Aus dem Institut für Pathologie
der Philipps-Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. R. Moll
Abteilung für Neuropathologie
Leitung: Prof. Dr. H.-D. Mennel

Kartierung chromosomaler Aberrationen der Chromosomen 9p21, 13q14.3 und 20q13 in sporadischen Coloncarcinomen mit Hilfe einer semiquantitativen Polymerasekettenreaktion

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt

von
Cornelia Siewecke
aus
Bielefeld

Marburg 2002

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 12. September 2002
gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs
Dekan: Prof. Dr. B. Maisch
Referent: Prof. Dr. H.-D. Mennel
Korreferent: Prof. Dr. K. H. Seifart
2. Korreferent: Prof. Dr. E. Weihe

Meinen lieben Eltern

INHALTSVERZEICHNUNG

1 EINLEITUNG 8

1.1 Problemstellung 8

1.2 Epidemiologie des colorectalen Carcinoms 8

1.3 Klinik und Vorsorge des CRC 9

1.4 Klassifikation des CRC 10

1.5 Operative und adjuvante Therapie des CRC 13

1.6 Die Ätiologie des CRC und seine Prävention 14

1.6.1 Die Rolle der Ernährung und Möglichkeiten der Chemoprävention 14

1.6.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen 15

1.6.3 Familiäre Tumorerkrankungen des Gastrointestinaltraktes 15

1.7 Die molekulare Genetik der CRC 23

1.7.1 Onkogene und Tumor-Suppressor-Gene 24

1.7.2 Das Ki-ras-Proto-Onkogen 25

1.7.3 Das APC-Gen 26

1.7.4 Das Tumor-Suppressor-Gen p53 27

1.7.5 Das DCC-Gen 27

1.7.6 Die Adenom-Carcinom-Sequenz 28

1.8 Das Chromosom 9p und die Rolle des CDKN2-Gens in der Pathogenese von Malignomen 30

1.9 Das Chromosom 13q und die Rolle des Retinoblastom-Gens in der Pathogenese von Malignomen 32

1.10 Das Chromosom 20q und die Rolle des CAS-Gens in der Pathogenese von Malignomen 33

1.11 Zielsetzung 36

2 MATERIAL UND METHODIK 37

2.1 Material 37

2.1.1 Chemikalien und Geräte 37

2.1.2 Untersuchungsmaterial 37

2.1.3 Oligonukleotid-Primer 41

2.2 Methoden 42

2.2.1 DNA-Isolierung aus Gefriermaterial 42

2.2.2 Untersuchung der Tumor- /Normal-Gewebeproben mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion 43

2.2.3 Die Gelelektrophorese 44

2.2.4 Bestimmung der optischen Dichte von Bandenmustern auf Polyacrylamidgelen 45

3 ERGEBNISSE 46

3.1 Detektion chromosomaler Alterationen in spezifischen Bereichen der Chromosomen 9p, 13q und 20q 46

3.1.1 Untersuchung des Chromosoms 9p im Bereich des CDKN2-Gens und benachbarter Loci 46

3.1.2 Untersuchung des Chromosoms 13q im Locus Rb 1.20 und einem benachbarten Locus 49

3.2 Untersuchung des Chromosoms 20q im Bereich des CAS-Gens und benachbarter Loci 52

3.2.1 Der humane SRC-Genlocus 52

3.2.2 Der humane PTPN1-Genlocus 55

3.2.3 Der humane EDN3-Genlocus 57

3.2.4 Der humane CAS-Genlocus 59

3.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse 61

3.3 Korrelation zwischen den molekulargenetischen Ergebnissen und den klinisch-pathologischen Daten 66

3.3.1 Chromosom 9 66

3.3.2 Chromosom 13 66

3.3.3 Das Chromosom 20q 67

3.4 Der Locus D20S96 76

4 DISKUSSION 77

4.1 Der Nachweis eines LOH mit Hilfe der qualitativen PCR 78

4.2 Der Nachweis einer Amplifikation mit Hilfe der quantitativen PCR 79

4.3 Verluste der Heterozygosität im Bereich der Chromosomen 9p und 13q 81

4.3.1 Die Chromosomenregion 9p21-22 81

4.3.2 Die Chromsomenregion 13q14.3 82

4.3.3 Patientengut, Tumorlokalisation und Tumorhistologie 84

4.3.4 Korrelation zwischen dem Auftreten eines LOH, den Angaben zum Patientengut und den klinischen und histo-pathologischen Parametern 85

4.4 Bewertung der Untersuchung der Chromosomenregion des CAS-Gens mit Hilfe der semiquantitativen PCR 85

4.5 Bedeutung der Resultate für die Molekularbiologie des CRC 87

4.6 Perspektiven in der Onkologie 88

5 ZUSAMMENFASSUNG 90

6 LITERATURVERZEICHNIS 92

7 ANHANG 110

7.1 Übersicht der Ergebnisse der OD-Messung (Chromosom 20q) 110

7.2 Abkürzungen 117

7.3 Lebenslauf 120

7.4 Verzeichnis der akademischen Lehrer 122

7.5 Danksagung 124

7.6 Ehrenwörtliche Erklärung 125

1. Einleitung

1.1 Problemstellung

Die maligne Transformation eines Gewebes resultiert aus einer Serie von genetischen Alterationen, die zu einer aberranten Regulation der Zellteilung, der Apoptose und der DNA-Reparatur führen können. Fearon und Vogelstein untersuchten genetische Alterationen in colorectalen Neoplasien in verschiedenen Stadien der neoplastischen Transformation (Adenom-Carcinom-Sequenz) und demonstrierten, daß Carcinome den Phänotyp einer schrittweisen Akkumulation von genetischen Alterationen im Zellkern darstellen (Fearon und Vogelstein 1990). Somit liefern colorectale Carcinome (CRC) eines der besten Modellsysteme, die Tumorigenese auf molekularer Ebene zu verstehen. Das Kennzeichen des hereditären Nicht-Polypösen-CRC-Syndroms, dem häufigsten familiären Carcinom-Syndrom, sind Mikrosatelliten-instabilitäten (MIN). Durch molekular- und cytogenetische Vorarbeiten konnte gezeigt werden, daß grobe chromosomale Aberrationen statistisch signifikant häufiger in MIN-negativen CRC auftreten (Schlegel 1995). Ferner wurden chromosomale Abschnitte spezifiziert, die mit einem aggressiven Wachstums-verhalten assoziiert waren. In der vorliegenden Arbeit sollen diese chromo-somalen Regionen eingehender untersucht und eingegrenzt werden.

1.2 Epidemiologie des colorectalen Carcinoms

Der Kampf gegen Krebs ist nicht gewonnen, aber die Entwicklung eröffnet Hoffnungen. Erstmals wurde 1988 festgestellt, daß die Mortalitätsziffern der meisten Krebserkrankungen in Europa gesunken sind oder sich stabilisiert haben. Dieser günstige Trend setzte sich auch bis zum Ende der 90er Jahre fort (Meyer 1999).

In Deutschland ist das CRC mit Raten von 25-30 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner und Jahr nach dem Bronchialcarcinom beim Mann und dem Mammacarcinom der Frau die zweithäufigste maligne Erkrankung (Lehnert 1999).

Die Inzidenz des CRC hat sich von 1960 bis 1980 verdoppelt, so daß das CRC in den westlichen Industrieländern 12% aller carcinombedingter Todesfälle ausmacht (Conners 1995, Schmiegel 2000). Die Mortalität des CRC hat sich bei Männern in den 90er Jahren jedoch stabilisiert und ist bei Frauen seit Ende der 80er Jahre sogar rückläufig (Meyer 1999).

Das Lebenszeitrisiko, an einem CRC zu erkranken, beträgt ca. 6%, wobei die Mehrzahl der Carcinome nach dem 50. Lebensjahr auftreten (Schmiegel 2000). Somit kommt dem CRC in den westlichen Industrieländern eine hohe sozio-ökonomische Bedeutung zu.

1.3 Klinik und Vorsorge des CRC

Die Symptome des CRC sind diskret und treten meist erst nach Monaten oder Jahren auf. Als erstes Symptom treten Änderungen der Stuhlgewohnheiten, Leistungsknick und Gewichtsverlust auf. Besonders proximal (Colon ascendens et transversum) gelegene Tumoren verursachen wegen der weichen Stuhlbeschaffenheit erst spät bei lokal fortgeschrittenem Wachstum eine Stenosesymptomatik.

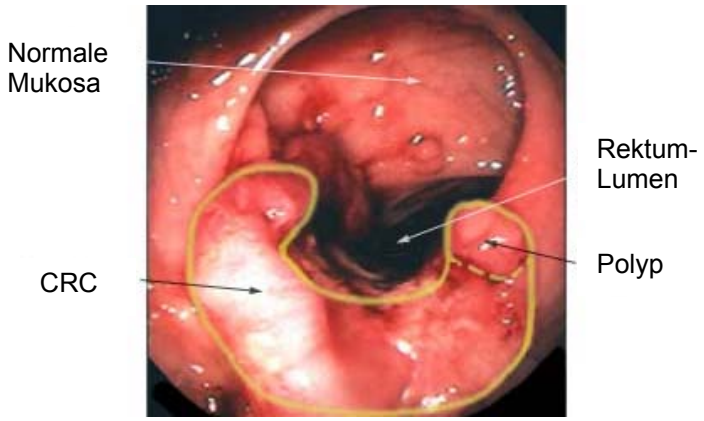


Abbildung 1: *Rektoskopischer Befund eines CRC und eines Polypen (mit freundlicher Genehmigung der Firma A Med-World AG, Berlin).*

Bei weiter distal (Sigmoid und Rectum) gelegenen Tumoren wird häufig Blut makroskopisch sichtbar, auch findet sich gelegentlich ein Schleimabgang. Schmerzen sind nur schwach ausgeprägt und zumeist - wie auch die mikrozytäre Eisenmangelanämie - ein Spätsymptom.
Die WHO empfiehlt daher für asymptomatische Personen ab dem 50. Lebensjahr neben dem Screening durch jährlichen Stuhltest auf okkultes Blut eine Sigmoidoskopie im Abstand von 5 Jahren (Lehnert 1999).

1.4 Klassifikation des CRC

Die überwiegende Anzahl der CRC befindet sich im Rectum (50%), gefolgt von den Carcinomen im Sigmoid mit einer Häufigkeit von ca. 25%. Anatomisch besteht keine exakte Grenze zwischen Rectum und Sigmoid. Für die Definition entscheidend ist die Höhe des Tumorunterrandes, die mit dem starren Rectoskop ab Anocutangrenze gemessen wird: bis 16 cm Höhe liegt ein Rectumcarcinom vor, darüber ein Sigmacarcinom. In den letzten Jahren wurde eine relative Zunahme proximal gelegener CRC beobachtet.

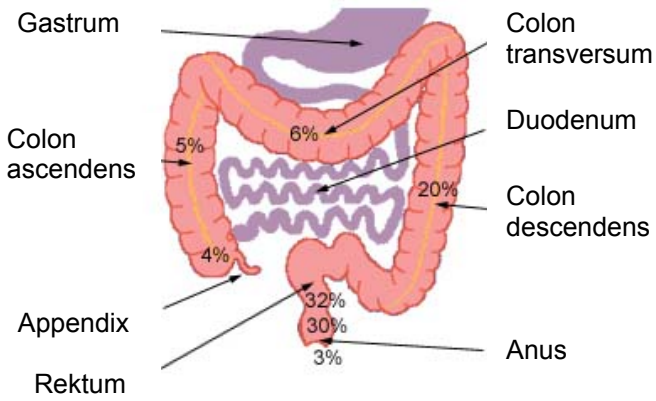


Abbildung 2: *Prozentuale Häufigkeitsverteilung des CRC nach Lokalisation (mit freundlicher Genehmigung der Firma A Med-World AG, Berlin).*

Im Colon wie auch im Rectum werden histologisch 6 Carcinomtypen unterschieden. Nahezu 80% der Carcinome sind Adenocarcinome, 20%

muzinöse Adenocarcinome. Selten finden sich dagegen Siegelring- und undifferenzierte Carcinome. Raritäten stellen die Plattenepithelcarcinome und adenosquamösen Carcinome dar.
Die Metastasierung erfolgt über eine lympho- und/oder hämatogene Ausbreitung. Die Lymphabflußwege des Colons entsprechen der arteriellen Versorgung entlang der A. ileocolica, A. colica dextra, den beiden Ästen der A. colica media und dem kurzen Stamm der A. mesenterica inferior mit der A. colica sinistra und den Aa. sigmoideae.
Entsprechend dem venösen Abfluß über das Pfortadersystem ist die Leber mit 70-80% bei hämatogener Metastasierung betroffen. Es folgt das Peritoneum mit 17-32%, die Lunge mit 12-37% und dann in absteigender Häufigkeit Skelett, Nebennieren und Gehirn (Lehnert 1999).

Die Prognose von Patienten mit CRC wird im Wesentlichen von dem Grad der Tumorinfiltration und -disseminierung bestimmt. Die Stadieneinteilung erfolgt mit Hilfe bildgebender Verfahren, intraoperativer und histologischer Befunde.

Es werden 3 histologische Differenzierungsgrade des CRC unterschieden:
1. Hohe Differenzierung (G_1): Carcinome mit histologischen und zellulären Charakteristika, die normalem Epithel sehr ähnlich sind (reguläre Drüsenstruktur, geringe Zellkernpleomorphie).
2. Mäßige Differenzierung (G_2): Irregularitäten der Drüsenform, Zellkernpleomorphie, Nekroseherde, erhöhte Mitoseaktivität.
3. Niedrige Differenzierung (G_3): Carcinome mit histologischen Charakteristika, die nur noch eine geringe Ähnlichkeit zum Normalepithel aufweisen (solide Tumorzellnester, hochgradige Zellkernpleomorphien, zahlreiche Mitosefiguren).

Die klinische Stadieneinteilung (Staging) erfolgte bis 1987 nach Dukes, der schon 1932 einen Zusammenhang zwischen der Eindringtiefe und der klinischen Prognose des CRC postulierte (Dukes 1932). 1967 wurde diese Stadieneinteilung zusätzlich noch um das Stadium Dukes D (Stadium der Fernmetastasierung mit einer deutlich schlechteren Prognose als das Stadium Dukes C) ergänzt (Turnbill 1967).

Dukes A	Tumor auf Mukosa, Submukosa bis Serosa beschränkt (ca. 90%)
Dukes B_1	Durchsetzung der Serosa mit Infiltration des angrenzenden Fettgewebes
Dukes B_2	Infiltration der Umgebung
Dukes C	Regionale Lymphknotenmetastasen
Dukes D	Fernmetastasen

***Tabelle 1**: Stadieneinteilung des CRC nach Dukes, modifiziert nach Turnbill.*

Mittlerweile ist durch verbesserte Früherkennungsmaßnahmen, Therapie und Nachsorge eine 5-Jahre-Überlebensrate bei Dukes A von 99%, bei Dukes B von 80% und bei Dukes C von 45% erzielt worden. Bei Dukes D liegt sie immer noch bei 0%.

Heute erfolgt die Stadieneinteilung der colorectalen Tumore nach dem TNM-System gemäß den Empfehlungen der UICC (Wittekind 1997).

T_0	Kein Anhalt für einen Primärtumor
T_{is}	Tumor beschränkt sich auf Mukosa oder Mukosa und Submukosa
T_2	Tumor mit Ausdehnung auf Muscularis propria oder Serosa
T_3	Tumor mit Ausdehnung auf unmittelbar angrenzende Strukturen
T_4	Tumor mit Ausdehnung auf die unmittelbar angrenzenden Organe und Gewebe hinaus
T_x	Minimalerfordernisse zur Beurteilung des Primärtumors sind nicht erfüllt
N_0	Kein Anhalt für einen Befall regionaler Lymphknoten
N_1	Befall von 1 - 3 regionalen Lymphknoten
N_2	Metastasen in 4 oder mehr Lymphknoten
N_x	Minimalerfordernisse zur Beurteilung der regionalen Lymphknoten sind nicht erfüllt
M_0	Kein Anhalt für Fernmetastasen
M_1	Fernmetastasen vorhanden
M_x	Minimalerfordernisse zur Beurteilung von Fernmetastasen sind nicht erfüllt

***Tabelle 2**: TNM-Staging der CRC nach UICC.*

Die zumeist erst postoperative Stadieneinteilung der CRC erfolgt wie in Tabelle 3 dargestellt.

Stadium I_a	T_1	N_0	M_0	Dukes A
Stadium I_b	T_2	N_0	M_0	
Stadium II	T_3	N_0	M_0	Dukes B
Stadium III	T_4	N_0	M_0	Dukes C
	jedes T	$N_{1,2}$	M_0	
Stadium IV	jedes T	jedes N	M_1	Dukes D

***Tabelle 3**: Stadieneinteilung der CRC.*

1.5 Operative und adjuvante Therapie des CRC

Die chirurgische Therapie des CRC besteht in der radikalen Resektion des Tumor tragenden Darmabschnittes mit dem zugehörigen regionalen Lymphabflußgebiet, gegebenenfalls unter Mitentfernung adhärenter Organe. Zur Bestimmung einer pN_0-Kategorie müssen mindestens 12 regionäre Lymphknoten patho-histologisch untersucht werden.
Zur Entfernung des intramuralen mikroskopischen Tumorwachstums ist grundsätzlich eine Resektionsgrenze von 2 cm ausreichend.
Durch adjuvante Behandlung soll das Rezidivrisiko nach kurativer Resektion (R_0) des Coloncarcinoms verringert werden. Für Patienten mit einer R_0-Resektion im Stadium I, II und IV wird keine adjuvante Therapie empfohlen. Eine adjuvante Behandlung im Stadium III sollte möglichst in klinischen Studien erfolgen. Außerhalb von Studien wird die Behandlung mit 5-Fluorouracil/Levamisol bzw. Kalziumfolinat über ein halbes bis ein Jahr durchgeführt. Mit diesen Therapien wurde eine durchschnittliche Verbesserung der Überlebensrate von etwa 5% erzielt.
Zur Palliativbehandlung von CRC-Patienten stehen chirurgische, endoskopische, strahlentherapeutische, chemotherapeutische und medikamentöse Therapien zur Verfügung (Connors 1995, Junginger 1999, Wein 1998).

1.6 Die Ätiologie des CRC und seine Prävention

1.6.1 Die Rolle der Ernährung und Möglichkeiten der Chemoprävention

Das heute favorisierte multifaktorielle Modell der Carcinogenese beim sporadischen Coloncarcinom geht davon aus, daß exogene Faktoren in der langen Verlaufszeit von 10–20 Jahren sowohl akzelerierend als auch inhibierend auf die Carcinomentstehung einwirken können. Experimentelle und epidemiologische Hinweise zusammen genommen ist davon auszugehen, daß die Ernährung in dieser Zeit einen Schlüsselfaktor in der Modulation des CRC spielt. Ein entscheidender Punkt ist die Beobachtung, daß eine „western-style"-Diät, die Entstehung von präneoplastischen Läsionen zu begünstigen scheint (Lipkin 1999). Besonders häufig findet sich das CRC in den USA und in Europa, selten dagegen in Japan und Ländern mit einem niedrigen sozioökonomischen Standard. Während noch im Jahre 1978 eine 50-fache Differenz zwischen der Mortalität durch CRC zwischen den Hoch-Risiko- und den Niedrig-Risiko-Ländern lag, war diese Differenz 1992 auf einen Faktor 12 gefallen (Bansal 1996, Nelson 1999).

Faktoren, die das Wachstum einer Zellpopulation und den programmierten Zelltod steuern, sind die entscheidenden Elemente in der physiologischen Differenzierung des sich rasch erneuernden Darmepithels (Hall 1994, Loeb 1999). Ob eine Zelle des Dickdarmepithels in die Mitose, Apoptose oder den Zell-Zyklus-Arrest übergeht, ist von Signalen eines komplizierten Netzwerkes abhängig, welches die Ernährung mit einschließt (Lipkin 1999).

In den 60er Jahren postulierte Wynder als erster, daß die Induktion eines CRC hauptsächlich mit dem Fettgehalt der Nahrung zusammen hänge (Wynder 1969). Seither ist man zu der Überzeugung gelangt, daß vor allem tierische Fette das Risiko, an einem CRC zu erkranken, erhöhen, wohingegen eine Diät, die reich an Omega-3-Fettsäuren ist, dieses erniedrigt. Zusätzlich scheint eine insgesamt kalorienarme und faserreiche Ernährung, ebenso wie die vermehrte Aufnahme von Kalzium, Selen, Vitamin A, C, D und E günstig zu sein (Lipkin 1999, MacLennan 1997, Nelson 1998, Nixon 1995).

Eine weitere protektive Wirkung soll die Einnahme von nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAID, z.B. Indomethacin, Aspirin, Ibuprofen) haben, indem

diese die Inzidenz des CRC bzw. die Mortalität an diesem senken als auch vor der Entstehung von Adenomen schützen (Bansal 1996, Collet 1999, DuBois 1996, Trujillo 1994).

1.6.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Zwar entstehen weniger als 1% der CRC auf dem Boden einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung, doch muß bei einer Colitis ulcerosa oder einem Morbus Crohn ein erhöhtes Krebsrisiko angenommen werden. Das Risiko an einem CRC zu erkranken erhöht sich 8 bis 10 Jahre nach Beginn einer ulcerativen Colitis exponentiell. Falls sich betroffene Patienten nicht einer prophylaktischen Colektomie unterzogen haben, entwickeln ca. 25-30% der Patienten nach 40 Jahren ein CRC (Bansal 1996).
Von nur einem geringfügig niedrigeren Risiko sind Patienten behaftet, die unter einem Morbus Crohn leiden (Bansal 1996, Schmiegel 2000).

1.6.3 Familiäre Tumorerkrankungen des Gastrointestinaltraktes

Es gibt 3 frühe große Studien, die sich mit dem familiären Risiko an einem CRC zu erkranken, beschäftigt haben. Diese Studien aus den späten 50ern [Utha, USA (Woolf 1958)], den 60ern [Ohio, USA (Macklin 1960)] und den 70er Jahren [London, Großbritannien (Lovett 1976)] untersuchten über einen definierten Zeitraum das Risiko für Verwandte 1. Grades von Patienten, die an einem CRC erkrankt waren, ebenfalls an einem CRC zu erkranken. Alle 3 Studien ergaben, daß sich das Risiko gegenüber der Normalbevölkerung um das 3,5-fache erhöhte. In den letzten 20 Jahren wurden ähnlich angelegte Studien mehrfach wiederholt. Es hat sich herausgestellt, daß Personen mit einem Verwandten 1. Grades, der an einem CRC erkrankt ist, ein zweifaches, Personen mit 2 betroffenen Verwandten 1. Grades ein vierfaches Risiko haben, und daß bei Personen, die erkrankte Verwandte 1. Grades haben, die bei Diagnosestellung unter 50 Jahre alt gewesen sind, sich das Risiko nochmals verdoppelt (Ahsan 1998, Burt 1996, Petersen 1995, Srivastava 1996).

Es wurden erbliche Syndrome identifiziert, die für eine colorectale Neoplasie prädisponieren oder sogar sicher in einer solchen münden. Ihr Anteil in Bezug auf alle auftretenden colorectalen Tumoren beträgt 10-15%.

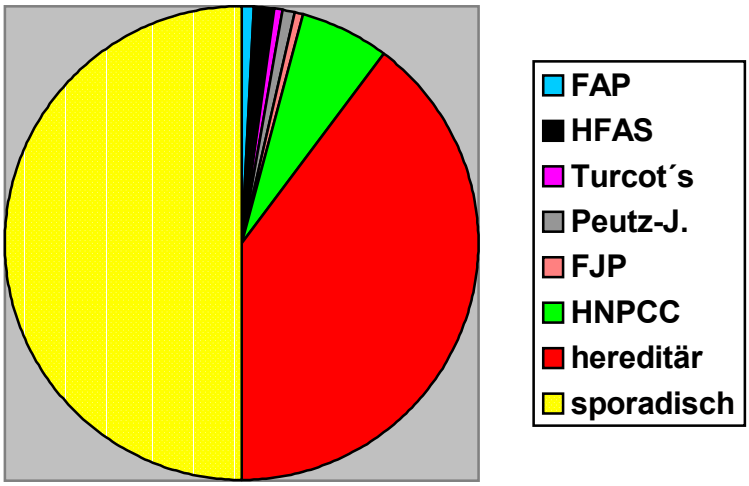


Abbildung 3: *Häufigkeitsverteilung der hereditären und sporadisch auftretenden CRC.*
Legende: *Autosomal dominant bedingt:* ***FAP****: Familiäre Polyposis,* ***HFAS:*** *Hereditäres flat adenoma Syndrom,* ***Turcot´s:*** *Turcot´s Syndrom,* ***Peutz-J.:*** *Peutz-Jeghers Syndrom,* ***FJP:*** *Familiäre juvenile Polyposis,* ***HNPCC:*** *Hereditäres Coloncarcinom Syndrom.* ***Sporadisch:*** *sporadisch multifaktoriell auftretend,* ***hereditär:*** *polygenetisch bedingt auftretend (modifiziert nach Watne 1997).*

Bei Patienten, die unter einem familiären Tumor-Syndrom leiden, wird zwischen einem dominanten und einem rezessiven Vererbungsmodus unterschieden, so daß die Prädisposition einen malignen Tumor zu entwickeln, durch ein oder beide Elternteil(e) vererbt wird, welche(r) Träger einer Keimlinienmutation ist (sind). Alternativ findet sich in Patienten ohne eine familiäre Vorbelastung in einer einzelnen Zelle - beispielsweise denkbar durch die Einwirkung von kanzerogenen Agentien - eine somatische Mutation, die den Anfang einer malignen Transformation darstellt. Das heißt, Exposition und

Disposition bestimmen das Risiko, an einer Neoplasie zu erkranken (Lairmore 1997).

1.6.3.1 Das hereditäre CRC-Syndrom

Auf dem Boden des hereditären autosomal-dominanten Nicht-Polypösen-CRC- (Heriditary non-polyposis colon carcinoma (HNPCC) -oder auch Warthin-Lynch-) Syndroms entstehen 5-10% aller CRC (Lynch-I-Syndrom) (Lynch 1998). Das Tumorspektrum des HNPCC-Syndroms beschränkt sich jedoch nicht nur auf das Colon und das Rektum, sondern manifestiert sich auch im Endometrium, in den Ovarien, im Magen, im Dünndarm, in der Leber, im Pankreas oder im Übergangsepithel des Nierenbeckens und im Uterus (assoziierte Carcinome, Lynch-II-Syndrom). Die Penetranz der Erkrankung wird auf 80-90% geschätzt (Lynch 1996, Watson 1994).

Für die klinische Diagnose eines HNPCC-Syndroms ist die Anamnese mit Berücksichtigung folgender Kriterien entscheidend:

Amsterdam-Kriterien zur Diagnose des HNPCC:

1. mindestens 3 Familienmitglieder mit CRC
2. mindestens 2 aufeinanderfolgende Generationen betroffen
3. ein Familienmitglied erstgradig verwandt mit den beiden anderen
4. ein Betroffener zum Zeitpunkt der Diagnose jünger als 50 Jahre
5. Ausschluß einer familiären adenomatösen Polyposis

(Punkte 1-5 müssen erfüllt sein) (Vasen 1991)

Im Jahre 1997 wurden den Amsterdam-Kriterien die Bethesda-Kriterien hinzugefügt, die sowohl das Lynch-II-Syndrom als auch histopathologische Kriterien mit berücksichtigen, wodurch sich das Risiko, die Prävalenz des HNPCC-Syndroms zu unterschätzen, verringert:

Bethesda-Kriterien zur Diagnose des HNPCC

1. Patienten mit Krebserkrankung in Familien, die die Amsterdam-Kriterien erfüllen
2. Patienten mit 2 HNPCC-assoziierten Carcinomen, einschließlich synchroner und metachroner CRC oder assoziierter extracolorectaler Carcinome
3. Patienten mit CRC und einem Verwandten 1. Grades mit colorectalem oder assoziiertem extracolorectalem Carcinom und/oder einem colorectalem Adenom; eine der Krebserkrankungen wurde im Alter < 45 Jahren diagnostiziert, das Adenom < 40 Jahren
4. Patienten mit CRC oder Endometriumcarcinom diagnostiziert im Alter < 45 Jahre
5. Patienten mit rechtsseitigem CRC mit einem undifferenzierten (solid/cribriform) Zelltyp in der Histopathologie diagnostiziert im Alter < 45 Jahren
6. Patienten mit CRC vom Siegelringtyp diagnostiziert im Alter < 45 Jahren
7. Patienten mit Adenomen diagnostiziert im Alter < 40 Jahren

(Einer der Punkte muß erfüllt sein) (Lehnert 1999, Rodriguez-Bigas 1997)

Einfache repetitive Dinukleotid-Sequenzen (Tandem-Repeats) der DNA werden als Mikrosatelliten bezeichnet. Das molekulargenetische Kennzeichen des HNPCC-Syndroms sind in 90% der Fälle eine Expansion oder Reduktion der Anzahl von kurzen Tandem-Repeats, sogenannte Mikrosatelliteninstabilitäten. Ursächlich für diese MIN sind defekte Reparaturenzyme [„**m**is**m**atch-**r**epair-system" (MMR)], wobei die MIN als phänotypisches Merkmal des HNPCC-Syndroms angesehen werden.

Enzyme des MMR erkennen fehlerhafte Basenpaarungen (mismatches) nach DNA-Replikation und berichtigen diese. Fehler, die vom MMR korrigiert werden sind nicht nur falsch zusammengefügte Basenpaare, sondern auch sogenannte „loop-outs" (herausstehende Schleifen) von nicht gepaarten Basen, die im neu synthetisierten DNA-Strang als Folge eines „Ausrutschen" („slippage") der DNA-Polymerase entstehen können. Solche

Mutationen treten besonders häufig im Bereich von repetitiven DNA-Sequenzen auf (Rüschoff 1995).

Es ist davon auszugehen, daß nicht nur Tandem-Repeats von diesen Replikationsfehlern betroffen sind, sondern ebenso Onkogene aktiviert und Tumor-Suppressor-Gene (z.B. das p53- oder APC-Gen) inaktiviert werden können (Lazar 1994). Auch sporadisch auftretende CRC zeigen in ca. 20% der Fälle MIN. Es hat sich gezeigt, daß sowohl hereditäre als auch sporadisch auftretende CRC, die MIN positiv sind, eine vermehrte Lokalisation (70%) im proximalen (rechten) Colonabschnitt aufweisen und ein weniger aggressives Wachstumsverhalten zeigen (Thibodeau 1993, Watson 1998).

Der Ursprung der fehlerhaften Reparaturenzyme liegt in einer Mutation (genotypisches Merkmal des Syndroms) der sogenannten „mismatch-repair"-Gene hs MSH2 (Chromosom 2p21-22), hs MLH1 (3p21-23), hs PMS1 (2q31-33), hs MSH6 (2p15-16), hs MSH3 (5q11.2-13.3) und hs PMS2 (7p22) (letztere 3 wurden nur selten beschrieben). In nahezu 60% aller betroffenen Familien findet sich eine Mutation des hs MSH2-Gens (Bronner 1994, Fishel 1993, Lairmore 1997, Leach 1993, Nicolaides 1994, Nystrom 1994, Papadopoulos 1994).

Umgekehrt liegt das Risiko für Träger einer Keimlinienmutation des Gens hs MLH1 oder hs MSH2 an einem CRC zu erkranken bei 80% (Lynch 1996a, Lynch 1996b, Lynch 1998).

1.6.3.2 *Die Familiäre adenomatöse Polyposis, das Gardner und das Turcot`s-Syndrom*

Die Familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) ist ein autosomal-dominantes Syndrom, bei welchem sich multiple (wenigstens 100) neoplastische Polypen im Gastro-Intestinal-Trakt mit Bevorzugung des Dickdarms finden. Zur Manifestation der Erkrankung kommt es normalerweise in der vierten Lebensdekade der Patienten mit Blut im Stuhl, Schleimabgang und Diarrhöe. Die FAP ist eine obligate Präkanzerose und somit die Therapie der Wahl die Colektomie. Unbehandelte Patienten entwickeln fast ausnahmslos bis zum 55. Lebensjahr ein CRC.

Im Jahre 1991 wurde ein Tumor-Suppressor-Gen (**A**denomatous **P**olyposis **C**oli-Gen, APC) entdeckt, das bei über 90% aller Patienten mit FAP als

Keimbahnmutation alteriert und zwar zumeist deletiert ist. Dieses Gen ist auf dem Chromosom 5q21 lokalisiert. Die Immunhistochemie hat gezeigt, daß das normale APC-Genprodukt im Zytoplasma eine besonders hohe Expression von Zellen des Epithels der oberen Schichten der colorectalen Krypten aufweist (Groden 1991).

Die Assoziation von FAP, Desmoidzysten und benignen Exostosen wird als Gardner-Syndrom bezeichnet. Das sich autosomal dominant vererbende Syndrom zeigt eine disseminierte Adenomatose des Colons, häufig auch des Magens und des Dünndarms. Die Polypen treten ab dem 10. Lebensjahr auf und haben insbesondere ab der 30. Lebensdekade eine hohe Tendenz maligne zu entarten (Yowono 1996).

Die Kombination der FAP mit neuroepithelialen Tumoren des zentralen Nervensystems wurde Turcot´s-Syndrom genannt.

Das Gardner- und Turcot´s Syndrom zeigen ebenso wie die FAP Mutationen des APC-Gens. Für den jeweiligen Phänotyp der Erkrankung scheint die genaue Lokalisation der Mutation im APC-Gen ursächlich zu sein. Es konnte bislang jedoch noch kein sicherer Zusammenhang zwischen dem jeweiligen Sitz einer Mutation und der extracolischen Erkrankungsmanifestation gezeigt werden (Lasser 1994, O´Sullivan 1997).

	FAP	HNPCC	Sporadische CRC
Häufigkeit	1%	5-10%	90%
Altershöhepunkt (Jahre)	20-40	35-55	65-75
Lokalisation des Tumors	beliebig	70% proximal	40% rectal
MIN	0%	> 90%	15%
Mutationen	APC	hs MLH1, hs MSH2	polygenetisch, multifaktoriell
Zahl der Adenome	> 100	1-5	< 10

***Tabelle 4**: Gegenüberstellung der 2 häufigsten familiären Tumorsyndrome und des sporadischen CRC (nach Bocker 1999).*

1.6.3.3 Hamartomatöse Polyposis-Syndrome

1.6.3.3.1 Die Juvenile Polyposis

Juvenile Polypen im Colon oder Rectum finden sich in immerhin 1-2% aller Kinder. Bei der autosomal-dominant vererbten juvenilen Polyposis (JPS) des Colons, die sich um das 7. Lebensjahr manifestiert, finden sich regelmäßig zwischen 30 und 300 hamartomatöse Polypen. Im Vordergrund der Beschwerden stehen gastrointestinale Blutungen mit Anämie, Hypoproteinämie und einer damit verbundenen Entwicklungsverzögerung des Kindes (Friedl 1999).

Die Polypen bilden sich in der Pubertät in den meisten Fällen zurück. Wenn sie jedoch persistieren, sind sie als Präkanzerosen anzusehen und müssen abgetragen bzw. das betroffene Segment reseziert werden - andernfalls entwickeln 50% der Betroffenen im Laufe ihres Lebens ein CRC (Jarvinen 1993, Watne 1997).

Der genetische Defekt der JPS wurde 1998 in dem Tumorsuppressor-Gen MADH4 (Chromosom 18q21.1), welches in den TGF-ß- (transforming growth-factor-ß) Signaltransduktionsweg involviert ist, lokalisiert (Friedl 1999).

1.6.3.3.2 Das Peutz-Jeghers-Syndrom

Kennzeichnend für diese seltene autosomal-dominant vererbte Polypenerkrankung ist die Kombination aus hamartomatösen Polypen des Gastrointestinaltrakts und Pigmentmalen auf Wangen- und Lippenschleimhaut. Symptomatisch werden die Polypen durch kolikartige abdominale Schmerzanfälle auf Grund rezidivierender Invaginationen der Polypen, Symptome einer Eisenmangelanämie, Blutauflagerungen auf dem Stuhl oder Melaena (Friedl 1999).

Betroffene haben ein erhöhtes Risiko, schon in jungen Jahren an einem Carcinom des Gastrointestinaltraktes zu erkranken. Es sind regelmäßige endoskopische Kontrollen erforderlich, wobei Polypen nur dann zu exzidieren sind, wenn sie Komplikationen machen. Das Peutz-Jeghers-Syndrom ist mit Carcinomen der Brust, des Pankreas, des Ovars oder der Testis assoziiert (Boardman 1998, Giardiello 1987).

Als ursächlich wurde 1998 ein Gen identifiziert, welches für eine Serin-Threonin-Kinase kodiert, die von der zuständigen Kommission die Nummer 11 erhalten hat - deshalb die Bezeichnung STK11 (Chromosom 19p13.3) (Amos 1997, Hemminiki 1998, Wang 1998). Man geht davon aus, daß STK11 als Tumor-Suppressor-Gen an der Regulation von Zellteilungs-, Differenzierungs- oder Signaltransduktionsprozessen beteiligt ist (Gruber 1998).

1.6.3.3.3 Das Cowden-Syndrom

Patienten mit diesem Syndrom entwickeln im Laufe der zweiten Lebensdekade hamartomatöse Läsionen im Gesicht, am Lippenrot, der Mundschleimhaut, an Händen und Füßen sowie Tumoren der Schilddrüse, des Mammagewebes und des Magen-Darm-Traktes.

Ein Cowden-Syndrom kann bereits in der Kindheit diagnostiziert werden, wenn eine Keimbahnmutation im PTEN-Gen, das für eine regulatorische Phosphatase auf Chromosom 10 (P = Phosphatase, TEN = Chromosom 10) kodiert, vorliegt (Friedl 1999).

1.7 Die molekulare Genetik der CRC

Die Tumorigenese kann als ein Prozeß angesehen werden, bei dem Zellen genetische Mutationen akkumulieren, die sie in die Lage versetzen, ihre Proliferationskapazität zu erhöhen und somit einen Selektionsvorteil erhalten. Dieser kann letztendlich zu einer neoplastischen Transformation eines Gewebes führen.

Normale Zellen besitzen multiple Mechanismen, die sie vor Mutationen schützen, die auf der Ebene der Nucleotid-Sequenz und dem chromosomalen Level auftreten können. Diese Mechanismen beinhalten Enzyme, die DNA-Schäden reparieren und Signaltransduktionswege, die zu einem Arrest im Zellzyklus führen, wenn individuelle Stadien im Zellzyklus noch nicht beendet sind. Normale Zellen werden somit daran gehindert, eine DNA-Replikation durchzuführen, wenn DNA-Schäden bestehen. Insofern ist es nicht überraschend, daß sich Mutationen von Krebszellen vornehmlich in Genen finden, die die Stabilität des Genoms kontrollieren (Carethers 1996, Loeb 1999).

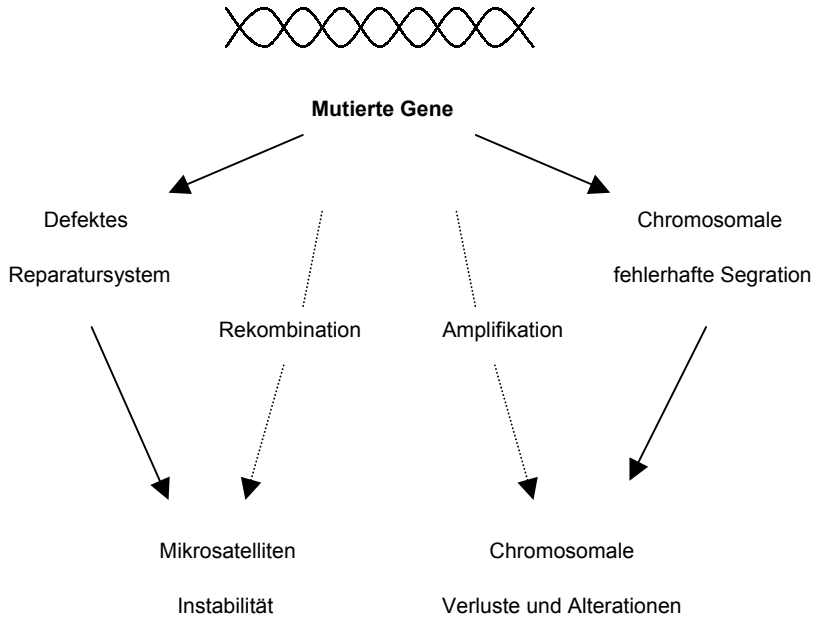


Abbildung 4: *Mutationen im Zellkern können auf verschiedenen Pfaden in einem mutierten Phänotyp enden (nach Loeb 1999).*

1.7.1 Onkogene und Tumor-Suppressor-Gene

In den letzten Jahrzehnten war eine der entscheidenden Entdeckungen auf der Suche nach den genetischen Ursprüngen von Tumoren das Aufspüren von Onkogenen und mutierten Tumor-Suppressor-Genen, welche sich in einer Vielzahl von Tumoren finden lassen und für den neoplastischen Charakter ihrer Zellen verantwortlich zu sein scheinen (Friend 1988).

Proto-Onkogene sind ein Teil des normalen Genoms und werden erst durch eine somatische Mutation (z.B. Amplifikation, Rekombination oder Punktmutation) aktiviert. Die Aktivierung eines Proto-Onkogens zu einem Onkogen führt entweder zu einer strukturellen Änderung des Genproduktes oder zu einer überproportionalen Konzentration eines normalen Proteins in einer Zelle (Land 1983). Proto-Onkogene scheinen eine essentielle Rolle in der Zell-Physiologie zu spielen und sind oft in die Regulation des normalen Zellwachstums involviert.

Es ist davon auszugehen, daß genetische Veränderungen in Onkogenen dominant wirken, da normalerweise der Defekt eines Allels ausreicht, um einen phänotypischen Effekt zu erzielen (Friend 1988, Hamilton 1993).

Dahingegen scheinen Tumor-Suppressor-Gene zelluläres Wachstum in Schach zu halten. Eine Inaktivierung dieser Gene kann also einen Verlust der negativen Regulation des Zellzyklus bedeuten, so daß Zellen in einen Zyklus der uneingeschränkten Zellproliferation eintreten können. Weiterhin wirken Tumor-Suppressor-Gene anscheinend auch fördernd auf die Ausdifferenzierung von Zellen, so daß der Funktionsverlust eines Tumor-Suppressor-Gens zu einer Entdifferenzierung eines Gewebes führen kann (Fearon 1990, Marshall 1991).

Somit könnte die Prädisposition für ein spezielles Tumorleiden seinen Ursprung in der ererbten oder auch Keimlinien-Inaktivierung einer Kopie eines Tumor-Suppressor-Gens haben. Im Folgenden kommt es bei einer von dieser Mutation betroffenen Person im Zielorgan zu einer somatischen Mutation (zumeist in Form einer Deletion) des bis zu diesem Zeitpunkt intakten zweiten Allels (Alexander 1986, Friend 1988, Hamilton 1993, Lairmore 1997). Das würde jedoch bedeuten, daß Tumor-Suppressor-Gene sich ausschließlich

rezessiv verhalten. Jedoch ist mit dieser Theorie die hohe Zahl der sporadisch auftretenden Tumoren (ca. 40%, Abbildung 3) in Bezug auf Suppressor-Gene schwer zu erklären, da 2 somatische Mutationen zusammentreffen müßten, um eine maligne Transformation zu induzieren. Dieses Problem führte zu der Hypothese, daß einige Tumor Suppressor-Gen-Mutationen ebenso wie die Onkogene einen Effekt auf das Wachstumsverhalten einer Zelle ausüben könnten, obwohl das ehemals homologe Wild-Typ-Allel noch intakt ist. Man spricht von einer dominant negativen Mutation: Mutierte Genprodukte interagieren mit Wild-Typ Gen-Produkten und inhibieren somit deren physiologische Funktion. Weiterhin wurde bereits für das p53-Gen (siehe Punkt 1.7.4) beobachtet, daß die Punktmutation in einem Allel häufig mit einem LOH (**L**oss **o**f **H**eterozygosity, Verlust der Heterozygosität) des Wild-Typ-Alles gekoppelt ist. Diese Beobachtung läßt darauf schließen, daß die eine molekulare Alteration die andere bedingt. Ein solcher Mechanismus ist auch für weitere Tumor-Suppressor-Gene denkbar (Carethers 1996, Fearon 1990, Friend 1988, Hamilton 1993, Marshall 1991).

Im Folgenden sollen die wichtigsten bislang bekannten Onkogene und Tumor-Suppressor Gene, die an der Tumorigenese des CRC beteiligt sind, kurz dargestellt werden.

1.7.2 Das Ki-ras-Proto-Onkogen

In etwa 50% (Studienergebnisse variieren zwischen 17 und 53%) aller CRC wurden Punktmutationen des Ki-*ras*-*G*ens (Chromosom 12p) in den Codons 12, 13 und 61 nachgewiesen. Eine ähnliche Prozentzahl an Mutationen wurde in Adenomen gefunden, die eine Größe von 1 cm überschritten hatten (Bos 1987, Morris 1996, Rashid 1999). Es ergaben sich deutliche Hinweise darauf, daß Ki-*ras*-Mutationen mit einer schlechteren Prognose der colorectalen Carcinomerkrankung verbunden sind (Finkelstein 1993).

Ki-*ras* ist ein Mitglied der *ras*-Proto-Onkogen-Familie (bei den anderen Mitgliedern handelt es sich um Ha-*ras* und N-*ras),* welche für ein ähnliches 21 kd schweres Protein (p 21 *ras*) kodieren, jedoch auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind. Wenn sich das Ki-*ras*-Protein in einem inaktivierten Zustand befindet, bindet es Guanosindiphosphat (GDP). Durch

einen Stimulus (z.B. durch eine Rezeptoraktivierung), wird GDP durch GTP (Guanosintriphosphat) ausgetauscht, wodurch Ki-*ras* in einen aktivierten Status übergeht. Das aktivierte Ki-*ras*-Molekül interagiert daraufhin mit mutmaßlichen Effektormolokülen über seine Effektordomäne und fördert auf diesem Wege das Zellwachstum. Nach dieser Interaktion wird das gebundene GTP augenblicklich wieder zu GDP hydrolysiert und Ki-*ras* geht in den inaktiven Status über. Dieser Signaltransduktionsweg ist durch ein mutiertes Ki-*ras*-Protein gestört. Stabilisiert sich ein mutiertes Ki-*ras*-Protein in seinem aktivierten Zustand, erlaubt dies der Zelle in eine unregulierte Proliferation und Transformation überzugehen (Charethers 1996).

1.7.3 Das APC-Gen

Zum anderen wurden in colorectalen Tumoren Deletionen von chromosomalen Abschnitten gefunden - zum Teil mit Mutationen des korrespondierenden Allels kombiniert -, welche allem Anschein nach Loci von Tumor-Suppressor-Genen beinhalten. In bis zu 35% aller sporadischen CRC wurde eine Deletion des Chromosoms 5q21 beobachtet (Solomon 1987), einem Abschnitt auf dem sich das APC-Gen und das MCC-Gen (**M**utated in **C**olorectal **C**arcinoma) befinden. Initial wurde die Region 5q21 verdächtigt, Träger eines Tumor-Suppressor-Gens zu sein, nachdem sich zeigte, daß dieser Chromosomenabschnitt konstitutionell bei Patienten mit FAP (siehe auch Punkt 1.6.3.2) deletiert ist.

Über 200 Keimbahnmutationen des mehr als 100 kb großen APC-Gens wurden gefunden. In den meisten Fällen handelt es sich bei der Mutation um eine Nonsens-Mutation, Insertion oder Deletion, die zu einem verstümmelten und somit inaktivierten Genprodukt führt. Eine zweite somatische Mutation oder Allel-Deletion des verbleibenden APC-Allel resultiert in einer tumorösen Transformation des betroffenen Gewebes.

Die Funktion des aus 2843 Aminosäuren bestehenden APC-Proteins mit einem Gewicht von 310 kd ist derzeit noch ungeklärt - man vermutet eine Assoziation mit dem Zytoskelett der Mikrotubuli und Zelladhäsionsmolekülen. Die somatische Mutation des APC-Gens findet sich in mehr als 2/3 aller sporadisch auftretenden colorectalen Neoplasien (Carethers 1996, Lairmore 1997, O´Sullivan 1998).

1.7.4 Das Tumor-Suppressor-Gen p53

Nahezu 75% aller in CRC nachgewiesenen Deletionen fanden sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 und dem langen Arm des Chromosoms 18 (Kern 1989, Vogelstein 1988). Am häufigsten war auf dem Chromosom 17p die Region 17p13.1 betroffen, die Träger des p53-Gens (benannt nach seinem Genprodukt mit einem Molekulargewicht von **53** KD) ist (Baker 1989). Tetramere des p53-Gens binden an Sequenzen der DNA in der Promotor-Region anderer Gene und regulieren deren Transkriptionsrate. Es wird vermutet, daß die meisten Gene, die durch p53 aktiviert werden können, in die negative Regulation des Zellwachstums involviert sind. Somit kann die Inaktivierung der p53-Funktion eine unkontrollierte Gewebsproliferation bedingen. Das p53-Protein spielt außerdem eine kritische Rolle in der Einleitung des programmierten Zelltods beim Auftreten geschädigter DNA. Über ein weiteres Gen (WAF1/CIP1) kann das p53-Protein zu einem Arrest des Zellzyklus in der G1-Phase führen, in welcher Zellen mit geschädigter DNA verbleiben, bis der Schaden repariert ist. Zellen mit einem defekten oder fehlendem p53-Protein gehen in die S-Phase des Zellzyklus über, ohne daß eine eventuell notwendige Reparatur erfolgen kann. Die dadurch ermöglichte Replikation geschädigter DNA kann wiederum zu onkogenen genetischen Veränderungen führen (Carethers 1996, Finlay 1989, Lairmore 1997, Marshall 1991).

Eine Vielzahl von Studien haben gezeigt, daß eine p53-Mutation mit einer verminderten 5-Jahre-Überlebensrate von CRC-Patienten assoziiert ist (Hamelin 1994).

1.7.5 Das DCC-Gen

In der Region des Chromosoms 18q21 befindet sich der Locus für das DCC-Gen (**D**eleted in **C**olorectal **C**arcinoma), welches eine Größe von 1,4 MB umfaßt. Das Gen kodiert für ein Protein von ca. 180 kd, welches vermutlich eine Rolle bei der Zell-Zell-Interaktion und -Adhäsion spielt. Der Verlust dieses Gens könnte zu einer mangelhaften Kontaktinhibition führen. Deletionen der Region 18q21 finden sich in ungefähr 50% aller späten Adenome und in 70%

aller CRC (Fearon 1988). Es wurde gezeigt, daß diese Deletionen mit einem leicht erhöhten Potential zur Metastasierung (Reymond 1998) und einer geringeren 5-Jahre-Überlebensrate assoziiert ist (Jin 1994, Kern 1989, Lairmore 1997, Lanza 1998, Martinez-Lopez 1998, Ogunbiyi 1998).

Nicht nur die Chromosomen 5q, 17p und 18q zeigten in colorectalen Tumoren Alterationen. Zusätzlich waren häufig (25-50% der untersuchten CRC) die Chromosomen 1q, 4p, 6p, 6q, 8p, 9q und 22q betroffen. Je mehr Chromosomen bei einem Patienten von Deletionen betroffen waren, desto schlechter erwies sich seine klinische Prognose (Kern 1989, Vogelstein 1989).
Die Vielfalt, die die verschiedenen colorectalen Tumoren bezüglich chromosomaler Veränderungen zeigen, ist möglicher Weise auch verantwortlich für die auffällige Heterogenität im Wachstumsverhalten dieser Tumoren.

Gen	Typ	Chromosom	Funktion
APC	Tumorsupressor-Gen	5q21-22	Wachstumssignal-inhibition
DCC	Tumorsupressor-Gen	18q21	Zell-Zell-Adhäsion
p53	Tumorsupressor-Gen	17p13.1	Transkriptionsfaktor, Wachstumsinhibiton, Zellzykluskontrolle
Ki-*ras*	Proto-Onkogen	12p12.1	Intrazelluläre Signaltransduktion

Tabelle 5: *In die colorectale Tumorigenese involvierte Gene (Carethers 1996).*

1.7.6 Die Adenom-Carcinom-Sequenz

Polypen zählen zu den häufigsten pathologisch-anatomischen Veränderungen des Dickdarms. Es wird unterschieden zwischen neoplastischen Polypen, zu denen Adenome und maligne Polypen gehören, und nicht-neoplastischen Polypen, die per definitionem nicht in ein Carcinom übergehen können, zu denen die hyperplastischen, hamartomatösen Polypen und die entzündlichen

Pseudopolypen gehören (Carethers 1996, Watne 1997). Das Verteilungsmuster dieser Schleimhautläsionen sowie das gehäufte Vorkommen in Populationen mit einem hohen Carcinomrisiko legen Beziehungen zum CRC nahe. Die Mehrzahl der hyperplastischen Polypen ist im rektosigmoidalen Bereich angesiedelt, der durch die längere Verweildauer des Stuhls einer erhöhten Exposition gegenüber möglicherweise darin enthaltenen kanzerogenen Substanzen unterliegt (Eckert 1997).
Über 80% der Colonpolypen sind adenomatöse Polypen, die echte Neoplasien des Drüsenepithels darstellen. Es wird zwischen villösen und tubulären Adenomen unterschieden.
Die Wahrscheinlichkeit des Vorliegens eines invasiven Carcinoms in einem Polypen steigt mit der Größe des Adenoms und liegt bei breitbasigen villösen Adenomen deutlich höher als bei tubulären Adenomen, tubuläre Adenome < 1 cm weisen in weniger als 1%, villöse Adenome > 2 cm in mehr als 20% einen Übergang in ein Carcinom auf (Lehnert 1999).

Das heutige Verständnis bezüglich der Entwicklung des CRC basiert auf dem Paradigma, welches Vogelstein und Fearon entwickelt haben (Fearon 1990).
Es wird vermutet, daß die Proliferation von Zellen des Darmepithels durch eine Inaktivierung des APC-Gens auf dem Chromosom 5q ausgelöst wird und in der Entstehung eines kleinen Adenoms resultiert (Goelz 1987, Watne 1997). In einem solchen Adenom tritt nachfolgend in wenigstens einer Zelle eine *ras*-Gen-Mutation auf und durch klonale Expansion entsteht ein größerer dysplastischer Tumor. Nun treten Deletionen der Chromosomen 17p und 18q hinzu. Welche dieser Mutationen letztendlich die Transformation eines Adenoms zu einem CRC mit nachfolgender Metastasierung einleitet, ist ungeklärt. Da sich jede der genannten Mutationen in allen Stadien der Tumorigenese finden läßt, spiegelt das Schaubild (Abbildung 5) lediglich eine Art Häufigkeitsverteilung des jeweiligen zeitlichen Auftretens der einzelnen Mutationen wieder. Mehr als 90% der untersuchten Carcinome hatten 2 oder mehr der 4 genannten Mutationen. Im Gegensatz dazu zeigten nur 7% der frühen Adenome mehr als eine der Mutationen. Diese Prozentzahl stieg bei den intermediären Adenomen auf 25% und auf 49% bei den späten Adenomen.

Es wurde beobachtet, daß erst eine Mutation von wenigstens 4 oder 5 Genen zu der Entstehung einer malignen Neoplasie führt. Veränderungen in weniger als 4 der genannten Gene fanden sich lediglich in gutartigen Tumoren. Obwohl bestimmte genetische Alterationen in einer bevorzugten Reihenfolge zu einander auftreten, scheint die Akkumulation der Genschäden für das Fortschreiten der Tumorigenese von größerer Bedeutung zu sein (Fearon 1990, Vogelstein 1988).

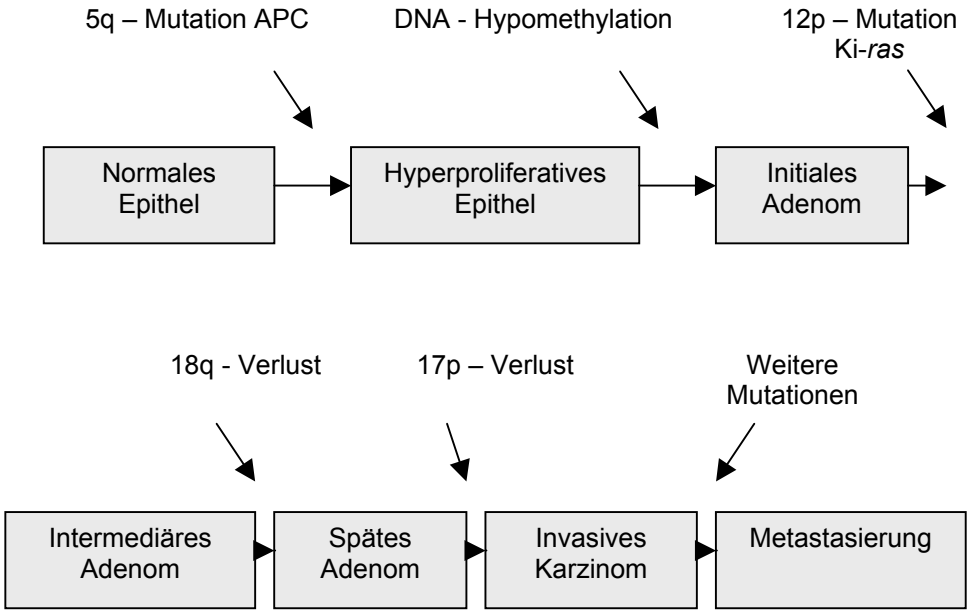


Abbildung 5: *Ein genetisches Modell für die colorectale Tumorigenese (modifiziert nach Fearon 1990).*

1.8 Das Chromosom 9p und die Rolle des CDKN2-Gens in der Pathogenese von Malignomen

Die Chromosomen-Region 9p21-22 ist seit der Entdeckung des Tumor-Suppressor-Gens CDKN2A (für *inhibitor of cyclin-dependent kinase,* auch bekannt als Produkt des MTS1, für *multiple tumour-suppressor1*, INK4a, p16) im Jahre 1994 Gegenstand umfangreicher Forschung (Kamb 1994, Nobori 1994). CDKN2A kodiert für ein 16 KD-Protein, welches schon im Jahre 1993 als ein Inhibitor von Cyklin-abhängigen Kinasen beschrieben wurde. Diese

sind ihrerseits Regulatoren der Zellteilung (G_1-Phase des Zellzyklus) (Serrano 1993).

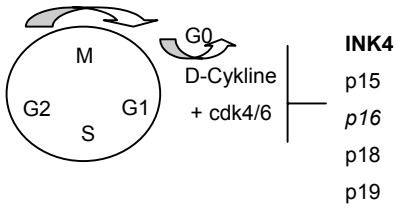


Abbildung 6: *Auszug aus dem Zellzyklus. Die Progression im Zellzyklus wird regiert von sequentiellen Formationen, Aktivierungen und Inaktivierungen einer Serie von Protein-Kinase-Komplexen, bestehend aus einer Cyklin-abhängigen Kinase (cdk) und Cyklin. Die cdks werden durch cdk-Inhibitoren negativ reguliert (nach Tsihilias 1999).*

Vorhergehende Studien haben gezeigt, daß die Region 9p21-22 häufig in Mammacarcinomen (Marsh 1997), Leukämien (Diaz 1990), Melanomen (Gruis 1995), Lungentumoren (Mead 1994), Gliomen (Ichimura 1994), Nierenzell-carcinomen (Cairns 1995), Ösophaguscarcinomen (Tarmin 1994) und in hepatozellulären Carcinomen (Piao 1998) einen Verlust der Heterozygosität oder eine homozygote Deletion aufweisen (Kamb 1994a).
In einer Arbeit aus dem Jahre 1995 wurde mit Hilfe der CGH (**C**omparative **g**enomic in Situ **H**ybridization) in CRC in 21% der Fälle (4/18) eine Deletion des Chromosomen 9p beobachtet. Ein LOH im Locus D9S171 (CDKN2A-Gen) konnte nur in einem von 18 Fällen (5,5%) nachgewiesen werden (Schlegel 1995).
In einer Untersuchung aus dem Jahre 1998 konnten in einem Kollektiv von CRC in bis zu 50% (20% von 10 Tumoren mit MIN und 50% von 16 Tumoren ohne MIN) der Fälle der Verlust eines Allels, nahe dem Tumor-Suppressor-Gen CDKN2A nachgewiesen werden (Tomlinson 1998).

1.9 Das Chromosom 13q und die Rolle des Retinoblastom-Gens in der Pathogenese von Malignomen

Das hereditäre Retinoblastom ist ein seltener pädiatrischer Tumor, welcher sich klinisch als eine autosomal dominante Erkrankung präsentiert.
Knudson entwickelte ein theoretisches Modell, nach welchem die Ursache des Retinoblastoms in 2 genetischen Alterationen liegt. Er vermutete, daß beim hereditären Retinoblastom eine Keimbahnmutation der Retinazelle vorliegt („first hit"), auf welche als ein somatisches Ereignis eine zweite Mutation mit Verlust des Wildtyp-Allels folgt („second hit"). In sporadischen Tumoren müßte es daher zu 2 somatischen Mutationen in einer Retinazelle kommen (Knudson 1971). Das Rb-Gen stellt somit den Prototyp eines Tumor-Suppressor-Gens dar.
Der Locus für das Rb-Gen wurde dem Chromosom 13q14.3 zugeordnet (Sparkes 1983). Das Gen hat eine Größe von 200 kb und kodiert für ein Protein, welches aus 928 Aminosäuren besteht. Das Rb-Protein wird während der G_1-Phase des Zellzyklus einer Phosphorylisierung unterzogen, welches seine Interaktion mit Mitgliedern der E2F-Familie modifiziert. Bei der E2F-Familie handelt es sich um Stimulatoren der Transkription von Genen, die in die Kontrolle des Zellwachstums involviert sind. Durch die Bindung von pRb an E2F, wird E2F als Transkriptionsaktivator inhibiert (Sellers 1997). Im Jahre 1995 fand man über Studien an transfizierten Osteosarkomzelllinien heraus, daß pRb nicht nur ein Regulator der Zellproliferation, sondern auch der Apoptose zu sein scheint (Haas-Kogan 1995). Ein Verlust der pRb-Funktion führt so zum Fehlen eines wichtigen Faktors der Wachstumsregulation.
Das Rb-Gen spielt nicht nur eine Rolle bei der Entwicklung von Retinoblastomen sondern auch bei der Formation anderer Tumoren. Sowohl Osteosarkome als auch Weichteilsarkome treten gehäuft bei Patienten auf, die einen mutanten Rb-Locus tragen (Cance 1990, Wunder 1991). Desweiteren fand sich eine Rb-Inaktivierung in kleinzelligen und nicht kleinzelligen Lungentumoren (Harbour 1988, Xu 1991), in Blasentumoren (Logothetis 1992), in Carcinomen des Magens (Cho 1996), der Prostata (Latil 1999), des

Colons (Chiang 1998), der Mamma (Eirikdottir 1998, Trudel 1992) sowie auch in einigen Glioblastomen (Henson 1994).
Eine weitere Studie an CRC zeigte in der Immunhistochemie eine inverse Beziehung zwischen p53- und Rb-Protein-Expression. Tumoren mit einer hohen p53- aber niedrigen pRb-Expression waren niedriger differenziert und in einem weiter fortgeschrittenen Stadium (Chetty 1998). In einer Arbeit aus dem darauf folgenden Jahr (Yamamoto 1999) konnte eine ansteigende Expression des pRb-Proteins im Rahmen der Transformation von normaler Colonmukosa, über das Adenom hin zum Carcinom gezeigt werden. Diese Beobachtung scheint für ein Tumor-Suppressor-Gen paradox zu sein und legt die Vermutung nahe, daß auch die Entwicklung einer Tumorzellpopulation die Expression von Zellteilungsinhibitoren hochregulieren muß, um eine Homöostase aufrecht zu erhalten, in der ein optimales Wachstum möglich ist.

1.10 Das Chromosom 20q und die Rolle des CAS-Gens in der Pathogenese von Malignomen

In einer Übersichtsarbeit aus dem Jahre 1997 wurden bisherige Literaturangaben bezüglich chromosomaler Alterationen solider Neoplasien zusammengefaßt. Es ergab sich, daß das Chromosom 20 als eines von 4 Chromosomen häufiger eine Zunahme an chromosomalen Abschnitten als einen Verlust zeigte. In dem Kollektiv der CRC fanden sich in ca. 16% eine Zunahme und in ca. 5% der Fälle eine Abnahme des Chromosomenmaterials (Mertens 1997).

Im Jahre 1995 wurden Plasmide isoliert, die ein cDNA-Fragment beinhalten, welches einer Brustkrebszelllinie (MCF-7) eine Resistenz gegenüber Pseudomonas Exotoxin, Diphterie Toxin und TNF α und β verleiht (Brinkmann 1995a). Dieses Fragment stellt ein Antisense-Fragment zu dem CSE1 (Chromosomen-Segration)-Gen der Hefe Saccharomyces cerevisiae dar (Xiao 1993), ein Gen, welches eine Rolle in der Chromosensegration während der Zellteilung spielt (Brinkmann 1995b). Das CSE1-Homologon im Menschen wurde CAS (**C**ellular **A**poptosis **S**usceptibility)-Gen genannt. Da CSE1 in die Chromosomen-

segregation von Hefen involviert ist, liegt die Vermutung nahe, daß auch CAS eine Rolle in der Zellteilung spielt. So zeigte CAS auch eine starke Expression in Geweben, die proliferierende Zellen enthalten, Hoden und fetale Leber, wie auch rasch wachsende Tumorzelllinien.

Hingegen wurde beobachtet, daß der CAS-Level in Phasen des Wachstumsstillstandes fällt (Brinkmann 1996a). Gleichzeitig reduziert jedoch, wie bereits oben erwähnt, eine Schwächung des CAS-Proteins durch Expression von antisense-DNA, die Sensitivität von Zellen gegenüber einer durch Immunotoxine und verschiedene bakterielle Toxine oder durch TNF-α/β induzierte Apoptose (Brinkmann 1995a, 1996a).

Ein Mechanismus, durch welchen CAS sowohl zu einer Proliferation als auch zu einer Apoptose führen kann, ist seine Funktion als Kern-Transportfaktor. CAS vermittelt die Kern-zytosolische Wiederverwertung von Importin α und möglicherweise anderer Faktoren, die den Transport von spezifischen Proteinen in den Zellkern vermitteln. Einige dieser Proteine (z.B. p53, CDKN2), die auf dem Importin-Wege in den Zellkern gelangen, sind notwendig für die Durchführung und/oder Progression der Mitose. Das erklärt die Beobachtung, daß eine Reduktion des CAS-Proteins einen Zell-Zyklus-Arrest in der G2-Phase zur Folge hat (Ogryzko 1997). Auch für die Apoptose scheinen Transportvorgänge in den Zellkern von einer großen Bedeutung zu sein. Zum Beispiel müssen Transkriptionsfaktoren und p53 während der Apoptose in den Kern transportiert werden.

Obwohl das CAS-Protein im Zellkern lokalisiert sein muß, um seiner Kern-Transport-Funktion gerecht zu werden, findet sich der größte Teil des CAS-Proteins im Zytoplasma, wo es mit den Mikrotubuli assoziiert ist. Die Verbindung von CAS mit den zytoplasmatischen Mikrotubuli stellt eventuell ein Reservoir von inaktivem CAS-Protein dar; alternativ hat das CAS-Protein vielleicht eine bestimmte Funktion während der Interphase. In der Meiose und Mitose steht CAS in einer starken Verbindung mit den Zentriolen und den Mitosespindeln (Brinkmann 1998).

Im Jahr 1996 wurde das CAS-Gen auf dem Chromosom 20q13 lokalisiert. Es konnte gezeigt werden, daß CAS in Brustkrebszelllinien eine vier- bis achtfache, in CRC-Zelllinien eine fünffache und in Leukämiezelllinien eine sechs- bis achtfache Amplifikation aufweisen kann (Brinkmann 1996b). Schon

in einer vorhergehenden Studie, die sich mit chromosomalen Alterationen von aggressiven Mammacarcinomen befaßte, konnte eine Amplifikation des Chromosoms 20q13 nachgewiesen werden (Tanner 1994).
Bei der Untersuchung von Lymphomen mit Hilfe der Immunhistochemie ließen sich in 10 bis 60% der niedrig malignen Non-Hodgkin Lymphomen und in bis zu 80% der hochmalignen Non-Hodgkin Lymphomen und Hodgkin Lymphomen CAS-positive Zellen nachweisen (Wellmann 1997).

1.11 Zielsetzung

Genetische Veränderungen sind nach unserem heutigen Verständnis die Ursache der Tumorentstehung und Tumorprogression. Die Assoziation bestimmter genetischer Veränderungen mit einer schrittweisen Tumorprogression ist eindrucksvoll am CRC beschrieben worden.
Auch ein anderer genetischer Mechanismus, der mit der Tumorentstehung vergesellschaftet ist, der sogenannte „Mutator-Phänotyp“ der HNPCC, wurde erstmals in CRC beschrieben. CRC stellen daher einen hoch interessanten Modelltumor zum Verständnis genetischer Veränderungen und ihrer funktionellen Konsequenzen während der Tumorprogression dar.
Im Rahmen der dieser Dissertation zugrundeliegenden Vorarbeiten konnte gezeigt werden, daß sich die beiden genetischen Mechanismen - grobe genetische Aberrationen und MIN des Mutatot-Phänotyps - in CRC gegenseitig nahezu ausschließen (Schlegel 1995).
Interessanterweise zeigte sich, daß chromosomale Veränderungen im Bereich der Chromosomen 9p21-22 (Lydiatt 1998, Orlow 1994), 13q14 (Chetty 1998, Eiriksdottir 1998) und 20q13 (Tanner 1994) mit einer frühen Metastasierung und entsprechend schlechter Prognose einhergingen.

In der vorliegenden Arbeit sollten daher 3 Bereiche bearbeitet werden.

1. Es sollten die cytogenetisch mit Hilfe der CGH charakterisierten chromosomalen Abschnitte die Veränderungen in CRC aufwiesen (9p21-22, 13q14 und 20q13) mit Hilfe molekulargenetischer Methoden (PCR) an den mit CGH untersuchten CRC (n = 11) näher eingegrenzt werden.
2. Es sollte die Region des Chromosoms 20 (20q13), die in CRC Amplifikationen aufwies, anhand von Tumorproben und korrespondierender Kontroll-DNA von 41 Patienten kartiert werden.
3. Die genetischen Befunde sollten mit den klinischen Daten verglichen werden, um so Hinweise auf eine prognostische Relevanz in CRC zu erhalten.

2 Material und Methodik

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Geräte

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien wurden - von einigen Ausnahmen abgesehen, die bei der Erläuterung der Methoden angeführt werden - von der Firma Roth, Karlsruhe bezogen.

Es wurden folgende Geräte zur Durchführung der Arbeit eingesetzt:
Für die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurde ein Thermozykler von der Firma MJ Research, Inc., Watertown, USA (PTC-100^{TM} Programmable Thermal Controller) benutzt.
Zur Denaturierung der PCR-Produkte wurde der Thermoblock der Firma Thermo Dux, Wertheim (Techne Dri-Block DB 2 A) verwendet.
Als Sequenzierkammer für die PAA-Gelelektrophorese diente die „Sequi-Gen GT Sequencing Cell“ der Firma Bio-Rad, Hercules, USA. Auch die dazu benötigte Spannungsquelle, der zum Trocknen der Gele eingesetzte „Gel Air Dryer“ und die Kammer für die Agarose-Gelelektrophorese stammten von der Firma Bio-Rad, Hercules, USA. Für die Agarose-Gelelektrophorese wurde eine Spannungsquelle von der Firma Pharmacia, Uppsala, Schweden benutzt. Zur Anregung der mit Ethidium-Bromid gefärbten Agarosegele, wurde eine UV-Lichtquelle der Firma Vilber Lourmat, Frankreich (TFX-20M) und zum Photographieren der Gele eine Kamera der Firma IPPI GmbH, München verwendet.

2.1.2 Untersuchungsmaterial

Einundvierzig Tumorproben und die korrespondierenden nicht-neoplastischen Gewebe (Leukozyten) der Patienten wurden freundlicher Weise von Herrn Prof. Dr. med. Rüschoff, Institut für Pathologie, Klinikum Kassel (ehemals Universität Regensburg) zur Verfügung gestellt.

Im Rahmen dieser Studie wurden die Proben von 10 weiblichen und 31 männlichen Personen untersucht. Für die Studie wurde die Genehmigung durch die Ethik-Kommission Regensburg erteilt.

Nr.	Alter	Geschl	FamAn	T	N	M	G	Lok	Histologie
1	71	M		4	0	0	2	R	glandulär
2	72	M		1	0	0	2	R	glandulär
3	66	M	M: Dickdarm	2	0	0	2	R	papillär
4	59	M		3	0	0	2	R	glandulär
5	39	W		3	3	1	2	L	glandulär
6	67	W	B: Lymphom (52 J.) S: Magen (65 J.)	3	0	0	2	L	cribriform
7	56	M		2	0	0	2	R	10% muzinös, papillär
8	52	M		x	0	0	2	R	Glandulär
9	53	M	V: Magen (50 J.)	2	0	0	2	R	Glandulär
10	82	W	B: Leber (56J.)	3	3	1	2	R	glandulär-cribriform
11	58	M		2	0	0	3	R	muzinös
12	59	M		1	0	0	2	R	glandulär
13	62	W		4	0	x	3	R	glandulär- solide
14	62	W		3	1	x	2	R	glandulär
15	46	M	V: Dickdarm T: Dickdarm	2	0	x	2	R	glandulär-desmoform
16	55	M		3	2	x	2	L	adenomatös
17	57	M		3	1	x	2	R	glandulär
18	62	M		4	2	1	2	L	cribriform
19	39	M		3	2	1	3	R	solide
20	79	M		4	0	x	2	L	glandulär
21	74	W	V: Magen (43 J.), S: Gehirn (69)	3	3	x	2	R	glandulär
22	80	M		3	0	0	2	R	glandulär
23	66	M		3	0	x	2	R	glandulär -cibriform
24	61	M		3	1	x	2	R	glandulär
25	52	W		3	0	x	2	L	30% muzinös
26	65	M		4	1	1	3	R	muzinös
27	51	W	B: Magen	2	3	x	3	R	solid- muzinös- adenomatös
28	64	M		3	1	x	2	R	glandulär
29	67	M		3	2	x	2	R	glandulär
30	53	W		3	1	1	2	L	glandulär
31	66	M		1	0	0	2	L	glandulär
32	85	W		3	1	x	3	R	glandulär
33	65	M		4	0	0	2	L	glandulär
34	84	M	V: Magen (75 J.), S: Rektum, Bronchial (51 J.)	3	0	0	2	R	80% muzinös
35	78	M		3	2	x	2	R	glandulär
36	44	M		3	0	0	2	R	90% solide
37	70	M		2	0	0	2	R	cribriform
38	64	W		2	1	x	2	L	glandulär
39	75	M		3	3	0	3	L	glandulär -cribriform
40	64	M		4	0	0	3	R	cribriform
41	84	M		4	0	0	2	R	glandulär

Tabelle 6: *Angaben zum Patientengut und der Tumorhistologie.*

Legende: ***Geschl:*** *Geschlecht;* ***FamAn:*** *Familiär bekannte Tumorerkrankungen;*

V: *Vater ;* ***M:*** *Mutter ;* ***B:*** *Bruder ;* ***T****: Tochter ;* ***S****: Sohn;* ***Lok****: Lokalisation;* ***J.:*** *Jahre.*

Das Durchschnittsalter der Patienten lag bei 63,6 Jahren +/- 11,8 Jahren (44-85 Jahre). Auf der rechten Seite, d.h. proximal der Flexura coli sinistra im Colon ascendens, Coecum und Colon transversum waren 30 der Tumoren lokalisiert. Elf der Tumore fanden sich im Colon descendens, Sigma oder Rectum, also auf der linken Seite (distal) der Flexura coli sinistra.
Die Klassifikation der Tumore erfolgte gemäß UICC nach dem TNM-Schema. Dabei fand sich folgende Verteilung (nähere Angaben können der Tabelle 6 entnommen werden):

T - Primärtumor

T0 (x)	in 1 Fall konnte die lokale Ausbreitung des Primärtumors nicht beurteilt werden
T1	in 3 Fällen infiltrierte der Tumor die Submukosa
T2	in 8 Fällen infiltrierte der Tumor die Muscularis propria
T3	in 21 Fällen infiltrierte der Tumor durch die muscularis propria in die Subserosa oder in nicht peritonialisiertes pericolisches oder perirectales Gewebe
T4	in 8 Fällen perforierte der Tumor das viszerale Peritoneum oder infiltrierte direkt in andere Organe oder Strukturen

N - Regionäre Lymphknoten

N0	in 23 Fällen fanden sich keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	in 8 Fällen fanden sich Metastasen in 1-3 pericolischen bzw. perirectalen Lymphknoten
N2	in 5 Fällen wurden Metastasen in 4 oder mehr pericolischen bzw. perirectalen Lymphknoten entdeckt
N3	in 5 Fällen befanden sich Metastasen in Lymphknoten eines benannten Gefäßstammes

M - Fernmetastasen

Mx in 16 Fällen konnte das Vorliegen von Fernmetastasen nicht beurteilt werden

M0 in 19 Fällen fanden sich keine Fernmetastasen

M1 in 6 Fällen fanden sich mindestens eine Fernmetastase

Histopathologische Gradeinteilung nach UICC

G1 in keinem Fall war der Primärtumor gut differenziert

G2 in 33 Fällen war der Tumor mäßig differenziert

G3 in 8 Fällen war der Tumor schlecht differenziert

Bei jedem der untersuchten 41 colorectalen Tumoren lag für diese Studie eine histologische Typisierung vor. Zweiundzwanzig der Tumoren waren glanduläre, 4 cribriform, einer adenomatös, 4 muzinös, 3 glandulär-cribriform, 2 solide, einer papillär, einer glandulär-solide, einer glandulär-desmoform, einer solid-muzinös-adenomatös und einer muzinös-papillär. Somit waren 35 der CRC histologisch den adenomatösen und 4 den muzinösen Tumoren zuzuordnen. Zwei der Carcinome zeigten sowohl einen adenomatösen als auch einen muzinösen Aufbau.

2.1.3 Oligonukleotid-Primer

Für die verschiedenen Polymerasekettenreaktionen wurden insgesamt 13 Oligonukleotid-Primer eingesetzt. Im einzelnen können diese der Tabelle 7 entnommen werden.

Locus	**Länge [bp]**	**Annealing-Temp. [°C]**	**Bezug**	**Sequenz**
D9S156 (Weissenbach 1992)	133-155	55	Eurogentec	
forward	AFM-051xd6 **f Mikro.**			5´-ATCACTTTTAACTGAGGCGG-3´
reverse	AFM-051xd6 **r**			5´-AGATGGTGGTGAATAGAGGG-3´
Locus	**Länge [bp]**	**Annealing-Temp. [°C]**	**Bezug**	**Sequenz**
D9S171 (Weissenbach 1992)	159-177	55	MWG	
forward	AFM-186xc3 **f Mikro.**			5´-AGCTAAGTGAACCTCATCTCTGTCT-3´
reverse	AFM-186xc3 **r**			5´-ACCCTAGCACTGATGGTATAGTCT-3´
Locus	**Länge [bp]**	**Annealing-Temp. [°C]**	**Bezug**	**Sequenz**
D9S1813 (Dib 1996)	226-264	55		
forward	AFM-a312zh1 **f Mikro.**			5´-GGGCTTGGCACTTAATAC-3´
reverse	AFM-a312zh1 **r Mikro.**			5´-AATGGCCTAAAACCTGG-3´
Locus	**Länge [bp]**	**Annealing-Temp. [°C]**	**Bezug**	**Sequenz**
CA repeat 16kB telomeric to CDNK2 gene (Kamb 1994b)	291-303	45	MWG	
forward	p16Ca **f Mikro**.			5´-GCCTTTGCTCTTACTACA-3´
reverse	p16Ca **r**			5´-GTTCTTCCTCACATTTTA-3´
Locus	**Länge [bp]**	**Annealing-Temp. [°C]**	**Bezug**	**Sequenz**
D13S170 (Weissenbach 1992)	113-137	55	Eurogentec	
forward	AFM-240wh2 **f Mikro.**			5´-TTGCACTGTGGAGATAAACACATAG-3´
reverse	AFM-240wh2 **r**			5´-TCACATTGTCTTTTAAGGCAGGAG-3´
Locus	**Länge [bp]**	**Annealing-Temp. [°C]**	**Bezug**	**Sequenz**
Rb 1.20 (mono-nucl. Repeat)	450-500	51	Eurogentec	
forward	RB103 **f**			5´-AATTAACAAGGTGTGGTGGT-3´
reverse	RB57 **r**			5´-TGTATCCCGGCTAGCCTATCTC-3´
Locus	**Länge [bp]**	**Annealing-Temp. [°C]**	**Bezug**	**Sequenz**
D20S96 (Weissenbach 1992)	99-133	55	MWG	
forward	AFM-029yc3 **f Mikro.**			5´-CACTGCAACTCTAACCTGGG-3´
reverse	AFM-029yc3 **r**			5´-CCTGTATGCTGCATTTCCTG-3´

Locus	**Länge [bp]**	**Annealing-Temp. [°C]**	**Bezug**	**Sequenz**
CAS-Gene (Chr.20)	75-90	55	MWG	
forward	hCAS **f**			5´-GACATCCCGTCTTCCTATATG-3´
reverse	hCAS **r**			5´-AAGAAGXXTXAXTAGAGXAGGA-3´
Locus	**Länge [bp]**	**Annealing-Temp. [°C]**	**Bezug**	**Sequenz**
human endothelin 3 (Bloch 1989, Gopal 1991)	92	47	MWG	
forward	hsEDN3 **f**			5´-GTGCTTCACCTACAAGGAC-3´
reverse	hsEDN3 **r**			5´-ACCACAAAAGGCTGACTT-3´
Locus	**Länge [bp]**	**Annealing-Temp. [°C]**	**Bezug**	**Sequenz**
human PTPN (Brown-Shimer 1990)	246	61	MWG	
forward	hsPTPN1x **f**			5´-TTGGAGTCCCTGAATCACC-3´
reverse	hsPTPN1x **r**			5´-CAGCCAGACAGAAGGTTCC-3´
Locus	**Länge [bp]**	**Annealing-Temp. [°C]**	**Bezug**	**Sequenz**
hs SRC-Gen (Morris 1989)	129	55	MWG	
forward	hsSRC **f**			5´-CCACAGGGATGGTGAAC-3´
reverse	hsSRC **r**			5´-GCTCCTGAGGCTCCTT-3´
Locus	**Länge [bp]**	**Annealing-Temp. [°C]**	**Bezug**	**Sequenz**
hs ß-actin	180	58	MWG	
forward	D7S12 **f**			5´-CTTGATGAGGTAGTCAGTCAGGTCC-3´
reverse	D7S12 **r**			5´-TATCCAGGCTGTGCTATCCCTGTAC-3´

Tabelle 7: *Oligonukleotidprimer und ihre Spezifikation.*

Legende: ***f:*** *forward bzw. Sense;* ***r:*** *reverse bzw. antisense;* ***Mikro.:*** *Mikrosatellitenprimer;* ***forward:*** *forward-Primer;* ***reverse:*** *reverse-Primer;* ***Bezug:*** *Bezugsquelle;* ***MWG:*** *Firma MWG-Biotech in Ebersberg, Deutschland;* ***Eurogentec:*** *Firma Eurogentec in Seraing, Belgien.*

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Isolierung aus Gefriermaterial

Die 41 Tumorpatienten wurden in der Klinik und Poliklinik für Chirurgie der Universität Regensburg operiert. Direkt nach der Extraktion wurde ein Teil des Tumorgewebes bei -80°C bis zur weiteren Bearbeitung in dem Pathologischen Institut der Universität Regensburg eingefroren.

Das Gefriermaterial wurde in flüssigem Stickstoff zermörsert und in 10 ml TE (TE Puffer: 10 mM Tris mit pH 8; 1 mM EDTA mit pH 8) suspendiert. Nach einer Überführung der Suspension in Eppendorf-Gefäße wurden 60 µl

Proteinase K (5 µg/µl) und 30 µl 20%-iges SDS pro 1 ml Suspension hinzugefügt. Daraufhin wurde ein Verdau bei 56° C im Thermoblock über Nacht durchgeführt - mindestens so lange bis die Lösung klar war. Am nächsten Tag wurde die Proteinase K inaktiviert, indem das Verdauprodukt 10 Minuten lang auf 94° C erhitzt wurde. Das Produkt wurde in 15 ml Reagenzröhrchen (Falcon) überführt. Daraufhin wurden im Verhältnis 1 : 1 hintereinander Phenol, dann Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25 : 24 : 1) und zuletzt Chlorophorm/Isoamylalkohol (24 : 1) hinzugegeben. Dazwischen wurden die Phasen jeweils gemischt und anschließend durch eine Zentrifugation bei 3000 U/min getrennt. Der Überstand wurde jeweils abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Zum Schluß wurde der Überstand auf Eis aufbewahrt und die DNA mit 100%igem Ethanol ausgefällt. Die Lösung wurde abzentrifugiert und das DNA-Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen. Die Reinigung mit Ethanol wurde dreimal wiederholt. Im Anschluß wurde die DNA an der Luft getrocknet. Danach wurde die DNA in 50 µl TE gelöst.

2.2.2 Untersuchung der Tumor- /Normal-Gewebeproben mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion

200 ng genomische DNA wurden als Vorlage (template) in einem Reaktionsvolumen von 20 µl eingesetzt, welches 0,6 µM Primer-Gemisch, 0,02 mM von jedem der 4 Desoxynucleotriphosphate (dNTP´s: dGTP, dATP, dTTP, dCTP, Firma Boehringer, Mannheim), 1 Unit taq-DNA-Polymerase (Firma Qiagen, Hilden), 3 µl $MgCl_2$ und 5µl TRIS-Puffer-Lösung, aufgefüllt mit aqua bidest auf ein Volumen von 20 µl, enthielt.

Die PCR wurde mit 40 Amplifikationszyklen (94° C, 40 sek.; 45°-61° C, je nach Primer-Paar (siehe Tabelle 7), 1 min; 72° C, 2 min) durchgeführt. Im ersten Zyklus betrug die Denaturierungszeit (94° C) 5 min, im letzten Zyklus wurde die Hybridsierungszeit zur Strangverlängerung (72° C) auf 5 min erhöht.
Anschließend wurden die Reaktionsprodukte bei -20° C aufbewahrt.

2.2.3 Die Gelelektrophorese

Die PCR-Fragmente wurden elektrophoretisch in Agarose- bzw. Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt. Für die Agarose-Gelelektrophorese wurden die PCR-Fragmente in einem DNA-Ladepuffer (95% Formamid, 10 mmol NaOH, 0,05% Xylencyanol) aufgenommen, auf 1%ige Agarosegelen (40 mmol TIS-Acetat, 2 mmol EDTA, pH 8,5) aufgetragen und bei einer konstanten Spannung von 80 V zwischen einer halben und einer Stunde (je nach Fragmentgröße des PCR-Produktes) aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel in 0,01%igem Ethidium-Bromid für 5 Minuten gefärbt. Die DNA-Fragmente wurden unter einer UVA-Lampe (295 nm) sichtbar gemacht und mit Hilfe einer CCD-Kamera und entsprechender Software digitalisiert, sowie für die weitere Auswertung gespeichert und ausgedruckt.

Für die Untersuchung der Mikrosatelliten wurden die PCR-Produkte in denaturierende 6,5%ige Polyacrylamid-Gele (89 mmol TRIS, 89 mmol Borsäure, 0,2 mmol EDTA) bei einer konstanten Spannung von 1600 V bei 50° C für 1 bis 3 Stunden aufgetrennt.

Im Anschluß wurde das Gel nach dem folgenden Protokoll mit Silber gefärbt:

5 min	10%ige Ethanollösung, zum Fixieren der DNA-Fragmente
3 min	1%ige Salpetersäurelösung, um den ph-Wert zu erniedrigen
einige s	aqua bidest.
20 min	0,012 M Silbernitratlösung, in der sich im sauren Milieu die freien Silberionen an die Basen der DNA binden können
einige s	aqua bidest.
wenige min	0,28 M Natriumcarbonatlösung mit 0,019% Formalin, wodurch die Silberionen zu elementarem Silber reduziert werden und somit die Silber-DNA-Komplexe sichtbar werden
2 min	10%ige Eisessiglösung - bewirkt eine erneute pH-Wert-Erniedrigung, wodurch die Reaktion gestoppt wird und eine zu starke Hintergrundfärbung vermieden wird
2 min	aqua bidest

Daraufhin wurde das Gel auf Whatman-Papier aufgespannt und in einem Gerät mit einem Heißluftgebläse getrocknet. Die Gele wurden mit Hilfe eines konventionellen Scanners (Hewlett-Packard HP Scan Int 5p) digitalisiert.

2.2.4 Bestimmung der optischen Dichte von Bandenmustern auf Polyacrylamidgelen

Die densitometrische Auswertung der Untersuchungsergebnisse erfolgte an den digitalen Gelelektrophorese-Resultaten mit Hilfe des Programms NIH (Scion Corp.) auf einem AST P100 Computer. Die optische Dichte der Gelbanden (Abbildung 7) wurde durch Integration der Fläche unter der Kurve (Integrierte Optische Dichte, Abbildung 8) nach Abzug des Hintergrundgrauwertes ermittelt.

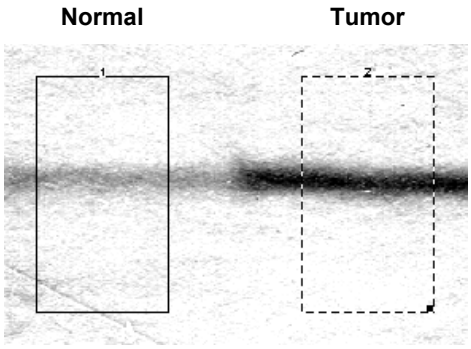


***Abbildung 7**: Markierung zweier digitalisierter Bandenmuster.*

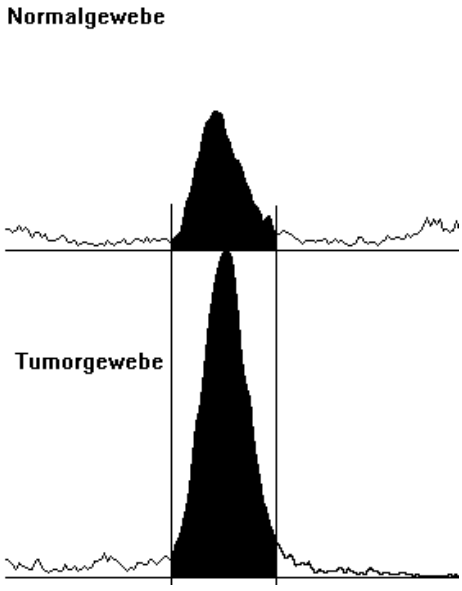


***Abbildung 8**: Beispielhafte Messung der optischen Dichte eines Bandenmusters.*

3 Ergebnisse

3.1 Detektion chromosomaler Alterationen in spezifischen Bereichen der Chromosomen 9p, 13q und 20q

3.1.1 Untersuchung des Chromosoms 9p im Bereich des CDKN2-Gens und benachbarter Loci

Das distale Ende des Chromosoms 9p wurde mit 4 verschiedenen Primern (AFM-051xd6, AFM-186xc3, AFM-a312zh1 und p16CA) mit Hilfe der PCR auf einen Verlust der Heterozygosität untersucht.

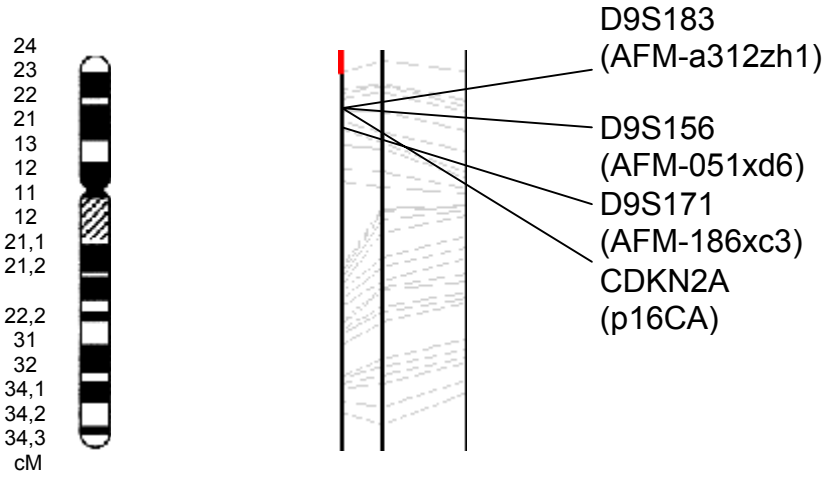


***Abbildung 9**: Kartierung des Chromosoms 9.*

***Legende : cM:** centi-Morgan.*

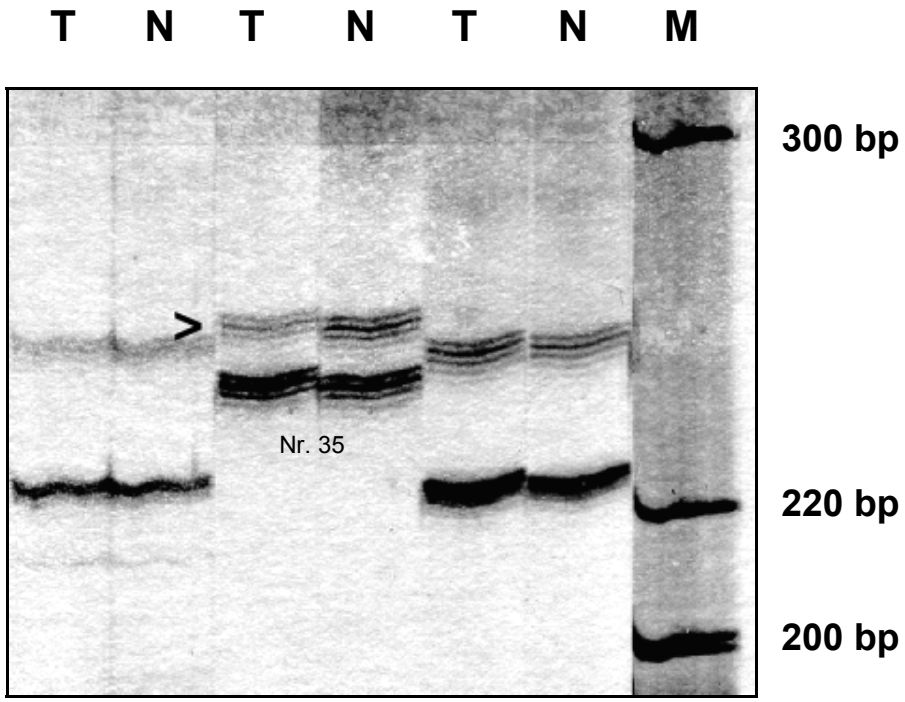


Abbildung 10: *Verlust der Heterozygosität im Locus D9S1813 (siehe Pfeil).*
Legende: M: *Marker,* ***N:*** *Normalmaterial,* ***T:*** *Tumormaterial.*

Lediglich eine Tumorprobe (Fall-Nr. 35) der 11 untersuchten CRC zeigte einen LOH im Locus D9S1813.
DNA des Normalgewebes zeigte im Locus D9S1813 nach elektrophoretischer Auftrennung des PCR-Produktes 2 Banden. In dem Tumor-PCR-Produkt zeigte sich eine Verminderung der Intensität der Färbung des kürzeren DNA-Fragmentes. Die vorhandene jedoch nur geringe Amplifikation dieses Allels läßt sich durch kontaminierende DNA, insbesondere Entzündungszellen, erklären.

Die Tumorprobe Nr. 35 zeigte weiterhin einen LOH in dem am weitesten distal gelegenen Locus D9S156. Zehn der 11 untersuchten DNS-Probenpaare waren für diesen Locus informativ.

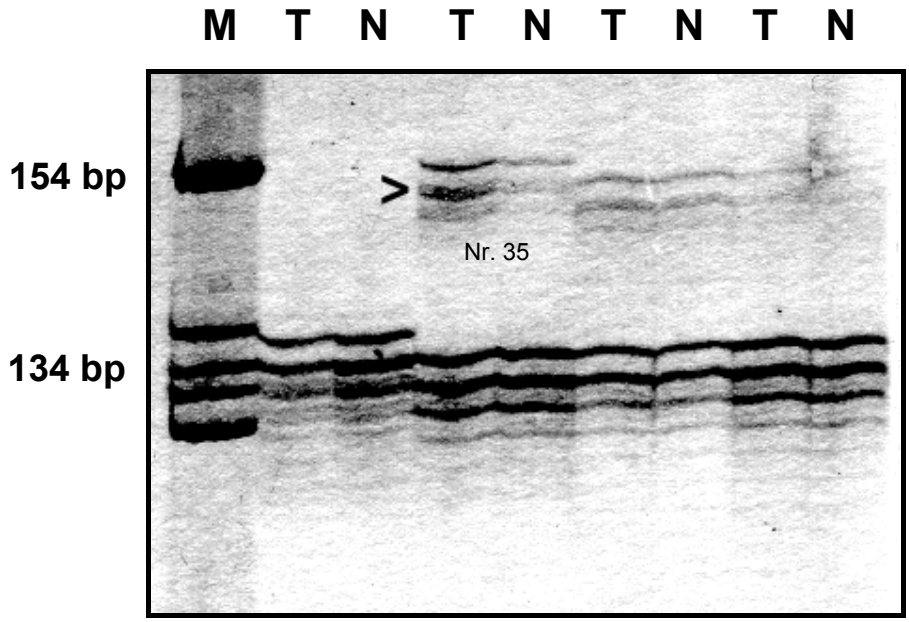


***Abbildung 11**: Verlust der Heterozygosität im Locus D9S156 (siehe Pfeil).*
***Legende: M:** Marker, **N:** Normalmaterial, **T:** Tumormaterial.*

Der Mikrosatelliten-Locus, der 16 kB telomerisch des CDNK2A Gens (8 informative Loci) lokalisiert ist sowie der Locus D9S171 (8 informative Loci) wiesen keine Alterationen auf.

Locus	D9S183	D9S156	D9S171	CDKN2A
Fallnummer				
2	norm.	norm.	norm.	norm.
3	norm.	norm.	n.i.	norm.
8	norm.	norm.	n.i.	norm.
12	norm.	norm.	norm.	n.i.
15	norm.	norm.	norm.	n.i.
18	norm.	n.i.	norm.	norm.
35	LOH	LOH	norm.	norm.
37	norm.	norm.	n.i.	n.i.
39	norm.	norm.	norm.	norm.
40	norm.	norm.	norm.	norm.
41	norm.	norm.	norm.	norm.

***Tabelle 8**: Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchung des Chromosoms 9p im Bereich des CDKN2A-Gens und 3 benachbarter Loci.*
***Legende: norm.:** normal; **n.i.:** nicht informativ.*

3.1.2 Untersuchung des Chromosoms 13q im Locus Rb 1.20 und einem benachbarten Locus

Zur Untersuchung des Chromosoms 13q wurden 2 Marker gewählt, AFM-240wh2 und Rb 103 bzw. Rb57.

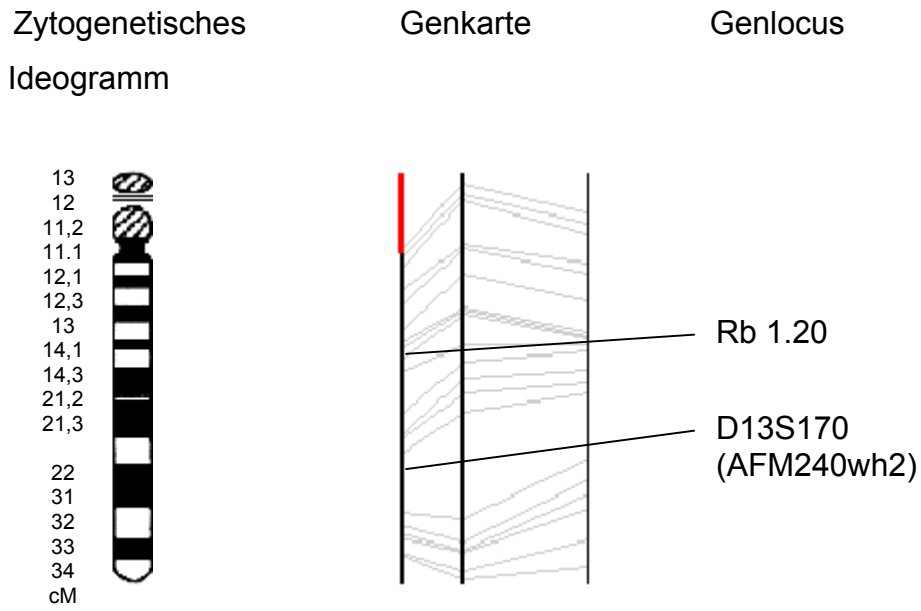


***Abbildung 12**: Kartierung des Chromosoms 13.*

***Legende : cM:** centi-Morgan.*

Von den 11 untersuchten Tumor-/Normalprobenpaaren waren im Falle des Genlocus Rb 1.20 10 Paare und im Falle des Locus D13S170 8 Probenpaare informativ. Lediglich eine Tumorprobe (Fall-Nr. 15) der 11 untersuchten CRC zeigte einen LOH im Locus Rb 1.20 (siehe Abbildung 13).

DNA des Normalgewebes zeigte im Locus Rb 1.20 nach elektrophoretischer Auftrennung des PCR-Produktes 2 Banden. In dem Tumor-PCR-Produkt zeigte sich in Relation zum Normal-PCR-Produkt eine Verminderung der Intensität der Färbung des kürzeren DNA-Fragmentes. Die vorhandene jedoch nur geringe Amplifikation dieses Allels läßt sich wiederum durch kontaminierende DNA, insbesondere Entzündungszellen, erklären.

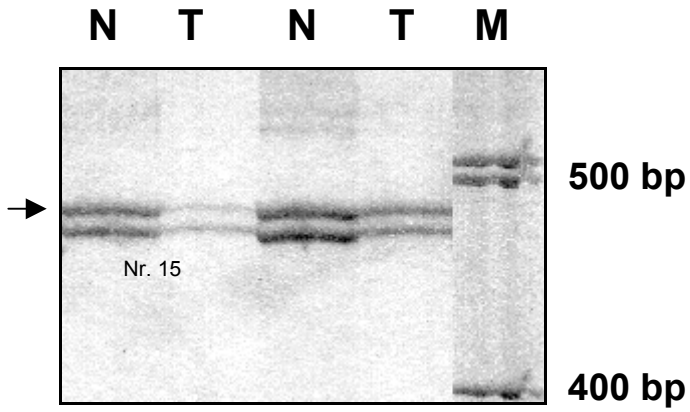


***Abbildung 13**: Verlust der Heterozygosität im Locus Rb 1.20 (siehe Pfeil).*
***Legende: M:** Marker, **N:** Normalmaterial, **T:** Tumormaterial.*

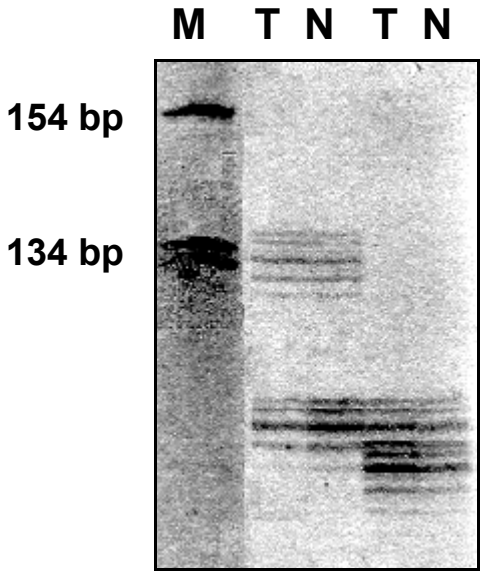


***Abbildung 14:** Beispielhafte Auswahl zweier PCR-Probenpaare (von links nach rechts: Nr.40 und Nr. 2; Primer: AFM240wh2).*
***Legende: M:** Marker, **N:** Normalmaterial, **T:** Tumormaterial.*

Locus Fallnummer	Rb	D13S170
2	norm.	norm.
3	n.i.	norm.
8	norm.	norm.
12	norm.	norm.
15	LOH	norm.
18	norm.	norm.
35	norm.	n.i.
37	n.i..	n.i.
39	norm.	n.i.
40	norm.	norm.
41	norm.	norm.

Tabelle 9: *Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchung des Chromosoms 13q im Locus Rb 1.20 und dem benachbarten Locus D13S170.*
Legende: norm.: *normal;* ***n.i.:*** *nicht informativ.*

3.2 Untersuchung des Chromosoms 20q im Bereich des CAS-Gens und benachbarter Loci

Insgesamt wurden 41 Tumor-/Normalprobenpaare mit Hilfe der PCR mit Primern für das CAS-Gen und 4 seiner flankierenden Marker (hs EDN3, hs PTPN1x, hs SRC, AFM-029yc3) untersucht.

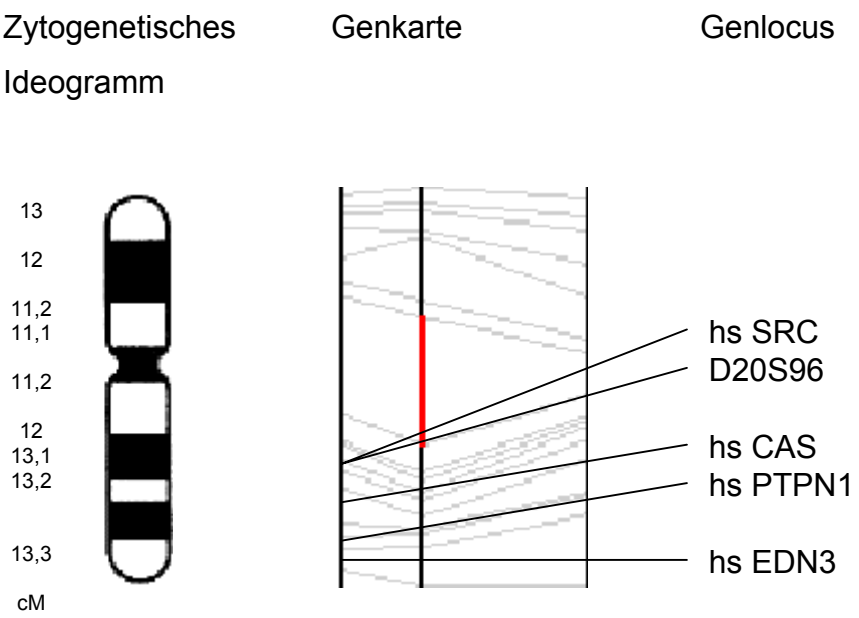


Abbildung 15: *Kartierung des Chromosoms 20.*
Legende : cM: *centi-Morgan.*

3.2.1 Der humane SRC-Genlocus

Von 28 informativen PCR-Proben, die mit Hilfe des Primers hs SRC gewonnen wurden, zeigten nach elektrophoretischer Auftrennung unter Einbezug des Housekeeping-Gens human-ß-actin 13 Proben (46,4%) eine Zunahme der optischen Dichte (OD) der Bande im Tumormaterial gegenüber der Normalprobe. Das Verhältnis war bei Zunahme der OD des Tumormaterials gegenüber dem Normalgewebe im arithmetischen Mittel 1,67.

Von 28 informativen PCR-Proben, die mit Hilfe des Primers humanes SRC gewonnen wurden, zeigten nach elektrophoretischer Auftrennung unter Einbezug des Housekeeping-Gens human-ß-actin 15 Proben (53,6%) eine Abnahme der OD der Bande im Tumormaterial gegenüber der Normalprobe. Das Verhältnis war bei Abnahme der OD des Tumormaterials gegenüber dem Normalgewebe im arithmetischen Mittel 0,74.

Insgesamt betrug der Mittelwert der Tumor-/Normalratio $x = 1,1$ und die Standardabweichung $s = 0,59$. Der Median lag bei 0,85.

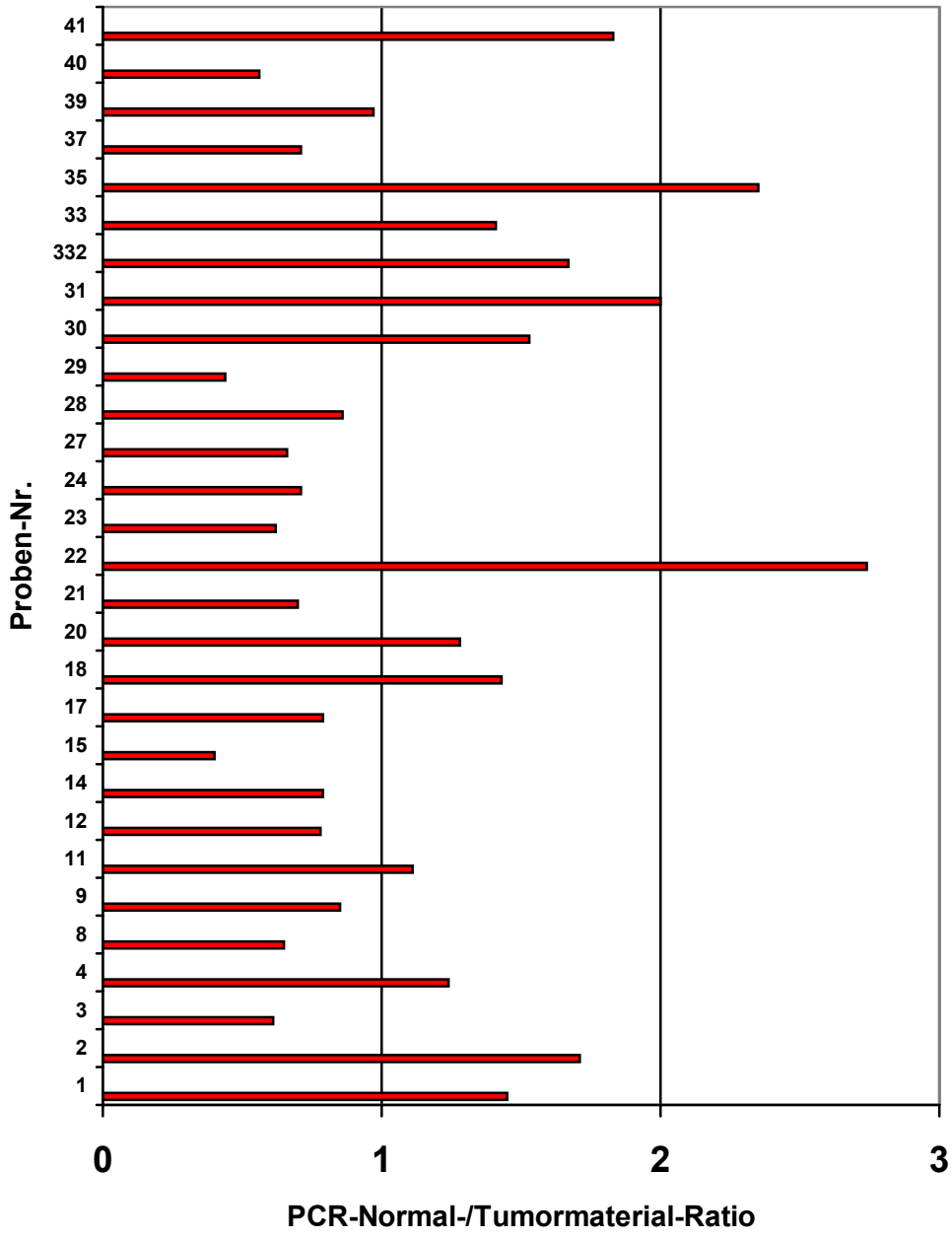


Abbildung 16: *Zunahme der OD des Tumormaterials gegenüber dem Normalgewebe unter Einbezug des Houskeeping-Gens humanes ß-actin im Falle des Primers humanes SRC.*

3.2.2 Der humane PTPN1-Genlocus

Von 17 informativen PCR-Proben, die mit Hilfe des Primers humanes PTPN1x gewonnen wurden, zeigten nach elektrophoretischer Auftrennung unter Einbezug des Housekeeping-Gens humanes ß-actin 8 Proben (47%) eine Zunahme der OD der Bande im Tumormaterial gegenüber der Normalprobe. Das Verhältnis war bei Zunahme der OD des Tumormaterials gegenüber dem Normalgewebe im arithmetischen Mittel 1,53.
Von 17 informativen PCR-Proben, die mit Hilfe des Primers humanes PTPN1x gewonnen wurden, zeigten nach elektrophoretischer Auftrennung unter Einbezug des Housekeeping-Gens humanes ß-actin 9 Proben (53%) eine Abnahme der OD der Bande im Tumormaterial gegenüber der Normalprobe. Das Verhältnis war bei Abnahme der OD des Tumormaterials gegenüber dem Normalgewebe im arithmetischen Mittel 0,71.

Insgesamt betrug der Mittelwert der Tumor-/Normalratio $x = 1,1$ und die Standardabweichung $s = 0,55$. Der Median lag bei 0,95.

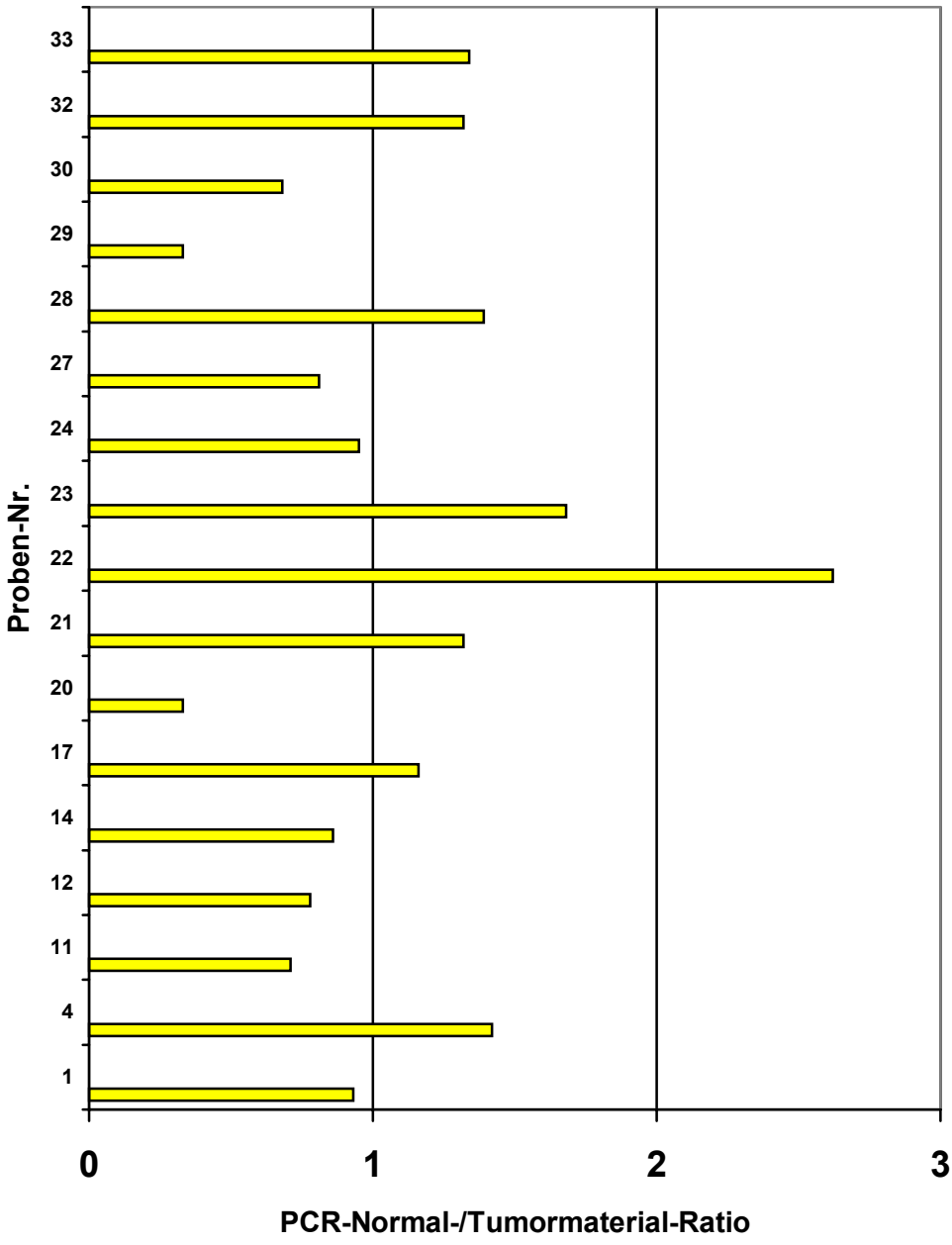


Abbildung 17: *Zunahme der OD des Tumormaterials gegenüber dem Normalgewebe unter Einbezug des Houskeeping-Gens humanes ß-actin im Falle des Primers humanes PTPN1x.*

3.2.3 Der humane EDN3-Genlocus

Von 27 informativen PCR-Proben, die mit Hilfe des Primers humanes EDN3 gewonnen wurden, zeigten nach elektrophoretischer Auftrennung unter Einbezug des Housekeeping-Gens humanes ß-actin 16 Proben (59,3%) eine Zunahme der OD der Bande im Tumormaterial gegenüber der Normalprobe. Das Verhältnis war bei Zunahme der OD des Tumormaterials gegenüber dem Normalgewebe im arithmetischen Mittel 1,66.

Von 27 informativen PCR-Proben, die mit Hilfe des Primers humanes EDN3 gewonnen wurden, zeigten nach elektrophoretischer Auftrennung unter Einbezug des Housekeeping-Gens humanes ß-actin 9 Proben (33%) eine Abnahme der OD der Bande im Tumormaterial gegenüber der Normalprobe. Das Verhältnis war bei Abnahme der OD des Tumormaterials gegenüber dem Normalgewebe im arithmetischen Mittel 0,41.

Insgesamt betrug der Mittelwert der Tumor-/Normalratio $x = 1,25$ und die Standardabweichung $s = 0,74$. Der Median lag bei 1,1.

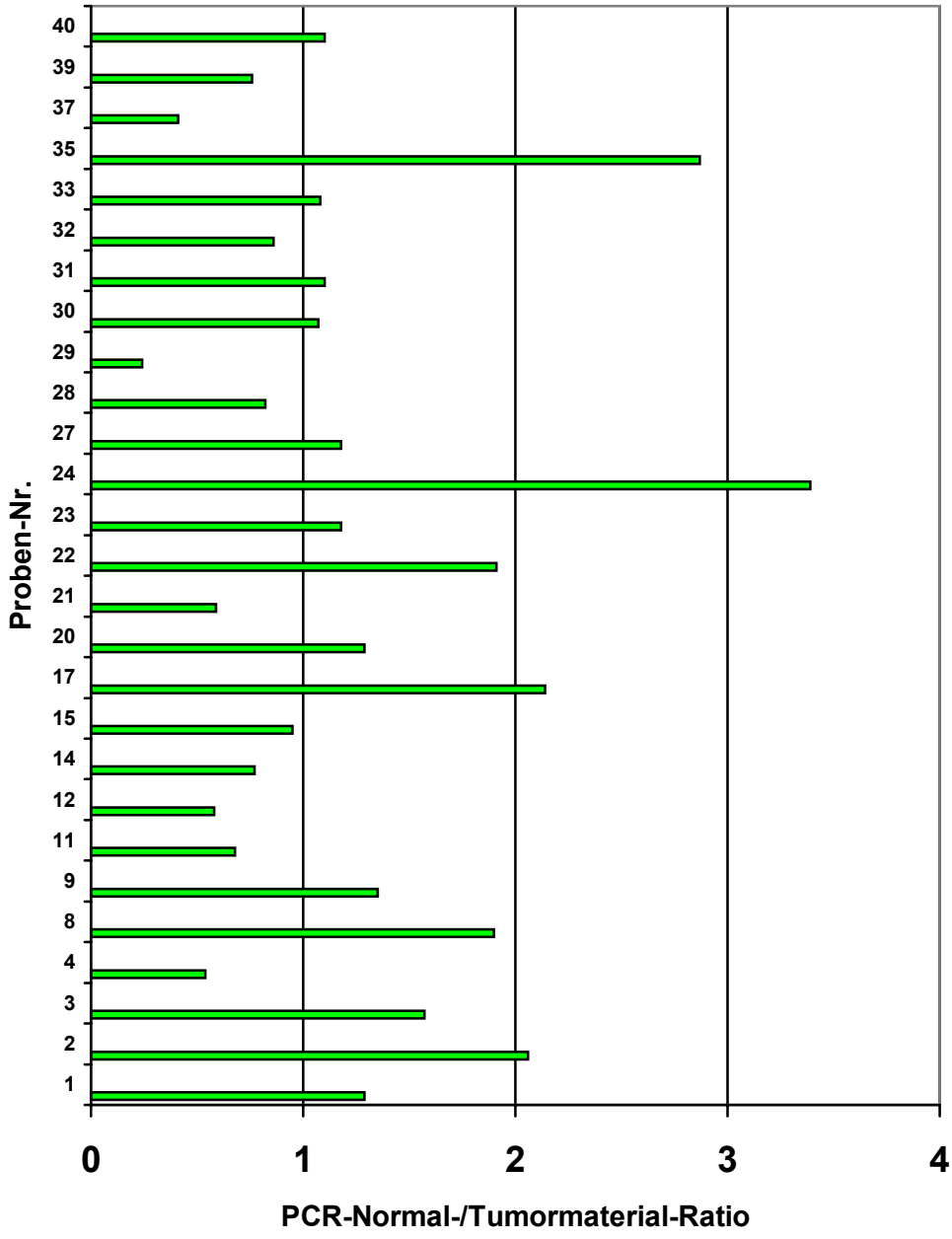


Abbildung 18: *Zunahme der OD des Tumormaterials gegenüber dem Normalgewebe unter Einbezug des Houskeeping-Gens humanes ß-actin im Falle des Primers humanes endothelin 3.*

3.2.4 Der humane CAS-Genlocus

Von 32 informativen PCR-Proben, die mit Hilfe des Primers humanes CAS gewonnen wurden, zeigten nach elektrophoretischer Auftrennung unter Einbezug des Housekeeping-Gens humanes ß-actin 20 Proben (62,5%) eine Zunahme der OD der Bande im Tumormaterial gegenüber der Normalprobe. Das Verhältnis war bei Zunahme der OD des Tumormaterials gegenüber dem Normalgewebe im arithmetischen Mittel 1,5.

Von 32 informativen PCR-Proben, die mit Hilfe des Primers humanes CAS gewonnen wurden, zeigten nach elektrophoretischer Auftrennung unter Einbezug des Housekeeping-Gens humanes ß-actin 12 Proben (37,5%) eine Abnahme der OD der Bande im Tumormaterial gegenüber der Normalprobe. Das Verhältnis war bei Abnahme der OD des Tumormaterials gegenüber dem Normalgewebe im arithmetischen Mittel 0,61.

Insgesamt betrug der Mittelwert der Tumor-/Normalratio $x = 1,1$ und die Standardabweichung $s = 0,46$. Der Median lag bei 1,12.

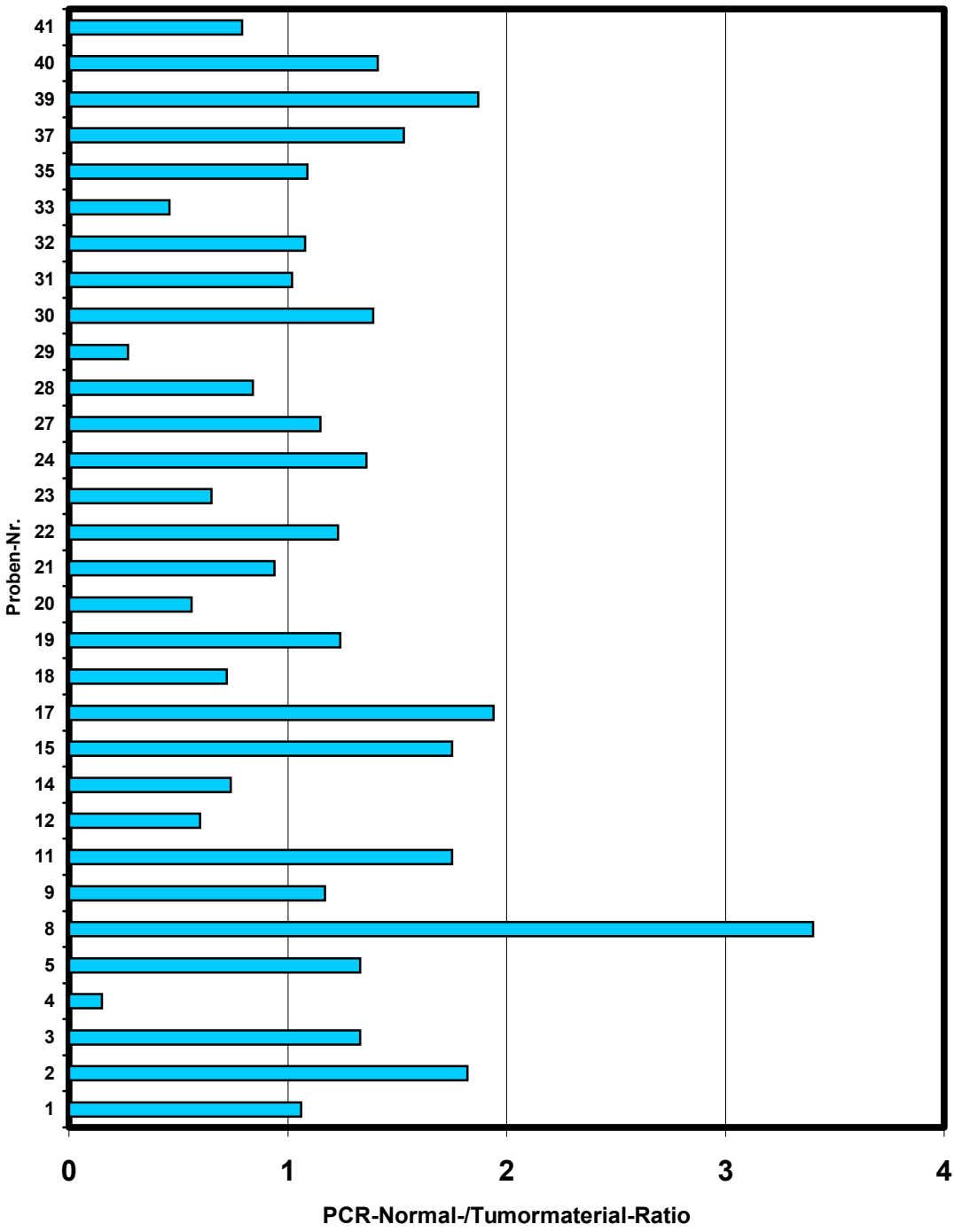


Abbildung 19: *Zunahme der OD des Tumormaterials gegenüber dem Normalgewebe unter Einbezug des Hous-keeping-Gens humanes ß-actin im Falle des Primers humanes CAS.*

3.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Auf Grund der densitometrischen Ergebnisse der PCR-Amplifikation der EDN3-, PTPN1-, CAS-, D20S96-, und SRC-Genloci wurde bei einem PCR-Normalgewebe-/Tumor-Verhältnis von > 1,75 (entspricht der mehr als 3,5-fachen haploiden DNA) von einer Gesamtamplifikation ausgegangen. Bei einem Wert unter 0,5 (entspricht weniger als der einfachen haploiden DNA) wurde von einem Verlust im Bereich eines Genlocus ausgegangen. Die Zusammenfassung der Ergebnisse ist in der Tabelle 10 dargestellt.

Fall-Nr.	EDN3-Genlocus	PTPN1-Genlocus	CAS-Genlocus	SRC-Genlocus
1	norm.	norm.	norm.	norm.
2	+	n.i.	+	norm.
3	norm.	n.i.	norm.	norm.
4	norm.	norm.	-	norm.
5	n.i.	n.i.	norm.	n.i.
8	+	n.i.	+	norm.
9	norm.	n.i.	norm.	norm.
11	norm.	norm.	norm.	norm.
12	norm.	norm.	norm.	norm.
14	norm.	norm.	norm.	norm.
15	norm.	n.i.	norm.	-
17	+	norm.	+	norm.
18	n.i.	n.i.	norm.	norm.
19	n.i.	n.i.	norm.	n.i.
20	norm.	-	norm.	norm.
21	norm.	norm.	norm.	norm.
22	+	+	norm.	+
23	norm.	norm.	norm.	norm.
24	+	norm.	norm.	norm.
27	norm.	norm.	norm.	norm.
28	norm.	norm.	norm.	norm.
29	-	-	-	-
30	norm.	norm.	norm.	norm.
31	norm.	n.i.	norm.	+
32	norm.	norm.	norm.	norm.
33	norm.	norm.	-	norm.
35	+	n.i.	norm.	+
37	-	n.i.	norm.	norm.
39	norm.	n.i.	+	norm.
40	norm.	n.i.	norm.	norm.
41	n.i.	n.i.	norm.	+

Tabelle 10: *Zusammenschau der densitometrischen Ergebnisse der PCR-Amplifikation der EDN3,-, PTPN1-, CAS-, SRC-Genloci (Tumor-/Normal-Ratio) unter Einbezug des Housekeeping-Gen humanes ß-actin.*

Legende: +: *Ratio > 1,75;* ***-:*** *Ratio < 0,5;* ***norm.:*** *normal;* ***n.i.:*** *nicht informativ.*

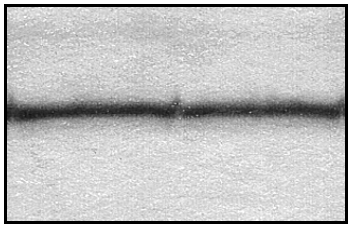
Von den 31 informativen Tumor-/Normalprobenpaaren zeigte ein Paar in 3 Genloci, 4 in 2 Genloci und 3 Paare in einem Locus eine Zunahme (Ratio > 1,75) der OD im Tumormaterial. Von den 31 informativen Tumor-/Normalprobenpaaren zeigte 1 Paar in 4 Genloci, und 5 Paare in einem Locus eine Abnahme (Ratio < 0,5) der OD im Tumormaterial.

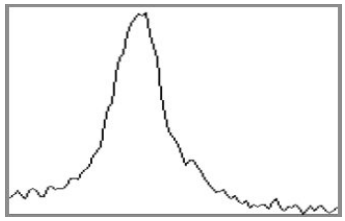
Im Locus humanes EDN3 zeigten sich in 6 von 27 (22,2%) informativen Fällen eine Zunahme der OD, in 2 (7,4%) Fällen eine Abnahme der OD.
Im Locus humanes PTPN1x zeigten sich in 1 von 17 (5,9%) informativen Fällen eine Zunahme der OD, in 2 (11,8%) Fällen eine Abnahme der OD.
Im Locus humanes CAS zeigten sich in 4 von 31 (12,9%) informativen Fällen eine Zunahme der OD, in 3 (9,7%) Fällen eine Abnahme der OD.
Im Locus humanes SRC zeigten sich in 4 von 29 (13,8%) informativen Fällen eine Zunahme der OD, in 2 (6,9%) Fällen eine Abnahme der OD.

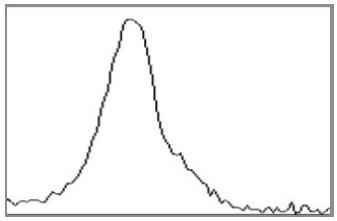
Für alle Genloci zusammengenommen zeigten 15 von 104 (14,4%) informativen Fällen eine Zunahme (Ratio > 1,75) und 9 Fälle (8,7%) eine Abnahme der OD (Ratio < 0,5) im Tumormaterial gegenüber der Normalprobe.

humanes ß-actin

N T



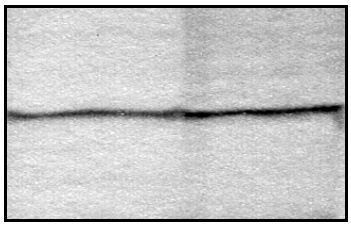


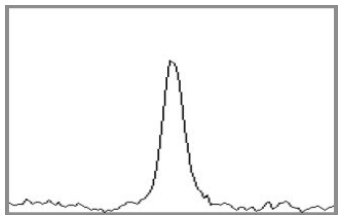


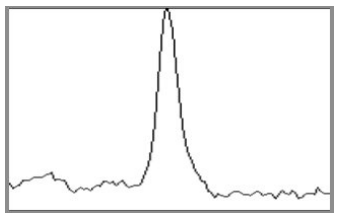
OD N: 7709 OD T: 7295

humanes SRC

N T





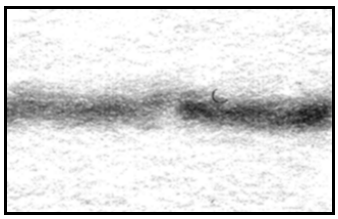


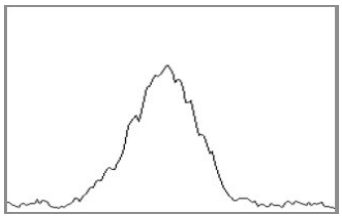
OD N: 2690 OD T: 3806

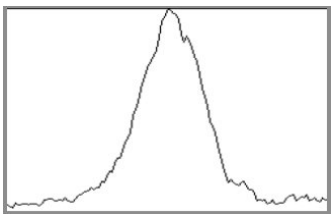
Faktor: 1,53

humanes CAS

N T





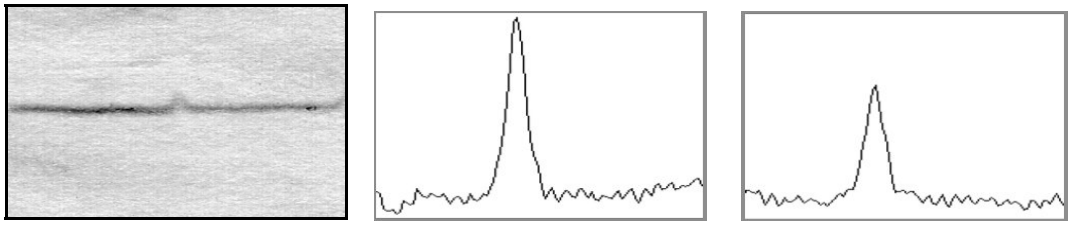


OD N: 863 OD T: 1144

Faktor: 1,39

humanes PTPN1

N **T**

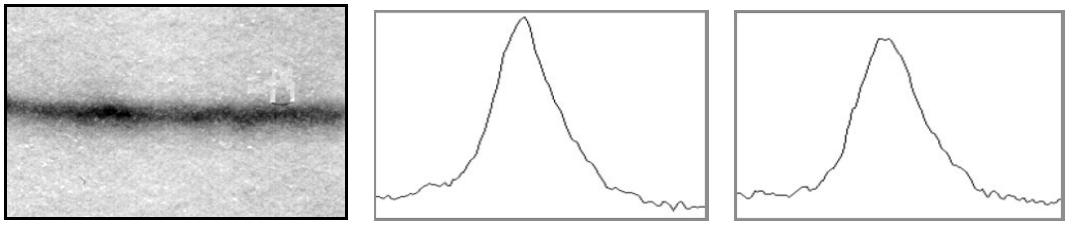


OD N: 2810 OD T: 1831

Faktor: 0,68

humanes EDN3

N **T**



OD N: 1279 OD T: 1220

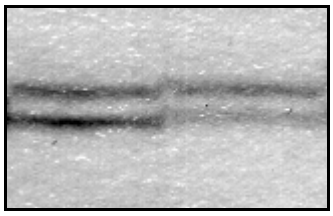
Faktor: 1,07

***Abbildung 20**: Beispielhafte Darstellung der elektrophoretischen Auftrennung von PCR-Proben mit Angabe der dazugehörigen optischen Dichte an Hand des Falles Nr. 30.*

Das Chromosom 20q wurde weiterhin mit Hilfe des Mikrosatelliten-Primers AFM-029yc3 untersucht. In 4 Fällen ließen sich ein Verlust der Heterozygosität im Locus D20S96 darstellen. Es zeigte sich jeweils in einer Bande im PCR-Produkt der Tumorprobe eine Verminderung der Intensität der Färbung.

Fall-Nr. 23

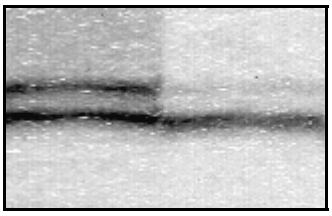
N **T**



mit Amplifikation in
den Loci hs CAS, hs PTPN1
und hs EDN3

Fall-Nr. 27

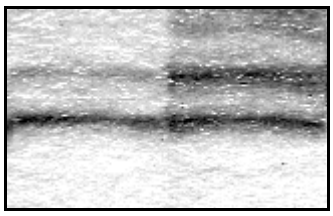
N **T**



mit Amplifikation im
Locus hs CAS

Fall-Nr. 31

N **T**



mit Amplifikation in
den Loci hs SRC, hs CAS
und hs EDN3

Fall-Nr. 34

N **T**

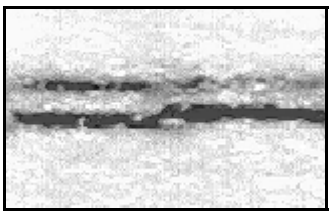


Abbildung 21: *Chromosomale Alteriationen des Locus D20S96.*

3.3 Korrelation zwischen den molekulargenetischen Ergebnissen und den klinisch-pathologischen Daten

3.3.1 Chromosom 9

Lediglich eine (Fall-Nr: 35) von 11 untersuchten Tumorproben zeigte einen LOH, und zwar sowohl im Locus D9S1813 als auch im Locus D9S156. Die Probe stammte von einem männlichen Patienten. Histologisch gehörte das CRC zu den glandulären Tumoren; der Tumor war mäßig differenziert (G_2). Er ließ sich dem Tumorstadium $T_3N_2M_x$ zuordnen. Das CRC lag proximal der Flexura coli sinistra, also rechtsseitig.

3.3.2 Chromosom 13

Lediglich eine (Fall-Nr: 15) von 11 untersuchten Tumorproben zeigte einen LOH, und zwar im Locus Rb 1.20. Die Probe stammt von einem männlichen Patienten. Histologisch gehörte das CRC zu den glandulär-desmoformen Tumoren; der Tumor war mäßig differenziert (G_2). Er ließ sich dem Tumorstadium $T_2N_0M_x$ zuordnen. Das CRC lag proximal der Flexura coli sinistra, also rechtsseitig.

3.3.3 Das Chromosom 20q

3.3.3.1 Zusammenhang zwischen der Tumorlokalisation und den Ergebnissen der densitometrischen Bestimmungen bezüglich des Primers humanes CAS und 3 seiner flankierenden Marker

In folgender Tabelle wurde die Anzahl der Fälle, die eine Zunahme der OD (Ratio > 1,75) im Tumormaterial gegenüber dem Normalgewebe bzw. Abnahme der OD (Ratio < 0,5) zeigten, der Anzahl der Fälle gegenübergestellt, die für diesen Primer informativ waren.

Lokalisation	**hs SRC**	**hs CAS**	**hs PTPN1x**	**hs EDN3**	**Summe**
Links	1 / 6	1 / 7	0 / 3	0 / 5	2 / 23
Zunahme	(16,6%)	(14,3%)	(0%)	(0%)	(8,7%)
Abnahme	0 / 6	0 / 7	1/ 3	0 / 5	1 / 23
	(0%)	(0%)	(33,3%)	(0%)	(4,3%)
Rechts	3 / 22	3 / 24	1 / 14	6 / 23	13 / 81
Zunahme	(13,6%)	(12,5%)	(7,1%)	(26%)	(16%)
Abnahme	2 / 22	2 / 24	1 / 14	2 / 23	7 / 81
	(9,1%)	(8,3%)	(7,1%)	(8,7%)	(8,6%)

Tabelle 11: *Assoziation zwischen der Tumorlokalisation und den Ergebnissen der densitometrischen Bestimmungen.*

Legende: Links: *CRC distal der Flexura coli sinistra gelegen;* ***Rechts:*** *CRC proximal der Flexura coli sinistra gelegen.*

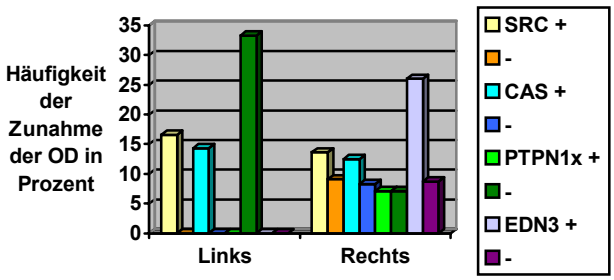


Abbildung 22: *Sowohl für die linksseitig gelegenen als auch die rechtsseitig gelegenen CRC wird die Häufigkeit der relativen Zunahme der OD in Prozent im Tumormaterial gegenüber dem Normalgewebe der Häufigkeit der relativen Abnahme der OD im Tumormaterial gegenüber dem Normalgewebe nebeneinandergestellt.*
Legende*: **Links:** CRC distal der Flexura coli sinistra gelegen; **Rechts:** CRC proximal der Flexura coli sinistra gelegen; **+:** Zunahme der OD; **-:** Abnahme der OD.*

Insgesamt zeigten somit von 81 informativen PCR-Produkten des CRC-Probenmaterials des rechten Colonabschnittes 13 (16%) eine Zunahme und 7 (8,6%) eine Abnahme der OD im Tumormaterial gegenüber der Normalprobe. Demgegenüber zeigten von 23 PCR-Produkten des CRC-Probenmaterials aus dem linken Colonabschnitt 2 (8,7%) eine Zunahme und 1 (4,3%) eine Abnahme der OD.

3.2.2.2 Assoziation zwischen der Tumorhistologie und den Ergebnissen der densitometrischen Bestimmungen bezüglich des Primers humanes CAS und 3 seiner flankierenden Marker

In folgender Tabelle wurde die Anzahl der Fälle, die eine Zunahme der OD (Ratio > 1,75) bzw. Abnahme der OD (Ratio < 0,5) zeigten, der Anzahl der Fälle gegenübergestellt, die für diesen Primer informativ waren (Tabelle 12).

Histologie	hs SRC	hs CAS	hs PTPN1x	hs EDN3	Summe
glandulär	3 / 19	3 / 21	1 / 15	6 / 19	13 / 74
Zunahme	(15,8%)	(14,3%)	(6,7%)	(31,6%)	(17,6%)
Abnahme	1 / 19	2 / 21	2 / 15	1 / 19	6 / 74
	(5,3%)	(9,5%)	(13,3%)	(5,3%)	(8,1%)
cibriform	0 / 3	0 / 3	*	0 / 2	0 / 8
Zunahme	(0%)	(0%)		(0%)	(0%)
Abnahme	0 / 3	0 / 3	*	1 / 2	1 / 8
	(0%)	(0%)		(50%)	(12,5%)
muzinös	0 / 1	0 / 1	0 / 1	0 / 1	0 / 4
Zunahme	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
Abnahme	0 / 1	0 / 1	0 / 1	0 / 1	0 / 4
	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
glandulär-cibriform	0 / 2	1 / 2	0 / 2	0 / 2	1 / 8
Zunahme	(0%)	(50%)	(0%)	(0%)	(12,5%)
Abnahme	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 8
	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
solide	*	0 / 1	*	*	0 / 1
Zunahme		(0%)			(0%)
Abnahme		0 / 1			0 / 1
		(0%)			(0%)
Adenomatös	*	*	*	*	
Zunahme					
Abnahme	*	*	*	*	
papillär	0 / 1	0/ 1	*	0 / 1	0 / 3
Zunahme	(0%)	(0%)		(0%)	(0%)
Abnahme	0 / 1	0 / 1	*	0 / 1	0 / 3
	(0%)	(0%)		(0%)	(0%)
glandulär-solide	*	*	*	*	*
Zunahme					
Abnahme	*	*	*	*	*
glandulär-	0 / 1	0 / 1	*	0 / 1	0 / 3
desmoform	(0%)	(0%)		(0%)	(0%)
Zunahme					
Abnahme	1 / 1	0 / 1	*	0 / 1	1 / 3
	(100%)	(0%)		(0%)	(33,3%)
solid-muzinös-	0 / 1	0/ 1	0 / 1	0 / 1	0 / 4
adenomatös	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
Zunahme					
Abnahme	0 / 1	0 / 1	0 / 1	0 / 1	0 / 4
	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
muzinös-papillär	*	*	*	*	0 / 4
					(0%)

Tabelle 12: *Zusammenhang zwischen den Ergebnissen der densitometrischen Bestimmungen und der Tumorhistologie.*

Legende: *: *nicht informativ.*

3.3.3.2 Assoziation zwischen der histopathologischen Gradeinteilung (grading) und den Ergebnissen der densitometrischen Bestimmungen bezüglich des Primers humanes CAS und 3 seiner flankierenden Marker

In der folgenden Tabelle wurde die Anzahl der Fälle, die eine Zunahme der OD (Ratio > 1,75) bzw. Abnahme der OD (Ratio < 0,5) im PCR-Produkt des Tumormaterials gegenüber dem Normalmaterial zeigten, der Anzahl der Fälle gegenübergestellt, die für diesen Primer informativ waren.

Differenzierungs-Grad	**hs SRC**	**hs CAS**	**hs PTPN1x**	**hsEDN3**	**Summe**
G_2	4 / 24	3 / 24	1 / 15	5 / 22	13 / 85
Zunahme	(16,7%)	(12,5%)	(6,7%)	(22,7%)	(15,3%)
Abnahme	2 / 24	2 / 24	2 / 15	2 / 22	8 / 85
	(8,3%)	(8,3%)	(13,3%)	(9,1%)	(9,4%)
G_3	0 / 5	1 / 6	0 / 3	0 / 5	1 / 19
Zunahme	(0%)	(16,7%)	(0%)	(0%)	(5,3%)
Abnahme	0 / 5	0 / 6	0 / 3	0 / 5	0 / 19
	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)

Tabelle 13: *Assoziation zwischen den histopathologischen Differenzierungsgraden (grading) und den Ergebnissen der densitometrischen Bestimmungen.*
Legende: *: *nicht informativ;* ***G_2 :*** *mäßiger Differenzierungsgrad;* ***G_3:*** *niedriger Differenzierungsgrad.*

Jeweils alle Genloci zusammengefaßt, zeigten somit von 85 informativen PCR-Produkten des CRC-Probenmaterials mit einem histologisch mäßigem Differenzierungsgrad 13 (15,3%) eine Zunahme und 8 (9,4%) eine Abnahme der OD im Tumormaterial gegenüber der Normalprobe. Demgegenüber zeigten von 19 PCR-Produkten des CRC-Probenmaterials mit einem histologisch niedrigem Differenzierungsgrad 1 (5,3%) eine Zunahme und keines eine Abnahme der OD.

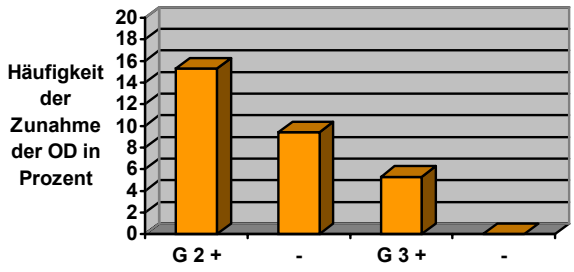


Abbildung 23: *Zusammenhang zwischen der Zunahme der OD im Tumormaterial gegenüber dem Normalmaterial und dem Differenzierungsgrad des Tumors. Häufigkeit der Zunahme der OD in Prozent, alle Genloci zusammen genommen.*

Legende: ***G2:*** *mäßiger Differenzierungsgrad;* ***G3:*** *niedriger Differenzierungsgrad;* ***+:*** *Zunahme der OD;* ***-:*** *Abnahme der OD.*

3.3.3.3 Assoziation zwischen der Stadieneinteilung nach UICC und den Ergebnissen der densitometrischen Bestimmungen

In folgender Tabelle wurde die Anzahl der Fälle, die eine Zunahme der OD (Ratio > 1,75) bzw. Abnahme der OD (Ratio < 0,5) im PCR-Produkt des Tumormaterials gegenüber der Normalprobe zeigten, der Anzahl der Fälle gegenübergestellt, die für diesen Primer informativ waren.

Stadium	hs SRC	hs CAS	hs PTPN1x	hsEDN3	Summe
I	1 / 7	1 / 7	*	1 / 7	3 / 21
Zunahme	(14,3%)	(14,3%)		(14,3%)	(14,3%)
Abnahme	0 / 7	0 / 7	*	1 / 7	1 / 21
	(0%)	(0%)		(14,3%)	(4,8%)
II	1 / 2	0 / 2	1 / 2	1 / 2	3 / 8
Zunahme	(50%)	(0%)	(50%)	(50%)	(37,5%)
Abnahme	0 / 2	1 / 2	1 / 2	0 / 2	2 / 8
	(0%)	(50%)	(50%)	(0%)	(25%)
III	2 / 5	2 / 5	0 / 2	2 / 4	6 / 16
Zunahme	(40%)	(40%)	(0%)	(50%)	(37,5%)
Abnahme	1 / 5	1 / 5	2 / 2	1 / 4	5 / 16
	(20%)	(20%)	(100%)	(25%)	(31,2%)
IV	0 / 2	0 / 4	0 / 1	0 / 1	0 / 8
Zunahme/ Abnahme	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)

Tabelle 14: *Assoziation zwischen der Stadieneinteilung nach UICC und den Ergebnissen der densitometrischen Bestimmungen.*
Legende: *: *nicht informativ. Bei 17 Tumoren war eine Stadieneinteilung nicht möglich.*

Jeweils alle Genloci zusammengefaßt, zeigten somit von 21 informativen PCR-Produkten des CRC-Probenmaterials im Stadium I 4 (19%) eine Zunahme und einer (4,8%) eine Abnahme der OD im Tumormaterial gegenüber der Normalprobe. Demgegenüber zeigten von 8 PCR-Produkten des CRC-

Probenmaterials im Stadium II 4 (50%) eine Zunahme und einer (25%) eine Abnahme der OD. Von 16 PCR-Produkten des CRC-Probenmaterials im Stadium III zeigten 6 (37,5%) eine Zunahme und 5 (31,2%) eine Abnahme der OD. Im Stadium IV zeigten von 8 PCR-Produkten des CRC-Probenmaterials weder ein CRC eine Zunahme noch eine Abnahme der OD.

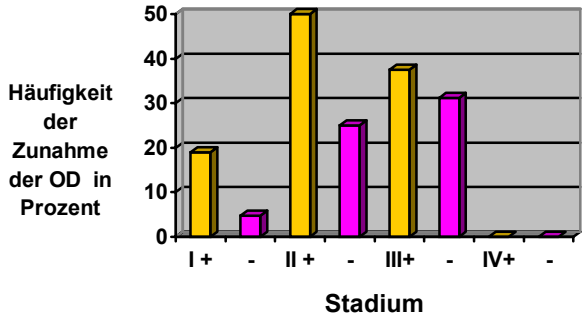


***Abbildung 24**: Zusammenhang zwischen der Zunahme der OD und der Stadieneinteilung des Tumors. Häufigkeit der Zunahme bzw. Abnahme der OD im einzelnen Tumorstadium in Prozent, jeweils alle Genloci zusammengefaßt.*
***Legende: I:** Stadium I; **II:** Stadium II; **III:** Stadium III; **IV:** Stadium IV; **+:** Zunahme der OD; **-:** Abnahme der OD.*

3.3.3.4 Zusammenhang zwischen der Geschlechtszugehörigkeit und den Ergebnissen der densitometrischen Bestimmungen.

In folgender Tabelle wurde die Anzahl der Fälle, die eine Zunahme der OD (Ratio > 1,75) bzw. Abnahme der OD (Ratio < 0,5) im PCR-Produkt des Tumormaterials gegenüber dem Normalmaterial zeigten, der Anzahl der Fälle gegenübergestellt, die für diesen Primer informativ waren.

Geschlecht	**hs SRC**	**hs CAS**	**hs PTPN1x**	**hs EDN3**	**Summe**
männlich	3 / 25	4 / 25	1 / 13	6 / 23	14 / 86
Zunahme	(12%)	(16%)	(7,7%)	(26,1%)	(16,3%)
Abnahme	2 / 25	2 / 25	2 / 13	2 / 23	8 / 86
	(8%)	(8%)	(15,4%)	(8,7%)	(9,3%)
weiblich	0 / 4	0 / 5	0 / 4	0 / 4	0 / 18
Zunahme	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
Abnahme	0 / 4	0 / 5	0 / 4	0 / 4	0 / 18
	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)

Tabelle 15: *Assoziation zwischen der Geschlechterverteilung und den Ergebnissen der densitometrischen Bestimmungen.*

Von 86 PCR-Produkten der CRC-Probenmaterialien, welche von männlichen Patienten entnommen wurden, zeigten 14 (16,3%) eine Zunahme (Ratio > 1,75) und 8 (9,3%) eine Abnahme (Ratio < 0,5) der OD im Tumormaterial gegenüber dem Normalmaterial. Von 18 PCR-Produkten der CRC-Probenmaterialien, welche von weiblichen Patienten entnommen wurden, zeigte kein Fall eine Zunahme oder eine Abnahme der OD.

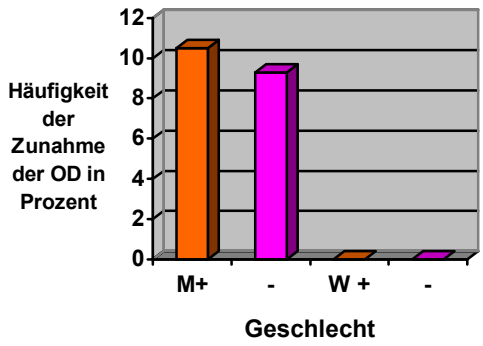


Abbildung 25: *Zusammenhang zwischen der Zunahme der OD und der Geschlechtszugehörigkeit des betroffenen Patienten. Häufigkeit der Zunahme der OD in Prozent, alle Genloci zusammen genommen.*
Legende: ****:*** *nicht informativ;* ***+:*** *Zunahme der OD;* ***-:*** *Abnahme der OD;* ***M:*** *männlich;* ***W:*** *weiblich.*

3.4 Der Locus D20S96

In 4 Fällen konnte mit Hilfe des Primers AFM-029yc3 im Locus D20S96 eine genetische Alteration gezeigt werden. Sowohl für die histologischen als auch für die klinischen Parameter und den Angaben zum Patientengut ließ sich kein Zusammenhang mit dem Auftreten von genetischen Alterationen stellen. Lediglich die Probennummer 31 zeigte zusätzlich zum LOH im Locus D20S96 auch eine Zunahme (Ratio > 1,75) der OD im Tumormaterial gegenüber der Normalprobe im Falle des Primers hs SRC.

Fall-Nr.	Geschlecht	Histologie	Differen-zierung	Stadium	Amplifikation
23	männlich	glandulär-cibriform	G_2	*	
27	weiblich	solid-muzinös-adenomatös	G_3	*	
31	männlich	glandulär	G_2	I	Zunahme im Genlocus hs SRC
34	männlich	muzinös	G_2	II	

Tabelle 16: *Angaben zum Patientengut, der Klinik und der Tumorhistologie.*
Legende: G: *Grad der Differenzierung;* ****:*** *nicht bestimmt.*

4 Diskussion

Die Genetik der Tumorigenese der CRC wurde in den letzten Jahren intensiv untersucht, so daß man heute weiß, daß eine Vielzahl von genetischen Alterationen in die Entstehung eines CRC involviert sind.
Das Retinoblastom- und CDKN2-Gen sind beides gut charakterisierte Tumor-Suppressor-Gene, die, wenn sie inaktiviert werden, zu einem Verlust der Negativ-Regulation des Zell-Zyklus und letztendlich zu einer unkontrollierten Proliferation und zur malignen Transformation eines Gewebes führen können (Chetty 1998, Kamb 1994). Es wird spekuliert, daß das Genprodukt des CAS-Genlocus eine wichtige Funktion in der Zellteilung und Apoptose übernimmt (Brinkmann 1995ab, 1996a, 1998). In verschiedenen Malignomen konnte eine vielfache Amplifikation dieses Genlocus nachgewiesen werden (Brinkmann 1996b, Tanner 1994, Wellmann 1997).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 11 sporadisch aufgetretene CRC mit Hilfe der PCR auf einen Verlust der Heterozygosität im Bereich des CDKN2A-Genlocus (Chromosom 9p) und Rb-Genlocus (Chromosom 13q) untersucht.
Es wurden insgesamt 41 DNA-Proben mit dem Primer für das CAS-Gen (Chromosom 20q) und flankierende Marker auf eine Amplifikation der jeweiligen Chromosomenregionen untersucht.

Lediglich in einem von 11 (7,7%) der untersuchten CRC-DNA-Proben konnte ein LOH der Chromosomenregion 9p21-22 nachgewiesen werden. Diese Probe zeigte bei 2 der 4 zur Analyse verwendeten Primer einen LOH. Dabei handelte es sich um die Loci D9S1813 und D9S156.
Ein direkter Vergleich unserer Daten mit entsprechenden Angaben in der Literatur ist für die Loci D9S183 und D9S156 nicht möglich. Jedoch konnte in einer vorhergehenden Arbeit in dem benachbarten Locus D9S171 (CDKN2-Gen) auch nur in einem von 18 CRC-Fällen (5,5%) ein LOH gezeigt werden, was sich mit unseren Versuchsergebnissen für die beiden oben genannten Genloci deckt (Schlegel 1995).

Es wurden 11 Tumorproben mit 2 Primern aus dem Bereich des Rb-Genlocus 13q14.3 auf LOH untersucht. Wiederum wies nur eine von 11 CRC-Proben (7,7%) im PCR-Produkt des Tumormaterials einen LOH im Rb-Genlocus auf. Die Arbeitsgruppe von Chiang zeigte mit 7 von 57 (13%) CRC-Fällen eine nahezu doppelt so hohe Zahl an LOH im Rb-Genlocus als in der vorliegenden Arbeit (Chiang 1998). Ursächlich für dieses differente Ergebnis könnte unter anderem die um ein fünffaches höhere Fallzahl gewesen sein.

Einundvierzig CRC- und ihre korrespondierenden Normal-DNA-Proben wurden mit dem Primer für das CAS-Gen und 4 seiner flankierenden Marker auf eine Amplifikation der jeweiligen Chromosomenregionen untersucht. Für alle Genloci zusammen genommen konnte sowohl in 15 von 104 (14%) der informativen Fälle eine relative Zunahme der OD über den Faktor 1,5 im Tumormaterial gegenüber dem Normalmaterial, als auch in 9 von 104 (9%) der Fälle ein Verlust der OD um weniger als den Faktor 0,75 gezeigt werden. Somit kann zwar tendenziell eher von einer häufigeren Amplifikation als von einem Verlust von Chromosomenmaterial im Tumor- gegenüber dem Normalmaterial gesprochen werden, jedoch sind diese Ergebnisse nicht signifikant.

4.1 Der Nachweis eines LOH mit Hilfe der qualitativen PCR

Die Polymerasenkettenreaktion ist eine Methode, bei der Oligonukleotidprimer dazu eingesetzt werden, um bestimmte DNA-Sequenzen (z.B. Genloci) selektiv zu amplifizieren. Man kann mit Hilfe der PCR geringste Mengen einer Ziel-DNA hochspezifisch klonieren. Die außergewöhnliche Empfindlichkeit der Methode bedeutet jedoch gleichzeitig eine große Empfindlichkeit gegenüber Kontaminationen externer DNA (Strachan 1996).
Ein Verlust der Heterozygosität (LOH) bedeutet den Verlust eines Allels auf einem Chromosom. Man kann diesen Verlust mit Markern nachweisen, für die die betreffende Person heterozygot ist. Um durch einen LOH eine Inaktivierung eines Gens zu erklären, geht man davon aus, daß das

verbliebene Allel nicht funktionell ist, z.B. durch eine angeborene oder zweite somatische Mutation (Kamb 1994).
Je höher die Kontamination des Probenmaterials mit Stromazellen, Entzündungszellen und umgebendem Normalgewebe, desto unsicherer die Interpretation der Untersuchungsergebnisse der PCR, da mit einer hohen Zahl an falsch negativen Ergebnissen zu rechnen ist. Auch kann eine intratumorale Heterogenität einer malignen Neoplasie dazu führen, daß ein LOH in den analysierten Regionen nicht zur Darstellung kommt, wenn der Prozentsatz der alterierten Zellen zu gering ist (Latil 1999).

4.2 Der Nachweis einer Amplifikation mit Hilfe der quantitativen PCR

Es ist bekannt, daß das PCR-Ausgangsprodukt (PCR-Edukt) während der PCR einer exponentiellen Amplifikation unterliegt. Eine mathematische Beschreibung der Produkt-Akkumulation während der PCR in jedem Zyklus ist die Folgende:

$$Y_n = Y_{n-1} \bullet (1+ E_v), \text{ mit } 0 \leq E_v \leq 1 \text{ (Gleichung 1)}$$

E_v steht für die Effektivität der Amplifikation, Y_n repräsentiert die Nummer der Moleküle des PCR-Produktes nach einem Zyklus n, und Y_{n-1} ist die Nummer der Moleküle des PCR-Produktes nach dem Zyklus n - 1. Um die Nummer der Moleküle des PCR-Produktes nach einer bestimmten Anzahl von Zyklen zu berechnen, muß die Gleichung gelöst werden. Da E_v für eine limitierte Anzahl von Zyklen während der exponentiellen Phase der Reaktion gleich bleibt, ist diese Berechnung nur während dieser Phase möglich. Somit kann die Akkumulation des PCR-Produktes annähernd mit folgender Gleichung beschrieben werden:

$$Y = X \bullet (1 + E_e)^n \text{ (Gleichung 2)}$$

Y repräsentiert die Nummer der Moleküle des PCR-Produktes und X das PCR-Edukt, n die Nummer der Zyklen. Da pro Zyklus höchstens eine Kopie erstellt werden kann hat die Effektivität (E_e) einen Wert zwischen 0 und 1. Die zweite

Gleichung ist nur für eine begrenzte Anzahl von Zyklen gültig, normaler Weise für bis zu 20 oder 30 Zyklen. Dann verlangsamt sich der Amplifikationsprozess hin zu einer konstanten Amplifikationsrate, bis eine Plateauphase erreicht wird und keine weitere Amplifikation mehr stattfindet. Für Gleichung 1 würde das bedeuten, daß E_v immer kleiner werden würde bis es den Wert 0 erreicht hat (Hengen 1995, Reischl 1999). Das heißt, falls verschiedene PCR-Reaktionsgemische verwendet werden, die eine unterschiedliche Menge an PCR-Edukt enthalten, diese die gleiche Zykluszahl durchlaufen und die Amplifikation über die exponentielle Phase hinaus ausgedehnt wird, daß die quantitativen Unterschiede zwischen den PCR-Produkten geringer ausfallen können als sie initial im PCR-Edukt vorlagen. Ursächlich dafür ist die Tatsache, daß Reaktionsgemische, die von Beginn an mehr Startmaterial (DNA) beinhaltet haben, schneller die Plateauphase erreichen als Gemische, die eine geringere Menge aufwiesen (Raemaekers 1999).

Der Charakter der PCR-Reaktion in seiner konventionellen Form erlaubt es nicht, die Nukleinsäuren eines speziellen Chromosomenabschnittes direkt zu quantifizieren. Schon geringfügige Differenzen in der Effizienz von Amplifikationsreaktionen können eine große Auswirkung auf die Quantität des PCR-Produkts haben (Hengen 1995, Orlando 1998). Neben den vorhersehbaren Variabilitäten (Schwankungen in der Ursprungskonzentration der DNA, Qualität und Konzentration der taq-Polymerase, der d´NTPs, $MgCl_2$, Primer), können zusätzlich eine Anzahl von nicht vorhersehbaren Faktoren, häufig verbunden mit der Qualität der extrahierten DNA, Einfluß auf das PCR-Produkt nehmen (Orlando 1998, Zimmermann 1996).

Der Ausdruck „Quantitative PCR“ steht für jede PCR-Technik, die es ermöglicht, in einer Probe die Menge eines speziellen DNA-Abschnittes zuverlässig zu bestimmen (Orlando 1998). Abhängig von der jeweiligen Extraktionsprozedur, enthalten aus zellulärem Material isolierte Nukleinsäuren eine große Zahl von „nicht-Ziel-DNA“. Die Gegenwart von weiteren zellulären Nukleinsäuren ermöglicht die Coamplifikation einer weiteren DNA-Sequenz gemeinsam mit der Zielsequenz im gleichen Ansatz. Diese zweite Zielsequenz sollte mit der ersten Zielsequenz weder Primer-Bindungs-Sequenzen teilen,

noch in Regionen liegen, die sich zwischen den beiden Primer-Bindungs-Sequenzen befinden (Reischl 1999).
Für die sogenannte semiquantitative, nicht kompetitive PCR können interne Standards in Form von Referenz-Genen genutzt werden. Die Verwendung von Referenz-Genen kann Fehlern vorbeugen, die durch Unterschiede in der Konzentration und Qualität von DNA-Proben entstehen. Häufig wird, wie in der vorliegenden Arbeit, als Referenz-Gen das Housekeeping-Gen β-actin eingesetzt. Zur Bestimmung der relativen Menge des interessierenden DNA-Abschnittes wird das Verhältnis zwischen den beiden gewonnenen PCR-Produkten herangezogen (Orlando 1998, Raemaekers 1999).

4.3 Verluste der Heterozygosität im Bereich der Chromosomen 9p und 13q

4.3.1 Die Chromosomenregion 9p21-22

Die Inaktivierung des CDKN2-Gens auf dem Chromosom 9p wurde schon in zahlreichen Malignomen beobachtet, zu denen Carcinome der Leber, der Mamma, der Lunge, der Niere und des Ösophagus gehören (Cairns 1995, Marsh 1997, Mead 1994, Nobori 1994, Piao 1998, Tarmin 1994). Arbeiten, die sich mit dem Verlust der Heterozygosität flankierender Marker des CDKN2-Gens in hepatozellulären Carcinomen und Mammacarcinomen befaßten, fanden in 40 - 50% der Fälle einen LOH (Marsh 1997, Piao 1998).

In einer Arbeit von Schlegel aus dem Jahre 1995 wurden 18 CRC mit Hilfe der Mikrosatelliten-PCR bezüglich des Genlocus D9S171 (CDKN2-Gen) auf LOH untersucht. Es zeigte sich lediglich in einem Fall ein LOH, entsprechend also in 5,5% der Fälle. Weiterhin wurden die selben Tumor-DNA-Proben mittels der CGH auf Deletionen untersucht. Vier der 18 Proben (22%) wiesen eine Deletion des Chromosoms 9p auf, jedoch nicht die DNA-Probe, die einen LOH im Locus D9S171 zeigte. Die Ergebnisse der CGH deuteten auch daraufhin, daß sich Deletionen eher telomerisch der Region 9p22 befinden. In der Arbeit war der Genlocus D9S171 auf dem Chromosom 9p mit einem der 4 von uns untersuchten Genloci identisch (Schlegel 1995).

In unserer Arbeit zeigte eine von 11 (7,7%) mit Hilfe der PCR auf LOH untersuchten CRC-DNA-Proben einen LOH des Chromosoms 9p21-22. Diese Probe zeigte gleich bei 2 der 4 verwendeten Primer einen LOH. Dabei handelte es sich um die Loci D9S1813 und D9S156, der Locus D9S171 zeigte keine entsprechende Alteration. Jedoch wäre die Prozentzahl der detektierten LOH mit der in der Arbeit von Schlegel vergleichbar niedrig.

In einer Untersuchung aus dem Jahre 1998 wiesen 12 von 32 (38%) der mit Hilfe des Primers D9S958 (CDKN2-Gen) untersuchten CRC einen LOH auf. Da in dieser Arbeit eine andere Teilsequenz der Chromosomenregion des CDKN2-Genlocus, telomerisch der von uns untersuchten Region, herausgegriffen wurde, sind diese Zahlen mit unseren Daten nicht direkt vergleichbar (Tomlinson 1998). Die Tatsache, daß der in der Arbeit von Tomlinson verwendete Primer einen Genlocus telomerisch der von uns untersuchten Loci flankiert und einen deutlich höheren Prozentsatz an LOH aufweist, deckt sich mit den Ergebnissen der CGH-Untersuchung von Schlegel, die schon einen Hinweis darauf lieferten, daß genetische Alterationen eher telomerisch des Locus D9S171 zu erwarten sind (Schlegel 1995).

Die Beobachtung, daß sich bei einer Tumor-Probe gleich 2 LOH in benachbarten Loci zeigten, legt die Vermutung nahe, daß ein größerer Abschnitt des Chromosoms 9p von einer Alteration betroffen ist, die beide Loci involviert. Andererseits besteht auch die Möglichkeit, daß nicht der gesamte Bereich zwischen diesen beiden Loci von einem LOH betroffen ist, vielleicht aber der Verlust in einem Locus das Auftreten eines weiteren LOH begünstigt hat. Letztere Beobachtung wurde auch schon in Studien an Magen- (Cho 1996) und Mammacarcinomen (Marsh 1997) gemacht.

4.3.2 Die Chromsomenregion 13q14.3

Eine Arbeit, die sich mit LOH im Bereich des Rb-Gens beschäftigte, konnte im Falle des CRC in 7 der 53 (13%) untersuchten Tumore einen LOH im Locus 13q14.3 aufzeigen (Chiang 1998). Eine weitere Untersuchung aus dem selben

Jahr wies in 8 von 49 (16%) der CRC-DNA-Proben einen LOH nach (Tomlinson 1998).

Ferner konnte in Prostatacarcinomen in 38% der Fälle (18/47) und in Carcinomen der Mamma in 21% der Fälle mindestens ein LOH (139 Tumorproben, 4 Marker der Rb-Gen-Region) nachgewiesen werden (Eiriksdottir 1998, Latil 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurden 11 Tumorproben mit 2 Primern im Bereich des Rb-Genlocus 13q14.3 auf LOH untersucht. Nur eine von 11 CRC-Proben wies im PCR-Produkt des Tumormaterials einen LOH im Rb-Genlocus auf. Eine Ursache für dieses Ergebnis könnte sicherlich die niedrigere Fallzahl in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu den oben aufgeführten Arbeiten sein.

Sowohl bezüglich der Chromosomenregion 9p21-22 als auch der Region 13q14.3 scheinen bei einer Zusammenschau unserer Daten und der Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, Verluste der Heterozygosität als möglicher Pathomechanismus der Tumorigenese in Carcinomen der Mamma, Prostata und Leber häufiger aufzutreten als in CRC.

4.3.3 Patientengut, Tumorlokalisation und Tumorhistologie

In einer Arbeit aus dem Jahre 1999 wurden 42 Proben von Patienten mit CRC mit 150 Primern Genom-weit auf LOH mit Hilfe der PCR untersucht. Es stellte sich heraus, daß bezüglich des Chromosoms 9p in der Gruppe der jüngeren Patienten (< 50 Jahre) 50% (5/10) aller informativen Tumorproben und in der Gruppe der älteren Patienten (> 50 Jahre) lediglich 8% (2/23) einen LOH zeigten. Auch das Ergebnis der Untersuchung eines weiteren Chromosoms (14q) zeigte eine Altersverteilung, die in die leiche Richtung weist : 60% (6/10) der Tumorproben von jüngeren Patienten zeigten einen LOH, wohingegen nur 33% (8/24) der Proben in der Gruppe der älteren Patienten einen LOH aufwiesen (Weber 1999). Daraus ließ sich schließen, daß ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten von LOH in den untersuchten Chromosomenabschnitten und dem Alter in dem ein CRC aufgetreten ist besteht.

In der vorliegenden Arbeit lag das Durchschnittsalter der Patienten bei einem Alter von 65 Jahren, der jüngste Patient war 44 Jahre und der älteste 85 Jahre alt, was unter anderem eine Erklärung für unsere niedrigere Zahl an detektierten LOH sein könnte.

Weiterhin müssen bei dem Vergleich unserer Ergebnisse mit den Literaturangaben auch die unterschiedlichen ethnischen Hintergründe bedacht werden. So zeigte sich in einer Arbeit aus dem Jahre 1997, die sich mit Mutationen des Ki-*ras*-Oncogens und p53-Tumorsuppressor-Gens in CRC befaßte, daß in der europäischen Saar-Luxemburg-Region die Mutationsrate deutlich niedriger lag als in amerikanischen Studien (Pauly 1997). So stammen die Daten in den mit unserer Arbeit vergleichbaren Untersuchungen aus den USA (Tomlinson 1998, Weber 1999) und Taiwan (Chiang 1998).

Im Unterschied zum Gesamtkollektiv aller CRC-Patienten, in welchem Frauen von dieser Krebserkrankung häufiger als Männer betroffen sind (Bansal 1996), wurden in unserer Arbeit die Tumorproben von nur 10 weiblichen und dafür von 31 männlichen Personen untersucht.

Fraglich ist, in wie weit die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Carcinomproben bezüglich der Tumorlokalisation und -histologie repräsentativ im Vergleich zum Gesamtkollektiv der CRC sind. Auffallend ist, daß sich 73% (30/41) der in dieser Arbeit untersuchten Carcinome proximal der Flexura coli sinistra und lediglich 27% (11/41) der Tumoren sich im Colon descendens, Sigmoid oder Rectum befanden. Den Literaturangaben zur Folge finden sich dahingegen im Gesamtkollektiv der CRC schon alleine 75% der CRC im Sigmoid oder Rectum (Lehnert 1999).

Von den 41 untersuchten CRC gehörten 35 Proben (85%) histologisch zu den adenomatösen und 4 (10%) zu den muzinösen Tumoren. Zwei weitere Tumorproben waren keiner dieser beiden Differenzierungsmuster eindeutig zuzuordnen. Diese prozentuale Verteilung entspricht den Angaben zur histologischen Klassifizierung der CRC in der Literatur (Lehnert 1999).

4.3.4 Korrelation zwischen dem Auftreten eines LOH, den Angaben zum Patientengut und den klinischen und histo-pathologischen Parametern

Auf Grund der relativ geringen Fallzahl und der gleichzeitig hohen Heterogenität bezüglich der Angaben zur Tumorhistolgie bzw. der klinischen Stadieneinteilung der Krebserkrankung läßt sich keine Korrelation zwischen dem Auftreten eines LOH und den bekannten Angaben zum Patientengut und den klinischen und histo-pathologischen Parametern herstellen.

4.4 Bewertung der Untersuchung der Chromosomenregion des CAS-Gens mit Hilfe der semiquantitativen PCR

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 41 DNA-Proben mit dem Primer für das CAS-Gen und 4 seiner flankierenden Marker auf eine Amplifikation der jeweiligen Chromosomenregionen untersucht. Bei keinem der Loci konnte eine signifikante Zunahme der OD im Tumormaterial gegenüber der Normalprobe gezeigt werden. Für die jeweiligen eingesetzten Primer schwankte der Median

für die Ratio der OD von Tumor-/ und Normalprobe zwischen den Faktoren 0,85 und 1,12, der Mittelwert zwischen den Faktoren 1,09 und 1,25 und auch die Standardabweichung zwischen 0,46 und 0,74.
Auch nach Festsetzung eines Schwellenwertes, ab welchem eine Zunahme (Ratio > 1,75) oder Abnahme (Ratio < 0,5) der Ratio der OD in einem PCR-Produkt als eine Amplifikation bzw. als ein Verlust anzusehen ist, konnte lediglich für alle Genloci zusammen genommen in 14,4% (15/104) der informativen Fälle eine Amplifikation, aber auch in 8,7% (9/104) der Fälle ein Verlust nachgewiesen werden. Die Prozentzahlen schwankten für die einzelnen Loci bezüglich einer Zunahme der OD zwischen 12,9% (CAS-Gen) und 22,2% (humanes EDN3-Gen), sowie für eine Abnahme der OD zwischen 6,9% (humanes SRC) und 11,8% (humanes PTPN1x). Somit kann zwar tendenziell eher von einer Zunahme als von einer Abnahme der OD-Ratio im PCR-Produkt im Tumor- gegenüber dem Normalmaterial gesprochen werden, jedoch sind diese Ergebnisse auch unter dieser Betrachtungsweise nicht signifikant.

Im Vergleich dazu konnte in einer Untersuchung aus dem Jahre 1996 mit Hilfe von Southern-Blots in Coloncarcinomzelllinien eine bis zu fünffache Amplifikation des CAS-Gens nachgewiesen werden (Brinkmann 1996b).

Ursächlich für die bezüglich unserer Zielsetzung nicht signifikanten Daten in der vorliegenden Untersuchung könnte die für die PCR verwandte Zahl an Amplifikationszyklen sein. Jede PCR ist in unserer Arbeit 40 Zyklen durchlaufen. Nach Angaben der Literatur sollte die PCR bereits in der exponentiellen Amplifikationsphase gestoppt werden, das heißt nach ca. 20 bis 30 Zyklen (Reischl 1999).

Des weiteren wurde der als interne Standard genutzte Genlocus humanes ß-actin nicht im selben Probenansatz wie der Primer für das Zielgen amplifiziert, wie in der oben zitierten Literatur empfohlen, sondern es wurde hierzu in einem weiteren Versuchsansatz eine gesonderte PCR durchgeführt (Orlando 1998, Raemaekers 1999). Das kann zur Folge haben, daß schon leichte Schwankungen in Qualität und Quantität der eingesetzten DNA-Proben,

d´NTPs, taq-Polymerase usw. große Auswirkungen für die Menge der jeweiligen PCR-Produkte haben können.

Es ist auch zu berücksichtigen, daß in der Arbeit von Brinkmann die molekulargenetischen Untersuchungen an Carcinomzelllinien und nicht direkt am Tumorgewebe durchgeführt wurden, so daß in unserem Fall eine höhere Kontamination des Carcinommaterials durch Normalgewebe (Stroma, Entzündungszellen) zu erwarten ist, was wiederum vermehrt zu falsch negativen Versuchsergebnissen führen kann (Brinkmann 1996b).

4.5 Bedeutung der Resultate für die Molekularbiologie des CRC

Die Tatsache, daß in unserer Arbeit die jeweils 11 untersuchten Tumorproben für die 4 auf dem Chromosom 9p gelegenen Loci lediglich zwei LOH und auch für die 2 untersuchten Loci auf dem Chromosom 13q nur einen LOH zeigten, muß nicht bedeuten, daß Alterationen dieser Genloci nicht in die Entstehung der übrigen CRC einbezogen waren. Vielleicht waren Mechanismen wie Punktmutationen oder Mikrodeletionen der untersuchten Genloci in die Tumorigenese involviert, die mit unseren Untersuchungsmethoden nicht erfaßt werden konnten (Cho 1996).
Auch ist es denkbar, daß LOH in den Chromosomenregionen 9p21-22 und 13q14.3 für bislang noch nicht erfaßte Untergruppen der CRC als eine heterogene Erkrankung von Relevanz sind, wie es z.B. das Ergebnis der Untersuchung von Weber zeigte, in der LOH in der Region 9p21-22 besonders bei jüngeren Carcinompatienten gezeigt werden konnte (siehe 4.3.3) (Weber 1999).
Es werden weitere Studien von Nöten sein, um die klinische Bedeutung von spezifischen genetischen Alterationen wie LOH der Chromosomen 9p, 13q und Amplifikationen von Regionen des Chromosoms 20q in CRC für Prognose und Monitoring der Patienten zu ergründen. Bezüglich des Chromosoms 9p sollte zukünftig ein besonderes Augenmerk auf mögliche Deletionen telomerisch der von uns untersuchten Genloci gerichtet werden.

4.6 Perspektiven in der Onkologie

Das Wissen um molekulargenetische Veränderungen in colorektalen Neoplasien liefert gegenwärtig und auch in der Zukunft neue Strategien zur Behandlung von Patienten mit einem hohen Risiko, in ihrem Leben an einem CRC zu erkranken.
Schon heute ist es mit der detailierten molekularen Identifikation und Definition von Mutationen, die während der Tumorigenese auftauchen, in einem gewissen Umfang möglich, spezifische genetische Alterationen in präsymptomatischen Stadien einer Erkrankung zu detektieren oder durch diese Genanalysen Aussagen über die Rezidivwahrscheinlichkeit oder dem Metastasierungsverhalten eines Carcinoms zu treffen (Blum 1995, Lairmore 1997).
So wird es vielleicht möglich sein, Onkogene als Biomarker zur frühen Diagnose eines Krebsleidens einzusetzen. Sidransky et al. haben schon 1992 eine Methode vorgestellt, mit deren Hilfe, mutierte Formen des Ki-*ras*-Onkogens im Stuhl von 40% des untersuchten Patientenkollektivs mit CRC nachzuweisen war (Sidransky 1992). Auch war es bereits möglich, Ki-*ras*- (19% der untersuchten Fälle mit Ki-*ras*-Mutation im CRC) und p53-Mutationen (70% der untersuchten Fälle mit p53-Mutation im CRC) im Serum von CRC-Patienten nachzuweisen (Hibi 1998).
Nicht oder minimal invasive Diagnoseverfahren könnten auch die Compliance von Hoch-Risiko-Patienten (z.B. Verwandte eines FAP-Patienten) erhöhen, die ohne vorherige molekulargenetische Diagnostik eine Rekto-Sigmoidoskopie vielleicht ablehnen würden.

Letztendlich bleibt das Ziel der Bemühungen, in Tumoren aufgezeigte molekulargenetische Alterationen als Ansatzpunkt für neue Therapie-möglichkeiten zu nutzen. Die Hoffnung darauf, eines Tages die Möglichkeit zu haben, mit Auswirkungen von Onkogenen direkt interferieren oder den Verlust von Tumor-Suppressor-Genen ausgleichen zu können, geben den grund-legenden Forschungsarbeiten wie der vorliegenden ihren Sinn.
Die Gentherapie zur Behandlung von Krebserkrankungen wurde initial mit einem hohen Level von Optimismus und Enthusiasmus gefeiert. Durch

Übertragung eines intakten Gens erhofft man sich eine Korrektur im genetischen Muster des Patienten bzw. die Kompensation des krankheits-auslösenden Gens. Unlängst wurden diese Einschätzungen durch die Realisation gedämpft, daß die mangelnde Effizienz (unter anderem bedingt durch die Instabiltät des transferierten Materials) und Präzision des Gentransfers bislang signifikante Barrieren darstellen, eine wirkliche Therapie-option zu generieren (Mauckner 1997, Vile 2000).
Dennoch wurden bereits erste Wege in diese Richtung mit vielversprechenden Resultaten beschritten. So ist es beispielsweise bereits möglich, bei Bronchialkarzinom-Patienten mit einem defekten p53-Gen, ein funktionsfähiges p53-Gen mit Hilfe eines Adenovirus einzuschleusen und somit die Sensitivität des Carcinoms gegenüber Chemotherapeutika zu erhöhen (Schuler 2001).

Entscheidend für den Erfolg der Gentherapie wird es sein, zu verstehen, in welcher Rolle diese in dem schon bestehenden Therapiemanagement von Malignomen ihren besten Einsatz finden kann. Eine Vielzahl an Studien zeigt ein großes Potential für die Zusammenarbeit von pharmazeutischen, immunologischen und radiotherapeutischen Disziplinen, Tumorzellen auf effizientere Art zu vernichten. Es ist unwahrscheinlich, daß die Gentherapie in den kommenden Jahren für sich allein eine kurative Rolle in der Krebstherapie spielen wird. Entscheidend ist es jedoch, die Bedeutung der Gentherapie in dem Bewußtsein der Kliniker zu etablieren, damit diese eines Tages vielleicht eine der Leittherapien der Krebserkrankung darstellen kann (Vile 2000).

5 Zusammenfassung

Genetische Veränderungen haben eine überragende Bedeutung für die Entstehung und Progression humaner Tumoren. Die Zusammenhänge zwischen spezifischen Mutationen und der schrittweisen Modifizierung sind am besten an CRC beschrieben (Fearon 1990).
Darüber hinaus tritt in familiären CRC im Rahmen des HNPCC-Syndroms ein alternativer Mutationsmechanismus in der Tumorentstehung auf, der sogenannte „Mutator-Phänotyp“ der MIN.
Das CRC kann daher als ein interessanter Modelltumor zum Verständnis genetischer Veränderungen in der Tumorenstehung angesehen werden.
Außerdem gehört das CRC in den westlichen Industrieländern zu den 3 häufigsten Krebserkrankungen mit steigender Inszidenz (Bansal 1996). Vor allem proximal des Sigmoids gelegene Carcinome führen erst spät zu einer spezifischen Beschwerdesymptomatik (Lehnert 1999). Ein Anliegen molekulargenetischer Untersuchungen ist es, Risikogruppen frühzeitig aufzuzeigen und einer entsprechenden Diagnostik zukommen zu lassen.

Durch molekular- und cytogenetische Vorarbeiten (Schlegel 1995) konnten chromosomale Abschnitte eingegrenzt werden, die mit einem aggressiven Wachstumsverhalten assoziiert waren. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diese Abschnitte näher einzugrenzen.
Dazu wurde die Chromosomenregion 9p21-22, die Träger des CDKN2-Gens ist, mit verschiedenen Mikrosatelliten-Markern auf einen Verlust der Heterozygosität untersucht. Die 11 untersuchten Carcinomproben zeigten in einem Fall sowohl einen LOH im Locus D9S1813 als auch im Locus D9S156.
Auf Grund dieser Ergebnisse scheinen die chromosomalen Verluste des Chromosoms 9p21 in CRC weiter distal des CDKN2-Genlocus gelegen zu sein.

Die Chromosomenregion 13q14.3 ist Träger des Rb-Gens. Diese Region wurde anhand von 2 Mikrosatelliten-Primern bezüglich eines LOH untersucht. Es zeigte sich in einem der 11 untersuchten Coloncarcinomproben ein LOH

(Locus Rb 1.20). Demnach scheint das Rb-Gen in den hier untersuchten CRC eher seltener von Verlusten betroffen zu sein.

Insgesamt 41 CRC-Proben wurden mit Hilfe einer semiquantitativen PCR auf eine Amplifikation des Chromosoms 20q13 untersucht. Dabei wurde das CAS-Gen und 4 seiner flankierenden Gene untersucht. Es häufen sich die Hinweise darauf, daß CAS sowohl eine Rolle bei der Zellproliferation als auch bei der Apoptose spielt (Brinkmann 1995ab, 1996a, Ogryzko 1997). In Coloncarcinomzelllinien konnte eine bis zu fünffache Amplifikation des CAS-Gens nachgewiesen werden (Brinkmann 1996b). In unserer Arbeit konnte jedoch keine signifikante Amplifikation des CAS-Gens oder der benachbarten Chromosomenregionen gezeigt werden.

Auf Grund der vorliegenden Daten scheinen bislang nicht näher charakterisierte Gene in die Tumorprogression der CRC involviert zu sein, die mit methodisch feineren Techniken erfaßt werden sollten.

6 Literaturverzeichnis

Ahsan H, Neugut AI, Garbowski GC, Jacobson JS, Forde KA, Treat MR, Waye JD (1998) Family history of colorectal adenomatous polyps and increased risk for colorectal cancer. Ann Intern Med 128: 900-905

Alexander RJ, Buxbaum JN, Raicht RF (1986) Oncogene alterations in primary human colon tumors. Gastroenterology 91: 503-1510

Amos CI, Bali D, Thiel TJ, Anderson JP, Gourley I, Frazier ML, Lynch PM, Luchtefeld MA, Young A, McGarrity TJ, Seldin MF (1997) Fine mapping of a genetic locus for Peutz-Jeghers syndrome on chromosome 19p. Cancer Res 57: 3653-3656

Baker S J, Fearon E R, Nigro J M, Hamilton S R, Preisinger A C, Jessup J M, VanTuinen P, Ledbetter D H, Barker D F, Nakamura YY, White R, Vogelstein B (1989) Chromosome 17 deletions and p53 mutations in colorectal carcinomas. Science 244: 217-221

Bansal P, Sonnenberg A (1996) Risk of colorectal cancer in inflammatory bowel disease. Am Coll of Gastroenterology 44-48

Bloch K, Eddy RL, Shows TB, Quertermous T, (1998) cDNA cloning and chromosomal assignment of the gene encoding endothelin 3. J Biol Chem 264: 18161

Blum HE (1995) Colorectal cancer: future population screening for early colorectal cancer. Eur J Cancer 31A (7/8) 1369-1372

Boardman LA, Thibodeau SN, Schaid DJ, Lindor NM, McDonnel SK, Burgart LJ, Ahlquist DA, Podratz KC, Pittelkow M, Hartmann LC (1998) Increased risk for cancer in patients with the Peutz-Jeghers syndrome. Ann Intern Med 128:896-899

Bocker T, Rüschoff J, Fishel R (1999) Molecular diagnostics of cancer predisposition: hereditary non-polyposis colorectal carcinoma and mismatch repair defects. Biochem Biophys Acta 1423: 01-10

Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaan-de Vries M, van Boom JH, van der Eb AJ, Vogelstein B (1987) Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. Nature 327: 293-297

Brinkmann U, Brinkmann E, Pastan (1995a) Expression cloning of cDNAs that render cells resistant to Pseudomonas and Diphteria toxin and immunotoxins. Mol Med 1: 206-216

Brinkmann U, Brinkmann E, Gallo M, Pastan I (1995b) Cloning and characterization of a cellular apoptosis susceptibility gene, the human homologue to the yeast chromosome segregation gene CSE1. Proc Natl Acad Sci USA 92: 10427-10431

Brinkmann U, Brinkmann E, Gallo M, Scherf U, Pastan I (1996a) Role of CAS, a human homologue to the yeast chromosome segregation gene CSE1, in toxin and tumor necrosis factor mediated apoptosis. Biochemistry 35: 6891-6899

Brinkmann U, Gallo M, Polymeropoulos MH, Pastan I (1996b) The human CAS (cellular apoptosis susceptibility) gene mapping on chromosome 20q13 is amplified in BT474 breast cancer cells and part of aberrant chromosomes in breast and colon cancer cell lines. Genome Res 6: 187-194

Brinkmann U (1998) Human genetics ´98: Apoptosis. CAS, the human homologue of the yeast Chromosome-Segregation Gene CSE1, in proliferation, apoptosis, and cancer. Am J Hum Genet 62: 509-513

Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK (1994) Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary nonpolyposis colon cancer. Nature 363: 258-261

Brown-Shimer S, Hohnson KA, Lawrence JB, Johnson C, Bruskin A, Green NR, Hill DE (1990) Molecular cloning and chromosome mapping of the human gene encoding protein phosphotyrosyl phosphatase 1B. Proc Nat Acad Sci 87: 5148-5152

Burt RW (1996) Familial risk and colon cancer. Int J Cancer 69: 44-46

Cairns P, Tokino K, Eby Y and Sidransky D (1995) Localisation of tumour suppressor loci on chromosome 9 in primary human renal cell carcinoma. Cancer Res 55: 224-227

Cance WG, Brennan MF, Dudas ME (1990) Altered expression of the retinoblastoma gene product in human sarcomas. N Engl J Med 323(21): 1457-1462

Carethers JM (1996) The cellular and molecular pathogeneses of colorectal cancer. Gastroenterol Clin North Am 25(4): 737-754

Chetty R, Subramoney T, Singh JP (1998) Retinoblastoma and p53 protein expression in sporadic colorectal cancers. Eur J Surg Oncol 24: 436-439

Chiang JM, Chou Y-HW, Chou T-B (1998) K-ras codon 12 mutation determines the polypoid growth of colorectal cancer. Cancer Res 58: 3289-3293

Cho J-H, Noguchi M, Ochiai A, Hirohashi S (1996) Loss of heterozygosity of multiple suppressor genes in human gastric cancers by polymerase chain reaction. Lab Invest 74: 835-841

Collet JP, Sharpe C, Belzile E, Boivin JF, Hanley J, Abenhaim L (1999) Colorectal cancer prevention by non steroidal anti-inflammatory drugs: effects of dosage and timing. Br J Cancer 81(1): 62-68

Connors TA, Duncan R, Knox RJ (1995) The chemotherapie of colon cancer. Eur J Cancer 31A(7/8): 1373-1378

Deutsche Krebsgesellschaft e.V. (1997) Leitlinien der Deutschen Krebsgesellschaft zur Therapie des Rektumcarcinoms / Koloncarcinoms. Forum DKG 12: 285-297

Diaz MO, Rubin CM, Harden A, Ziemin S, larson RA, Le BM, Rowley JD (1990) Deletions of interferon genes in acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med 332: 77-82

Dib C, Faure S, Fizames C, Samson Drouot N, Vignal A, Millasseau P, Marc S, Hazan J, Seboun E, Lathrop M, Morissette J, Weissenbach J, Gyapay G (1996) A comprehensive genetic map of the human genome based on 5, 264 microsatellites. Nature 380 (6570): 152-154

DuBois RN, Giardiello FM, Smalley WE (1996) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, eicosanoids, and colorectal cancer prevention. Gastroenterol Clin North Am 258(4): 773-789

Dukes CE (1932) The classification of cancer of the rectum. J Pathol Bacteriol 35 (23): 395-413

Eckert M., Heilmann K, Wiebecke B (1997) Hyperplastische Polypen des Kolons. Pathologe 18: 228-232

Eiriksdottir G, Johannesdottir G, Ingvarsson S, Björnsdottir IB, Jonasson JG, Agnarsson BA, Hallgrimsson J, Gudmundsson J, Egilsson V, Sigurdsson H, Barkardottir RB (1998) Mapping loss of heterozygosity at chromosome 13q: loss at 13q12-q13 is associated with breast tumour progression and poor prognosis. Eur J Cancer 34(13): 2076-2081

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

Finkelstein SD, Sayegh R, Bakker A, Swalsky P (1993) Determination of tumor aggressiveness in colorectal cancer by K-ras analysis. Arch Surg 128: 526-532

Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. The p53 can act as a suppressor of transformation. Cell 57: 1083-1093

Fishel R, Lescoe MK, Rao MRS, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, et al. (1993) The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. Cell 75: 1027-1038

Friedl W, Kruse R, Jungck M, Back W, Loff S, Propping P, Jenne DE (1999) Hamartomatöse Polyposis-Syndrome. Dt Ärztbl 96(37): A-2285-2291

Friend SH, Dryja TP, Weinberg RA (1988) Oncogenes and Tumor-Suppressing Genes. N Engl J Med 318: 618-622

Giardiello FM, Welsh SB, Hamilton SR (1987) Increased risk of cancer in the Peutz-Jeghers syndrome. N Engl J Med 316: 1511-1514

Goelz SE, Vogelstein B, Hamilton SR, Feinberg AP(1987) Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms. Science 228:187-90

Gopal Rao VVN, Loffler C, Hansmann I (1991) The gene for the novel vasoactive peptide endotholin 3 (EDN 3) is localized to human chromosome 20q13.2-qter. Genomics 10: 840-841

Groden J, Thlivers A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, White R et al. (1991) Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis gene. Cell 66: 589-600

Gruber SB, Entius MM, Petersen GM, Laken SJ, Longo PA, Boyer R, Levin AM, Mujumdar UJ, Trent MJ, Kinzler KW, Vogelstein B, Hamilton SR, Polymeropoulos MH, Offerhaus GJ, Giardiello FM (1998) Pathogenesis of adenocarcinoma in Peutz-Jeghers syndrome. Cancer Res 58: 5267-5270

Gruis NA, van Der Velden PA, Skankuijl LA, Prins DE, Weaver-Feldhaus J, Kamb A, Bergmann W, Frants RR (1995) Homozygotes for CDKN2 (p16) germline mutation in Dutch familial melanoma kindreds. Nature Genet 10: 351-353

Haas-Kogan D, Kogan SC, Levi D, Dazin P, Ang AT, Fung Y-KT, Israel MA (1995) Inhibition of apoptosis by the retinoblastoma gene product. EMBO J 14(3): 461-472

Hall PA, Coates PJ, Ansari B, Howood D (1994) Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract. The importance of apoptosis. J Cell Sci 107: 3569-3577

Hamelin R, Laurent-Puig P, Olshwang S, Jego N, Asselain B, Remvikos Y, Girodet J, Salmon RJ, Thomas G (1994) Association of p53 mutations with short survival in colorectal cancer. Gastroenterology 106: 42-48

Hamilton SR (1993) The molecular genetics of colorectal neoplasia. Gastroenterology 105: 3-7

Harbour WJ, Lai SL, Wang-Peng J (1988) Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC. Science 241: 353-357

Hemminiki A, Markie D, Tomlinson IPM, Avizienyte E, Roth S, Loukola A, Bignell G, Warren W, Aminoff M, Hoglund P, Jarvinen H, Kristo P, Pelin K, Ridanpaa M, Salovaara R, Toro T, Bodmer W, Olschwang S, Olsen AS, Stratton MR, delaChapelle A, Aaltonen LA (1998) A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. Nature 391: 184-187

Hengen PN (1995) Methods an reagents. Quantitative PCR: an accurate measure of mRNA. Trends Biochem Sci 20: 476-477

Henson HW, Schnitker BS, Correa LM, von Deimling A, Fassbender F, Xu H-J, Benedict WF, Yandell DW, Louis DN (1994) The retinoblastoma gene is involved in malignant progression of astrozytomas. Ann Neurol 36: 714-721

Hibi K, Robinson CR, Booker S, Wu L, Hamilton SR, Sidransky D, Jen J (1998) Molecular detection of genetic alterations in the serum of colorectal cancer patients. Cancer Res 58: 1405-1407

Ichimura K, Schmidt EE, Yamaguchi N, James CD, and Collins VO (1994) A common region of homozygous deletion in malignant human gliomas lies between the IFN a/w gene cluster and D9S171 locus. Cancer Res 54: 3127-3130

Jarvinen HR (1993): Juvenile gastrointestinal polyposis. Probs Gen Surg 10: 749-757

Jin J, Kim H, Piantadosi S (1994) Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. N Engl J Med 331: 213-221

Junginger T (1999) Interdisziplinäre Leitlinien zur Therapie des Kolonkarzinoms. Forum DKG 14. 132-147

Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavigian SV, Stockert E, Day RS, Johnson BE, Skolnick MH (1994) A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. Science 264: 436-440

Kamb A, Liu Q, Harshman K, Tavtigian S (1994a) Rates of p16 (MTS1) Mutations in primary Tumors with 9p loss. Science 265: 415-417

Kamb A, Shattuck-Eidens D, Eeles R, Liu Q, Gruis NA, Ding W, Hussey C, Tran T, Miki Y, Weaver-Feldhaus J, McClure M, Aitken JF, Anderson DE, Bergman W, Frants R, Goldgar DE, Green A, MacLennan R, Martin NG, Meyer LJ, Youl P, Zone JJ, Skolnick MH, Cannon-Albright LA (1994b) Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. Nature Genet (8): 22-26

Kern SE, Fearon ER, Tersmette KWF, Enterline JP, Leppert M, Nakamura Y, White R, Vogelstein B, Hamilton SR (1989) Allelic loss in colorectal carcinoma. JAMA 261: 3099-3103

Knudson AG Jr. (1971) Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma. Proc Natl Acad Sci USA 68: 820-823

Lairmore TC, Norton JA (1997) Advances in molecular genetic. Am J Surg 173: 37-41

Land H, Parada LF, Weinberg RA (1983) Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis. Science 222: 771-778

Lanza G, Matteuzzi M, Gafa R, Orvieto E, Maestri I, Santini A, del Senno L (1998) Chromosome 18q allelic loss and prognosis in stage II and III colon cancer. Int J Cancer 79(4): 390-395

Lasser DM, DeVivo DC, Garvin J, Wilhelmsen KC (1994) Turcot´s syndrome: evidence for linkage to the adenomatous polyposis coli (APC) locus. Neurology 44: 1083-1086

Latil A, Bieche I, Pesche S, Volant A, Valeri A, Fournier G, Cussenot O, Lidereau R (1999) Loss of heterozygosity at chromosome arm 13q and Rb1 status in human prostate cancer. Hum Pathol 30: 809-815

Lazar V, Grandjouan S, Bognel C (1994) Accumulation of multiple mutations in tumour suppressor genes during colorectal tumorigenesis in HNPCC patients. Hum Molec Genet 3: 2257-2260

Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R (1993) Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Cell 75: 1215-1225

Lehnert T, Schaible A, Herfarth C (1999). Onkologische Prinzipien beim Kolonkarzinom. Chirurg 70: 499-510

Lipkin M, Reddy B, Newmark H, Lamprecht SA (1999) Dietry factors in human colorectal cancer. Annu Rev Nutr 19:5 45-8

Loeb KR, Loeb LA (1999) Genetic instability and the mutator phenotype. Am J Pathol 154 (6): 1621-1626

Logothesis CJ, Xu HJ, Ro JY, et al. (1992) Altered expression of retinoblastoma protein and known prognostic variables in locally advanced bladder cancer. J Natl Cancer Inst 84: 1256-1261

Lovett E (1976) Family studies in cancer of the colon and rectum. Br J Surg 63: 13-18

Lydiatt WM, Davidson BJ, Schantz SP, Caruana S, Chaganti RS (1998) 9p21 deletion correlates with recurrence in head and neck cancer. Head Neck 20(2): 113-118

Lynch HT, Smyrk T, Lynch JF (1996) Overview of natural history, Pathology, molecular genetics and management of HNPCC (Lynch syndrome). Int J Cancer 69: 38-43

Lynch HAT, Smyrk T (1996a) Heriditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch Syndrome). An updated review. Cancer 78: 1149-67

Lynch HAT, Smyrk T, Lynch JF (1996b) Overview of natural history, pathology, molecular genetics and management of HNPCC (Lynch syndrome). Int J cancer 69: 38-43

Lynch HAT, Smyrk T (1998) An update on Lynch Syndrome. Curr Opin Oncol 10: 349-356

Macklin MT (1960) Inheritance of the cancer of the stomach and large intestine in man. J Natl Cancer Inst 24: 551-571

MacLennan R (1997) Diet and colorectal cancer. Int J Cancer Supplement 10: 10-12

Marsh KL, Varley JM (1997) Loss of heterozygosity at chromosome 9p in ductal carcinoma in situ and invasive carcinoma of the breast. Br J Cancer 77(9): 1439-1447

Marshall CJ (1991) Tumor suppressor genes. Cell 64: 313-326

Martinez-Lopez E, Abad A, Font A, Monzo M, Ojanuren I, Piffarre A, Sanchez JJ, Martin C, Rosell R (1998) Allelic loss on chromosome 18q as a prognostic marker in stage II colorectal cancer. Gastroenterology 114: 1180-1187

Mauckner A, Nikol S (1997) Aktueller Stand der Gentherapie. Dt Ärztbl 94(15): A-995

Mead LJ, Gillespie MT, Irving LB, Campbell LJ (1994) Homozygous and hemizygous deletions of 9p centromeric to the interferon genes in lung cancer. Cancer Res 54: 2307-2309

Mertens F, Johansson B, Höglund M, Mitelman F (1997) Chromosomal imbalance maps of malignant solid tumors. A cytogenetic of 3185 neoplasms. Cancer Res 57: 2765-2780

Meyer R (1999) Epidemiologie: Weniger Krebstote in Europa. Dt Ärztbl 96(42): A-2624

Morris CM, Honeybone LM, Hollings PE, Fitzgerald PH (1989) Localization of the SRC oncogene to the chromosome band 20q11.2 and loss of this gene with deletion (20q) in T´two leukemie patients. Blood 74: 1768-1773.

Morris RG, Curtis LJ, Romanowski P, Hardcastle JD, Jenkins DA, Robinson M, Wyllie AH, Bird C. (1996) Ki-*ras* mutations in adenomas: a characteristic of cancer-bearing colorectal mucosa. J Pathol 180: 357-363

Nelson RL, Persky V, Turyk M (1999) Determination of factors responsible for the declining incidence of colorectal cancer. Dis Colon Rectum 42: 741-752

Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Wei YF, Carter KC, Ruben SM (1994) Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. Nature 365: 274-276

Nixon D (1995) Diet and chemoprevention of colon polyps and colorectal cancer. Sem Surg Oncol 11: 411-415

Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA (1994) Deletions of cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. Nature 368: 753-756

Nystrom-Lahti M, Parsons R, Sistonen P, Pylkkänen L, Aaltonen LA, Leach FS (1994) Mismatch repair genes on chromosomes 2p and 3p account for a major share of hereditary nonpolyposis colorectal cancer families evaluated by linkage. Am J Hum Genet 55: 659-665

Ogryzko VV, Brinkmann E, Howard BH, Pastan I, Brinkmann U (1997) Antisense inhibition of CAS, the homologue of the yeast chromosome segregation gene CSE1, Interferes with mitosis in HeLa cells. Biochemistry 36(31): 94493-94500

Ogunbiyi OA, Goodfellow PJ, Herfarth K, Gagliardi G, Swanson PE, Birnbaum EH, Read TE, Fleshman JW, Kodner IJ and Moley JF (1998) Confirmation that chromosome 18q allelic loss in colon cancer is a prognostic indicator. J Clin Oncol 16: 427-433

Olschwang S, Hamelin R, Laurent-puig P, Thuille B, DeRyecke Y, Li, Y-J, Muzeau F, Girodet J, Salmon R-J, Thomas G (1997) Alternative genetic pathways in colorectal carcinogenesis. Proc Natl Acad Sci USA 94: 12122-12127

Orlando C, Pinzani P, Pazzagli M (1998) Development in quantitative PCR. Clin Chem Lab Med 36(5): 255-269

Orlow I, Lianes P, Dalbagni G, Reuter VE, Cordon-Cardo C (1994) Chromosome 9 allelic losses and microsatellite alterations in human bladder tumors. Cancer Res 54(11): 2848-2851

O´Sullivan MJ, McCarthy TV, Doyle CT (1997) Familial adenomatous polyposis. Am J Clin Pathol 109: 521-526

Papadopoulos N, Nicolaides NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA, et al. (1994) Mutation of a mutL homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Science 263: 1625-1629

Pauly M, Schmitz M, Kayser I, Türeci Ö, Lagoda P, Seitz G, Dicato M (1997) Ki-*ras* oncogene and tumour suppressor gene mutations in colorectal carcinomas from European Saar-Luxemburg region are less frequent than predicted by classic adenoma-carcinoma sequence model. Eur J Cancer 33(13): 2265-2272

Petersen GM (1995) Genetic epidemiology of colorectal cancer. Eur J Cancer 31A(7/8):1047-1050

Piao Z, Park C, Lee J-S, Yang CH, Choi KY, Kim H (1998) Homozygous deletions of the CDKN2 gene and loss of heterozygosity of 9p in primary hepatocellular carcinoma. Cancer Lett 122: 201-207

Raemaekers L (1999) General principles of quantitative PCR. Quantitative-PCR-Protocols 26: 31-41

Rashid A, Zahurek M, Goodman SN, Hamilton SR (1999) Genetic epidemiology of mutated K-ras proto-oncogene, altered suppressor genes, and microsatellite instability in colorectal adenomas. Gut 44: 826-833

Reischl U, Kochanowski B (1999) Quantitative PCR – A survey of the present technology. Quantitative-PCR-Protocols 26: 3-30

Reymond MA, Dworak O, Remke S, Hohenberger W, Kirchner T, Köckerling F (1998) DCC protein as a predictor of distant metastases after surgery for rectal cancer. Dis Colon Rectum 41: 755-760

Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, Henson DE, Jass JR, Khan PM, Lynch H, Perucho M, Smyrk T(1997) A national Cancer Institute workshop on hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines J Natl Cancer Inst 89: 1758-1763

Rüschoff J, Bocker T, Schlegel J, Stumm G, Hofstädter F (1995) Microsatellite instability: new aspects in the carcinogenesis of colorectal carcinoma. Virchows Arch 426: 215-222

Schackert HK, Hahn M, Pistorius S, Sager HD (1999) Präventive Chirurgie des vererbten colorectalen Carcinoms als Folge molekularer Diagnostik. Chirurg 70: 345-352

Schlegel J, Stumm G, Scherthan H, Zirngibl H, Rüschoff J, Hofstädter F (1995) Comperative genomic in situ hybridization of colon carcinomas with replication error. Cancer Res 55: 6002-6059

Schmiegel W, Adler G, Fölsch U, Layer P, Pox C, Sauerbruch T (2000) Prävention und Früherkennung in der asymptomatischen Bevölkerung – Vorsorge bei Risikogruppen. Dt Ärztebl 97:A 2234-224 [Heft 34-35]

Schuler M, Herrmann R, De Greve JL, Stewart AK, Gatzemeier U, Stewart DJ, Laufman L, Gralla R, Kuball J, Buhl R, Heussel CP, Kommoss F, Perruchoud AP, Shepherd FA, Fritz MA, Horowitz JA, Huber C, Rochlitz C (2001) Adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer in patients receiving chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer: results of a multicenter phase. J Clin Oncol 19 (6):1750-8

Sellers WR, Kaelin WG Jr. (1997) Role of the Retinoblastoma Protein in the Pathogenesis of human cancer. J Clin Oncol 15: 3301-3312

Serrano M, Hannon GJ and Beach D (1993) A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. Nature 366: 704-707

Sidransky D, Tokino T, Hamilton SH (1992) Identification of ras oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors. Science 256: 102-105

Solomon E, Voss R, Hall V, Bodmer WF, Jass JR, Jeffrey AJ, Lucibello FC, Patel I, Rider SH (1987) Chromosome 5 allele loss on human colorectal carcinomas. Nature 328: 616-619

Sparkes RS, Murphree AL, Lingua RW (1983) Gene for hereditary retinoblastoma assigned to human chromosome 13 by linkage to esterase-D. Science 217: 971-973

Srivastava S, Rossi SC (1996) Early detection research program at the NCI. Int J Cancer 69: 35-37

Strachan T, Read AP (1996) DNA-Klonierung und DNA-Analyse mit Hilfe der PCR. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg: Molekulare Humangenetik: 153-171

Tanner MM, Tirkkonen M, Kallioniemi A, Collins C, Stokke T, Karhu R, Kowbel D, Shadravan K, Hintz M, Kuo WL, Waldmann FM, Isola JJ, Gray JW, Kallioniemi OP (1994) Increased copy number at 20q13 in breast cancer. Cancer Res 54 (16): 4257-4260

Tarmin L, Yin J, Zhou X, Suzuki T, Jiang H-Y, Rhyu M-G, Abraham JM, Krasna MJ, Cottrell J and Melter SJ (1994) Frequent loss of heterozygosity on Chromosome 9 in adenocarcinoma and squamous sell carcinoma of the oesophagus. Cancer Res 54 (16): 6094-6096

Thibodeau SN, Bren G, Schaid D (1993) Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. Science 260: 816-819

Tomlinson I, Ilyas M, Johnson V, Davies A, Clark G, Talbot I, Bodmer W (1998) A comparison of the genetic pathways involved in the pathogenesis of three types of colorectal cancer. J Pathol 184: 148-152

Trudel T, Mulligan L, Cavenee W, et al. (1992) Retinoblastoma and p53 gene product expression in breast carcinoma. Hum Pathol 23: 1388-1394

Trujillo MA, Garewal HS, Sampliner RE (1994) Nonsteroidal antiinflammatory agents in chemoprevention of colorectal cancer. Dig Dis Sci 39(10) :2260-2266

Tsihlias J, Kapusta L, Slingerland J (1999) The prognostic significance of altered cyclin-dependent kinase inhibitors in human cancer. Annu Rev Med 50: 401-23

Turnbill RB, Kyle K, Watseon FR, Spratt J (1967). Cancer of the colon: The influence of the no-touch isolation technique on survival rates. Ann Surg 166: 4250-4259

Vasen HFA, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT (1991) The international collaborative group on hereditary non-polyposis colorectal cancer (ICG-HNPCC). Dis Colon Rectum 34: 424-425

Vile RG, Russell SJ, Lemoine NR (2000) Cancer gene therapy: hard lessons and new courses. Gene Therapy 7:2-8

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton, SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakumura Y, White R, Smits AMM, Bos JL (1988) Genetic alterations during colorectal-tumor development. N Engl J Med 319: 525-532

Vogelstein B, Fearon ER, Kern SE, Hamilton SR, Peisinger AC, Nakamura Y, White R (1989) Allelotype of colorectal carcinomas. Science 244: 207-211

Wang ZJ, Taylor F, Churchman m, Norbury G, Tomlinson J (1998) Genetic pathways of colorectal carcinogenesis rarely involve the PTEN and LKB1 genes outside the inherited harmartoma syndromes. Am J Pathol 153: 363-366

Watson P, Lynch HAT (1994) The tumor spectrum in HNPCC. Anticancer Res 14: 1635-1640

Watson P, Lin KM, Rodriguez-Bigas MA, Smyrk T, Lemon S, Shashidharan M, Franklin B, Karr B, Thorson A, Lynch HAT (1998) Colorectal carcinoma survival among hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma family members. Cancer 83: 259-66

Watne AL (1997) Colon polyps. J Surg Oncol 66: 207-214

Weber TK, Conroy J, Keitz B, Rodriguez-Bigas, Petrelli NJ, Stoler DL, Anderson GR, Shows TB, Nowak NJ (1999) Genome-wide allelotyping indicates increased loss of heterozygosity on 9p and 14q in early age of onset colorectal cancer. Cytogenet Cell Genet 86: 142-147

Wein A, Riedel C, Lehnert T, Wakker R, Reingruber B, Teichmann W, Kohnen R, Herfarth C, Hohenberger W, Hahn EG (1998) Adjuvante Behandlung beim Kolonkarzinom. Dtsch med Wschr 123: 674-680

Weissenbach J, Gyapay G, Dib C, Vignal A, Morissette J, Millasseau P, Vaysseix G, Lathrop M (1992) A second-generation linkage map of the human genome. Nature 359(6398): 794-801

Wellmann A, Laszl K, Fest T, Scherf U, Pastan I, Raffeld M, Brinkmann U (1997) Localization of the Cell Proliferation and Apoptosis-Associated CAS Protein in Lymhoid Neoplasms. Am J Pathol 150: 25-30

Wittekind C, Wagner G (1997) TNM Klassifikation maligner Tumoren. 5. Aufl. UICC Springer, Berlin, Heidelberg, New York

Woolf CM (1958) A genetic study of carcinoma of the large intestine. Am J Hum Genet 10: 42-47

Wunder JS, Czitrom AA, Kandel R (1991) Analysis of alterations in the retinoblastoma gene and tumor grade in bone and soft-tissue sarcomas. J Natl Cancer Inst 83: 194-200

Wynder EL, Kajitani T, Ishikawa S, Dodo H, Takona A (1969) Environmental factors of cancer of the colon and rectum. II. Japanese epidemiological data. Cancer 23: 1210-20

Xiao Z, McGrew JT, Schroeder A J, Fitzgerald-Hayes M (1993) CSE1 and CSE2. Two new genes required for accurate mitotic chromosome segregation in saccharomyces cerevisiae. Mol Cell Biol 13: 4691-4702

Xu HJ, Hu SX, Cagle PT (1991) Absence of retinoblastoma protein expression in primary non-small cell lung carcinomas. Cancer Res 51: 2735-2739

Yamamoto H, Soh JW, Monden T, Klein MG, Zhang LM, Shirin H, Arber N, Tomita N, Schieren I, Stein CA, Weinstein IB (1999) Paradoxical increase in retinoblastoma protein in colorectal carcinomas may protect cells from apoptosis. Clin Cancer res 5(7): 1805-1815

Yowono M, Rossi TM, Fisher JE, Tjota A (1996) Oncogene expression in patients with familial polyposis coli/Gardner´s syndrome. Int Arch Allergy Immunol 111: 89-95

Zimmermann K, Mannhalter J W (1996) Technical aspects of quantitive competitive PCR. Biotechniques 21: 268-279

7 Anhang

7.1 Übersicht der Ergebnisse der OD-Messung (Chromosom 20q)

Tabelle: PCR-/Normal- /Tumormaterial-Ratio nach Messung der OD; nachfolgend Einbezug des house-keeping-Gens humanes ß-actin.

Proben-Nr.	ß-actin OD	SRC OD	Quotient	CAS OD	Quotient	PTPN1x OD	Quotient	EDN3 OD	Quotient	yc3
1 N	10871	3374	3,2	6128	1,8	2880	3,8	4932	2,2	
T	12095	5490	2,2	6998	1,7	2937	4,1	7017	1,7	
Zunahme			***1,45***		***1,06***		0,93		***1,29***	
2 N	3592	999	3,6	600	6,0			983	3,7	
T	2059	967	2,1	631	3,3			1144	1,8	
Zunahme			***1,71***		***1,82***				***2,06***	
3 N	2806	922	3,0	1701	1,65			774	3,6	
T	2051	418	4,9	1652	1,24			904	2,3	
Zunahme			0,61		***1,33***				***1,57***	
4 N	5111	2391	2,1	1042	4,9	1864	2,7	855	6,0	
T	9899	5893	1,7	301	32,8	5335	1,9	892	11,1	
Zunahme			***1,24***		0,15		***1,42***		0,54	
5 N	961			243	4,0					
T	1172			388	3,0					
Zunahme					***1,33***					
6 N		8485						165		
T		7244						1738		
*										

Proben-Nr.	ß-actin OD	SRC OD	Quotient	CAS OD	Quotient	PTPN1x OD	Quotient	EDN3 OD	Quotient	yc3
7 N		3331		7890						
T		5626		2951						
*										
8 N	2130	892	2,4	422	5,1			346	6,2	
T	1602	432	3,7	1088	1,5			507	3,2	
Zunahme			0,65		***3,4***				***1,9***	
9 N	1268	174	7,3	890	1,4			406	3,1	
T	1075	126	8,6	884	1,2			460	2,3	
Zunahme			0,85		***1,17***				***1,35***	
10 N		1229						332		
T		1710						2984		
*										
11 N	7720	2506	3,1	3546	2,8	6649	1,7	4597	1,7	
T	11559	4161	2,8	7087	1,6	4821	2,4	4680	2,5	
Zunahme			***1,11***		***1,75***		0,71		0,68	
12 N	2971	657	4,5	1045	2,8	355	8,4	371	8,0	
T	2769	475	5,8	583	4,7	257	10,8	200	13,9	
Zunahme			0,78		0,60		0,78		0,58	
13 N		6295		7371		171		6343		
T		6297		8570		732		8829		
*										
14 N	6582	4391	1,5	920	7,2	729	8,3	6460	1,0	
T	10134	5359	1,9	1044	9,7	1059	9,6	7948	1,3	
Zunahme			0,79		0,74		0,86		0,77	
15 N	1889	746	2,5	683	2,8			532	3,6	
T	1999	325	6,2	1232	1,6			531	3,8	
Zunahme			0,4		***1,75***				0,95	

Proben-Nr.	ß-actin OD	SRC OD	Quotient	CAS OD	Quotient	PTPN1x OD	Quotient	EDN3 OD	Quotient	yc3
16 N		4349		8888				3590		
T		3405		5849				6571		
*										
17 N	6501	4245	1,5	686	9,5	766	8,5	366	17,8	
T	4354	2260	1,9	895	4,9	596	7,3	525	8,3	
Zunahme			0,79		***1,94***		***1,16***		***2,14***	
18 N	1469	1406	1,0	841	1,8					
T	3584	4918	0,7	1443	2,5					
Zunahme			***1,43***		0,72					
19 N	1003			196	5,1					
T	1297			288	4,1					
Zunahme					***1,24***					
20 N	6013	599	10,0	815	7,4	954	6,3	3387	1,8	
T	6845	954	7,8	518	13,2	355	19,3	4896	1,4	
Zunahme			***1,28***		0,56		0,33		***1,29***	
21 N	9689	1163	8,3	1149	8,4	754	12,9	5114	1,9	
T	8930	754	11,8	1091	8,9	917	9,8	2823	3,2	
Zunahme			0,70		0,94		***1,32***		0,59	
22 N	9936	1032	9,6	1559	6,4	2949	3,4	1106	9,0	
T	5338	1528	3,5	1029	5,2	4108	1,3	1137	4,7	
Zunahme			***2,74***		***1,23***		***2,62***		***1,91***	
23 N	9261	3869	2,4	1047	8,8	682	13,6	7009	1,3	
T	9122	2339	3,9	674	13,5	1132	8,1	7971	1,1	Alteration
Zunahme			0,62		0,65		***1,68***		***1,18***	
24 N	11516	4237	2,7	1087	10,6	387	29,8	1483	7,8	
T	8752	2301	3,8	1117	7,8	279	31,4	3863	2,3	
Zunahme			0,71		***1,36***		0,95		***3,39***	

Proben-Nr.	ß-actin OD	SRC OD	Quotient	CAS OD	Quotient	PTPN1x OD	Quotient	EDN3 OD	Quotient	yc3
25 N		964		8616		944		13812		
T		1147		8634		1398		5907		
*										
26 N		6541		8256		703		4960		
T		5448		7979		1499		2777		
*										
27 N	11050	5610	2,0	1036	10,7	4313	2,6	4260	2,6	
T	10405	3523	3,0	1123	9,3	3303	3,2	4681	2,2	Alteration
Zunahme			0,66		***1,15***		0,81		***1,18***	
28 N	6787	1352	5,0	898	7,6	676	10,0	4704	1,4	
T	7707	1333	5,8	844	9,1	1070	7,2	4465	1,7	
Zunahme			0,86		0,84		***1,39***		0,82	
29 N	3013	3573	0,84	9206	0,32	1075	2,8	6298	0,47	
T	10382	5421	1,9	8562	1,2	1228	8,5	5236	2,0	
Zunahme			0,44		0,27		0,33		0,24	
30 N	7709	2690	2,9	863	8,9	2810	2,7	1279	6,0	
T	7295	3806	1,9	1144	6,4	1831	4,0	1220	5,9	
Zunahme			***1,53***		***1,39***		0,68		***1,07***	
31 N	9424	2035	4,6	1119	8,4			8482	1,1	
T	7846	3442	2,3	961	8,2			7859	1,0	Alteration
Zunahme			***2,00***		***1,02***				***1,1***	
32 N	10799	2418	4,5	7687	1,4	862	12,5	9340	1,2	
T	10046	4632	2,7	7616	1,3	1055	9,5	7344	1,4	
Zunahme			***1,67***		***1,08***		***1,32***		0,86	
33 N	12744	821	15,5	1120	11,4	2961	4,3	9512	1,3	
T	13278	1207	11,0	526	25,2	4191	3,2	10752	1,2	
Zunahme			***1,41***		0,46		***1,34***		***1,08***	
34 N		5803		13538				4923		
T		5393		8583				4146		Alteration
*										

Proben-Nr.	ß-actin OD	SRC OD	Quotient	CAS OD	Quotient	PTPN1x OD	Quotient	EDN3 OD	Quotient	yc3
35 N	2212	4085	4,7	1861	1,2			518	4,3	
T	1842	6321	2,0	1699	1,1			1251	1,5	
Zunahme			***2,35***		***1,09***				***2,87***	
36 N				7280						
T				17049						
*										
37 N	2167	6945	3,4	755	2,9			605	3,6	
T	3771	7699	4,8	1961	1,9			428	8,8	
Zunahme			0,71		***1,53***				0,41	
38 N		3180						2329		
T		2384						4624		
*										
39 N	1988	6003	3,0	717	2,8			756	2,6	
T	1978	5739	3,1	1330	1,5			584	3,4	
Zunahme			0,97		***1,87***				0,76	
40 N	2055	13835	1,8	656	3,1			446	4,6	
T	3347	14743	3,2	1525	2,2			794	4,2	
Zunahme			0,56		***1,41***				***1,10***	

Proben-Nr.	ß-actin OD	SRC OD	Quotient	CAS OD	Quotient	PTPN1x OD	Quotient	EDN3 OD	Quotient	yc3
41 N	1507	1343	1,1	650	2,3					
T	1710	2663	0,6	596	2,9					
Zunahme			***1,83***		0,79					

Legende:

N: Normalgewebe

T: Tumorgewebe

OD: Optische Dichte (Grauwert)

Zunahme : Faktor, um welchen sich die OD im Tumorgewebe gegenüber dem Normalgewebe erhöht; Werte < 1 (Normaldruck) entsprechen einer Abnahme (negativen Zunahme) der OD.

***:** Da kein Wert des Housekeeping-Gens humanes ß-actin vorliegt, ist eine Aussage über die Zunahme der OD in diesen Fällen leider nicht möglich.

7.2 Abkürzungen

A.	Ateria
AA.	Ateriae
APC	Adenomatous Polyposis Coli
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
ca.	circa
CAS	cellular apoptosis susceptibility
CDKN2A	inhibitor of cyclin-dependent kinase
cdk	cyclin-dependent kinase
cDNA	cyclische DNA
CGH	comperative genomic in situ hybridization
CRC	Colorectales Carcinom
CSE	Chromosomensegregation
dATP	2´-Desoxyadenosin-5´-triphosphat
DCC	deletiert in Coloncarcinomen
dCTP	2´-Desoxycytidin-5´-triphosphat
dGTP	2´-Desoxyguanosin-5´-triphosphat
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dTTP	2´-Desoxythymidin-5´-triphosphat
EDN3	Endothelin 3
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis
G_{1-3}	Grad 1 – 3
GDP	Guonosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HCV	Hepatitis-C-Virus
HFAS	heriditary flat adenoma syndrom
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HNPCC	hereditary non-polyposis colorectal cancer
hs	humanes
JPS	Juvenile Polyposis

kd	kilo dalton
kb	Kilobasen
LOH	loss of heterozygosity
M	Marker
MADH4	mother against decapentaplegic
MB	Megabasen
MCC	mutated in colorectal carcinoma
$MgCl_2$	Magnesium-Chlorid
µl	Mikroliter
MIN	Mikrosatelliteninstabilität
MLH1	mutL homolog 1
mM	Milimolar
MMR	mismatch repair
MPS2	Mucopoly saccharidoris II
MSH2	mutS homolog2
MSH3	mutS homolog3
MSH6	mutS homolog6
MTS1	multiple tumour-suppressor 1
N	Normalmaterial
norm.	normal
n.i.	nicht informativ
Nr.	Nummer
NSAID	nonsteroidal anti-inflammatory drugs
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase chain reaction
PMS1	postmeiotic segregation increased
PTEN	Phosphatase-Ten
PTPN1	protein tyrosine phosphotase non-receptor type 1
R_0-Resektion	kurative Resektion, histologisch im Gesunden
Rb	Retinoblastom
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SRC	avian sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog
STK	Serin-Threonin-Kinase
T	Tumormaterial
taq	Thermus aquaticus
TE	TRIS/EDTA
TGF-ß	transforming growth-factor-ß

TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Trishydroxymethyl-Aminomethan
UICC	Union International Contre Le Cancer
USA	United States of America
UV	ultraviolett
V	Volt
WHO	World Health Organization
p	kurzer Arm des Chromosoms x
q	langer Arm des Chromosoms x
z.B.	zum Beispiel

7.3 Lebenslauf

Am 20. Januar 1973 wurde ich, Cornelia Siewecke als Tochter von Elisabeth Siewecke, geborene Vogt, und ihrem Mann Winfried in Bielefeld geboren. Ich habe einen älteren Bruder Michael, der als Dplombetriebswirt arbeitet.

Schulausbildung

1979 – 1983	Grundschule Borgholzhausen
1983 - 1992	Christophorus-Gymnasium Versmold
11. Juni 1992	Allgemeine Hochschulreife

Akademische Bildung

WS 1992/1993	Studium der Zahnmedizin an der Universität Marburg
SS 1993 – WS 1997/98	Studium der Humanmedizin an der Universität Marburg
SS 1998 – WS 1999	Praktisches Jahr an der Universität Regensburg
Mai 1999 – Oktober 2000	Beschäftigung als Ärztin im Praktikum an der Universität Tübingen
seit Dezember 2000	Assistenzärztin an der Universität Regensburg Klinik und Poliklinik für Dermatologie

Prüfungen

8. September 1994	Ärztliche Vorprüfung
29. August 1995	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
30. März 1997	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
12. April 1999	Ärztliche Prüfung

Famulaturen

März - April 1995	Chirurgie im St. Franziskus - Hospital in Bielefeld
September - Oktober 1995	Allgemeinmedizin in der Praxis Dr. Tiwisina in Borgholzhausen
März - April 1996	Kinderkardiologie an der Thomas-Jefferson-University of Philadelphia / PA / USA
Juli - August 1996	Allgemeine Pathologie an der Universität Marburg

Studienbegleitende Tätigkeiten

SS 1993 - SS 1997	Studienberaterin für den Fachbereich Humanmedizin; Nachtdienste und Extrawachen in der Gynäkologie, Augenheilkunde und Inneren Medizin
WS 1996 - SS 1997	Kursassistentin am Institut für Allgemeine Pathologie in Marburg

7.4 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren Damen/Herren in Marburg:

Arnold
Aumüller
Barth
Basler
Baum
Daut
Dederichs
Emons
Gotzen
Happle
Kern
Klose
Kretschmer
Kroll
Mennel
Netter
Riedmüller
Rothmund
Schachtschabel
Schlegel
Vogel
Wagner
Wichert

Meine akademischen Lehrer waren Damen/Herren in Regensburg:

Anthuber
Birnbaum
Feuerbach
Jauch
Jilg
Krämer
Landthaler
Lock
Lohmann
Maghsudi
Nerlich
Notheis
Palitzsch
Riegger
Ruf
Schölmerich
Zietz

7.5 Danksagung

Ich möchte die Gelegenheit nutzen, mich bei folgenden Personen ganz herzlich zu bedanken:

- Herrn Prof. Dr. med. H.-D. Mennel, Abteilung für Neuropathologie des Zentrums für Pathologie der Philipps-Universität Marburg, für die Vergabe dieser Dissertation und die Bereitstellung der Räumlichkeiten und Materialien

- Herrn Prof. Dr. med. J. Schlegel, Abteilung für Neuropathologie des Instituts für Pathologie und Pathologische Anatomie der TU München, für die gute Betreuung und ständige Diskussionsbereitschaft

- Herrn Prof. Dr. med. J. Rüschoff, Institut für Pathologie, Klinikum Kassel, für die Bereitstellung der DNA-Proben

- den Mitarbeitern im Labor der Neuropathologie Marburg, allen voran Herrn Guido Piontek; nicht zuletzt für die vielen anregenden Diskussionen

- meinen Eltern für die unermüdliche psychische Unterstützung im Verlauf der Doktorarbeit

7.6 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Kartierung chromosomaler Aberrationen der Chromosomen 9p21, 13q14.3 und 20q13 in sporadischen Coloncarcinomen mit Hilfe einer semiquantitativen Polymerasekettenreaktion“ im Med. Zentrum für Pathologie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Mennel und der Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. Schlegel ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in dem folgenden Publikationsorgan veröffentlicht: Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie (Nachweis von Deletionen des Chromosoms 9p in metastasierenden Coloncarcinomen mit Hilfe der CGH. Verh Dtsch Ges Path 81: 453).

Marburg, den 01. September 2001