiger Tumor-Charakteristika nötig ist, in der Lebenszeitspanne eines Individuums nicht erreicht werden würde. Zur Steigerung der Mutationsrate wird ein „Motor“ benötigt. Dieser Motor heißt genetische Instabilität. Erst eine genetisch instabile Zelle hat die Fähigkeit, die notwendigen genetischen Veränderungen zu akkumulieren und damit den gesamten Genotyp einer malignen Tumorzelle in sich zu vereinen (Worthley et al. 2007, Hanahan und Weinberg 2007).

Die genetische Instabilität des kolorektalen Karzinoms zeigt sich strukturell in zwei Ausprägungen. Der Großteil der sporadischen kolorektalen Karzinome (ca. 85%) ist chromosomal instabil (CIN = chromosomal instability), der andere Teil (ca. 15%) der kolorektalen Karzinome zeigt seine genetische Instabilität in Form der so genannten Mikrosatelliten-Instabilität (MSI = microsatellite instability).

1.5 Genetische Instabilität des kolorektalen Karzinoms: Chromosomale Instabilität, Mikrosatelliten-Instabilität und Methylator Pathway (Methylierungs-Signalweg)

Chromosomale Instabilität:

Bei zytologischen Untersuchungen weisen die meisten soliden Tumore Anomalien hinsichtlich der Anzahl oder der Zusammensetzung ihrer Chromosomen auf; eine Tatsache, die auf eine zugrunde liegende chromosomale Instabilität (CIN) hinweist.

Während der normale chromosomale Karyotyp als diploid bezeichnet wird, bezeichnet man chromosomale Veränderungen des Karyotyps bei Tumoren allgemein als aneuploid. Beim sporadischen kolorektalen Karzinom zeigen ca. 85% der Tumore eine CIN (Lengauer et al. 1998).

Die Ursachen für eine CIN sind nicht vollständig geklärt. Es werden hierfür zum einen Mutationen in Genen angesehen, die bei der Aufteilung der Chromosomen im Rahmen der Mitose auf die Tochterzellen verantwortlich sind. Dies sind insbesondere Gene, die für den Spindelapparat, die Schwester-Chromatid-Anordnung, die Kinetochoren-, Zentrosomen- und Mikrotubulstruktur kodieren (Jallepalli und Lengauer 2001). Auch den so genannten „Checkpoint“-Genen (wie p53, pRb, p16 und p21) wird bei Mutationen das Auftreten einer CIN zugeschrieben (Worthley et al. 2007). Diese Gene bewirken in physiologischer Weise einen Arrest in der G1- und/oder G2-Phase des Zellzyklus und ermöglichen so die Reparatur von DNS-Schäden, oder sie bewirken einen gesteuerten Zelltod bei irreparablen Schäden (Apoptose).

Telomere sind spezielle Chromatin-Strukturen an den Enden der Chromosomen. Während der Replikation kann die DNA-Polymerase diese Abschnitte nicht vollständig synthetisieren, was zu einer Kürzung der Telomere im Laufe der Zellteilungen führt. Wird eine kritische Länge erreicht, so werden Checkpoint-Gene aktiviert, die eine weitere Zellteilung verhindern oder die Apoptose einleiten. Es scheint im Tiermodell so zu sein, dass Zellen eine CIN anhäufen, wenn sie eine kritische Telomerlänge überleben. Im weiteren Verlauf scheint eine Überexpression von Telomerase weiteres Kürzen der Telomere zu verhindern. Die Zellen entgehen somit dem physiologischen „Alterungsprozess“ und erwerben unbegrenzte Teilungsfähigkeit (Grady und Carethers 2008).

Mikrosatelliten-Instabilität:

Im Gegensatz zu den Ursachen für die CIN, die nach obiger Darstellung nicht vollständig geklärt sind, ist die Grundlage für den Erwerb der so genannten Mikrosatelliten-Instabilität (MSI) weitgehend aufgedeckt.

Die MSI betrifft ca. 15% der sporadischen kolorektalen Karzinome. Diese zeigen keine chromosomalen Veränderungen, sie sind diploid. Auch diese Tumore sind genetisch instabil, sie weisen auf dem ganzen Genom Veränderungen in kurzen repetitiven DNS-Sequenzen auf. Die meisten dieser repetitiven DNS-Sequenzen liegen in nicht kodierenden Bereichen der DNS.

Ursächlich für das Auftreten dieser MSI ist der Verlust von Mismatch-Repair Genen (MMR). Es sind heute 7 dieser Mismatch-Repair Gene bekannt (hMSH2, hMSH3, hMLH1, hMLH3, hPMS1, hPMS2 und hMSH6). Ihre Funktion ist es, zufällige Basenfehlpaarungen in der DNS zu korrigieren. Ein Ausfall dieser MMR-Gene führt zur Anreicherung von Basenfehlpaarungen im gesamten Genom und somit zur Insuffizienz der betroffenen Gene. Beim kolorektalen Karzinom sind Basenfehlpaarungen in den Mikrosatellitenabschnitten der Gene für β -Catenin, TGF- β und APC beschrieben worden (Worthley et al. 2007).

Wie oben bereits erwähnt, betrifft die MSI ca. 15% aller sporadischen kolorektalen Karzinome und stellt damit eine Untergruppe der kolorektalen Karzinome dar (Hawkins und Ward 2001). Beim erblichen HNPCC-Syndrom (hereditäres nicht-Polyposis-assoziiertes kolorektales Karzinom-Syndrom = Lynch-Syndrom) liegt eine heterozygote Keimbahnmutation von MMR-Genen (Lokus: 2p16 und 3p21) vor. Durch eine zufällige Mutation im intakten Allel des MMR-Gens kommt es zur MSI. Träger dieser Keimbahnmutation haben daher ein 80%-Risiko, im Laufe ihres Lebens an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken (Peltomäki 2005, Lindblom et al. 1993).

Methylator Pathway (Methylierungs-Signalweg):

Methylierungen finden sich im gesamten Bereich der DNS. Das Dinukleotidpaar Cytosin/Guanin ist im menschlichen Genom nicht gleichmäßig verteilt und stark unterrepräsentiert. Während die Mehrzahl der CpG-Dinukleotide methyliert sind, gibt es 1-2 kbp lange Abschnitte, die so genannten CpG-Inseln (CpG-Island), die eine relativ hohe Dichte an unmethylierten CpG-Dinukleotiden aufweisen.

Bei mehr als 60% aller bekannten Gene finden sich CpG-Inseln in den Promotor-Regionen und den ersten Exons. Durch die Methylierung von Cytosin wird das Ablesen der folgenden codierenden DNS-Abschnitte blockiert. Dies findet physiologisch, z. B. bei der Inaktivierung eines der X-Chromosomen statt.

Im Rahmen der Karzinogenese können durch Methylierung von CpG-Islands Tumorsuppressorgene (MLH1, p16) unterdrückt werden. Dies ist biologisch gleichbedeutend mit dem Erwerb einer inaktivierenden Mutation des Tumorsuppressorgens. Die Tumore werden als „CpG Island Methylator Phenotyp positiv“ (= CIMP+) klassifiziert.

Eine Methylierung des CpG-Island des MLH1-Gens bewirkt, genauso wie eine erworbene oder angeborene Mutation des MLH1-Gens (siehe auch vorangegangener Abschnitt: MSI), einen Mikrosatelliten-instabilen Genotyp.

Jedoch liegt nicht bei allen CIMP+ -Tumoren eine Mikrosatelliten-Instabilität vor. Ein weiteres Tumorsuppressorgen, das durch Methylierung inaktiviert werden kann, scheint O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) zu sein. So wurde eine Inaktivierung von MGMT, kombiniert mit KRAS-Mutationen, auch bei Tumoren mit einer gering ausgeprägten Mikrosatelliten-Instabilität (so genannte MSI-L (low)-Tumore) beschrieben (Worthley et al. 2007).

1.6 Adenom-Karzinom-Sequenz und genetisches Progressionsmodell des kolorektalen Karzinoms

Im Rahmen der Adenom-Karzinom-Sequenz wird das Adenom als mögliche Vorstufe eines sich entwickelnden kolorektalen Karzinoms beschrieben. Die Entwicklung von einem Adenom zum Karzinom zieht sich über einen Zeitraum von ca. 10-15 Jahren hin. In Abhängigkeit von der Größe des Adenoms, der Morphologie (tubuläres, villöses und tubulovillöses Adenom) und des Dysplasie-Grades unterscheidet sich das Entartungsrisiko (Riede und Schaefer 1993).

Im Jahre 1988 stellten Vogelstein et al. den morphologischen Stadien der Adenom-Karzinom-Sequenz genetische Veränderungen gegenüber. Hiernach entwickelt sich ein sporadisches kolorektales Karzinom aus einem (noch) gutartigen Adenom (Größe bis 1 cm) über ein fortgeschrittenes Adenom (Zunahme der Größe über 1 cm

und Nachweis von entarteten Zellen) in ein Karzinom. Sie detektierten in fortgeschrittenen Adenomen zu 58% Mutationen im KRAS-Gen und fanden ebenfalls als frühe genetische Veränderung den Verlust von 5q. Der Schritt zum Karzinom zeigte sich genetisch im Verlust von Chromosomen 18q und 17p. Es wurde hierbei nicht die starre Folge obig beschriebener Mutationen, sondern die Kumulation als entscheidend angesehen (Vogelstein et al. 1988).

Das genetische Progressionsmodell von Vogelstein demonstriert die genetische – und weiter differenziert – die chromosomale Instabilität des kolorektalen Karzinoms. Es hat in seiner Grundform bis heute Bestand, ist allerdings um eine Vielzahl an involvierten Genen erweitert worden.

Vor der Entwicklung von makroskopisch sichtbaren Polypen sind, bei mikroskopischen Untersuchungen, veränderte Schleimhautkrypten beim kolorektalen Karzinom gesehen worden. Diese (mikroskopisch) erkennbaren Veränderungen der Schleimhaut des Dickdarms werden im Anglizismus als *aberrant crypt focus* = ACF bezeichnet. Sie werden heute als erste morphologisch feststellbare pathologische Veränderung der Dickdarmschleimhaut angesehen. Bei molekulargenetischen Untersuchungen wurden in bis zu 63% dieser histomorphologisch veränderten Schleimhautkrypten Mutationen im KRAS-Gen gesehen. KRAS ist ein GTP-bindendes Protein, das – aktiviert – Wachstum stimulierende Signale sendet. Es wird in die Gruppe der Onkogene eingeteilt. Onkogene sind Gene, die bei Überexpression oder durch aktivierende Mutationen zur Karzinogenese führen. Bei KRAS hydrolysiert physiologischerweise eine intrinsische GTPase GTP-gebundenes KRAS in GDP-gebundenes KRAS und bewirkt so eine Inaktivierung des Proteins. Mutationen des KRAS-Gens beeinträchtigen die GTPase-Aktivität und bewirken somit eine Dauerstimulierung mit Wachstumssignalen (Ellis und Clark 2000).

APC ist unter anderem an einem Multiproteinkomplex beteiligt, der physiologischerweise einen Abbau von β -Catenin ermöglicht. β -Catenin ist in der Lage, mit anderen Proteinen die Expression von bestimmten Genen zu ermöglichen (so genannter Wnt-Pathway). Einige dieser Gene sind im Rahmen der Tumorprogression von Wichtigkeit (c-myc, Cyclin D1, MMPs, uPAR, CD44, c-met, VEGF und andere). Eine Mutation im APC-Gen bewirkt somit ein vermehrtes Ablesen oben genannter Gene (Huang und Du 2008).

Neben der Karzinogenese im Rahmen der Adenom-Karzinom-Sequenz ist APC auch bei einer angeborenen Erkrankung des Kolons beteiligt: Patienten mit der angeborenen familiären adenomatösen Polyposis (FAP) entwickeln hunderte bis tausende Polypen im Kolon. Sie bekommen unbehandelt spätestens im frühen Erwachsenenalter ein kolorektales Karzinom. Bei genetischen Untersuchungen dieser Erkrankten wurde eine Mutation im APC-Gen festgestellt. Der über APC vermittelte Abbau von β -Catenin findet bei ihnen nicht statt. Das als Transkriptionsfaktor fungierende β -Catenin reichert sich somit im Zellkern an und führt zur Genexpression von Onkogenen. Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass sich das Gen für APC auf dem Chromosomenarm 5q21 findet. Heute wird als initiales Ereignis der Karzinogenese des kolorektalen Karzinoms eine aktivierende Mutation des KRAS-Gens angenommen. Als nächster Schritt folgen die Mutation des APC-Gens, respektive der Verlust von 5q (Worthley et al. 2007).

Vogelstein et al. verknüpften den Verlust des Chromosomenarms 18q im Rahmen der Tumorprogression mit dem Verlust des DCC-Gens (Deleted in Colon Cancer, lokalisiert auf 18q21) (Vogelstein et al. 1988). DCC ist als Zelladhäsionsmolekül angesehen worden. Seine funktionellen Aufgaben betreffen die Zell-Zell- bzw. die Zell-Matrix-Verbindung. Das DCC-Gen wird in die Gruppe der Tumorsuppressorgene eingeteilt. Ein Verlust von DCC sollte mit einer geringeren Differenzierung und einer Tumorprogression im Sinne einer erhöhten Invasionsbereitschaft und metastatischen Kapazität einhergehen (Fearon 1995). In aktuellen Untersuchungen zeigt sich jedoch, dass es eher der Verlust des Gens für SMAD4 ist – ebenfalls auf dem Chromosomenarm 18q21.1 lokalisiert –, der im Rahmen der Adenom-Karzinom-Sequenz relevant ist. SMAD4 ist als Transkriptionsfaktor am TGF- β -pathway beteiligt. Ein Verlust von SMAD4 resultiert daher in einer Störung der TGF- β vermittelten Zellregulation. TGF- β ist als negativer Wachstumsfaktor für zelluläre Differenzierung und Integrität wichtig.

SMAD4 scheint, unabhängig vom TGF- β -pathway, durch reduzierte Expression von VEGF das Tumorwachstum zu unterdrücken (Schwarte-Waldhoff und Schmiegel 2002). Es wurde des Weiteren gezeigt, dass angeborene Defekte im SMAD4-Gen zum Auftreten von Polypen im Kindesalter (Juvenile Polypose) führen. Patienten mit diesem Defekt tragen ein erhöhtes Risiko, ein kolorektales

Karzinom zu entwickeln (Howe et al. 1998, Houlston et al. 1998).

Der Verlust von p53 wird auch aktuell als relativ spätes Ereignis in der Karzinogenese des kolorektalen Karzinoms angesehen. P53 wird aktiviert durch zellulären Stress, DNS-Schäden und/oder Signale von Onkogenen. Es nimmt nun eine der wichtigsten Rollen im Zellzyklus ein. Je nach Ausmaß der Zellschädigung kann durch p53 eine Reparatur von DNS-Schäden, ein Zellzyklusarrest oder die Apoptose der Zelle eingeleitet werden. P53 wird aufgrund seiner herausragenden Stellung daher auch Wächter des Genoms genannt (Lane 1992, Efeyan und Serrano 2007).

Normalerweise wird p53 durch eine Ubiquitin-Ligase (MDM2) degradiert. Durch Hemmung von MDM2 über ARF kommt es zum Anstieg von p53 in der Zelle. ARF stellt somit einen p53 „Stabilisator“ dar. Im Tiermodell wird die Transkription von ARF unter anderem durch Onkogene (c-myc, KRAS) induziert. Eine inaktivierende Mutation von ARF führt also zu einer verminderten p53-Stabilisierung und führt zur Ausbildung eines Tumorphänotyps (Gil und Peters 2006, Efeyan und Serrano 2007).

Beim kolorektalen Karzinom zeigt sich in 50-75% ein Verlust oder eine Inaktivierung von p53 (Leslie et al. 2002).

Wie bereits von Vogelstein et al. (1988) beschrieben, wird auch aktuell nicht die starre Folge oben genannter genetischen Veränderungen im Rahmen der Karzinogenese postuliert. Es wird davon ausgegangen, dass die Kumulation an genetischen Veränderungen eine permissive Situation für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms ermöglicht. Die Genprodukte von KRAS, APC, SMAD4 und p53 sind in eine Vielzahl von Regelkreisen eingebunden und nehmen hier Schlüsselstellen ein. Es können jedoch einzelne Mutationen umgangen werden, wenn andere den Regelkreis betreffende Mutationen ähnliche Auswirkungen haben (Arends 2000).

1.7 Chromosomale Veränderungen des kolorektalen Karzinoms

Angelehnt an die von Fearon und Vogelstein (1990) beschriebenen molekulargenetischen Ereignisse der Adenom-Karzinom-Sequenz, ist es vor allem Ried et al., der 1996 mit Hilfe der komparativen genomischen Hybridisierung (CGH) chromosomale Aberrationen den unterschiedlichen Stadien der Adenom-Karzinom-Sequenz zuordnete (Ried et al. 1996).

Die Progression des kolorektalen Karzinoms vom Adenom zum Karzinom geht mit einem spezifischen Muster an chromosomalen Gewinnen und Verlusten einher. Im Stadium des Adenoms wurden Gewinne des Chromosoms 7 und 20 sowie Verluste von 18 und 17p gezeigt. Karzinome zeigten Gewinne der Chromosomenarme 20q, 13q, 8q, 7p, 1q und 5p und Verluste von 4, 8p, 17p und 18q. Dieses Muster an chromosomalen Veränderungen ist ebenso auch bei klassischen zytogenetischen Bandenanalysen gefunden worden und kann auch mit den von Fearon und Vogelstein beschriebenen genetischen Veränderungen korreliert werden. Die Tumorsuppressorgene p53 und SMAD4 liegen auf 17p und 18q. Dies sind die Chromosomen, die bei der Mehrzahl der kolorektalen Karzinome verloren gegangen sind (Bardi et al. 1995, Fearon und Vogelstein 1990).

Ghadimi et al. erweiterten 2003 das chromosomale Muster um den Gewinn von 8q23-24, den sie in bis zu 70% der lymphatisch metastasierten kolorektalen Karzinome fanden (Ghadimi et al. 2003).

Wie oben beschrieben, liegen detaillierte Beschreibungen von chromosomalen Aberrationen in der Adenom-Karzinom-Sequenz vor. Es ist bislang jedoch keine Einigkeit über spezifische chromosomale Aberrationen hinsichtlich der Bildung hämatogener Metastasen erzielt worden (Paredes-Zaglul et al. 1998; Al-Mulla et al. 1999; Korn et al. 1999; Hidaka et al. 2000, Nakao et al. 2001; Aragane et al. 2001; Hermsen et al. 2002, Knösel et al. 2003; Diep et al. 2003 a; Alcock et al. 2003, Postma et al. 2007).

1.8 Klinische Problematik

Wie bereits erwähnt ist die histopathologische Aufarbeitung und die hieraus resultierende TNM-Klassifikation der Goldstandard zur Beurteilung der Prognose eines Patienten. Bei Betrachtung der UICC-Stadien zeigt sich, dass eine lymphogene Metastasierung (UICC-Stadium II versus UICC-Stadium III) zu einer deutlichen Verschlechterung der Fünf-Jahres-Überlebensrate und einer größeren Heterogenität bezüglich der Prognose führt (Fünf-Jahres-Überlebensrate UICC-Stadium II: 65-75% versus Fünf-Jahres-Überlebensrate UICC-Stadium III: 25-60%). Ein Tumorprogress mit einer hämatogenen Metastasierung (UICC-Stadium IV) führt zu einer weiteren deutlichen Verschlechterung der Fünf-Jahres-Überlebensrate.

Während der Lymphknotenstatus sicher postoperativ durch den Pathologen beurteilt werden kann, und hier auch Mikrometastasen in Lymphknoten bei einer entsprechenden Aufarbeitung nicht durch das diagnostische Raster fallen, sieht dies bei hämatogenen Metastasen anders aus. Durch die prätherapeutische Diagnostik (Ultraschall der Leber, Computertomographie des Abdomen, Röntgen-Thorax) und die intraoperative Palpation der Leber können hämatogene Metastasen erst bei einer Größe von ca. 1 cm diagnostiziert werden. So genannte Mikrometastasen in der Leber zeigen sich erst im weiteren Krankheitsverlauf des Patienten. Diese Patienten sind im Rahmen der prätherapeutischen Diagnostik unterklassifiziert worden. Ihre Fünf-Jahres-Überlebensrate ist schlechter als zunächst angenommen.

Hämatogene Metastasen fallen somit immer wieder durch das apparative diagnostische Raster und werden erst im weiteren Krankheitsverlauf erkennbar.

Auch vermeintlich lokal begrenzte Tumore haben dabei die Fähigkeit, hämatogene Metastasen zu bilden. In einer französischen Multicenterstudie zeigte sich das Risiko einer Lebermetastasierung bei T1-Tumoren von 3,7%, bei T2-Tumoren von 13,3% und bei T3-Tumoren von 30,4% (Nachbeobachtungszeitraum fünf Jahre) (Manfredi et al. 2006).

In dem untersuchten Kollektiv dieser Arbeit finden sich Tumore (T2/3, N0), die ohne lymphatisch metastasiert zu sein, eine synchrone hepatische Metastasierung zeigen. Diese Tumore werden allein aufgrund der prätherapeutischen/intraoperativen

Staging-Diagnostik als UICC-IV-Tumore eingestuft. Sie unterliegen jedoch einem großen Risiko unterklassifiziert zu werden, wenn ihre Metastasen durch die Diagnostik nicht entdeckt werden. Ein unabhängiger Prognosefaktor bezüglich einer zu erwartenden oder bereits eingetretenen hämatogenen Metastasierung wäre demnach von großem klinischem Wert.

Bei verschiedenen malignen Erkrankungen werden heute molekulare Marker als solche Prognosefaktoren verwendet. Beim Mammakarzinom wird der Östrogen/Progesteron-Rezeptor-Status des Tumors mit in die Therapie einbezogen. Bei der akuten lymphatischen Leukämie werden Oberflächenmoleküle bei der Wahl des Therapieregimes und der Risikoabschätzung des Patienten berücksichtigt (Deutsche Krebsgesellschaft und Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e. V. 2008 und Deutsche Krebsgesellschaft und Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie 2008).

Molekulare Marker werden zurzeit beim kolorektalen Karzinom nur zur Verlaufskontrolle eingesetzt. Hierzu wird der CEA-Wert (engl.: carcino-embryonic antigen = karzinoembryonales Antigen) im Blutserum bestimmt. CEA ist ein Oberflächenmolekül, das auf den meisten kolorektalen Karzinomen zu finden ist und von den Tumorzellen sezerniert wird. Ein erneuter Anstieg des CEA-Wertes nach kurativer Resektion wird als Hinweis für ein Rezidiv gesehen. Die Leitlinie der deutschen Krebsgesellschaft empfiehlt daher eine halbjährliche Kontrolle des CEA-Wertes beim fortgeschrittenen kolorektalen Karzinom. Da eine Erkrankung an einem kolorektalen Karzinom nicht unbedingt mit einer Erhöhung des CEA-Wertes einhergehen muss und es auch beim Gesunden CEA-Wert-Erhöhungen geben kann (z. B. können Raucher einen erhöhten CEA-Wert von bis zu 20 ng/ml haben), wird die Bestimmung des CEA-Wertes nicht zur Früherkennung eingesetzt.

Ein präoperativ deutlich erhöhter CEA-Wert ist mit einer schlechteren Prognose korreliert worden (Wanebo et al. 1978, Park und Lee 2007). Er wird aber aktuell nicht zur Bestimmung der Fünf-Jahres-Überlebensrate mit herangezogen.

1.9 Fragestellung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde nach einem molekularen Marker gesucht, der die hämatogene Metastasierungspotenz des kolorektalen Karzinoms abschätzen lässt. Hierzu wurden aggressive, hepatisch metastasierende kolorektale Karzinome (= Auftreten von Leberfiliae synchron zur Diagnose des Primärtumors, d. h. Vorliegen von Leberfiliae zum Zeitpunkt der Diagnose oder innerhalb von 6 Monaten nach Diagnosestellung) mit nicht hepatisch metastasierten kolorektalen Karzinomen (Nachbeobachtungszeitraum 2 Jahre) verglichen. Das Kollektiv der synchron hepatisch metastasierten Tumore (im Folgenden: M1) und das Kollektiv der nicht hepatisch metastasierten Tumore (im Folgenden: M0) beinhaltete jeweils 18 Tumore.

Wie bereits vorausgehend beschrieben, liegt bei ca. 85% der kolorektalen Karzinome eine chromosomale Instabilität zu Grunde. Die komparative genomische Hybridisierung (CGH) ermöglicht eine Detektion chromosomaler Aberrationen eines Tumors. Sie stellt gleichzeitig aufgrund ihrer Methodik eine mögliche Screening-Methode dar und ist somit ideal für die Identifizierung eines chromosomalen Markers für die hämatogene Metastasierung geeignet.

Es sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Inwieweit unterscheiden sich die chromosomalen Aberrationen lokal fortgeschrittener, nicht fernmetastasierter Karzinome (M0) und hepatisch metastasierter Karzinome (M1)?
2. Kann ein chromosomales Profil aufgezeigt werden, das den metastatischen Phänotyp begründet?

2. Material

2.1 Tumorgewebe

Das untersuchte Kollektiv besteht aus 36 Patienten mit einem primären kolorektalen Karzinom, die in der Zeit von 1998 - 2001 in der Abteilung für Allgemein- und Viszeralchirurgie der Universitätsmedizin Göttingen (Direktor Prof. Dr. med. H. Becker) operiert wurden. Die Probenentnahme aus den Primärtumoren erfolgte durch Fachärzte der Abteilung Pathologie der Universitätsmedizin Göttingen (Direktor Prof. Dr. med. H.-J. Radzun). Die Proben sind nach der operativen Resektion innerhalb einer halben Stunde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei –80 Grad Celsius gelagert worden.

2.2 Referenzgewebe

Als Referenzgewebe diente weibliches sowie männliches tumorfreies Lebergewebe, das ebenfalls innerhalb einer halben Stunde nach der operativen Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 Grad Celsius gelagert wurde.

3. Methoden

3.1 Komparative genomische Hybridisierung

Die komparative genomische Hybridisierung (= Comparative genomic hybridisation = CGH) ist ein Screeningverfahren hinsichtlich chromosomaler Gewinne und Verluste eines Tumors. Das Verfahren ist 1992 erstmals von Kallioniemi und kurz darauf von Du Manoir beschrieben worden (Kallioniemi et al. 1992, Du Manoir et al. 1993).

Bei dieser molekulargenetischen Untersuchungstechnik werden gleiche Mengen an Tumor- und Kontroll-DNS mit unterschiedlichen Fluorochromen markiert und gleichzeitig auf normale Metaphasenchromosomen hybridisiert. Es wird davon

ausgegangen, dass die Kontroll-DNS aus gesundem Gewebe mit einem physiologischen (diploiden) Chromosomensatz gewonnen wird. Hingegen zeichnet sich Tumorgewebe zumeist durch den Verlust oder Gewinn chromosomalen Materials aus, die hieraus gewonnene Tumor-DNS ist demzufolge durch Überrepräsentation oder Unterrepräsentation genetischen Materials gekennzeichnet. Bei der gleichzeitigen Hybridisierung eines Überschusses an Kontroll- und Tumor-DNS auf die denaturierten Metaphasenchromosomen kommt es zu einer Konkurrenzsituation hinsichtlich der Bindungsmöglichkeiten an den Chromosomen. Im Tumor überrepräsentierte genetische Abschnitte binden im Gegensatz zur Kontroll-DNS vermehrt an ihren jeweiligen Chromosomenabschnitten. Sind genetische Abschnitte im Tumor unterrepräsentiert, so bindet relativ mehr Kontroll-DNS an diesen Chromosomenabschnitten. Durch digitale Bildaufnahme, der mit Kontroll- und Tumor-DNS hybridisierten Metaphasen, kann durch rechnergesteuerte Verhältnisberechnung der Fluorochrome zueinander eine Aussage über chromosomale Verluste oder Gewinne des Tumors erzielt werden.

Mit Hilfe der CGH sind theoretisch chromosomale Gewinne ab 250 Kilobasenpaaren (Kbp) (bei High-Amplifikation des chromosomalen Abschnittes) und totale chromosomale Verluste ab 1-2 Megabasenpaaren (Mbp) detektierbar (Weiss et al. 1999). Limitierend wirkt hier allerdings die Kontamination der Tumor-DNS mit normaler DNS durch sich im Tumorgewebe befindliche Entzündungszellen und Fibrozyten. Es wird daher ein Tumorgehalt von mindestens 75% in dem untersuchten Gewebestück gefordert, die dann detektierbaren Gewinne und Verluste liegen in der Größenordnung von 10-20 Mbp.

Neben den oben beschriebenen Limitationen bei der Detektion kleiner chromosomaler Veränderungen liegt es in der Methodik der CGH begründet, dass strukturelle chromosomale Veränderungen (balancierte chromosomale Translokationen, Inversionen, Ringchromosomen, Tetraploidie) ohne quantitative Veränderung des Chromosomensatzes nicht detektiert werden können (Kallioniemi et al. 1994, Du Manoir et al. 1995).

Die CGH berücksichtigt darüber hinaus keine mögliche chromosomale Heterogenität im untersuchten Tumormaterial. Es werden stattdessen nur diejenigen

vorherrschenden genetischen Aberrationen detektiert, die in mindestens 50% der Tumorzellen vorliegen (Kallioniemi et al. 1994). Speziell bei der Fragestellung dieser Arbeit ist somit die Möglichkeit in Betracht zu ziehen, dass in einem heterogenen Tumor kleine mit hämatogener Metastasierungstendenz ausgestattete Subpopulationen nicht detektiert worden sind.

Genetische Gewinne und Verluste auf bestimmten chromosomalen Regionen müssen bei der CGH mit Vorsicht interpretiert werden. So entziehen sich die kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen (13, 14, 15) aufgrund ihres Reichtums an Heterochromatin vollständig der Auswertung durch die CGH. Bei der Beurteilung der Chromosomenabschnitte 1p32-pter, 16p, 19p und 22q ist Vorsicht geboten (Kallioniemi et al. 1994).

3.2 DNS-Extraktion aus Gefriergewebe

Die DNS-Extraktion erfolgte mit Hilfe eines DNS-Extraktions-Kits (QIAamp-Tissue Kit von Qiagen, Hilden, Deutschland). Die gewonnene DNS wurde bei vier Grad Celsius gelagert.

Zur Gewinnung der DNS wurde ein ca. 0,5 x 0,5 cm großes Stück Tumor- sowie Referenzgewebe mit dem Skalpell zerkleinert und in einen Eppendorfcup überführt. Dann wurden 360 µl, 55 Grad Celsius warmer ATL-Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) und 50 µl Proteinase K (20 mg/ml, Boehringer Mannheim, Mannheim Deutschland, jetzt: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) hinzugefügt. Anschließend erfolgte ein Vortexen und Inkubieren für drei Stunden bei 55 Grad Celsius. Als nächstes wurden nun 400 µl AL-Puffer (Quiagen, Hilden, Deutschland) hinzugegeben und für zehn Minuten bei 70 Grad Celsius inkubiert. Als nächstes wurden 420 µl Ethanol (100%) zugefügt und nochmals gevortext. Beim folgenden Schritt sollte nun die DNS aus dem verdauten Tumor- und Referenzgewebe gelöst werden. Dies erfolgte durch das Binden der DNS an eine Silikatgelmembran. Dazu wurde der Inhalt des Eppendorfcups auf eine QIAamp-Säule, die auf einem QIAamp-Auffangcup saß, überführt (beides Qiagen, Hilden, Deutschland). Durch eine anschließende Zentrifugation für drei Minuten bei 8000 U/min konnte die DNS, gebunden an der QIAamp-Säule, gewonnen werden. Das Filtrat wurde verworfen.

Die folgenden Waschschriffe dienen zum Entfernen des Ethanols von der QIAamp-Säule. Dazu wurden 500 µl AW-Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) auf die QIAamp-Säule gegeben und bei 8000 U/min für eine Minute zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und der Waschschriff wiederholt (Zentrifugation für drei Minuten bei 14000 U/min). Das Filtrat wurde erneut verworfen. Als nächster Schriff musste die DNS von der QIAamp-Säule gelöst werden. Dazu wurde die QIAamp-Säule auf einen neuen QIAamp-Auffangcup überführt und 200 µl Aqua bidest. hinzugegeben. Hiernach erfolgte eine Inkubation für drei Minuten bei Raumtemperatur und erneute Zentrifugation für eine Minute bei 8000 U/min. Die DNS lag nun als Eluat im QIAamp-Auffangcup vor. Sie wurde bei vier Grad Celsius gelagert.

3.3 DNS-Gelelektrophorese

Die DNS kann durch Auftragen auf ein Agarosegel, das in einem elektrischen Spannungsfeld liegt, hinsichtlich ihrer Basenpaarlänge differenziert werden.

Die gewonnenen DNS-Eluate stellen ein relativ heterogenes Gemisch an DNS-Bruchstücken unterschiedlichster Basenpaarlänge dar. Diese negativ geladenen DNS-Bruchstücke wandern in dem unter Spannung stehenden Agarosegel in Richtung Anode. Kleine DNS-Bruchstücke wandern hierbei im gleichen Zeitraum weiter Richtung Anode als größere DNS-Bruchstücke. Es kann durch simultanes Auftragen eines Markers mit bekannter Länge die Länge der DNS-Bruchstücke abgeschätzt werden. Um die DNS im Gel sichtbar zu machen, wird das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt. Ethidiumbromid interkaliert in die DNS und ermöglicht durch seine fluoreszierende Eigenschaft im UV-Licht die Darstellung der DNS.

In der mit Laufpuffer gefüllten Elektrophoresekammer wurden die Taschen eines mit Ethidiumbromid versetzten 1% Agarosegels mit dem Gemisch aus DNS-Eluat zu 5 µl und Ladungspuffer (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) zu 2 µl bestückt. Ein Gemisch aus Lambda-DNS zu 1,5 µl, Ladungspuffer zu 2 µl (beides MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) sowie 5 µl Aqua bidest. bildeten den Längenstandard. Die Auftrennung erfolgte für 45 Minuten bei einer Spannung von 80 Volt. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht mit einer Wellenlänge von 312 nm fotografiert.

Reagenz	Zusammensetzung	Hersteller
10 x TBE-Puffer	108 g Trishydroxymethylaminomethan 55 g Borsäure 40 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 ad 1000 ml Aqua bidest.	Merck, Darmstadt, Deutschland Merck, Darmstadt, Deutschland SERVA, Heidelberg, Deutschland
Laufpuffer	100 ml 1 x TBE	
Ladungspuffer (= Loadingbuffer)	Fertigreagenz	MBI Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland
1,5 % Agarosegel	0,75 g Agarose 50 ml 1 x TBE 7,5 µl Ethidiumbromid	FMC Bio Products, Rockland, USA SIGMA, St. Louis, USA
DNS-Längenmarker Lambda	Längenmarker mit 74-26282 bp	MBI Fermentas, St-Leon-Rot, Deutschland

Tabelle 3.3.1: Reagenzien für die DNS-Gelelektrophorese.

3.4 Photometerauswertung der DNS

Mit Hilfe der Photometrie ist eine Konzentrationsbestimmung fein verteilter oder gelöster Stoffe in einer Probe möglich. Dazu wird die Absorption bzw. Streuung (Extinktion) eines monochromatischen Lichtstrahles durch eine Probe gemessen. Die Wellenlänge des Lichtstrahles wird entsprechend dem Absorptionsmaximum des zu bestimmenden Stoffes gewählt. Die Absorption der Probe ist direkt proportional zum molaren Extinktionskoeffizienten (stoffspezifische Größe), der Schichtdicke der Probe und der Konzentration. Mit Hilfe des Gesetzes von Lambert-Beer kann somit die Konzentration des gelösten Stoffes in der Probe errechnet werden.

Doppelsträngige DNS hat ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm.

Durch Vergleich der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm und der Absorption bei 280 nm (Absorptionsmaximum für Proteine) kann durch den Quotienten eine Aussage über die Reinheit des DNS-Eluats gemacht werden. Ein Quotient von $1,8 - 1,9 \frac{^{260}}{^{280}}$ gilt hierbei als optimal.

Die Eichung des Photometers (Bio Photometer Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) erfolgte mit Aqua bidest. als Leerwert. Die DNS wurde verdünnt (5 µl DNS mit 95 µl Aqua bidest.) und dann bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm gemessen. Die Errechnung der DNS-Konzentration sowie des DNS/Protein-

Quotienten erfolgte automatisch durch das Photometer. Es wurden nur Proben untersucht, die eine Konzentration von mindestens 50 µg/ml DNS und einen Reinheits-Quotienten von 1,7 – 2,0 $^{260}/_{280}$ aufwiesen.

3.5 Metaphasen

Die Metaphasen wurden von humanen T-Lymphozyten weiblicher und männlicher Spender gewonnen. Die Lymphozyten wurden unter Zusatz von Phythämagglutinin, welches die Proliferation anregt, kultiviert. Das Spindelgift Colchizin stoppte die Mitose der Lymphozyten in der Metaphase. Durch eine hypotone Kaliumchlorid-Lösung wurden die Zellen zum Platzen gebracht und die Zellkerne freigelegt. Nach Aufreinigung und Fixierung der Chromosomen erfolgte das Austropfen auf Objektträgern.

Um sowohl weibliche Metaphasen als auch männliche Metaphasen zu gewinnen, wurde die folgende Metaphasenpräparation aus weiblichem und aus männlichem Spenderblut durchgeführt. 10 ml heparinisertes Vollblut wurde 10 Minuten bei 800 U/min zentrifugiert. Das oben stehende Serum wurde abgesaugt und der lymphozytenreiche Buffy-Coat in eine 50 ml Kulturflasche überführt. Nach Zugabe von 40 ml RPMI 1640 Nährmedium (PAA, Linz, Österreich) mit 10 ml fetalem Kälberserum (GIBCO® Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland) und 400 µl Phythämagglutinin (GIBCO® Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland) wurde vorsichtig geschwenkt und für 72 Stunden bei 37 Grad Celsius inkubiert. Durch Zugabe von 400 µl des Spindelgiftes Colchizin (Colcemid® GIBCO® 10µg/ml, Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland) wurde die Zellteilung gestoppt. Nach Aufschütteln des Zellrasens wurde der Inhalt auf zwei neue Kulturflaschen aufgeteilt. Diese inkubierten bei 37 Grad Celsius für 30 Minuten und wurden dann bei 1000 U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, und es wurden 35 ml einer 0,4% Kaliumchloridlösung (Merck; Darmstadt, Deutschland) zum Zellsediment hinzugegeben. Anschließend erfolgte ein sorgfältiges Durchmischen und eine Inkubation für 15 Minuten bei 37 Grad Celsius im Brutschrank. Durch die hypotone Kaliumchloridlösung wurden die Zellen lysiert, die Zellkerne freigelegt, die Chromosomen entwirrt und die Spreitung erleichtert. Anschließend erfolgte ein

erneutes Zentrifugieren für 10 Minuten bei 1000 U/min. Hiernach wurde der Überstand abpipettiert und tropfenweise 20 ml Fixierlösung (= Methanol-Eisessiglösung: 3 Teile 100% Methanol auf 1 Teil 100% Essigsäure, Merck, Darmstadt, Deutschland) unter regelmäßigem Schütteln hinzugegeben. Dann erfolgte eine Inkubation für 20 Minuten bei Raumtemperatur.

Die folgenden Schritte dienten zum Reinigen der Zellsuspension. Hierzu wurde zunächst bei 1000 U/min für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und das verbleibende Zellsediment in 20 ml Fixierlösung erneut resuspendiert. Dieser Schritt wurde zwei - dreimal wiederholt, um die Suspension zu reinigen und die Qualität der Spreitung zu verbessern. Anschließend erfolgte die Resuspension des Zellsedimentes in 4 ml Fixierlösung. Ein oder zwei Tropfen dieser Suspension wurden dann aus einigen Zentimetern Höhe auf einen staub- und fettfreien Objektträger ausgetropft. Die Objektträger wurden luftgetrocknet und anschließend in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (70% - 85% - 100%) dehydriert. Die Lagerung der dehydrierten Objektträger erfolgte in 100% Ethanol bei -20 Grad Celsius.

Lösung	Zusammensetzung	Hersteller
RPMI 1640 Nährmedium	Fertigreagenz	PAA, Linz, Österreich
Phythämagglutinin GIBCO®	Fertigreagenz	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
Fixierlösung	3 Teile Methanol 100% 1 Teil Essigsäure 100%	Merck, Darmstadt, Deutschland Merck, Darmstadt, Deutschland
Colcemid® GIBCO®	Konzentration 10 µg/ml	Invitrogen GmbH; Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid-Lösung 0,4%	100 ml H ₂ O, bidest. 0,4 g KCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fetales Kälberserum GIBCO®	Fertigreagenz	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 3.5.1: Reagenzien für die Metaphasenpräparation.

3.6 Pepsin-Verdau der Metaphasenpräparate

Durch die Inkubation der Metaphasenpräparate mit Pepsin wird die so genannte Permeabilisierung des Präparates erreicht. Die Wirkung des proteolytischen Pepsins besteht darin, dass DNS assoziierte Proteine entfernt werden. Die DNS der Metaphasenpräparate wird somit für die Sondenfragmente besser erreichbar, respektive das Metaphasenpräparat permeabel. Durch den Verdau freiliegender

Proteinen wird darüber hinaus das unspezifische Ablagern von Antikörper-Fluoreszenzkomplexen vermindert.

Im Wasserbad wurde eine Glasküvette mit 70 ml Aqua bidest. auf 37 Grad Celsius erwärmt. Dann wurden 20 µl Pepsin (100 mg/ml, SIGMA, St. Louis, USA) hinzugegeben und gut vermischt. Zur Aktivierung der Enzymtätigkeit erfolgte die Zugabe von 700 µl einer ein normalen HCl-Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) mit erneutem Vermischen. Die Metaphasenpräparate wurden nun für 7 min in der Glasküvette angedaut. Anschließend erfolgte ein Waschen der Metaphasenpräparate in 2xSSC (siehe Tabelle 3.6.1) und eine Dehydrierung in einer aufsteigender Ethanol-Reihe (70% - 85% - 100%) jeweils für fünf Minuten. Hiernach wurden die Objektträger an der Luft getrocknet.

Lösung	Zusammensetzung	Hersteller
Pepsin	Konzentration: 100 mg/ml	SIGMA, St.Louis, USA
ein normale HCl-Lösung	1 mol HCl/l	Merck, Darmstadt, Deutschland
20 x SSC	87,750 g NaCl 47,145 g Natriumcitratdihydrat ad 1000 ml Aqua bidest. pH 7,0	Merck, Darmstadt, Deutschland Merck, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 3.6.1: Reagenzien für den Pepsin-Verdau der Metaphasenpräparate.

3.7 Denaturierung der Metaphasenpräparate

Ziel der Denaturierung ist die Dissoziation der Doppelstrang-DNS in ihre Einzelstränge. Dazu müssen die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Strängen aufgespalten werden. Dies gelingt durch Erwärmen der Metaphasenpräparate unter Zugabe von Formamid. Durch Formamid, das die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen hemmt, kann die benötigte Temperatur zur Spaltung der DNS-Doppelstränge reduziert werden. Die zur Dissoziation der DNS-Doppelstränge benötigte Temperatur hängt unter anderem vom Anteil an Guanin-Cytosin Wasserstoffbrücken ab (stabilere Wasserstoffbrückenbindungen als zwischen Adenin und Thymin), von der Länge der DNS und dem evtl. Vorhandensein von Kationen (meist Na^+), die den Doppelstrang stabilisieren. Damit ein Wiederanlagern der Doppelstränge verhindert wird, erfolgt die

sofortige Fixierung der dissoziierten Metaphasen nach der Denaturierung in kalter Ethanol-Reihe.

Die bei –20 Grad Celsius in 100% Ethanol gelagerten Metaphasenpräparate wurden an der Luft getrocknet. Dann wurden sie bei 69 Grad Celsius für zwei Minuten in einer Glasküvette mit Denaturierungslösung (siehe Tabelle 3.7.1) behandelt. Anschließend folgte die sofortige Fixation bei –20 Grad in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (70% - 85% - 100%) jeweils für fünf Minuten. Im Anschluss wurden die Metaphasenpräparate erneut an der Luft getrocknet.

Lösung	Zusammensetzung	Hersteller
Denaturierungslösung	35 ml deionisiertes Formamid	Merck, Darmstadt, Deutschland
	5 ml 20 x SSC pH 7,0	
	5 ml 0,5 M Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
	5 ml Aqua bidest.	
	pH 7,0	

Tabelle 3.7.1: Reagenzien für die Denaturierung der Metaphasenpräparate.

3.8 Nicktranslation

Bei der Nicktranslation werden markierte Nukleotide in die DNS-Doppelhelix eingebaut. Die Markierung der Tumor DNS erfolgt mit Digoxigenin-11-dUTP, die Markierung der Referenz DNS mit Biotin-16-dUTP. An diese Nukleotide können fluoreszierende Farbstoffe binden, es wird somit möglich, die DNS sichtbar zu machen.

Der entscheidende Parameter ist die Aktivität der DNase I, durch die die Einzelstrangbrüche (Nicks) in die DNA eingefügt werden. An diesen Bruchstellen beginnt nun die zugegebene DNS-Polymerase mit der Elongation des DNS-Stranges. Dabei verwendet sie markierte (Digoxigenin-11-dUTP, Biotin-16-dUTP) sowie unmarkierte Nukleotide. Es entstehen so Sondenfragmente. Enthält die DNS zu wenige Nicks, dann sind die Sondenfragmente zu lang und nicht ausreichend markiert. Ein Zuviel an Nicks führt zu kurzen Sondenlängen, die später nicht stringent an die Zielsequenz paaren. Die Sondenfragmente sollten eine Länge von 200-1000 Basenpaaren haben. Die Überprüfung erfolgt durch eine Gelelektrophorese.

Das Pipettieren für die Nicktranslation erfolgte auf Eis in Eppendorfcups. Der Ansatz wurde nach seiner Zusammenstellung kurz in der gekühlten Zentrifuge kollektiert und dann für 85 Minuten bei 15 Grad Celsius inkubiert. Die Länge der DNS-Fragmente wurde mit einem 1,5% Agarosegel und entsprechenden Längenmarker (pUC 19 DNS, Länge 26, 501 bp MBI Fermentas, St-Leon-Rot, Deutschland) überprüft. Die Enzymreaktion von DNase I und Polymerase I wurde in der Zwischenzeit durch Einfrieren (-20 Grad Celsius) des Ansatzes unterbrochen. Zeigte sich im Gelfoto eine ausreichende Länge der Sondenfragmente, so wurde die Enzymreaktion durch EDTA gestoppt. Waren die Sondenfragmente zu lang, so wurde der Ansatz für 10-20 Minuten nachinkubiert und nach erneutem Gelfoto mit EDTA gestoppt.

Menge	Reagenz	Zusammensetzung	Hersteller
3,0 µg	DNS	Tumor- bzw. Referenz-DNS	
10 µl	10x Puffer	500 mM Tris-HCl pH 7,5 100 mM MgCl ₂ 10 mM DTT	MBI Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland
2,0 µl	dNTP	1 mM dATP, dCTP, dGTP	Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
1,0 µl	dTTP	1 mM dTTP	Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
1,0 µl	Digoxigenin-11-UTP, bzw. Biotin-16-dUTP	1 mM Digoxigenin-11-UTP, bzw. Biotin-16-dUTP	Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland. Jetzt: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
1,5 µl	DNS-Polymerase I	DNS-Polymerase I 10U/µl	MBI Fermentas, St-Leon-Rot, Deutschland
1,5 µl	DNase I 1:250 verdünnt	498 µl 1 M Tris-HCl pH 7,5 2 µl DNase I Stock (DNase I Stock: 1 mg DNase I Lyophilisat (9000 U) in 50% Glycerin, 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM MgCl ₂)	Merck, Darmstadt, Deutschland Boehringer Mannheim, Mannheim Deutschland. Jetzt: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland Merck, Darmstadt, Deutschland Merck, Darmstadt, Deutschland
ad 100 µl	Aqua bidest.		
Nach Inkubation: 5 µl	EDTA	0,5 M, pH 8,0	SERVA, Heidelberg, Deutschland

Tabelle 3.8.1: Zusammensetzung des Ansatzes für die Nicktranslation.

3.9 Sondenansatz

Der Sondenansatz setzt sich aus Biotin-16-dUTP markierter Tumor-DNS, Digoxigenin-11-UTP markierter Referenz-DNS sowie humaner COT-1-DNS zusammen. Die COT-1-DNS soll durch das Binden an so genannten unspezifischen Sequenzen auf den Chromosomen die dortige Hybridisierung der Referenz- und Tumor-DNS verhindern.

Aus diesem Ansatz wurde nach Zugabe von Natriumacetat und Ethanol ein DNS-Pellet ausgefällt.

Bei dem Pipettieren des Sondenansatzes wurde gleichgeschlechtliche Referenz- und Tumor-DNS verwendet. Der Ansatz wurde kurz gevortext und dann bei -20 Grad Celsius über Nacht, alternativ bei -80 Grad Celsius für 30 Minuten, inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation für 20 Minuten bei 14000 U/min in der gekühlten Zentrifuge wurde der Alkoholüberstand vorsichtig abpipettiert. Zu dem sich am Boden abgesetzte DNS-Pellet wurden 700 μ l, 70% Ethanol hinzugegeben und bei 45 Grad Celsius bis zu 30 Minuten gewaschen. Hiernach erfolgten eine erneute Zentrifugation und das Abpipettieren des Ethanol-Überstandes. Das verbliebene DNS-Pellet wurde dann an der Luft getrocknet.

Menge	Reagenz	Hersteller
66 μ l	markierte Tumor-DNS	
66 μ l	markierte Referenz-DNS	
80 μ l	COT-1-DNS (1 μ g/ μ l)	Boehringer Mannheim, Mannheim Deutschland. Jetzt: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
10 μ l	Na-Acetat 3 M, pH 4,8	Merck, Darmstadt, Deutschland
530 μ l	Ethanol 100%, -20 Grad	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 3.9.1: Zusammensetzung des Sondenansatzes.

3.10 Denaturierung und Hybridisierung des Sondenansatzes

Um eine Hybridisierung des Sondenansatzes an die bereits denaturierten Metaphasenchromosomen zu ermöglichen, muss dieser ebenfalls denaturiert werden. Dies erfolgt analog der Metaphasendenaturierung mit deionisiertem Formamid. Es wird so einzelsträngige Sonden-DNS erzeugt.

Bei der Hybridisierung erfolgt die Anlagerung der einzelsträngigen Sonden-DNS an die komplementären Zielsequenzen auf den Chromosomen. Die Stringenz (= Prozentsatz der korrekt gepaarten Basenpaare) dieser Bindung hängt von einer Vielzahl von Faktoren ab, unter anderem der Temperatur, der Ionenstärke und der Konzentration helixdestabilisierender Faktoren (Formalin). Die Hybridisierung wird durch einen Hybridisierungspuffer erleichtert. Diese Lösung enthält als essentiellen Bestandteil Dextransulfat, das die Geschwindigkeit der Hybridisierung erhöht.

Um eine bessere Denaturierung des Sondenansatzes zu ermöglichen, wurde das an der Luft getrocknete DNS-Pellet zunächst in 6 µl Hybridisierungspuffer (siehe Tabelle 3.10.1) bei 37 Grad Celsius auf dem Thermomixer resuspendiert. Nach Zugabe von 6 µl deionisiertem Formamid (Merck, Darmstadt, Deutschland) erfolgte dann die Denaturierung bei 76 Grad Celsius für sieben Minuten. Hieran schloss sich ein 15 Minuten dauerndes Vorhybridisieren bei 37 Grad Celsius des Sondenansatzes an. Nun wurden 12 µl des Sondenansatzes auf die denaturierten und dehydrierten Metaphasenpräparate pipettiert und luftblasenfrei mit einem 18x18 mm großen Deckglas eingedeckelt und mit Fixogum (Marabu GmbH & Co. KG, Tamm, Deutschland) verschlossen. Die Hybridisierung erfolgte 72 Stunden bei 37 Grad Celsius in einer feuchten Kammer (HYBrite™, VYSIS, Stuttgart-Fasanenhof, Deutschland).

Lösung	Zusammensetzung	Hersteller
Hybridisierungspuffer	20 % Dextransulfat 4 x SSC	Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
deionisiertes Formamid	deionisiertes Formamid	Merck, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 3.10.1: Reagenzien für die Denaturierung und Hybridisierung des Sondenansatzes.

3.11 Detektion der Hybridisierung

Nach der Hybridisierung des Sondenansatzes folgen stringente Waschschriffe, um schlecht oder nicht gebundene Sonden zu entfernen. Anschließend werden die korrekt gebundenen Sonden visualisiert. Dies geschieht durch fluoreszierende Antikörper: Fluoreszein-Avidin bindet hierbei an mit Biotin markierter Tumor-DNS und anti-Digoxigenin-Rhodamin bindet an mit Digoxigenin markierter Referenz-DNS. Die

Antikörper emittieren nach Anregung mit Licht der entsprechenden Wellenlänge die für sie typische Fluoreszenz. Die Intensität der Fluoreszenz ist hierbei proportional zur gebundenen Antikörpermenge.

Die gesamten Waschschritte fanden bei 42 Grad Celsius in, im Wasserbad erwärmten, Glasküvetten statt. Die hybridisierten Metaphasenpräparate wurden zunächst für 2 Minuten in Lösung B (siehe Tabelle 3.11.1) gegeben. Dies erfolgte, um das Fixogum aufzuweichen. Nun wurde das Fixogum vorsichtig vom Objektträger entfernt. Dabei wurde darauf geachtet, dass es zu keiner mechanischen Irritation der Metaphasen unter dem Deckgläschen kommt. Das Deckgläschen wurde ebenfalls entfernt.

Es folgte nun dreimaliges Waschen der Objektträger in Lösung A (siehe Tabelle 3.11.1) und hieran anschließend ebenfalls dreimaliges Waschen in Lösung B.

Nun wurden die Objektträger mit 300 µl Blockinglösung beschichtet (siehe Tabelle 3.11.1) und mit 24 x 60 mm Deckgläschen eingedeckelt. Hierdurch sollte später ein unspezifisches Binden der Antikörper verhindert werden. Anschließend wurden die Objektträger für 30 Minuten bei 37 Grad Celsius in einer feuchten Kammer inkubiert.

Zur Herstellung der Detektionslösung wurden in 1000 µl einer SSC/BSA/Tween-Lösung (siehe Tabelle 3.11.1), 15 µl anti-Digoxigenin-Rhodamin (0,2 mg/ml Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) und 5 µl Fluoreszein-Avidin (1 mg/ml VECTOR, Burlingame, USA) für 10 Minuten bei 37 Grad Celsius abgedunkelt inkubiert. Anschließend wurde bei 8000 U/min für drei Minuten zentrifugiert. Fehlgebildete Antikörper-Antikörper Komplexe setzten sich so am Boden ab. Nun wurde ein Überstand von 800 µl vorsichtig abpipettiert und in ein Licht geschütztes neues Eppendorfcup überführt. Dies war die im Folgenden verwendete Detektionslösung.

Die Objektträger wurden kurz mit Lösung C (siehe Tabelle 3.11.1) überspült und dann mit jeweils 300 µl der Detektionslösung beschichtet, eingedeckelt mit 24 x 60 mm Deckgläschen und bei 37 Grad Celsius für 45 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert.

Nach Entfernung des Deckgläschens wurden nicht gebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen in Lösung C entfernt. Nun erfolgte die Beschichtung des Objektträgers mit 20 µl DAPI-Lösung (siehe Tabelle 3.11.1) und Eindeckeln mit 24 x 60 mm Deckgläschen. Das jetzt fertige Präparat wurde abgedunkelt bei vier Grad Celsius bis zur Bildaufnahme gelagert.

Lösung	Zusammensetzung	Hersteller
Waschlösung A	70% nicht deionisiertes Formamid 2 x SSC	Merck, Darmstadt, Deutschland
Waschlösung B	2 x SSC 0,1% TWEEN 20	SIGMA, St. Louis, USA
Waschlösung C	4 x SSC 0,1% TWEEN 20	SIGMA, St. Louis, USA
Blockinglösung	4 x SSC 3% BSA 0,1% TWEEN 20	SIGMA, St. Louis, USA SIGMA, St. Louis, USA
Detektionslösung	4 x SSC 1% BSA 0,1% TWEEN 15 µl anti-Digoxigenin-Rhodamin (0,2 mg/ml) 5 µl Fluoreszein-Avidin (1 mg/ml)	SIGMA, St. Louis, USA SIGMA, St. Louis, USA Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland VECTOR, Burlingame, USA
DAPI-Lösung	50% 4',6'-Diamino-2-phenylindol 50% Vectorshield	VECTOR, Burlingame, USA Linaris GmbH, Wertheim Deutschland

Tabelle 3.11.1: Reagenzien für die Detektion der Hybridisierung.

3.12 Bildaufnahme

Die Bildaufnahme erfolgte mit einem Auflichtfluoreszenz-Mikroskop (Axiovert 25, Zeiss; Jena, Deutschland) und einer aufgesetzten CCD-Kamera (= Charge coupled device) (Photometrics SENSYS, München, Deutschland) bei 820-facher Vergrößerung. Durch Anregungsfilter im Mikroskop wird die für das jeweilige Fluorochrom benötigte Wellenlänge erzeugt. Dies sind 495 nm für die Anregung von FITC, 575 nm für die Anregung von Rhodamin und 355 nm für die Anregung von DAPI. Die emittierte Fluoreszenz wird für jede Anregung bei einer bestimmten Wellenlänge gemessen, diese liegt bei 535 nm für FITC, bei 615 nm für TRITC und bei 450 nm für DAPI. Die emittierte Fluoreszenz wird dann in Form von drei Fotos (DAPI-, FITC- und TRITC-Bild) festgehalten und auf dem angeschlossenen Rechner gespeichert. Durch Kombination des FITC- und des TRITC-Bildes wurde von der Software des CGH-Analyseprogrammes (Quips Karyotyping/CGH, VYSIS, Woodcreek Drive, USA) ein viertes Bild, das so genannte Ratio-Bild, generiert.

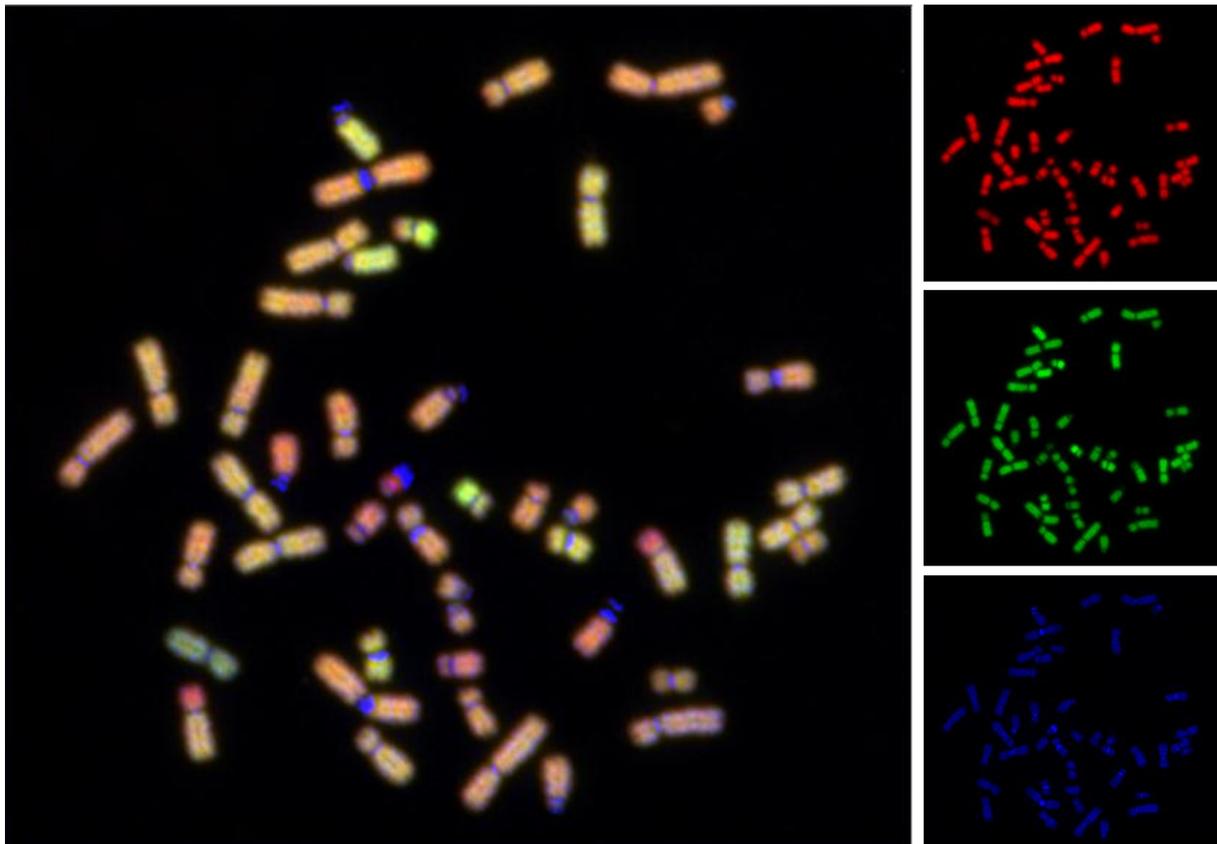


Abbildung 3.12.1: Links: Das Rechner-generierte Ratio-Bild. Rechts (von oben nach unten): TRITC-, FITC- sowie DAPI-Bild.

3.13 Auswertung

Die Auswertung der Metaphasenfotos erfolgte mit einem CGH-Analyseprogramm (Quips Karyotyping/CGH, VYSIS; Woodcreek Drive, USA). Hierzu wurde zunächst das in Graustufen konvertierte DAPI-Bild, in dem sich die für jedes Chromosom charakteristische Bänderung zeigt, einer Metaphase bearbeitet. Ausschließlich sich nicht überlagernde Chromosomen wurden mit Hilfe des Software-Tools „Schere“ aus dem Dapi-Bild geschnitten. So wurde jedes Chromosom einer einzelnen Bearbeitung und Typisierung zugänglich. Anschließend wurden die Paarigen Chromosom anhand der Chromosomen Nomenklatur (Mitelmann 1995) identifiziert und ein entsprechender Chromosomensatz gelegt (siehe Abbildung 3.13.1).

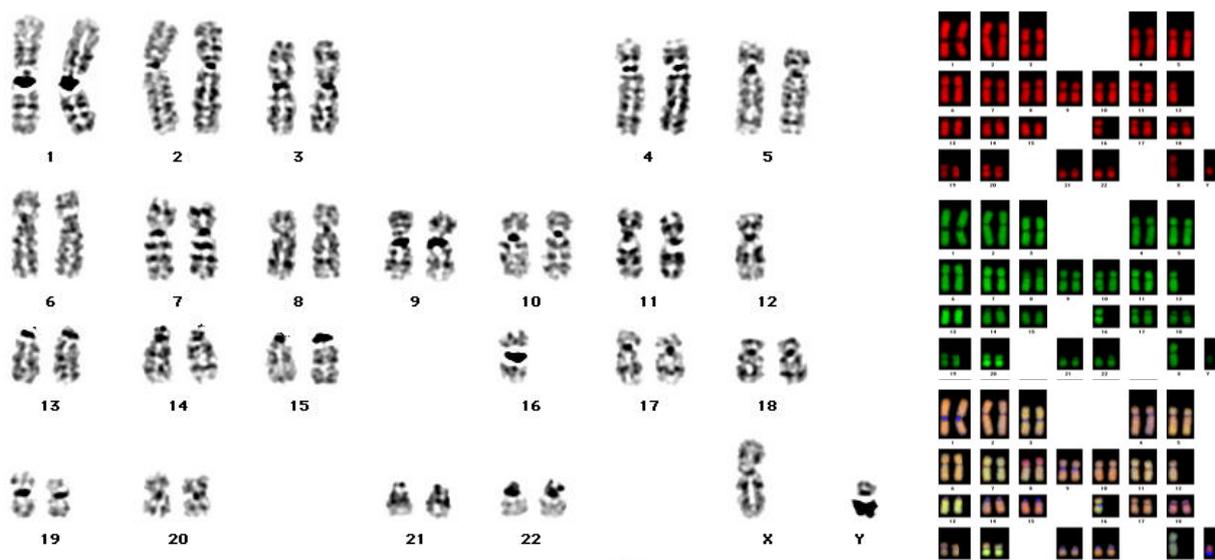


Abbildung 3.13.1: Links: Die invertierte Dapi-Färbung des geordneten und bearbeiteten Chromosomensatzes. Ein Chromosom 12 sowie ein Chromosom 16 sind aus der Auswertung genommen worden. Rechts klein (von oben nach unten): FITC-, TRITC sowie Ratio-Bild des Chromosomensatzes.

In weiteren Arbeitsschritten wurden die Chromosomen bearbeitet. Hierzu wurden mit Hilfe des CGH-Analyseprogrammes die Chromosomen ausgerichtet. Mit Hilfe des Software-Tools „Achse“ wurde die Längsachse in jedem Chromosom überprüft und gegebenenfalls korrigiert. Es wurde dann, durch Auswertung des FITC-, TRITC- sowie Dapi-Bildes, jedes Chromosom bezüglich unspezifisch angelagerter Fluorochrome, Deformierungen oder Verschmutzungen beurteilt. Beeinträchtigte

Chromosomen wurden aus dem Analyseprogramm genommen. Diese Bearbeitungsschritte wurden rechnergesteuert automatisch auf jedes der vier Bilder (DAPI-, FITC-, TRITC- und Ratio-Bild) übertragen. Abschließend lag ein kompletter Chromosomensatz (44 Autosomen, 2 Gonosomen, abzüglich der evtl. aus der Analyse entfernten Chromosomen) für die Bildung der Ideogramme zur Verfügung. Es wurden auf diese Weise für jeden untersuchten Tumor 10-15 Metaphasen für die Bildung der Ideogramme bearbeitet.

Anhand des Ratio-Bildes eines jeden Chromosoms wurde rechnergesteuert für jedes Chromosom ein Ideogramm entworfen (siehe auch Abbildung 3.13.2). Am Chromosomenideogramm stellt die schwarze Linie ein Tumor- zu Referenz-DNS, bzw. ein FITC- zu TRITC-Verhältnis von 1:1 dar. D. h. ein Ratiowert von 1 bedeutet, dass gleich viel Tumor- wie Referenz-DNS an dem Chromosomen gebunden haben. Ratio-Verhältnisse < 1 beschreiben ein vermehrtes Vorliegen von Referenz-DNS, respektive Ratio-Verhältnisse von > 1 ein vermehrtes Vorliegen von Tumor-DNS. Für jedes Chromosom wurde ein Summen-Ideogramm aus mindestens 10 Einzel-Ideogrammen erstellt (siehe auch Abbildungen 3.13.2/3).

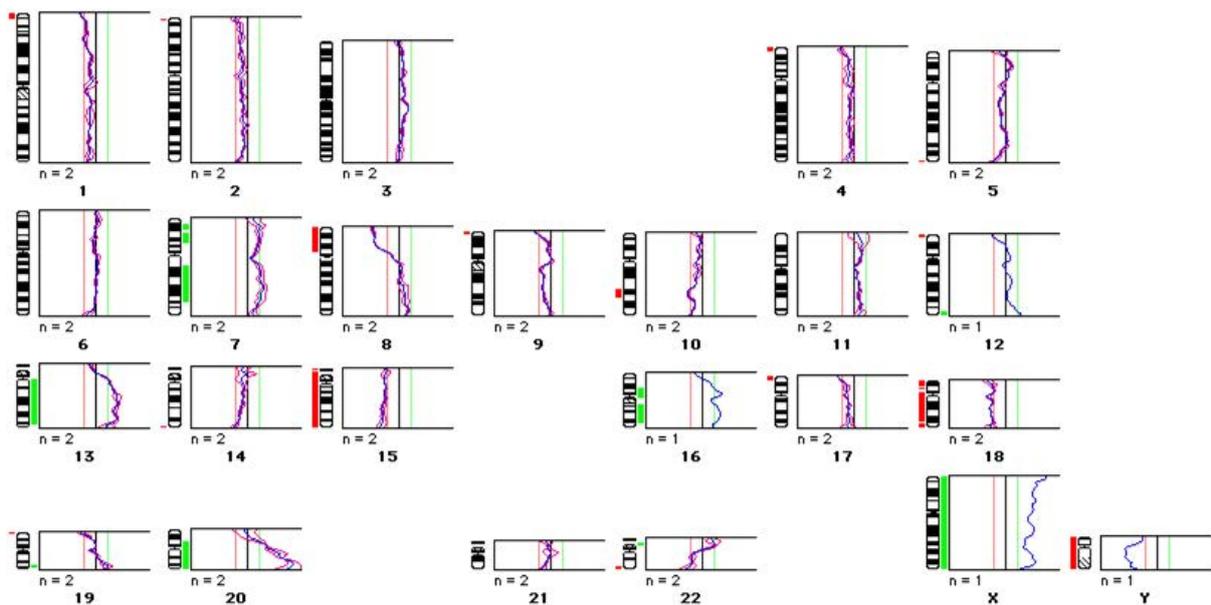


Abbildung 3.13.2: Das Einzelideogramm des oben gezeigten Chromosomensatzes.

Anhand des 95% Konfidenzintervalls des Summen-Ideogramms wurden Ratio-Verhältnisse, die $\geq 1,2$, bzw. $\leq 0,8$ waren, als DNS-Gewinne bzw. Verluste

interpretiert. Wurde ein Ratio-Verhältnis von $\geq 2,0$ erreicht, so wurde dies in der Auswertung als High-Level-Amplifikation gewertet. Gewinne, Verluste sowie High-Level-Amplifikationen wurden anhand der Nomenklatur für Chromosomen den entsprechenden Banden zugeordnet. Hierzu wurde jeweils das Summenideogramm mit sorgfältig ausgesuchten Einzelideogrammen verglichen und anhand der Ratio-Bilder die endgültige Bandenbeschreibung vorgenommen. Die definitive Bandenbeschreibung erfolgte vom Verfasser der Arbeit und Herrn Prof. Dr. med. B. M. Ghadimi gemeinsam. Die kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen (13, 14, 15) wurden aus der Auswertung genommen.

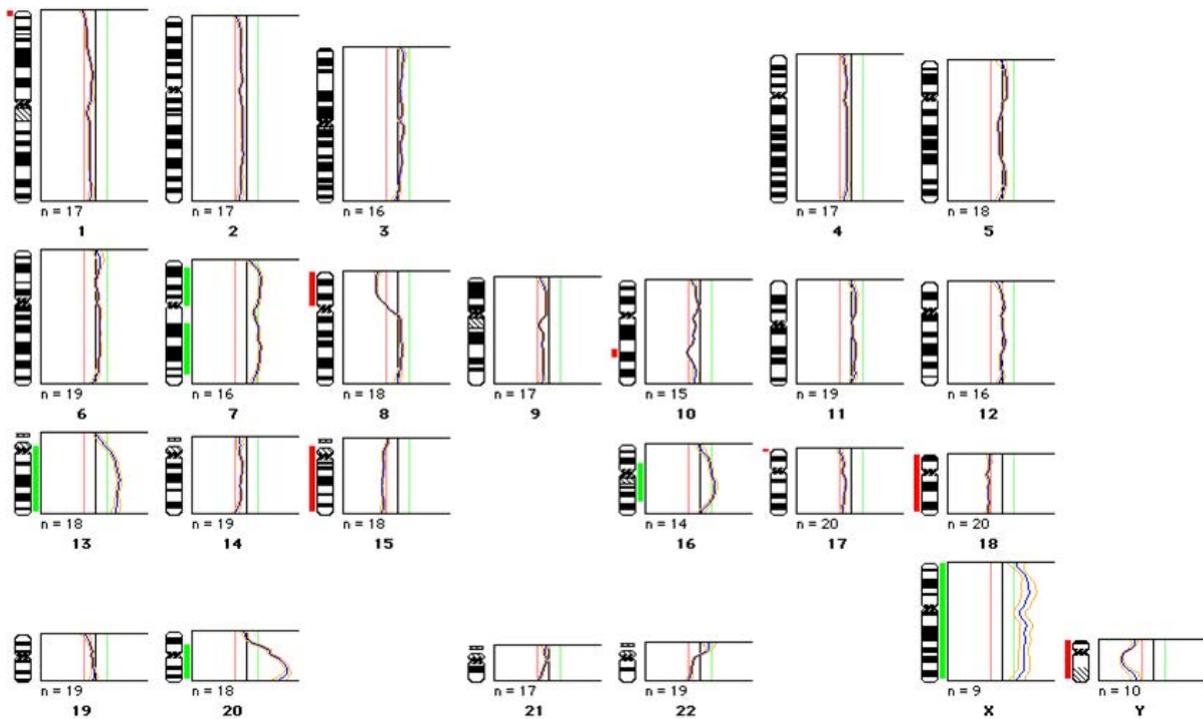


Abbildung 3.13.3: Das Summenideogramm von 10 Metaphasen. Überschreitungen des 95% Konfidenzintervalls über das Ratio-Verhältnis von 1,2 sind mit grünen Balken am Chromosom visualisiert. Rote Balken visualisieren ein Ratio-Verhältnis von kleiner 0,8.

4. Ergebnisse

4.1 Klinische Daten

Die Fragestellung dieser Arbeit war, inwieweit ein chromosomales Profil bei M1-Tumoren im Vergleich zu M0-Tumoren detektierbar ist, das als prognostischer Marker für aggressives Metastasierungsverhalten gesehen werden kann. Hierzu wurden zwei Kollektive (jeweils N=18) kolorektaler Karzinome mit der CGH auf chromosomale Unterschiede gescannt und verglichen.

Da hämatogene Metastasierung nicht direkt mit der lokalen Tumorgöße und dem Lymphknotenstatus korrelierbar ist (siehe Tabelle 4.1.1: Klinische Daten) wurde kein Wert auf eine homogene Strukturierung der Kollektive gelegt. D. h. es wurden in beiden Kollektiven T2-T4 sowie N0-N2 Tumore untersucht, postulierend, dass wenn es eine spezifische chromosomale Aberration – prädikativ für hämatogene Metastasierung – gibt, diese ebenso bei T2-, N0- Tumoren wie auch bei T4-, N2- Tumoren detektierbar sein muss. Da in vorangegangenen CGH-Studien allerdings eine Zunahme an genetischen Aberrationen mit der Tumordinfiltrationstiefe beschrieben worden ist (Fearon und Vogelstein 1990, Ried et al. 1996, Ghadimi et al. 2003) wurde darauf geachtet, dass die beiden Kollektive sich in der histopathologischen Zusammensetzung (T-, N-, G-Status) gleichen (siehe Tabelle 4.1.1: Klinische Daten).

Kollektiv M0	Alter	Geschlecht	Histopathologie	UICC-Stadium	Grading	Lokalisation
28	63	W	pT2 pN0 (0/23) cM0	I	2	Rechtes Kolon
27	54	M	pT3 pN0 (0/25) cM0	II	2	Zökum
21	60	W	pT3 pN0 (0/22) cM0	II	2	Rektum
20	53	M	pT3 pN0 (0/14) cM0	II	2	Sigma/Kolon
19	67	M	pT3 pN0 (0/26) cM0	II	2	Sigma
23	73	M	pT2 pN1 (2/16) cM0	III	2	Sigma
25	81	M	pT2 pN1 (1/21) cM0	III	2	Rektum/Sigma
31	52	M	pT3 pN1 (1/33) cM0	III		Rechtes Kolon
35	73	M	pT3 pN1 (1/32) cM0	III	2	Zökum
32	54	M	pT3 pN2 (19/21) cM0	III	2	Rektum
24	71	M	pT3 pN2 (21/55) cM0	III	2	Rechtes Kolon
30	60	M	pT3 pN2 (6/13) cM0	III	2	Rektum

29	66	W	pT3 pN2 (5/21) cM0	III	2	Rechtes Kolon
34	68	W	pT3 pN2 (14/15) cM0	III	2	Rektum
33	65	W	pT3 pN2 (12/12) cM0	III	2	Rechtes Kolon
26	71	M	pT4 pN2(9/19) cM0	III	2	Zökum/Kolon
36	65	M	pT4 pN2 (4/22) cM0	III	2	Rektum
22	69	W	pT4 pN2 (9/21) cM0	III	2	Zökum

Kollektiv M1	Alter	Geschlecht	Histopathologie	UICC-Stadium	Grading	Lokalisation
18	63	M	pT2 pN0 (0/25) pM1	IV	2	Rektum/Kolon
7	67	F	pT3 pN0 (0/19) pM1	IV	2	Kolon
2	65	M	pT3 pN0 (0/10) pM1	IV	2	Kolon
5	66	M	pT3 pN0 (0/17) pM1	IV	2	Rektum/Sigma
16	60	M	pT3 pN0 (0/17) pM1	IV	2	Rektum
15	68	M	pT2 pN1 (1/20) pM1	IV	2	Rektum
8	49	F	pT2 pN2 (5/21) pM1	IV	2	Rektum
13	65	M	pT3 pN1 (3/19) pM1	IV	2	Rektum
12	53	M	pT3 pN1 (3/21) pM1	IV	2	Rektum
6	78	M	pT3 pN2 (16/27) pM1	IV	2	Rektum/Sigma
11	78	F	pT3 pN2 (20/24) pM1	IV	2	Quercolon
3	61	F	pT3 pN2 (22/40) pM1	IV	2	Rechtes Kolon
14	64	M	pT3 pN2 (6/17) pM1	IV	2	Rektum
10	78	F	pT3 pN2 (4/30) pM1	IV	2	Rechtes Kolon
17	60	M	pT3 pN2 (18/21) pM1	IV	2	Rektum
9	75	F	pT4 pN2 (21/26) pM1	IV	2	Rektum
1	49	F	pT4 pN2 (29/30) pM1	IV	2	Sigma
4	50	M	pT4 pN2 (9/23) pM1	IV	2	Sigma

Tabelle 4.1.1: Klinische Daten.

4.2 Einzelne Betrachtungen der beiden Kollektive

Die chromosomalen Aberrationen wurden für jeden Fall in Form der gängigen chromosomalen Bandenbeschreibung festgehalten (siehe Tabelle 4.2.1.1: Chromosomen-/Sequenzveränderungen im Kollektiv M0, und Tabelle 4.2.2.1: Chromosomen-/Sequenzveränderungen im Kollektiv M1) (Mittelmann 1995).

Für beide Kollektive wurden die so genannten ANCA-Werte (average number of copy alterations) berechnet. Der ANCA-Wert gibt die durchschnittliche Anzahl an chromosomalen Veränderungen eines Kollektivs wieder. Hierzu wird die Summe aus den chromosomalen Veränderungen (Gewinne und Verluste) aller Einzelfälle durch die Anzahl aller Fälle geteilt. Eine Aufteilung des ANCA-Wertes eines Kollektivs in ANCA-Gains (= durchschnittliche Anzahl an gewonnenen chromosomalen Veränderungen) und ANCA-Losses (= durchschnittliche Anzahl an verlorenen chromosomalen Veränderungen) ist möglich.

Die Darstellung der chromosomalen Aberrationen erfolgte in Form eines Summenkaryogrammes für jedes Kollektiv. Hierbei wird an den Ideogrammen von jedem Chromosom der Bereich mit einem Strich markiert, der bei den einzelnen Fällen verloren (Markierung links des Chromosoms) oder gewonnen ist (Markierung rechts des Chromosoms). Zudem zeigen die kräftigen Linien so genannte Amplifikationen an, also deutlich erhöhte Kopiezahlen einer chromosomalen Region. Anhand der Ziffer über der Markierung ist eine eindeutige Fallzuordnung möglich (siehe Abbildung 4.2.1.2: Summenideogramm des Kollektivs M0 und Abbildung 4.2.2.2: Summenideogramm des Kollektivs M1).

4.2.1 Ergebnisse: Kollektiv M0

Das Kollektiv der nicht hepatisch metastasierten kolorektalen Karzinome zeigte einen ANCA-Wert von 10, der sich aus durchschnittlich 5 Verlusten und 5 Gewinnen pro Fall errechnete. Die häufigsten chromosomalen Gewinne waren 7 (45%), 8q (50%), 13 (61%), 20 (83%) und X (50%). Verluste an chromosomalem Material betrafen die Chromosomen 8p (33%), 14 (39%), 15 (33%), 17p (33%), 18q (72%) und Y (39%). Amplifikationen waren nur am Chromosom 20 zu detektieren. Die Tabelle 4.2.1.1 und

die Abbildung des Summenideogramms 4.2.1.2 geben eine Übersicht über alle Aberrationen.

Kollektiv M0		
Fallnr.	Chromosomen-/Sequenzgewinne	Chromosomen-/Sequenzverluste
28	20q	14, 17p, 18q, 19, 20p, 21
27	7, 12q12, 12p, 13, 20	Keine
21	13, 20, X	2q21-q31, 18
20	X	Keine
19	2q11-q33, 2p, 13, 20q	14, 17p, 18q21-qter, X, Y
23	7, 13q, 16p11.1-p12, 16q11.1-q23, 20p11.1-p11.2, 20q11.1-qter, X	8p, 10q22-q23, 15q, 18, Y
25	1p32-pter, 7, 8q11.2-qter, 9p, 13q, 19, 20, ampl 20q	4q24-qter, 5p, 5q11-q23, 8p12-pter, 14q, 16q, 17p, 18q
31	17q, 19, X	3p, 9p, 14, 15, 17p, 18, 22
35	1q, 7, 8q23-qter, 12q23-qter, 19, 20, X	4, 5
30	3q, 7, 8q, 13, 20q, X	1p, 4p, 8p, 10, 15q11-q22, 16p, 17p, 18, Y
29	7, X	19, 21, Y
33	7, 8q, 13, 16, ampl 20q	3p, 8p, 9, 18, 19p, 22, X
32	8q, 11p, 17, 20q, ampl 20q	8p, 14, 18, Y
34	1p31-p32, 8q22-q23, 10p12-pter, 13, 14q11.1-q12, 20q11.1-12, Xp	16p, 18q21-qter, 22, Xq
24	8q22-qter, 14, 19, 20, 22, X	4, 21, Y
26	7, 8q, 13, 16, 17q, 19, 20p11.1-12, 20q, 22, X, ampl 20q	1p11-p31, 1q11-qter, 4, 5, 8p, 10, 14, 15, 18, 21, Y
36	1q, 13, 20	1p, 4q27-qter, 12, 14, 15, 17q11-q22, 18
22	2q, 4q11-q28, 7p, 8q, 9p, 11, 13, 20q,	5, 10q, 15, 17, 18, 22

Tabelle 4.2.1.1: Chromosomen-/Sequenzveränderungen im Kollektiv M0.

Kollektiv M0, n=18

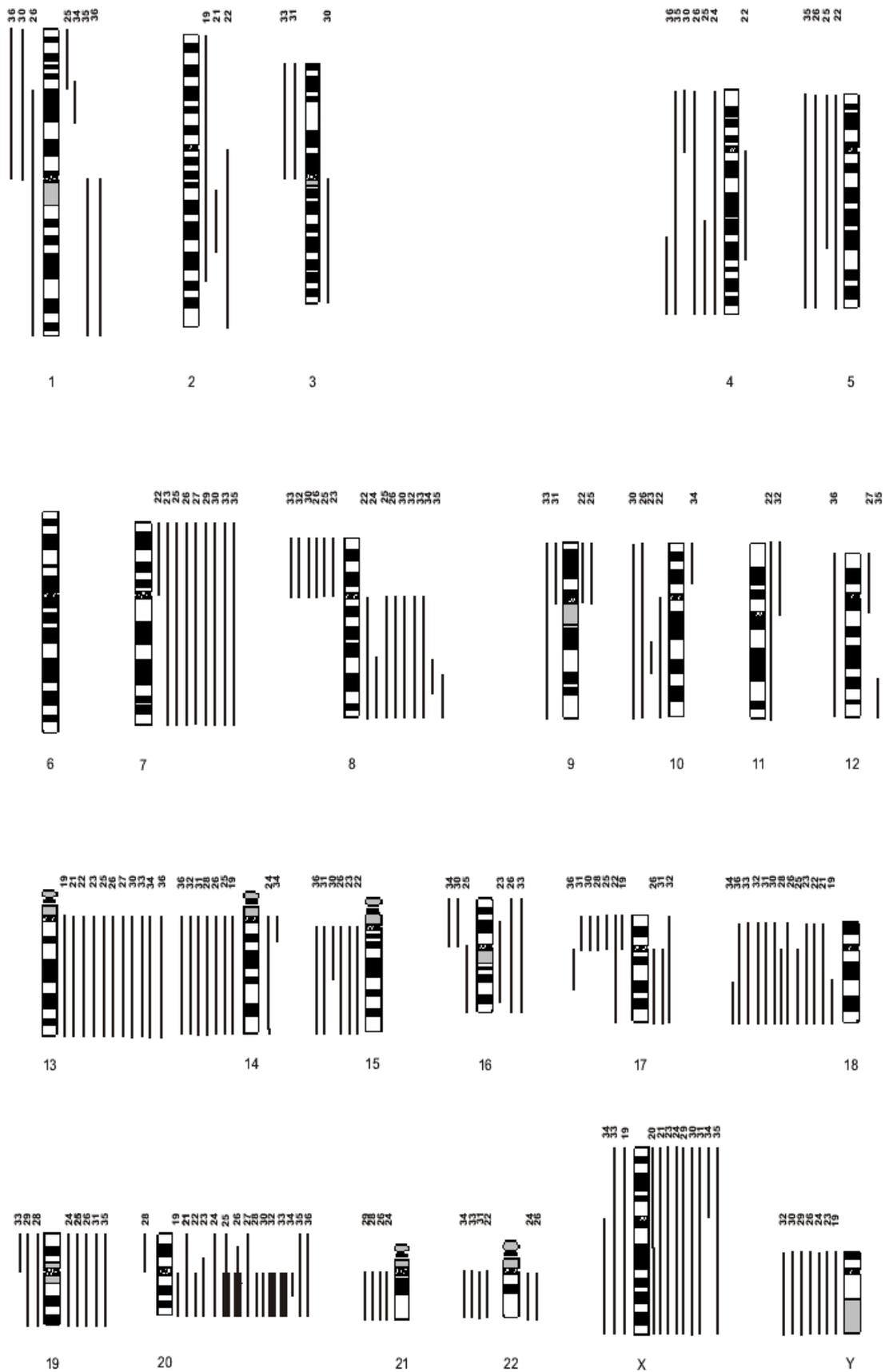


Abbildung 4.2.1.2: Summenideogramm des Kollektivs M0.

4.2.2 Ergebnisse: Kollektiv M1

Das Kollektiv der hepatisch metastasierten kolorektalen Karzinome zeigte einen ANCA-Wert von 13,8, der sich aus durchschnittlich 8 Verlusten und 5,8 Gewinnen pro Fall ergibt. Die häufigsten chromosomalen Gewinne waren 7 (39%), 8q (56%), 13 (72%) und 20 (83%). Verluste an chromosomalen Material betrafen die Chromosomen 1p (61%), 4q (33%), 8p (67%), 9q (39%), 15 (39%), 16p (44%), 17p (67%), 17q (44%), 18q (67%), 19 (50%), 20p (33%), 22 (50%) und Y (33%). Amplifikationen waren an der Chromosomenbande 5p13 sowie an den Chromosomenarmen 7p und 20q zu detektieren. Die Tabelle 4.2.2.1 und die Abbildung des Summenideogramms 4.2.2.2 geben eine Übersicht aller Aberrationen.

Kollektiv M1		
Fallnr.	Chromosomen-/Sequenzgewinne	Chromosomen-/Sequenzverluste
18	8q, 20q	1p32-pter, 8p, 18, 20p, Y
7	4q, 5q11-q22, 7, 12p, 13q21-q31	1p32-pter, 9q34, 16p, 17, 19, 20q, 22
2	2q22-q32, 4q, 4p11-p15, 5p, 5q11-q23, 6q11-q22, 9p, 13q14-qter, 20q, Y	1p32-pter, 8p, 9q31-qter, 11q12, 12q241-243, 14, 15q11-q23, 16p, 17, 18q, 19, 20p, 22
5	7, 8q, 13, 20q	8p, 15q11.1-q15, 17p, 18, 20p
16	7, 13, 19, 20p11.1-11.2, 20q, X	4, 8p, 14, 18, 21
15	6p22-pter, 13, 20q	4, 11q, 8p, 18, 20p
8	2q22-34, 3p12, 3q11-21.3, 4q, 5p, 5q11-23, 6q11-23, 7p, 9p, 10q11-22, 11p, 13, 20p	1p32-pter, 8p, 9q32-qter, 10p, 12q22-qter, 15, 16p, 17, 18p, 19, 22
13	7, 13, 20, ampl 7p	3, 4, 5q11-23, 5p, 14, 15, 17p, 18, 21, 22, Y,
12	1p32-pter, 7, 8q, 13, 20q	4, 8p12-pter, 10p, 14, 15q22-qter, 17p, 18q, 20p, Y
6	8q13-qter, 9q33-qter, 12p, 12q10-q14, 13, 20p11.2, 20q, X, ampl 20q	1p, 2q13-q31, 4, 8p, 17p, 18, 21q, Y
11	2q11-32, 8q22-qter, 20q	1p32-pter, 3p14-pter, 12q23-qter, 16, 17, 19, 22
3	8q, 9p, 13, 18q	1p32-pter, 6p21.3, 9q31-qter, 16, 17, 19, 22
14	1p32-pter, 7, 8q, 13, 15q22-24, 19, 20q, ampl 20q	3p11-14, 3q, 4p11-15.2, 4q, 6q11-21, 8p, 9p, 15q11-21, 18, 20p, Y
10	2q22-q34, 5q13-q22, 7p, 8q21-q23, 12p11.2, 20p11.1-11.2, Xq	1p32-pter, 4p15.2-pter, 8p12-pter, 9q33-qter, 16p, 17, 19, 22
17	1p32-pter, 5p13, 9q31-qter, 19, 20, X, ampl 5p13	18, Y

9	2q22-32, 5p, 5q11-q23, 7, 9p, 13	1p32-pter, 9q33-qter, 11q11.2, 12q22-qter, 16, 17, 19, 22
1	3q23-qter, 5p, 8q, 20	1p32-pter, 5q, 8p, 9q, 12q23-qter, 18q21-qter, 19, 21
4	1p13-p22, 2q21-q33, 3, 6q11-22, 7p, 8q, 9p, 13, 20, Xq	1p31-pter, 4p16, 8p, 9q33-qter, 10, 12q22-qter, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22

Tabelle 4.2.2.1: Chromosomen-/Sequenzveränderungen im Kollektiv M1.

Kollektiv M1, n=18

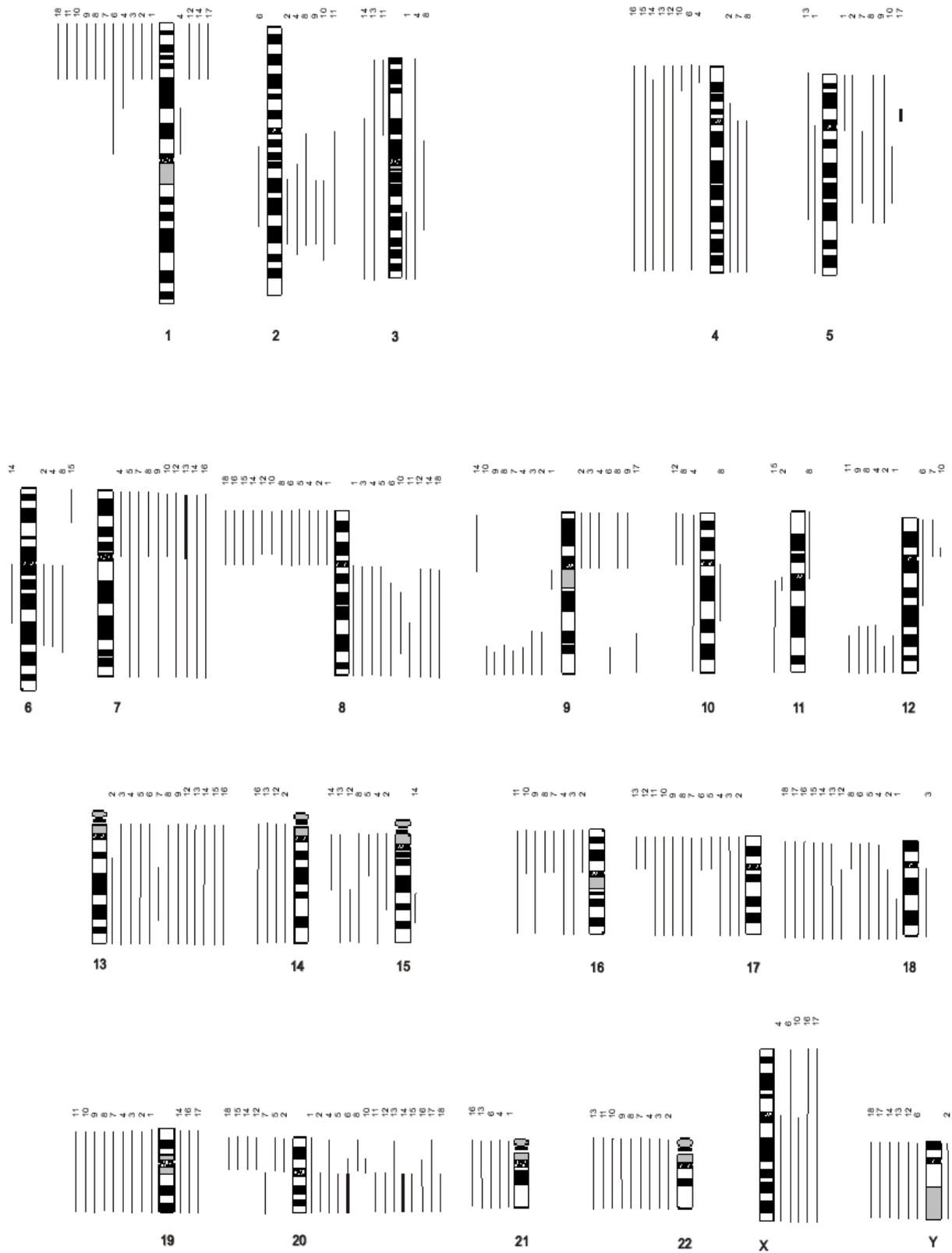


Abbildung 4.2.2.2: Summeideogramm des Kollektivs M1.

4.3 Vergleich von Kollektiv M0 mit Kollektiv M1

Die ANCA-Werte der beiden Kollektive wurden mit dem T-Test für unabhängige Proben verglichen.

Der Fisher-Exact-Test wurde durchgeführt, um einzelne chromosomale Veränderungen festzustellen, die prädikativ für eine Zuordnung M0 oder M1 sind. P-Werte kleiner 0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet.

Für den Vergleich der beiden Kollektive ist eine gemeinsame Darstellung der Gewinne (Abbildung 4.3.1.1) und Verluste (Abbildung 4.3.1.2) gewählt worden. Hier sind auf der X-Achse die Chromosomen 1-22 sowie das X-Chromosom aufgetragen, die Y-Achse spiegelt die prozentuale Häufigkeit der Gewinne, respektive Verluste, des jeweiligen Kollektives wider. Die blaue Linie steht für das Kollektiv M0, die rote Linie für das Kollektiv M1.

4.3.1 Auswertung: Kollektiv M0 und Kollektiv M1

T-Test für unabhängige Proben: Das Kollektiv M1 war, verglichen mit dem Kollektiv M0, genetisch instabiler. Dies wird durch den ANCA-Wert 13,8 für das Kollektiv M1 und 10,0 für das Kollektiv M0 verdeutlicht ($p < 0,05$).

Bei der Aufteilung des ANCA-Wertes in Gewinne und Verluste zeigte sich, dass es chromosomale Verluste waren, die das Kollektiv M1 gegenüber dem Kollektiv M0 instabiler werden ließen. ANCA-Verluste im Kollektiv M1: 8,0 versus ANCA-Verluste im Kollektiv M0: 5,0 ($p < 0,05$).

Es wurde kein signifikanter Unterschied bezüglich der ANCA-Gewinne in beiden Kollektiven gefunden.

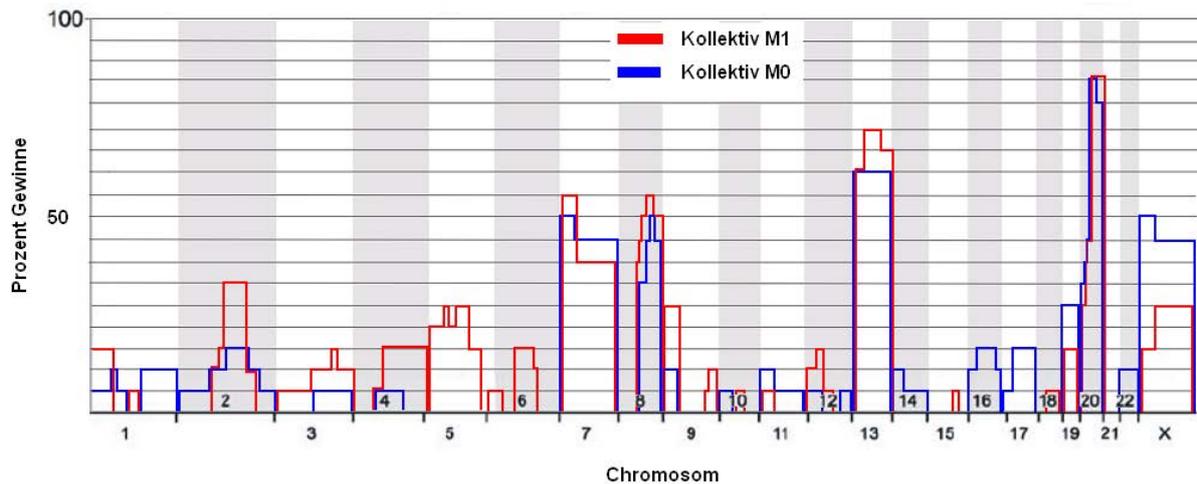


Abbildung 4.3.1.1: Gemeinsame Darstellung der Gewinne im Kollektiv M0 und M1.

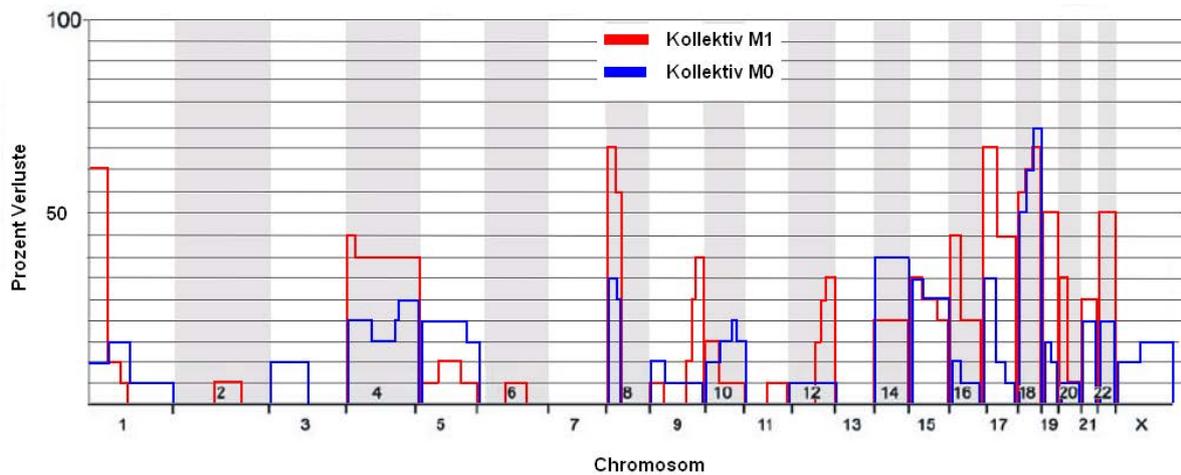


Abbildung 4.3.1.2: Gemeinsame Darstellung der Verluste im Kollektiv M0 und M1.

Fisher-Exact-Test: Es konnten drei genetische Verluste gefunden werden, die häufiger im Kollektiv M1 als im Kollektiv M0 waren. Es waren dies die chromosomalen Verluste: 1p32-pter ($p = 0.015$), 9q33-qter ($p = 0.041$) und 19q ($p = 0.028$). Bei der Betrachtung der chromosomalen Gewinne fand sich nur eine genetische Aberration, die häufiger im Kollektiv M1 als im Kollektiv M0 auftrat. Es war dies der Gewinn von 5p ($p = 0.045$).

Es zeigten 8/18 (44%) der Tumore im Kollektiv M1 den gemeinsamen Verlust von 1p32-pter, 9q33-qter und 19q. Dieses spezifische Muster an chromosomalen Verlusten fand sich nicht im Kollektiv M0. Es trat unabhängig vom T- und N-Stadium der Tumore im Kollektiv M1 auf.

4.4 Zusammenfassung

1. Der ANCA-Wert für das Kollektiv M0 betrug 10 gegenüber 13,8 für das Kollektiv M1. Das Kollektiv M1 ist daher genetisch instabiler als das Kollektiv M0 ($p < 0,05$).
2. Mit einer Signifikanz von $p < 0,05$ zeigte sich, dass es chromosomale Verluste waren, die das Kollektiv der M1-Tumore genetisch instabiler werden ließen als das Kollektiv der M0-Tumore.
3. Drei chromosomale Verluste (Verlust von 1p32-pter, 9q33-qter und 19q) fanden sich mit einer Signifikanz von $p < 0,05$ im Kollektiv der M1-Tumore im Vergleich zum Kollektiv der M0-Tumore.
4. Ein chromosomaler Gewinn (Gewinn von 5p) fand sich mit einer Signifikanz von $p < 0,05$ im Kollektiv der M1-Tumore im Vergleich zum Kollektiv der M0-Tumore.

5. Diskussion

5.1 Überblick

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Suche nach chromosomalen Aberrationen, die aussagekräftig für eine hämatogene Metastasierung in die Leber sind. Ähnlich dem chromosomalen Progressionsmodell der Adenom-Karzinom-Sequenz sollte der finale Schritt im Rahmen der Karzinogenese – die hämatogene Metastasierung – ebenfalls mit chromosomalen Aberrationen assoziiert werden. Zur Detektion der chromosomalen Aberrationen ist die komparative genomische Hybridisierung (CGH) verwendet worden.

Bei einer Pubmed Recherche im Jahre 2009 (Suchkriterien: CGH and colorectal and metastasis and/or liver) fanden sich 27 Veröffentlichungen zwischen den Jahren 1998 und 2009. Ein Studium dieser Veröffentlichungen zeigte, dass sich 19 Veröffentlichungen mit einer ähnlichen Fragestellung und Methodik wie in der vorliegenden Arbeit beschäftigten (Paredes-Zaglul et al. 1998; Meijer et al. 1998, Al-Mulla et al. 1999 und 2006; Korn et al. 1999; Hidaka et al. 2000, Nakao et al. 2001; Aragane et al. 2001; Hermsen et al. 2002, Knösel et al. 2002, 2003 und 2004; Diep et al. 2003 und 2004; Alcock et al. 2003, Ghadimi et al. 2006, Postma et al. 2007, Liu et al. 2007, Habermann et al. 2007).

Im Folgenden sollen die experimentellen Ergebnisse dieser Arbeit (siehe auch: 4.4 Zusammenfassung) kritisch und unter Berücksichtigung oben genannter Veröffentlichungen diskutiert werden (Abschnitte 5.2 - 5.4 der Diskussion).

Die Auswertung der chromosomalen Veränderungen im Kollektiv der M0- und M1-Tumore ergab signifikant häufiger ein Muster an chromosomalen Verlusten im Kollektiv der M1-Tumore. Die Abschnitte 5.5 - 5.6 der Diskussion beschäftigen sich mit hier befindlichen möglichen relevanten Anti-Metastasierungsgenen und Tumorsuppressorgenen.

5.2 Allgemeine Betrachtung der detektierten chromosomalen Veränderungen

Die in der vorliegenden Arbeit detektierten chromosomalen Aberrationen beider Kollektive spiegelten das allgemein anerkannte Muster an chromosomalen Veränderungen des kolorektalen Karzinoms wider. So waren die häufig gefundenen Gewinne von den Chromosomen 7, 8q, 13 und 20 sowie die Verluste der Chromosomen 4, 8p, 14, 15, 17p und 18 in anderen CGH-Studien bereits mehrfach beschrieben worden (Ried et al. 1996, Meijer et al. 1998, Paredes-Zaglul et al. 1998, Nakao et al. 2001, Aragane et al. 2001, Ghadimi et al. 2003, Knösel et al. 2003).

5.3 Zunahme der genetischen Instabilität beim Vergleich von M0- mit M1-Tumoren

Die Gruppe der M0-Tumore hatte einen durchschnittlichen ANCA-Wert von 10,0, der gleichmäßig in Gewinne und Verluste aufgeteilt war. Die Ergebnisse lagen damit in derselben Größenordnung wie andere CGH-Studien zum kolorektalen Karzinom (Ried et al. 1996, Al Mulla et al. 1999 und 2006, Korn et al. 1999, Ghadimi et al. 2003).

Der höhere ANCA-Wert von 13,8 für das Kollektiv M1 war bei Primärtumoren des kolorektalen Karzinoms in dieser Höhe noch nicht beschrieben worden. Meijer et al. (1998) fanden einen ANCA-Wert von 11,9. De Angelis et al. (1999) von 10, Ghadimi et al. (2003) von 9,8 bei fortgeschrittenen kolorektalen Karzinomen (Nodal-Status positiv, Tumordinfiltrationstiefe T3-4). In diesen Studien wurde jedoch keine Aussage bezüglich einer hämatogenen Metastasierung der untersuchten Primärtumore gemacht.

Bei der Betrachtung von CGH-Profilen kolorektaler Lebermetastasen fanden sich jedoch ähnlich hohe ANCA-Werte wie im untersuchten Kollektiv M1. Paredes-Zaglul et al. (1998) detektierten einen ANCA-Wert von 12,6. Diep et al. (2003/2004) publizierten ebenfalls einen ANCA-Wert von 12,6 (2003), bzw. 14 (2004) bei Lebermetastasen des kolorektalen Karzinoms. Korn et al. (1999) fielen mit dem detektierten ANCA-Wert von 9,9 in ihren Lebermetastasen ein wenig ab.

Als Ursache für diese unterschiedlichen ANCA-Werte können mehrere Faktoren ursächlich sein:

1.) Zunächst ist die Homogenität des untersuchten Tumormaterials für die Detektierbarkeit chromosomaler Veränderungen verantwortlich. So müssen mindestens 50% des untersuchten Tumormaterials dieselben chromosomalen Veränderungen nachweisen, damit diese mit der CGH detektiert werden können (Kallioniemi et al. 1994).

Eine nahezu hundertprozentige Reinheit des Tumormaterials könnte mit Hilfe der Mikrodissektion erreicht werden. Hierbei werden aus einem wenige μm dicken Präparateschnitt mit Hilfe eines Lasers ausschließlich Tumorzellen herausgeschossen. Diese werden anschließend im Rahmen einer PCR auf CGH notwendige Mengen vermehrt. Bei dem so gewonnenen CGH-Profil des Tumors muss jedoch in Betracht gezogen werden, dass sich im Tumor befindliche Subpopulationen methodisch bedingt eventuell der Untersuchung entziehen (Callagy et al. 2005).

2.) In den vorliegenden Studien wurden verschiedene Schwellenwerte, so genannte „cutt offs“, für die Ratioverhältnisse (siehe hierzu auch Material und Methoden: 3.13 Auswertung) berücksichtigt. Somit war die methodische Sensibilität unterschiedlich.

Ursächlich für das Heranziehen unterschiedlicher „cutt offs“ ist die Tatsache, dass bei „ruhig“ verlaufenden chromosomalen Profilen eindeutige Ausschläge im Summenprofil, auch bei nicht Erreichen des Schwellenwertes, von einigen Forschergruppen als relevante chromosomale Veränderungen eingeschätzt wurden. Eine Möglichkeit, hybridisierungsbedingte Unterschiede in den CGH-Profilen zu minimieren, wäre es, einen Referenzfall mit definierten chromosomalen Gewinnen zum Vergleich heran zu ziehen. Moore et al. machten den Vorschlag, einen t-Test zwischen einer Referenz/Referenz und einer Tumor/Referenz-Hybridisierung durchzuführen, um somit hybridisierungsbedingte Gewinne und Verluste aufdecken zu können (Moore et al. 1997).

3.) Als weiterer Faktor für die unterschiedlichen ANCA-Werte muss erwähnt werden, dass es auch CGH-Studien gab, bei denen die Chromosomenarme 1p32-pter, 16p, 19p und 22q nicht betrachtet wurden. Diese Chromosomen/Chromosomenregionen

zeigten bei der Hybridisierung von zwei Referenz-Proben unterschiedliche Intensitäten der FITC- und TRITC-Signale, was vermutlich durch unterschiedliche Hybridisierungseigenschaften von Biotin und Digoxigenin begründet ist (Kallioniemi et al. 1994). Es ist verständlich, dass der ANCA-Wert dieser Studien tendenziell niedriger war.

Auch wenn in den betrachteten Studien unterschiedliche ANCA-Werte detektiert wurden, lagen diese in derselben Größenordnung. Es herrschte in der gesichteten Literatur auch allgemein Einigkeit darüber, dass es im Rahmen der Tumorprogression zu einer Zunahme der genetischen Instabilität kommt (Fearon und Vogelstein 1990, Ried et al. 1996, Ghadimi et al. 2003).

5.4 Zunahme der genetischen Instabilität – bedingt durch chromosomale Verluste

Kontrovers wurde diskutiert, ob beim kolorektalen Karzinom Gewinne oder Verluste im Rahmen der Tumorprogression überwiegen. Erstmals konnte in dieser Arbeit der höhere ANCA-Wert von 13,8 in der Gruppe der M1-Tumore auf chromosomale Verluste zurückgeführt werden ($p < 0,05$).

Paredes-Zaglul et al. (1998) verglichen Primärtumore des kolorektalen Karzinoms mit Lebermetastasen von kolorektalen Karzinomen. In den chromosomalen Profilen der Metastasen detektierten sie häufiger chromosomale Verluste. Hieraus formulierten sie die Überschrift ihrer Publikation: „Evidence for Induction of the Metastatic Phenotyp by Loss of Tumor Suppressor Genes“ (Paredes-Zaglul et al. 1998). Im Kollektiv von Paredes-Zaglul et al. bestand jedoch keine Beziehung zwischen den Primärtumoren und den Lebermetastasen. Eine Zuordnung von chromosomalen Verlusten als prädikativer Wert hinsichtlich des Metastasierungsverhaltens eines Primärtumors war demnach aufgrund des Studiendesigns nicht möglich.

Nakao et al. veröffentlichten 2001 eine CGH-Studie bei der 19 M0-Tumore mit 16 M1-Tumoren (hepatische Metastasierung) verglichen wurden. Hinsichtlich der ANCA-Werte wurde für die beiden Kollektive keine Aussage gemacht. Es fand sich kein Unterschied bezüglich chromosomaler Verluste in den beiden Kollektiven. Dagegen

zeigte sich ein signifikanter Unterschied bezüglich chromosomaler Gewinne. Die Chromosomenarme 6q, 7q, 8q, 13q und 20q waren im Kollektiv der M1-Tumore signifikant häufiger gewonnen als im Kollektiv M0. Leider wurden in der Studie von Nakao et al. keine Aussagen bezüglich des T/N-Stadiums der Tumore gemacht. Die detektierten Gewinne könnten also auch für einen lokalen Tumorprogress oder eine lymphogene Metastasierung – und nicht für eine hämatogene Tumorprogression – relevant sein. Die chromosomalen Gewinne von Chromosom 7 und dem Chromosomenarm 13q werden des Weiteren als frühe genetische Aberrationen in der Tumorprogression angesehen (Ried et al. 1996).

Der Gewinn von Chromosom 20q wurde von Ried et al. (1996) bei der Progression von Adenomen zu Karzinomen gesehen und ist somit ebenfalls ein frühes Ereignis im chromosomalen Progressionsmodell des kolorektalen Karzinoms.

Hidaka et al. sahen den Gewinn von 20q13.2 in einer FISH-Studie bei 11% der kolorektalen Karzinome mit Lebermetastasen (N=18), bei 39% der untersuchten hepatischen Metastasen von kolorektalen Karzinomen (N=18) und dagegen nicht bei M0-Tumoren des kolorektalen Karzinoms (N=17) (Hidaka et al. 2000). Die Schlussfolgerung von Hidaka et al., dass eine Amplifikation von 20q31 mit (hepatischer) Metastasierung assoziiert ist, ist bei fehlender TN-Einstufung der M0- und M1-Tumore – wie bei Nakao et al. – fraglich.

Zusammenfassend zeigte sich beim Studium der oben genannten Publikationen keine chromosomale Region die spezifisch für eine hämatogene Metastasierung ist. Unabhängig von der Frage, ob solch eine Region überhaupt existiert, waren es vor allem die heterogenen Kollektive sowie die unterschiedlichen Studiendesigns, die vergleichende Betrachtungen erschwerten.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei histopathologisch vergleichbare Kollektive des kolorektalen Karzinoms untersucht. Der alleinige Unterschied zwischen den Kollektiven bestand in dem hämatogenen Metastasierungsverhalten der Tumore. So konnten chromosomale Unterschiede der Kollektive in direkter Beziehung zu dem Metastasierungsverhalten gesehen werden. Es konnte daher erstmalig gezeigt werden, dass es chromosomale Verluste sind, die einen aggressiven hämatogen metastasierenden Phänotyp des kolorektalen Karzinoms charakterisieren.

5.5 Spezifische chromosomale Verluste als prädiktiver Marker

Die konventionelle histopathologische Einstufung des kolorektalen Karzinoms hat Schwächen bezüglich der prognostischen Aussagekraft einer zu erwartenden hämatogenen Metastasierung. Es ist daher in mehreren Studien nach einzelnen molekularen Markern gesucht worden, die als prognostische Faktoren gewertet werden können.

Während es Anzeichen gibt, dass die lymphogene Metastasierung beim kolorektalen Karzinom mit dem Sequenzgewinn 8q23 vergesellschaftet zu sein scheint (Ghadimi et al. 2003), gibt es derzeit jedoch keine Einigung hinsichtlich einer für die hämatogene Metastasierung prädiktiven Region.

In der vorliegenden Arbeit waren die Verluste von 1p32-pter, 9q33-qter und 19q signifikant häufiger im Kollektiv M1 als im Kollektiv M0. Mögliche relevante Anti-Metastasierungsgene und Tumorsuppressorgene, die auf diesen Chromosomenabschnitten liegen, sollen im Folgenden diskutiert werden. Tumorsuppressorgene (früher Antionkogene) wirken im Normalzustand einer Zelle als Inhibitoren der Proliferation: Solange ihr Proteinprodukt exprimiert wird, ist eine exzessive Zellproliferation gehemmt. Ein Tumorwachstum wird durch sie supprimiert. Anti-Metastasierungsgene werden funktionell definiert: Sie unterdrücken eine Fernmetastasierung (z. B. in die Leber), ohne das Wachstum des Primärtumors zu beeinflussen. Aktuell sind über 20 Anti-Metastasierungsgene in vivo beschrieben worden (Horak et al. 2008).

5.5.1 Chromosom 1p

Der Verlust des Chromosomenarms 1p ist in der klassischen Zytogenetik bei ca. 50% der kolorektalen Karzinome nachweisbar (Couturier-Tupin et al. 1988, Bardi et al. 1995). Auch in anderen molekular-biologischen Studien konnten ähnlich hohe Prozentsätze gefunden werden. Di Vinci et al. sahen in einer FISH-Studie bei neun von zwanzig (45%) ihrer untersuchten kolorektalen Karzinomen den Verlust von 1p. Diesen konnten sie in sieben Fällen homogen über den gesamten Primärtumor

nachweisen. Ausgehend von der Hypothese, dass homogene genetische Veränderungen ein früher Schritt in der Tumorprogression sein müssen, sahen sie den Verlust von 1p als frühes Ereignis an (Di Vinci et al. 1996).

Thorstensen et al. zeigten in einer PCR-Studie mit mehreren Primern für 1p den Verlust bei Primärtumoren (in 50% der Fälle), lokalen Rezidiven (in 33% der Fälle) und Fernmetastasen (in 64% der Fälle) des kolorektalen Karzinoms (Thorstensen et al. 2000). Knösel et al. sahen 2003 in ihrer CGH-Studie, dass der Verlust von 1p36.1-2 kombiniert mit dem Verlust von 4q35 und den Gewinnen von 2p14-15, 15q22-23 und 22q11.2 signifikant mit einem kürzeren Überleben der Patienten korrelierte (Knösel et al. 2003). In einer Folgearbeit aus dem Jahre 2005 trat der Verlust von 1p gehäuft bei Leber- und Lungenmetastasen auf (Knösel et al. 2005).

Zusammenfassend zeigte sich Einigkeit in der gesichteten Literatur, dass der Verlust von 1p gehäuft beim kolorektalen Karzinom auftritt (Couturier-Tupin et al. 1988, Thorstensen et al. 2000, Knösel et al. 2005).

In dieser Arbeit wird genetischer Verlust auf 1p erstmals auf die Chromosomenregion 1p32-pter reduziert und in Korrelation mit hämatogener Metastasierung gebracht (siehe hierzu auch: 5.1 Überblick).

Auf dem Chromosomenabschnitt 1p36 ist das Tumorsuppressorgen p73 lokalisiert, das eine starke Homologie zu dem Tumorsuppressorgen p53 aufweist. In mehreren Studien konnten die Tumorsuppressor-Eigenschaften von p73 gezeigt werden, jedoch gibt es auch Studien, die p73 ein onkogenes Potential zuschreiben (Flores et al. 2005, Tannapfel et al. 1999). Seine vollständige Funktionsweise ist daher zurzeit noch nicht geklärt (Rosenbluth und Pietenpol 2008).

Neben p73 ist ein weiteres putatives Tumorsuppressorgen auf 1p lokalisiert: CDC2L1, auch p58 genannt (genaue Lokalisation: 1p36.33). CDC2L1 ist unter anderem im Rahmen der Zellteilung für die Ausbildung des Spindelapparates und der Zentrosomen-Reifung verantwortlich (Petretti et al. 2006). Ein Verlust von CDC2L1 führt über die gestörte Zellteilung zu einer genetischer Instabilität (Barna et al. 2008). Daneben scheint CDC2L1 auch die Anzahl an Östrogenrezeptoren auf der Zelloberfläche zu beeinflussen. Wang et al. beschrieben 2009 eine Reduktion der Östrogenrezeptorexpression (Östrogenrezeptor alpha) durch CDC2L1.

5.5.2 Chromosom 9q

Der chromosomale Verlust von 9q war in der Progression des kolorektalen Karzinoms bereits beschrieben worden (Gryfe et al. 1997). Eine Zuordnung zur hämatogenen Metastasierung war bislang nicht erfolgt. Allgemein ist chromosomalen Verlusten im Bereich von 9q, aufgrund niedriger Penetranz, in der gesichteten Literatur wenig Interesse geschenkt worden (siehe hierzu auch: 5.1 Überblick).

Im Bereich des in dieser Arbeit detektierten chromosomalen Verlustes von 9q33-qter liegt das Anti-Metastasierungs-gen Gelsolin (9q33). Gelsolin ist ein Actin-bindendes Protein und somit am Zytoskelett der Zelle beteiligt. Es unterdrückt Zell-Motilität. Im Tierversuch (Maus) kann durch Überexpression von Gelsolin ein Tumor-suppressiver Effekt gezeigt werden (Sazawa et al. 2002), während ein „Knockdown“ (= Ausschalten der Funktion eines Gens) von Gelsolin in menschlichen Epithelzellen eine erhöhte Motilität und eine epitheliale-mesenchymale Transformation bewirkte (in-vitro-Versuch) (Tanaka et al. 2006). Beim kolorektalen Karzinom konnte eine Abnahme der Gelsolin-Expression im Rahmen der Adenom-Karzinom-Sequenz gezeigt werden (Gay et al. 2008).

Im Bereich 9q34 liegt der Gen-Abschnitt für COL5A1. Dies ist ein extrazelluläres Matrix-Kollagen-Protein. Im Tierversuch wurde gezeigt, dass es durch Koffein zu einer vermehrten Expression von extrazellulären Matrixproteinen – unter anderem auch COL5A1 – kommt. Transgene Mäuse mit einem aggressiv metastasierenden Brusttumor zeigten, dass die durch Koffein induzierte vermehrte Expression extrazellulärer Matrixproteine mit einem Antimetastasierungs-effekt einhergeht (Yang et al. 2004).

5.5.3 Chromosom 19

Chromosom 19 wird kontrovers im Rahmen der Tumorprogression des kolorektalen Karzinoms diskutiert. Ried et al. (1996) detektierten bei ihren CGH-Untersuchungen keine Veränderungen am Chromosom 19. De Angelis et al. berichteten dagegen in einer CGH-Studie (45 kolorektale Karzinome, Dukes-Stadium B, C, D) über einen Gewinn von Chromosom 19 in knapp 10% der Fälle. In klassischen zytogenetischen

Analysen ist von Bardi et al. ebenfalls der Gewinn von Chromosom 19 beschrieben worden – allerdings in geringerer Anzahl als in der Arbeit von de Angelis et al. (Ried et al. 1996, De Angelis et al. 1999, Bardi et al. 1995).

Yeatman et al. beschrieben 1996 in einer CGH-Studie bei einer aggressiv metastatischen Zelllinie des kolorektalen Karzinoms (KM12L4A) unter anderem den kompletten Verlust vom Chromosom 19. Nakao et al. (2001) fanden beim Vergleich von 16 hepatisch metastasierten mit 19 nicht metastasierten Tumoren des kolorektalen Karzinoms in 31% der M1-Tumore und in 15% der M0-Tumore den Verlust von 19q. Sie konnten hieraus jedoch keine Signifikanz ableiten (Yeatman et al. 1996, Nakao et al. 2001). In einer 2008 veröffentlichten Studie konnte beim Vergleich von Lebermetastasen und primären Tumoren des kolorektalen Karzinoms der Verlust von 19q signifikant häufiger in der Gruppe der Metastasen gefunden werden. Allerdings standen auch bei dieser Studie Primärtumor und Metastase in keinem Verhältnis zueinander. Der prognostische Wert eines Verlustes von 19q konnte somit nicht gezeigt werden (Zeitoun et al. 2008).

Tumore unterschiedlicher Entität zeigen den Verlust von 19q als häufige chromosomale Aberration. Hervorzuheben sind hier vor allem das Oligodendrogliom und das Neuroblastom. Bei diesen Tumoren konnte der Verlust von 19q auch mit schlechter Prognose der Patienten korreliert werden (Law et al. 2005, Mora et al. 2001). Beim Prostata-Karzinom wurde ein Allelverlust im Bereich 19q12-13 ebenfalls mit Tumoraggressivität und schlechterer Prognose korreliert (Phillippa et al. 2003). Bei einer Zelllinie des Prostata-Karzinoms (TSU-pr1) konnte durch eine Transfektion mit Chromosom 19 der metastatische Phänotyp unterdrückt werden (Gao et al. 1999).

Auf dem Chromosomenarm 19q ist die Gruppe der Kallikreine lokalisiert. Dies sind 15 Serin Proteasen (KLK1-15), deren physiologische Aufgaben im Gewebsumbau, Aktivierung von Prohormonen und Regulation des Blutdrucks bestehen. Es wird angenommen, dass die Kallikreine im Rahmen einer Kaskade sich gegenseitig regulieren (Borgono et al. 2004). Das bekannteste Kallikrein ist KLK3 – auch Prostata spezifisches Antigen (PSA) genannt. Der PSA-Wert wird heute im Rahmen der Vor- und Nachsorgeuntersuchungen beim Prostatakarzinom bestimmt. Während

seine Aussagekraft als Screeningwert aktuell kritisch diskutiert wird, ist ein erneut ansteigender PSA-Wert nach radikaler Prostatektomie höchst verdächtig für ein Rezidiv und/oder die Ausbildung von Metastasen (Deutsche Gesellschaft für Urologie e. V. 2009).

Beim Mammakarzinom konnte im Tumorgewebe eine verminderte Expression von KLK10 im Vergleich zu gesunden Brustgewebe gesehen werden. Des Weiteren führt eine verminderte Expression von KLK10 beim Mammakarzinom zu einer reduzierten Empfindlichkeit bezüglich einer Tamoxifentherapie. KLK10 wird daher als mögliches Tumorsuppressorgen beim Mammakarzinom diskutiert (Luo et al. 2002).

Beim kolorektalen Karzinom konnte eine verminderte Expression von KLK1 gesehen werden, wobei KLK6, KLK8 und KLK10 überexprimiert zu sein scheinen (Yousef et al. 2004, Paliouras et al. 2007). Die vollständige Funktionsweise und Bedeutung der Kallikreine im Rahmen der Tumorprogression ist jedoch bisher nicht geklärt.

5.6 Kombiniertes Verlust von 1p32-pter, 9q33-qter und 19q – Aggressiver Genotyp eines Primärtumors?

In 8 von 18 (42%) Fällen der hepatisch metastasierten kolorektalen Karzinome (Kollektiv M1) konnte der kombinierte chromosomale Verlust von 1p32-pter, 9q33-qter und 19q gezeigt werden. Dieser Verlust trat ebenso bei T2- wie bei T4-Tumoren sowie N0- als N+ -Tumoren auf, er scheint daher ohne Korrelation zu einer lokalen Tumorausdehnung zu sein. Im Kollektiv der M0-Tumore fand sich der kombinierte chromosomale Verlust von 1p32-pter, 9q33-qter und 19q nicht.

Der kombinierte Verlust an Tumorsuppressorgenen und Anti-Metastasierungsgenen auf diesen Chromosomenabschnitten könnte damit einen aggressiv metastatischen Phänotyp begründen und einen molekularen Signalweg im Rahmen der Tumorprogression des kolorektalen Karzinoms darstellen.

Interessanterweise zeigte eine CGH-Array-Studie aus dem Jahre 2007 den Verlust von 1p36 und 9q34 mit dem Anteil an umgebenen Stromazellen beim kolorektalen Karzinom assoziiert. Der Anteil an Stromazellen wird als Interaktion des Tumors mit dem umgebenen Gewebe (= extrazelluläre Matrix = EZM) gewertet und ist somit für das Tumormicroenvironment wichtig (Fijneman et al. 2007).

Im Rahmen einer Metastasierung muss eine Tumorzelle eine Vielzahl von komplexen Einzelschritten absolvieren. Diese werden heute mit dem Schlagwort „metastatische Kaskade“ beschrieben (Ghadimi und Schlag 1998). Als initiales Ereignis muss die Zelle ihren Tumorverband verlassen und in die extrazelluläre Matrix (EZM) einwandern. Hierzu ist eine Interaktion mit der EZM nötig. Die von Fijneman et al. festgestellte Korrelation des Verlustes von 1p36 und 9q34 mit dem Anteil der Stromazellen lässt vermuten, dass auf diesen Chromosomenabschnitten EZM-modulierende Gene liegen.

6. Zusammenfassung

Die hämatogene Metastasierung stellt den schwerwiegendsten Schritt in der Tumorprogression dar. Die zu erwartende Fünf-Jahres-Überlebensrate verschlechtert sich mit ihr deutlich.

Eine hämatogene Metastasierung wird zurzeit ausschließlich apparativ durch die prätherapeutischen Staging-Untersuchungen, die intraoperative Palpation/Sonographie der Leber und im Rahmen der Nachsorge der Patienten diagnostiziert. Die histopathologische Aufarbeitung des Resektats liefert keine verlässliche Aussage über eine mögliche hämatogene Metastasierung.

Ein unabhängiger diagnostischer Marker bezüglich der hämatogenen Metastasierung könnte die Therapieoptionen erweitern und verbessern. Adjuvante Chemotherapien und engere Nachsorgetermine mit erweiterter Diagnostik könnten Risikopatienten so einen Vorteil verschaffen. Ziel dieser Arbeit war es daher, mit Hilfe einer Genom-Screening-Methode zu untersuchen, inwieweit sich hepatisch metastasierte von nicht hepatisch metastasierten kolorektalen Karzinomen unterscheiden. Im Idealfall sollte eine chromosomale Aberration gefunden werden, die prädiktiv für eine hämatogene Metastasierung ist.

Die untersuchten Kollektive bestanden aus 18 synchron hepatisch metastasierten und 18 nicht hepatisch metastasierten kolorektalen Karzinomen (Nachbeobachtungszeitraum 2 Jahre). Die Primärtumore der beiden Kollektive wurden mit Hilfe der komparativen genomischen Hybridisierung (CGH) analysiert. Mit der CGH kann eine Aussage über chromosomale Gewinne und Verluste des Tumors erfolgen.

Bei der Auswertung zeigte sich, dass die hepatisch metastasierten kolorektalen Karzinome mehr chromosomale Veränderungen zeigen als die nicht hepatisch metastasierten Tumore. Diese chromosomale Instabilität kann signifikant auf chromosomale Verluste zurückgeführt werden ($p < 0,05$).

Daneben zeigte sich in 44% der hämatogen metastasierten kolorektalen Karzinome ein bestimmtes Muster an chromosomalen Verlusten. Es ist dies der kombinierte Verlust von 1p32-pter, 9q33-qter und 19q.

Mögliche Tumorsuppressorgene und Anti-Metastasierungsgene, die auf den verlorenen Chromosomenabschnitten liegen sind p73 und CDC2L1 auf Chromosom 1p, Gelsolin und COL5A1 auf Chromosom 9q und die Gruppe der Kallikreine auf 19q.

7. Abkürzungen

ACF	Aberrant Crypt Focus
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Buffy-Coat	leukozytenreiche Grenzschicht zwischen roten Blutkörperchen und Blutserum nach Zentrifugation
CCD	charge coupled device
cDNA	komplementäre DNA
CEA	karzinoembryonales Antigen
CGH	„Comparative Genomic Hybridization“
CIN	chromosomale Instabilität
CIMP+	CpG Island Methylator phenotyp positiv
DAPI-Lösung	1 Teil: 4',6'-Diamino-2-phenylindol und 1 Teil: Vectorshield
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanidintriphosphat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNS-Pellet	makroskopisch sichtbare Ablagerung von DNS nach einem Extraktionsvorgang
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EZM	extrazelluläre Matrix
FAP	familiären adenomatösen Polyposis
FISH	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HNPCC	hereditäres nicht-Polyposis-assoziiertes kolorektale Karzinom-Syndrom
kbp	Kilobasenpaare
KRK	Kolorektales Karzinom
l	Liter
LOH	„Loss of Heterozygosity“
M	Molarität
Mbp	Megabasenpaare
MGMT	O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
min	Minute
MMR	Mismatch-Repair Gen
mRNA	„messenger“ Ribonukleinsäure
MSI	Mikrosatelliten-Instabilität
„Nicks“	Einzelstrangbrüche in der DNS
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionen-Konzentration
PSA	Prostata spezifisches Antigen
SSC	„Standard saline citrat“

TBE	Tris-Borat-EDTA
Tris HCl	Trishydroxymethylaminomethan-Salzsäure
TRITC	Tetramethylrhodamine - 5 - (and - 6) - isothiocyanate
TWEEN 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
U	Unit (= Einheit der Enzymaktivität)
UICC	Union internationale contre le cancer
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett

8. Literaturverzeichnis

Alcock HE, Stephenson TJ, Royds JA, Hammond DW (2003): Analysis of colorectal tumor progression by microdissection and comparative genomic hybridization.

Genes Chromosomes Cancer 37, 369-380.

Al-Mulla F, Keith WN, Pickford IR, Going JJ, Birnie GD (1999): Comparative genomic hybridization analysis of primary colorectal carcinomas and their synchronous metastases.

Genes Chromosomes Cancer 24, 306-314.

Al-Mulla F, Behbehani AI, Bitar MS, Varadharaj G, Going JJ (2006): Genetic profiling of stage I and II colorectal cancer may predict metastatic relapse.

Mod Pathol 19, 648-658.

Aragane H, Sakakura C, Nakanishi M, Yasuoka R, Fujita Y, Taniguchi H, Hagiwara A, Yamaguchi T, Abe T, Inazawa J et al. (2001): Chromosomal aberrations in colorectal cancers and liver metastases analyzed by comparative genomic hybridization.

Int J Cancer 94, 623-629.

Arends JW (2000): Molecular interactions in the Vogelstein model of colorectal carcinoma.

J Pathol 190, 412-416.

Bardi G, Sukhikh T, Pandis N, Fenger C, Kronborg O, Heim S (1995): Karyotypic characterization of colorectal adenocarcinomas.

Genes Chromosomes Cancer 12, 97-109.

- Barna M, Pusic A, Zollo O, Costa M, Kondrashov N, Rego E, Rao PH, Ruggero D (2008): Suppression of Myc oncogenic activity by ribosomal protein Haploinsufficiency. *Nature* 18, 971-975.
- Borgoño CA, Michael IP, Diamandis EP (2004): Human tissue kallikreins: physiologic roles and applications in cancer. *Mol Cancer Res* 2, 257-280.
- Callagy G, Jackson L, Caldas C (2005): Comparative genomic hybridization using DNA from laser capture microdissected tissue. *Methods Mol Biol* 293, 39-55.
- Cascinu S, Graziano F, Catalano V, Valentini M, Rossi MC, Baldelli AM, Ghiselli R, Saba V, Giordani P, Catalano G (2000): Prognostic value of S-phase fraction in T3N0M0 gastric cancer. Implications for adjuvant chemotherapy. *Anticancer Res* 20, 3839-3842.
- Couturier-Turpin MH, Louvel A, Couturier D, Esnous C, Poirier Y, Nepveux P (1988): Tubulovillous adenoma of the colon with hyperdiploidy, double-minute chromosomes, and inversion of chromosome 1. *Cancer Genet Cytogenet* 32, 253-262.
- De Angelis PM, Clausen OP, Schjølberg A, Stokke T (1999): Chromosomal gains and losses in primary colorectal carcinomas detected by CGH and their associations with tumour DNA ploidy, genotypes and phenotypes. *Br J Cancer* 80, 526-535.
- Denlinger CS, Cohen SJ (2007): Progress in the development of prognostic and predictive markers for gastrointestinal malignancies. *Curr Treat Options Oncol* 8, 339-351.

Deutsche Gesellschaft für Urologie e. V.: Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms (Version 1.01).

Hrsg. von Deutsche Gesellschaft für Urologie e. V., Düsseldorf 2009.

Deutsche Krebsgesellschaft e.V. und Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe: Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, 1. Aktualisierung 2008.

Hrsg. von W. Zuckschwerdt Verlag GmbH, Germering/München 2008.

Deutsche Krebsgesellschaft e.V. und Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie: Interdisziplinäre Leitlinie für die akute lymphoblastische und akute myeloische Leukämie im Kindesalter, Stand 2008.

Hrsg. von W. Zuckschwerdt Verlag GmbH, Germering/München 2008.

Diep CB, Parada LA, Teixeira MR, Eknaes M, Nesland JM, Johansson B, Lothe RA (2003 a): Genetic profiling of colorectal cancer liver metastases by combined Comparative genomic hybridization and G-banding analysis.

Genes Chromosomes Cancer 36, 189-197.

Diep CB, Thorstensen L, Meling GI, Skovlund E, Rognum TO, Lothe RA (2003 b): Genetic tumor markers with prognostic impact in Dukes' stages B and C colorectal cancer patients.

J Clin Oncol 21, 820-829.

Diep CB, Teixeira MR, Thorstensen L, Wiig JN, Eknaes M, Nesland JM, Giercksky KE, Johansson B, Lothe RA (2004): Genome characteristics of primary carcinomas, local recurrences, carcinomatoses, and liver metastases from colorectal cancer patients.

Mol Cancer 23, 3-6.

- Di Vinci A, Infusini E, Peveri C, Risio M, Rossini FP, Giaretti W (1996): Deletions at chromosome 1p by fluorescence in situ hybridization are an early event in human colorectal tumorigenesis.
Gastroenterology 111, 102-107.
- Du Manoir S, Speicher MR, Joos S, Schröck E, Popp S, Döhner H, Kovacs G, Robert-Nicoud M, Lichter P, Cremer T (1993): Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization.
Hum Genet 90, 590-610.
- Du Manoir S, Schröck E, Bentz M, Speicher MR, Joos S, Ried T, Lichter P, Cremer T (1995): Quantitative analysis of comparative genomic hybridization.
Cytometry 19, 27-41.
- Efeyan A, Serrano M (2007): p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes.
Cell Cycle 6, 1006-1010.
- Ellis CA, Clark G (2000): The importance of being K-Ras.
Cell Signal 12, 425-434.
- Eschrich S, Yang I, Bloom G, Kwong KY, Boulware D, Cantor A, Coppola D, Kruhøffer M, Aaltonen L, Orntoft TF et al. (2005): Molecular staging for survival prediction of colorectal cancer patients.
J Clin Oncol 23, 3526-3535.
- Fearon ER (1995): Molecular genetics of colorectal cancer.
Ann N Y Acad Sci 768, 101-110.
- Fearon ER, Vogelstein B (1990): A genetic model for colorectal tumorigenesis.
Cell 61, 759-767.

- Fijneman RJ, Carvalho B, Postma C, Mongera S, van Hinsbergh VW, Meijer GA (2007): Loss of 1p36, gain of 8q24, and loss of 9q34 are associated with stroma percentage of colorectal cancer.
Cancer Lett 258, 223-229.
- Flores ER, Sengupta S, Miller JB, Newman JJ, Bronson R, Crowley D, Yang A, McKeon F, Jacks T (2005): Tumor predisposition in mice mutant for p63 and p73: evidence for broader tumor suppressor functions for the p53 family.
Cancer Cell 7, 363-373.
- Fodde R, Smits R, Clevers H (2001): APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer.
Nat Rev Cancer 1, 55-67.
- Gao AC, Lou W, Ichikawa T, Denmeade SR, Barrett JC, Isaacs JT (1999):
Suppression of the tumorigenicity of prostatic cancer cells by gene(s) located on human chromosome 19p13.1-13.2.
Prostate 38, 46-54.
- Gay F, Estornes Y, Saurin JC, Joly-Pharaboz MO, Friederich E, Scoazec JY, Abello J (2008): In colon carcinogenesis, the cytoskeletal protein gelsolin is down-regulated during the transition from adenoma to carcinoma.
Hum Pathol 39, 1420-1430.
- Ghadimi BM, Schlag PM (1998): Tumor metastasis. Molecular principles and therapeutic options.
Chirurg 69, 1315-1322.
- Ghadimi BM, Grade M, Liersch T, Langer C, Siemer A, Füzesi L, Becker H (2003):
Gain of chromosome 8q23-24 is a predictive marker for lymph node positivity in colorectal cancer.
Clin Cancer Res 9, 1808-1814.

- Ghadimi BM, Grade M, Difilippantonio MJ, Varma S, Simon R, Montagna C, Füzési L, Langer C, Becker H, Liersch T et al. (2005): Effectiveness of gene expression profiling for response prediction of rectal adenocarcinomas to preoperative chemoradiotherapy.
J Clin Oncol 23, 1826-1838.
- Ghadimi BM, Grade M, Mönkemeyer C, Kulle B, Gaedcke J, Gunawan B, Langer C, Liersch T, Becker H (2006): Distinct chromosomal profiles in metastasizing and non-metastasizing colorectal carcinomas.
Cell Oncol 28, 273-281.
- Gil J, Peters G (2006): Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all.
Nat Rev Mol Cell Biol 7, 667-677.
- Grady WM, Carethers JM (2008): Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis.
Gastroenterology 135, 1079-1099.
- Gryfe R, Swallow C, Bapat B, Redston M, Gallinger S, Couture J (1997): Molecular biology of colorectal cancer.
Curr Probl Cancer 21, 233-300.
- Habermann JK, Paulsen U, Roblick UJ, Upender MB, McShane LM, Korn EL, Wangsa D, Krüger S, Duchrow M, Bruch HP et al. (2007): Stage-specific alterations of the genome, transcriptome, and proteome during colorectal carcinogenesis.
Genes Chromosomes Cancer 46, 10-26.
- Hanahan D, Weinberg RA (2007): The hallmarks of cancer.
Cell 100, 57-70.

- Hawkins NJ, Ward RL (2001): Sporadic colorectal cancers with microsatellite instability and their possible origin in hyperplastic polyps and serrated adenomas.
J Natl Cancer Inst. 93, 1307-13.
- Hermanek P, Wittekind Ch: Präkanzeröse Bedingungen und Läsionen des Verdauungstrakts. In: Hahn EG, Riemann JF (Hrsg.) Klinische Gastroenterologie. 3. Aufl. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart 1996, 1920-47.
- Hermesen M, Postma C, Baak J, Weiss M, Rapallo A, Sciutto A, Roemen G, Arends JW, Williams R, Giaretti W et al. (2002): Colorectal adenoma to carcinoma progression follows multiple pathways of chromosomal instability. Gastroenterology 123, 1109-1119.
- Hidaka S, Yasutake T, Takeshita H, Kondo M, Tsuji T, Nanashima A, Sawai T, Yamaguchi H, Nakagoe T, Ayabe H et al. (2000): Differences in 20q13.2 copy number between colorectal cancers with and without liver metastasis. Clin Cancer Res 6, 2712-2717.
- Horak CE, Lee JH, Marshall JC, Shreeve SM, Steeg PS (2008): The role of metastasis suppressor genes in metastatic dormancy. APMIS 116, 586-601.
- Houlston R, Bevan S, Williams A, Young J, Dunlop M, Rozen P, Eng C, Markie D, Woodford-Richens K, Rodriguez-Bigas MA (1998): Mutations in DPC4 (SMAD4) cause juvenile polyposis syndrome, but only account for a minority of cases. Hum Mol Genet 7, 1907-1912.
- Howe JR, Mitros FA, Summers RW (1998): The risk of gastrointestinal carcinoma in familial juvenile polyposis. Ann Surg Oncol 5, 751-756.

Huang D, Du X (2008): Crosstalk between tumor cells and microenvironment via Wnt pathway in colorectal cancer dissemination.

World J Gastroenterol 14, 1823-1827.

Jallepalli PV, Lengauer C (2001): Chromosome segregation and cancer: cutting through the mystery.

Nat Rev Cancer 1, 109-117.

Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D: (1992): Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors.

Science 30; 818-21.

Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D (1993): Comparative genomic hybridization: a rapid new method for detecting and mapping DNA amplification in tumors.

Semin Cancer Biol 4, 41-46.

Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D (1994): Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors.

Genes Chromosomes Cancer 10, 231-243.

Knösel T, Petersen S, Schwabe H, Schlüns K, Stein U, Schlag PM, Dietel M, Petersen I (2002): Incidence of chromosomal imbalances in advanced colorectal carcinomas and their metastases.

Virchows Arch 440, 187-194.

Knösel T, Schlüns K, Stein U, Schwabe H, Schlag PM, Dietel M, Petersen I (2003): Genetic imbalances with impact on survival in colorectal cancer patients.

Histopathology 43, 323-331.

- Knösel T, Schlüns K, Stein U, Schwabe H, Schlag PM, Dietel M, Petersen I (2004): Chromosomal alterations during lymphatic and liver metastasis formation of colorectal cancer.
Neoplasia 6, 23-28.
- Knösel T, Schlüns K, Dietel M, Petersen I (2005): Chromosomal alterations in lung metastases of colorectal carcinomas: associations with tissue specific tumor dissemination.
Clin Exp Metastasis 22, 533-538.
- Korn WM, Yasutake T, Kuo WL, Warren RS, Collins C, Tomita M, Gray J, Waldman FM (1999): Chromosome arm 20q gains and other genomic alterations in colorectal cancer metastatic to liver, as analyzed by comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization.
Genes Chromosomes Cancer 25, 82-90.
- Lane DP (1992): Cancer. p53, guardian of the genome.
Nature 358, 15-16.
- Law ME, Templeton KL, Kitange G, Smith J, Misra A, Feuerstein BG, Jenkins RB (2005): Molecular cytogenetic analysis of chromosomes 1 and 19 in glioma cell lines.
Cancer Genet Cytogenet 160, 1-14.
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1998): Genetic instabilities in human cancers.
Nature 396, 643-649.
- Leslie A, Carey FA, Pratt NR, Steele RJ (2002): The colorectal adenoma-carcinoma sequence.
Br J Surg 89, 845-860.
- Liersch T, Becker H, Langer C (2007): Rektumkarzinom.
Allgemeine und Viszeralchirurgie up2date, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart 2007, 41-72.

- Lindblom A, Tannergård P, Werelius B, Nordenskjöld M (1993): Genetic mapping of a second locus predisposing to hereditary non-polyposis colon cancer. *Nat Genet* 5, 279-282.
- Liu XP, Kawauchi S, Oga A, Sato T, Ikemoto K, Ikeda E, Sasaki K (2007): Chromosomal aberrations detected by comparative genomic hybridization predict outcome in patients with colorectal carcinoma. *Oncol Rep* 17, 261-267.
- Luo LY, Diamandis EP, Look MP, Soosaipillai AP, Foekens JA (2002): Higher expression of human kallikrein 10 in breast cancer tissue predicts tamoxifen resistance. *Br J Cancer* 86, 1790-1796.
- Manfredi S, Lepage C, Hatem C, Coatmeur O, Faivre J, Bouvier AM (2006): Epidemiology and management of liver metastases from colorectal cancer. *Ann Surg* 244, 254-259.
- Meijer GA, Hermsen MA, Baak JP, van Diest PJ, Meuwissen SG, Beliën JA, Hoovers JM, Joenje H, Snijders PJ, Walboomers JM (1998): Progression from colorectal adenoma to carcinoma is associated with non-random chromosomal gains as detected by comparative genomic hybridisation. *J Clin Pathol* 51, 901-909.
- Mitelmann F: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Hrsg. v. Mitelman F, Karger, Basel 1995.
- Moore DH 2nd, Pallavicini M, Cher ML, Gray JW (1997): A t-statistic for objective interpretation of comparative genomic hybridization (CGH) profiles. *Cytometry* 28, 183-190.
- Mora J, Cheung NK, Oplanich S, Chen L, Gerald WL (2002): Novel regions of allelic imbalance identified by genome-wide analysis of neuroblastoma. *Cancer Res* 62, 1761-1767.

- Nakao K, Shibusawa M, Ishihara A, Yoshizawa H, Tsunoda A, Kusano M, Kurose A, Makita T, Sasaki K (2001): Genetic changes in colorectal carcinoma tumors with liver metastases analyzed by comparative genomic hybridization and DNA ploidy.
Cancer 91, 721-726.
- Neville PJ, Conti DV, Krumroy LM, Catalona WJ, Suarez BK, Witte JS, Casey G (2003): Prostate cancer aggressiveness locus on chromosome segment 19q12-q13.1 identified by linkage and allelic imbalance studies.
Genes Chromosomes Cancer 36, 332-339.
- Paliouras M, Borgono C, Diamandis EP (2007): Human tissue kallikreins: the cancer biomarker family.
Cancer Lett 249, 61-79.
- Paredes-Zaglul A, Kang JJ, Essig YP, Mao W, Irby R, Wloch M, Yeatman TJ (1998): Analysis of colorectal cancer by comparative genomic hybridization: evidence for induction of the metastatic phenotype by loss of tumor suppressor genes.
Clin Cancer Res 4, 879-886.
- Park JY, Lee KH (2007): Carcinoembryonic antigen and patterns of recurrence after curative resection of the colorectal cancer.
Hepatogastroenterology 54, 1966-1969.
- Peltomäki P (2005): Lynch syndrome genes.
Fam Cancer 4, 227-232.
- Petretti C, Savoian M, Montembault E, Glover DM, Prigent C, Giet R (2006): The PITSLRE/CDK11p58 protein kinase promotes centrosome maturation and bipolar spindle formation.
EMBO Rep 7, 418-424.

-
- Postma C, Terwischa S, Hermsen MA, van der Sijp JR, Meijer GA (2007): Gain of chromosome 20q is an indicator of poor prognosis in colorectal cancer. *Cell Oncol* 29, 73-75.
- Quah HM, Chou JF, Gonen M, Shia J, Schrag D, Landmann RG, Guillem JG, Paty PB, Temple LK, Wong WD et al. (2008): Identification of patients with high-risk stage II colon cancer for adjuvant therapy. *Dis Colon Rectum* 51, 503-507.
- Ried T, Knutzen R, Steinbeck R, Blegen H, Schröck E, Heselmeyer K, du Manoir S, Auer G (1996): Comparative genomic hybridization reveals a specific pattern of chromosomal gains and losses during the genesis of colorectal tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 15, 234-245.
- Riede U-N, Schaefer H-E: Allgemeine und spezielle Pathologie.
Hrsg. Riede U-N und Schaefer H-E, 3. Auflage Georg Thieme Verlag KG, 1993.
- Robert-Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V.: Krebs in Deutschland 2003 – 2004. Häufigkeiten und Trends, 6. überarbeitete Auflage. Hrsg. v. Robert-Koch-Institut, Berlin 2008, 34-38.
- Rosenbluth JM, Pietsenpol JA (2008): The jury is in: p73 is a tumor suppressor after all. *Genes Dev* 22, 2591-2595.
- Schwarte-Waldhoff I, Schmiegel W (2002): Smad4 transcriptional pathways and angiogenesis. *Int J Gastrointest Cancer* 31, 47-59.

- Smith G, Carey FA, Beattie J, Wilkie MJ, Lightfoot TJ, Coxhead J, Garner RC, Steele RJ, Wolf CR (2002): Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53 – alternative genetic pathways to colorectal cancer.
Proc Natl Acad Sci USA 99, 9433-9438.
- Sazawa A, Watanabe T, Tanaka M, Haga K, Fujita H, Harabayashi T, Shinohara N, Koyanagi T, Kuzumaki N. (2002): Adenovirus mediated gelsolin Gene therapy for orthotopic human bladder cancer in nude mice.
J Urol 168, 1182–1187.
- Tanaka H, Shirkoohi R, Nakagawa K, Qiao H, Fujita H, Okada F, Hamada J, Kuzumaki S, Takimoto M, Kuzumaki N (2006): siRNA gelsolin knockdown Induces epithelial-mesenchymal transition with a cadherin switch in human mammary epithelial cells.
Int J Cancer 118, 1680-1691.
- Tannapfel A, Wasner M, Krause K, Geissler F, Katalinic A, Hauss J, Mössner J, Engeland K, Wittekind C (1999): Expression of p73 and its relation to histopathology and prognosis in hepatocellular carcinoma.
J Natl Cancer Inst 91, 1154-1158.
- Thorstensen L, Qvist H, Heim S, Liefers GJ, Nesland JM, Giercksky KE, Lothe RA (2000): Evaluation of 1p losses in primary carcinomas, local recurrences and peripheral metastases from colorectal cancer patients.
Neoplasia 2, 514-522.
- TNM Klassifikation maligner Tumoren. Hrsg. v. Ch. Wittekind, H.-J. Meyer,
7. Auflage, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, Weinheim 2010, 94-99.
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL (1988): Genetic alterations during colorectal-tumor development.
N Engl J Med 319, 525-532.

- Wanebo JH, Stearns M, Schwartz MK (1978): Use of CEA as an indicator of early recurrence and as a guide to a selected second-look procedure in patients with colorectal cancer.
Ann Surg 188, 481-493.
- Wang Y, Zong H, Chi Y, Hong Y, Yang Y, Zou W, Yun X, Gu J (2009): Repression of estrogen receptor alpha by CDK11p58 through promoting its ubiquitin-proteasome degradation.
J Biochem 145, 331-343.
- Weiss MM, Hermsen MA, Meijer GA, van Grieken NC, Baak JP, Kuipers EJ, van Diest PJ (1999): Comparative genomic hybridisation.
Mol Pathol 52, 243-51.
- Weitz J, Koch M, Debus J, Höhler T, Galle PR, Büchler MW (2005): Colorectal cancer.
Lancet 365, 153-165.
- Worthley DL, Whitehall VL, Spring KJ, Leggett BA (2007): Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer.
World J Gastroenterol 13, 3784-3791.
- Yang H, Rouse J, Lukes L, Lancaster M, Veenstra T, Zhou M, Shi Y, Park YG, Hunter K (2004): Caffeine suppresses metastasis in a transgenic mouse model: a prototype molecule for prophylaxis of metastasis.
Clin Exp Metastasis 21, 719-735.
- Yeatman TJ, Cher ML, Mao W, Wloch M, Tedesco T (1996): Identification of genetic alterations associated with the process of human experimental colon cancer liver metastasis in the nude mouse.
Clin Exp Metastasis 14, 246-252.

Yousef GM, Borgoño CA, Popalis C, Yacoub GM, Polymeris ME, Soosaipillai A, Diamandis EP (2004): In-silico analysis of kallikrein gene expression in pancreatic and colon cancers.

Anticancer Res 24, 43-51.

Zeitoun G, Mourra N, Blanché-Koch H, Thomas G, Olschwang S (2008): Genomic profile of colon cancer metastases.

Anticancer Res 28, 3609-3612.

Danksagung

Herrn Professor Dr. med. M. B. Ghadimi danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die Unterstützung bei der Auswertung. Unvergesslich werden mir die Abende im Labor in Erinnerung bleiben, in denen er Dienst hatte und zwischen Operationssaal und Notaufnahme vorbeischaute.

Herrn Dr. med. M. Grade danke ich für die Einarbeitung im Labor sowie die Hilfestellungen und Korrekturen an dieser Arbeit.

Frau Professor Dr. B. Kulle danke ich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Arbeit und des Papers.

Den Mitarbeitern der Abteilung Gastropathologie danke ich für die vielen kleinen Hilfen, die man bei der täglichen Laborarbeit benötigt.

Meinen Eltern und meiner Lebenspartnerin Sabine Ecker danke ich für die orthographischen Korrekturen an dieser Arbeit.

Wiesbaden, den 13.5.2011

Lebenslauf

Ich wurde am 10. Oktober 1976, als Sohn von Wolfgang und Bettina Mönkemeyer, in Uelzen geboren. Meine Kindheitsjahre mit Abschluss meiner Schulbildung 1996 verbrachte ich in Clausthal-Zellerfeld.

Nach Ableistung meines Zivildienstes am Robert-Koch-Krankenhaus in Clausthal-Zellerfeld begann ich 1997 mit dem Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen. Das dritte medizinische Staatsexamen legte ich 2004 ab und bekam die Erlaubnis zur Tätigkeit als Arzt im Praktikum.

Als Arzt im Praktikum nahm ich 2004 im Wirbelsäulenzentrum bei Herrn Professor Dr. med. M. Richter im St. Josefs-Hospital Wiesbaden meine erste Stelle an. Im Oktober 2004 erhielt ich die Approbation als Arzt.

Im Jahre 2006 wechselte ich an die Universität Göttingen und arbeitete in der Abteilung für Allgemein- und Viszeralchirurgie bei Herrn Professor Dr. med. H. Becker.

Im Jahre 2009 zog ich zurück nach Wiesbaden und arbeite seitdem in der Abteilung für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie von Herrn Professor Dr. med. L. Rudig in Rüsselsheim.

Am 22. Dezember 2009 bekamen meine Lebenspartnerin Sabine Ecker und ich unseren Sohn Noah Ecker. Am 26. April 2011 kam unsere Tochter Anna Ecker zur Welt.

Carsten Thomas Mönkemeyer

Wiesbaden, den 13.5.2011