

**Aus der Klinik für Chirurgie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Hans-Peter Bruch**

**Risikostratifizierung an kolorektalen
Adenomen bezüglich Rezidivgefahr und
synchron auftretenden Karzinomen mittels
Multi-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von

Constanze Ariane Brucker
geboren 28.12.1980 in Stade

Lübeck 2011

1. Berichtstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Jens K. Habermann PhD

2. Berichtstatterin: Prof. Dr. rer. nat. Christine Zühlke

3. Berichtstatter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Michael Linnebacher

Tag der mündlichen Prüfung: 08.06.2012

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 08.06.2012

Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AK	Antikörper
Abb.	Abbildung
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
BSA	Bovine Serum Albumin
Bsp.	Beispiel
bp	Basenpaare
2c	euploider DNA-Gehalt; diploide Chromosomenanzahl
CCD Kamera	Charge Coupled Device Kamera
CEP	Zentromer-Probe
CIN	Chromosomal Instability
CT	Computertomographie
CTD	C-terminale Domäne
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DCC	Deleted-in-colorectal-Cancer
DEPC-H ₂ O	Diethyl-pyrocbonat treated H ₂ O
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FITC	Fluoreszein-isothiocyanat
G0-Phase	Ruhephase im Zellzyklus
G1-Phase	Gap1, Intervall zwischen Mitose und S-Phase
G2-Phase	Gap2, Intervall zwischen S-Phase und Mitose
HCL	Salzsäure
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
5-JÜR	Fünfjahres-Überlebensrate
M	Molarität
M-Phase	Mitose-Phase
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Anzahl
PET	Positronenemissionstomographie
PBS	Phosphate buffer solution
S-Phase	Synthese-Phase
StB	Statistische Bildanalyse
TAE-Puffer	Tris-Base, Acetic Acid, EDTA
Tis	Tumor- in-situ
TRITC	Tetramethyl-rhodamine-isothiocyanat
UICC	Union internationale contre le cancer
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
WHO	World Health Organisation

1 Einleitung	1
1.1 Hintergrund	1
1.2 Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms	2
1.3 Ätiologie	2
1.4 Screening und Diagnose	4
1.5 Therapie und Verlauf.....	6
1.6 Histopathologie, Grading und Staging	8
1.7 Genetische Stabilität.....	10
1.8 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	12
1.9 Laminin-5 und Cyclin A	18
2 Fragestellung	19
2.1 Spezielle Zielsetzungen im Einzelnen	19
3 Material und Methoden	20
3.1 Patienten.....	20
3.2 Methoden.....	20
4 Ergebnisse	30
4.1 Panel 1 (CEP 18, SMAD7, EGFR).....	30
4.2 Panel 2 (CEP 17, NCOA3, p53)	31
4.3 Panel 3 (CEP 17, c-myc, RAB20).....	34
4.4 Vergleich von Adenomen und synchronen Karzinomen	35
4.5 Instabilitätsindices in Abhängigkeit vom Ploidiestatus	37
4.6 Panelübergreifende Korrelationen	37
4.7 Analyse der klinischen Parameter	38
5 Diskussion	43
5.1 Panel 1 (CEP 18, SMAD 7, EGFR)	43
5.2 Panel 2 (CEP 17, NCOA3, p53)	44
5.3 Panel 3 (CEP 17, c-myc, RAB20).....	46
5.4 Cyclin-A und Laminin-5.....	47

5.5 Fazit	49
5.6 Ausblick.....	49
6 Zusammenfassung.....	51
7 Literaturverzeichnis	52
8 Anhang	62
8.1 Verzeichnis der Abbildungen, Tabellen und Kasuistiken.....	62
8.2 Protokolle	69
8.3 Reagenzien, Geräte und Verbrauchsmaterialien	71
9 Danksagungen	73
10 Lebenslauf	74
11 Publikationsliste.....	75

1 Einleitung

1.1 Hintergrund

Das kolorektale Karzinom zählt zu den weltweit häufigsten malignen Tumoren mit einem durchschnittlichen Erkrankungsalter von 65 Jahren. In industrialisierten Ländern stellt es die dritt häufigste Todesursache aller Krebspatienten dar [Weitz 2005]. Da die 5-Jahres-Überlebensrate von über 90% im Frühstadium (UICC I) auf unter 60% im fortgeschrittenen Stadium (UICC III) sinkt [O`Connell 2004], ist eine frühzeitige Diagnose ausschlaggebend für eine kurative Therapie und die Prognose des Patienten.

Die meisten kolorektalen Karzinome entstehen auf dem Boden genetischer Veränderungen einzelner Mukosazellen, die über die „Adenom-Karzinom-Sequenz“ schließlich in einem invasiven Karzinom resultieren [Cho, Vogelstein 1992]. Gerade diesen prämaligen Läsionen wird im Rahmen der Screening-Untersuchungen besondere Beachtung geschenkt, was zur deutlichen Senkung der Mortalität kolorektaler Karzinome in den Industriestaaten geführt hat [Fleischer 1989]. Dennoch werden ca. 70% der Karzinome in fortgeschrittenen Tumorstadien mit schlechten Heilungschancen diagnostiziert. [Stearns 1981] Daher ist es notwendig, nach neuen, objektiven und verlässlichen Parametern für ein verbessertes Screening zu suchen.

Zytogenetische Studien konnten ein für kolorektale Karzinome charakteristisches Muster an chromosomalen Imbalancen, das heißt Verlusten oder Zugewinnen von einzelnen Chromosomen oder Chromosomenarmen, aufzeigen. Dieses unterscheidet sich zum einen von anderen soliden Tumorspezies [Habermann 2007] und kann bereits während der kolorektalen Karzinogenese wahrgenommen werden. Beispielsweise finden sich Zugewinne (Trisomie) von Chromosom 7 und 13 bereits in Adenomen [Bomme 1994]. Diese Aberrationen bleiben dann in den Karzinomen und Metastasen erhalten und werden dort durch zusätzliche Trisomien der Chromosomen bzw. Chromosomenarme 6, 8q und 20 sowie Verluste (Deletionen) von 4q, 8p, 17p und 18q ergänzt [Habermann 2007].

Vor diesem Hintergrund ist anzunehmen, dass Genen, die auf von Trisomien und/oder Deletionen betroffenen Chromosomen liegen, eine bedeutende Rolle in der kolorektalen Karzinogenese beizumessen ist. Die vorliegende Studie hat daher untersucht, ob mittels der Multi-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von Gen-

Sonden, welche numerische Chromosomen-aberrationen reflektieren, eine individuelle Karzinomrisiko-Stratifizierung bereits an Adenomen möglich ist.

1.2 Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms

Kolorektale Karzinome treten in Industrieländern bei Männern als dritt häufigstes und bei Frauen als zweit häufigstes Karzinom auf. Weltweit erkranken jährlich etwa eine Million Menschen neu an einem kolorektalen Karzinom, ca. 529.000 Patienten versterben pro Jahr daran [Parkin 2005]. Die Prävalenz für ein Adenom als prämaligne Vorstufe des kolorektalen Karzinoms wird in den USA mit 25 bzw. 50% (für 50 bzw. 70jährige) angegeben [DeVita 2008]. Standardisierte Inzidenzraten pro 100.000 Einwohner unterscheiden sich zwischen Männern und Frauen nur geringfügig (19,4 bzw. 15,3) wohingegen es erhebliche geographische Variationen mit Schwankungen um das 30-40 fache zwischen den höchsten und niedrigsten Inzidenzraten gibt [Brown 1998]. Sowohl die Inzidenz- als auch die Mortalitätsraten sind in den westlichen, industrialisierten Staaten deutlich höher als in Entwicklungsländern, was für die Beteiligung von Umweltfaktoren und Lebensbedingungen an der kolorektalen Karzinogenese spricht [Landis 1998].

1.3 Ätiologie

Genetische Prädisposition und umweltbedingte Risikofaktoren

Ca. 5-10% aller kolorektalen Tumore entstehen im Rahmen von hereditären Karzinom-Syndromen. Die Familiäre Adenomatosis polyposis coli (FAP, Mutation des APC-Gens) und das hereditäre nicht-polipöse Kolonkarzinom (HNPCC I und II = Lynch-Syndrom) stellen davon die zwei häufigsten Syndrome dar [Lynch 2003]. Weitere genetisch bedingte Risikogruppen stellen das seltene Polyposis-Syndrom, das Peutz-Jeghers-Syndrom, die Juvenile Poliposis, das Gardner-Syndrom, das Cowden-Syndrom [Lynch 2003, Half 2004], ein gehäuftes familiäres Auftreten von kolorektalen Adenomen oder Karzinomen [Fuchs 1994], das Cronkhite-Canada-Syndrom sowie chronisch entzündliche Darmerkrankungen dar. Neben dem Morbus Crohn ist hier vor allem die Colitis ulcerosa zu nennen, die mit Zunahme der Erkrankungsdauer ein deutlich erhöhtes Risiko für die Entstehung eines kolorektalen Karzinoms birgt und deshalb als Präkanzerose gilt [Bernstein 2001]. Als zusätzlich zur kolorektalen Karzinogenese beitragend werden umweltbedingte

Risikofaktoren wie Adipositas, Nikotinabusus [Willett 1990, Wilmink 1997, Slattery 1997, Potter 1999] und hoher Fleischkonsum vor allem bei Individuen mit hoher N-Acetyltransferase-Aktivität [DeVita 2008] diskutiert. Eine fettreiche Ernährung und hohe Gallensäurespiegel führen nach Suzuki und Bruce zur Schleimhautproliferation mit erhöhtem Neoplasierisiko. Kalzium, Folsäure, Vitamin D, C und E sowie der Einsatz nicht-steroidaler antiinflammatorischer Medikamente (NSAID) und neuerer selektiver Cyclooxygenase-(COX)-2-Inhibitoren gelten hingegen als protektiv [DeVita 2008].

Pathogenese sporadischer kolorektaler Karzinome – Die „Adenom-Karzinom-Sequenz“

Kolorektale Karzinome treten in 90% aller Fälle sporadisch, das heißt ohne definierte, hereditäre Komponente auf [Hauser 2004]. Normale Mukosazellen des Kolorektums befinden sich in einem kontrollierten Gleichgewicht zwischen Proliferation und Differenzierung basal gelegener Stammzellen einerseits und Apoptose apikaler Zellen und deren Abschilferung ins Darmlumen andererseits. Das Epithel des Kolorektums ist ein aktives System, das sich alle fünf bis sechs Tage erneuert. Die gesteigerte Proliferationsrate erhöht zugleich das Risiko für genetische Aberrationen, die es einzelnen Epithelzellen ermöglichen kann, sich dem kontrollierten Wachstum bzw. Gleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose zu entziehen. Auf diesem Wege entstehen die meisten kolorektalen Karzinome. Hierbei wird unterschieden zwischen Genmutationen und numerischen Aberrationen auf subchromosomaler oder chromosomaler Ebene (z.B. Amplifikationen von Onkogenen, Deletionen von Tumorsuppressorgenen), welche die chromosomale Instabilität reflektieren. 1990 publizierten Fearon und Vogelstein ein Modell der „Adenom-Karzinom-Sequenz“, welches die Korrelation bestimmter und wiederholt auftretender genetischer Aberrationen mit der morphologischen Transformation des Kolonepithels beschreibt [Fearon 1990].

Das auslösende Ereignis stellt hierbei eine Mutation des *Adenomatosis polyposis coli* (APC) Gens auf Chromosom 5q21 dar. Diese somatische Mutation ist in 80% aller sporadischen kolorektalen Adenome und Karzinome zu finden und führt zur Inaktivierung des APC-Gens und damit zum Verlust seiner Tumorsuppressorfunktion [DeVita 2008]. Ein daraus folgendes ungehemmtes Zellwachstum und

mögliche chromosomale Instabilität [Fodde 2001] schaffen Voraussetzungen für die maligne Entartung.

Des Weiteren spielen Mutationen in der Signalkaskade des Ras-Onkogens und des *p53*-Tumorsuppressorgens eine wichtige Rolle für den Übergang eines Adenoms in ein invasives Stadium [Vogelstein, Kinzler 2004], das durch unkontrollierte Epithelproliferation und –transformation einerseits sowie fehlenden Zellzyklusarrest und ausbleibende Apoptoseinduktion andererseits gekennzeichnet ist. Für die Entstehung von Fernmetastasen werden Loss-of-function-Mutationen in Tumorsuppressorgenen wie z.B. *DCC* und *SMAD4* beschrieben [Fodde 2002].

1.4 Screening und Diagnose

Beim Großteil der Patienten wird aufgrund von typischen Symptomen wie Blut im Stuhl, wechselndem Auftreten von Obstipation und Diarrhö, Tenesmen, Gewichtsverlust, Eisenmangelanämie und gelegentlich Ileussyptomatik der Verdacht auf ein kolorektales Karzinom geäußert. Diese Symptome treten oft erst spät im Krankheitsverlauf auf, so dass es sich bei ca. 50% der entdeckten Tumoren bereits um Karzinome im Stadium UICC III handelt. Das derzeitige Screening auf kolorektale Neoplasien umfasst die digital-rektale Untersuchung, den Test auf okkultes fäkales Blut (FOBT, z.B. Haemoccult®), die Sigmoidoskopie sowie die Koloskopie und wird für gesunde Individuen ohne familiäre Belastung ab dem fünfzigsten Lebensjahr empfohlen. Die „ideale“ Screening-Methode wird kontrovers diskutiert und muss nach Effektivität, Kosten und individuellen Risiken des Patienten bewertet und ausgewählt werden [Weitz 2005].

Der Goldstandard der Diagnostik beinhaltet neben der körperlichen Untersuchung eine digital-rektale Untersuchung, die Koloskopie mit Biopsien verdächtiger Schleimhautareale, Abdomensonographie und Röntgen-Thorax zum präoperativen Ausschluss von Fernmetastasen sowie die Endosonographie zur Abklärung von Tiefeninfiltration und Befall der regionären Lymphknoten.

Die jährlich durchgeführte Untersuchung des Stuhls auf okkultes Blut zeigte in einer Metaanalyse bisher durchgeführter Studien eine Mortalitätssenkung von 23% [Towler 1998]. Bereits ein einmalig positives Testergebnis indiziert eine komplette Koloskopie. Diese beinhaltet auch den Ausschluss eines Anal- oder

distalen Rektumkarzinoms mittels Proktoskopie. Nur bei technisch bedingt unvollständiger Koloskopie wird heute noch eine Kolonkontrastuntersuchung empfohlen, für die eine Sensitivität von 35% beschrieben wird [Menardo 2005].

Die Inzidenz von kolorektalen Karzinomen kann nach Angaben der National Polyp Study (NPS) [Walsh 2003 clinical applications, Walsh 2003 scientific review] durch die Koloskopie um 76-90% gesenkt werden. Für die Senkung der Mortalitätsrate gelten derzeit nur Schätzungen, die von einer Reduktion um 60% ausgehen [Fransohoff 2005].

Trotz Anerkennung der Koloskopie als diagnostischer Goldstandard kann eine als unauffällig befundene Spiegelung eine diagnostische Lücke verschleiern: einer Studie von Menard und Mitarbeitern zufolge ist in 10% der Fälle das Zökum bei der Koloskopie nicht ausreichend beurteilbar. Bezüglich der Adenomgröße werden in 15-20% Adenome, die kleiner als 10mm sind nicht erkannt, bei größeren Adenomen entgehen dem Untersucher immerhin noch 6% [Menardo 2005].

Das Risiko von neuen bzw. unentdeckt gebliebenen Karzinomen innerhalb von drei Jahren nach einer Koloskopie beschreiben Bressler et al. ebenfalls als lokalisationsabhängig mit 5,9% im Colon ascendens, 5,5% im Colon transversum, 2,1% in der linken Flexur bzw. im Colon descendens und mit 2,3% im Sigma und Rektum [Bressler 2007].

Es wäre daher von unschätzbarem Wert, wenn es zusätzlich zur histopathologischen Aufarbeitung von Adenomen Parameter geben würde, die eine individuelle Risikoabschätzung für das Vorliegen oder Entstehen eines kolorektalen Karzinoms erlaubten.

Die Sigmoidoskopie ermöglicht wie auch die Koloskopie die Intervention im Sinne einer Adenom-Abtragung oder Probenentnahme bei makroskopisch verdächtigen Arealen. Sie weist eine hohe Sensitivität und Spezifität für Adenome auf und führt als Screeningverfahren zu einer Senkung der Mortalität um 60-80% [Muller 1995, Newcomb 1992, Selby 1992]. Diesbezüglich verbessern neue Verfahren wie die Chromoendoskopie die Sensitivität der konventionellen Endoskopieverfahren und ermöglichen eine präzisere Markierung von Läsionen, was zu exakteren endoskopischen Resektionsergebnissen führt [Hurlstone 2004, Kiesslich 2003].

Die optische Auflösung endoskopischer Bildgebung konnte ausserdem durch Techniken wie das Narrow-Band-Imaging und die konfokale laserbasierte

Endomikroskopie verbessert werden. Der erstgenannte Ansatz bedient sich der Fokussierung auf ein schmales Lichtspektrum von 370-450 nm und ermöglicht damit eine bessere Darstellung von oberflächlichen Gefäßstrukturen. Mittels konfokaler laserbasierter Endomikroskopie kann eine optische Auflösung um den Faktor 1000 verbessert werden, so dass während einer endoskopischen Untersuchung eine in-vivo-Mikroskopie der Schleimhaut möglich ist. [Eickhoff 2006] Diese und andere neue Screeningverfahren wie virtuelle Koloskopie, molekulargenetische Untersuchung der DNA im Stuhl und Serum-Proteomics zeigen vielversprechende Ergebnisse, sind aber derzeit noch nicht in der klinischen Routine etabliert [Weitz 2005].

Für die Beurteilung der möglichen Infiltration in Nachbarorgane beim Rektumkarzinom wird die Therapieplanung und das Staging auf der Basis von endorektaler Sonographie, CT oder MRT empfohlen [Weitz 2005]. Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) eignet sich für die Detektion von Karzinomrezidiven, hat jedoch für das Staging primärer Karzinome nur eine geringe Aussagekraft [Goh 2004].

1.5 Therapie und Verlauf

Kolorektale Adenome sollten wenn möglich im Rahmen der endoskopischen Untersuchung vollständig entfernt werden. Das ermöglicht, einen sicheren Befund hinsichtlich des histologischen Subtyps der Neoplasie zu erhalten und somit das Risiko einer malignen Entartung zu beurteilen (5% für das tubuläre Adenom und 40% für das villöse Adenom) [DeVita 2008]. Zum anderen stellt die Polypabtragung ein Therapieverfahren dar.

Die Therapie der Wahl für kolorektale Karzinome besteht in einer radikalen Resektion wobei sich das Operationsausmaß nach der Tumorlokalisation und dem Lymphknoten-Status richtet. Ein Verfahren in No-Touch-Technik, bei dem vor der Mobilisation des betreffenden Darmabschnitts eine Ligatur der versorgenden Gefäße erfolgt, um ein Verstreuen von Tumorzellen in die Peripherie zu verhindern, ist dabei obligat. En-bloc-Kolektomie bzw. Kolonteilresektion können laparoskopisch durchgeführt werden. Das trifft auch für die Entfernung eventuell vorhandener Lebermetastasen zu. Das laparoskopische Verfahren ist hinsichtlich der onkologischen Langzeitergebnisse denen der konventionellen Laparatomie

gleich zu setzen [Clinical Outcomes Study].

Ein neuerer Ansatz für die Bestimmung des Lymphadenektomie-Ausmasses ist das sogenannte Wächter-Lymphknoten-Konzept, das z.B. in der Chirurgie des Mamma-Karzinoms schon standardmässig Anwendung findet und zum Ziel hat, die Lymphknoten mit dem höchsten Risiko eines Tumorbefalls an primären Drainagestellen ausfindig zu machen. Saha et al. beschreiben eine Übereinstimmung von 96% für die Vorhersage des Lymphknotenstatus mithilfe des Stagings von Wächter-Lymphknoten [Saha 2004]. Die prognostische Signifikanz muss erst in weiteren Studien bewiesen werden.

Bei Rektumkarzinomen der Stadien II und III wurde bisher eine adjuvante Radiochemotherapie an die Operation angeschlossen. Um ein präoperatives Downstaging zu erzielen, wird jetzt für Rektumkarzinome ab Stadium II auch eine neoadjuvante Radiochemotherapie empfohlen [Gunderson 2003]. Für Patienten mit Kolonkarzinom und hohem Rezidivrisiko wird im Gegensatz zur Chemotherapie die adjuvante Radiatio in einer Phase III-Studie [Martenson 2004] negativ bewertet. Neue Ansätze in der palliativen Chemotherapie fernmetastasierter kolorektaler Karzinome beinhalten den Einsatz neuer Zytostatika wie z.B. Irinotecan oder Oxaliplatin sowie die Erprobung von monoklonalen Antikörpern gegen Wachstumsfaktoren bzw. deren Rezeptoren (Bsp. Bevacizumab, Cetuximab). Diese neuen Therapeutika ermöglichen ein längeres ereignisfreies Überleben [Weitz 2005].

Für die Nachsorge spielen die Koloskopie und das Carcino-embryonale Antigen (CEA) als Tumorverlaufs-Marker eine wichtige Rolle. Patienten mit Rezidiven bzw. Fernmetastasen können mittels CEA in 91-93% der Fälle erkannt werden, die Spezifität liegt bei 98-100%. Allerdings setzt dieses Nachsorgeverfahren einen erhöhten CEA-Serumspiegel vor der Primärtumoroperation voraus. Als Screening-Marker wird CEA allerdings bislang aufgrund seiner niedrigen Sensitivität und Spezifität nicht eingesetzt [DeVita 2008].

Die Prognose des kolorektalen Karzinoms wird vor allem vom TNM-Stadium des Tumors – Infiltrationstiefe des Primärtumors (T-Stadium), Vorhandensein von Lymphknoten- (N-Stadium) bzw. Fernmetastasen (M-Stadium) und dem Ergebnis der chirurgischen Resektion (R-Stadium) - bestimmt [Compton 2000] (siehe auch Abschnitt 1.6).

1.6 Histopathologie, Grading und Staging

Histologie und maligne Transformation der Adenome

Kolorektale Adenome werden ihrer Histologie nach in drei Gruppen eingeteilt: tubuläre Adenome (adenomatöse Polypen, 75% aller Adenome), villöse Adenome (10%) und als Mischform die tubulär-villösen Adenome (villo-glanduläre Polypen, 15%) [Rubio 2006].

Tubuläre Adenome bestehen hauptsächlich aus glandulären Anteilen der Kolonmukosa, die schlauchförmige Verzweigungen bilden. Der Kopf des Adenoms wächst durchschnittlich auf zwei bis drei Zentimeter im Durchmesser, bei gestielten Adenomen besteht eine zwei bis drei Zentimeter lange Verbindung aus Muscularis mucosae, lymphatischem Gewebe und eingesprossenen Blutgefäßen zum umgebenden normalen Kolonepithel.

Die villösen Adenome hingegen bestehen hauptsächlich aus exophytisch wachsendem Oberflächenepithel, erreichen einen mittleren Durchmesser von 15 cm und können damit wie auch die anderen Formen einen großen Anteil des Kolonlumens verlegen. Tubulo-villöse Adenome stellen eine Mischform der beiden erstgenannten histologischen Typen dar [Ackroyd 1985].

Die Grösse eines Adenoms sowie seine Histologie und der Grad von Epitheldysplasien bestimmen sein malignes Potential: Morson et al. zeigten schon 1974, dass Adenome mit einer Grösse von einem Zentimeter im Durchmesser ein Karzinomrisiko von 1% aufweisen, Adenome ab zwei Zentimeter Durchmesser allerdings schon zu 35% ein Karzinom anzeigen [Ackroyd 1985]. Villöse Adenome zeigen eine Malignitätsrate von bis zu 40%, wohingegen tubuläre Adenome nur in 5% der Fälle maligne entarten. Bei tubulo-villösen Formen wird das Entartungsrisiko mit 22% angegeben.

Mit steigendem Dysplasiegrad lässt sich auch ein gesteigertes malignes Potential registrieren, das sich bei Größenzunahme des Adenoms potenziert: kleine Adenome (< 1cm) mit mittelgradiger Dysplasie zeigen nur ein 0,3 prozentiges Risiko für ein konsekutives Karzinom. Bei gleich großen Adenomen mit hochgradiger Dysplasie steigt dieser Wert auf 27% [Ackroyd 1985]. Histologischer Wachstumstyp, Grösse und Dysplasiegrad eines Adenoms stellen somit bislang die drei wichtigsten Parameter zur individuellen Risikoabschätzung eines Patienten dar, konsekutiv an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken.

Histologische Klassifikation der Karzinome (WHO)

Den grössten Anteil der kolorektalen Karzinome nehmen mit 90% die Adenokarzinome ein. Es werden tubuläre, papilläre und tubulo-papilläre Subtypen unterschieden. Zu den drei häufigsten histologischen Typen zählen ausserdem das muzinöse Adenokarzinom, sowie das Siegelringkarzinom. Andere histologische Tumortypen wie adenosquamöses, squamöses, kleinzelliges, medulläres Karzinom, Choriokarzinom, Karzinoid-Tumoren, Lymphome und Sarkome kommen seltener vor [Jass, Sobin 1989].

Grading nach WHO und UICC

Die WHO unterscheidet vier Differenzierungsgrade basierend auf der histologischen Ähnlichkeit des Karzinoms zum Ausgangsgewebe:

Hoch- und mittelgradig differenzierte Karzinome (niedriger Malignitätsgrad) werden von niedrig differenzierten und undifferenzierten Karzinomen (hoher Malignitätsgrad) unterschieden. Die Unterscheidung in niedrig und hochmaligne Karzinome scheint eine höhere prognostische Signifikanz zu haben als die Einteilung in einzelne Differenzierungsgrade [Greene 2002, DeVita 2008].

Einem hohen Differenzierungsgrad (WHO) entspricht die Bezeichnung G1 der UICC-Klassifikation (Union internationale contre le cancer), G2 dem mittelgradigen, G3 dem niedrig differenzierten und G4 dem undifferenzierten Karzinom.

Staging nach UICC

Dukes führte 1932 das erste Klassifikationssystem ein, das Tumoren in die Stadien

- A** Tumor ist beschränkt auf die Darmwand,
- B** Tumor penetriert die Darmwand und
- C** Tumor metastasiert in regionäre Lymphknoten

einteilt [Dukes 1932].

Es wurde später noch um das Stadium D erweitert, das Tumoren mit Fernmetastasen beschreibt (siehe Tabelle 1). Das TNM-System der UICC unterscheidet detaillierter die Invasionstiefe des Primärtumors (T-Stadium), die

Anzahl befallener Lymphknoten (N-Stadium) sowie das Vorhandensein von Fernmetastasen (M-Stadium) [Wittekind, Meyer 2010].

UICC-Stadium	T	N	M	Dukes-Stadium
0	Tis	N0	M0	A
I	T1,T2	N0	M0	A
IIA	T3	N0	M0	B
IIB	T4a	N0	M0	B
IIC	T4b	N0	M0	B
III	jedes T	N1,N2	M0	C
IIIA	T1, T2	N1a	M0	C
	T1	N2a	M0	C
IIIB	T3, T4a	N1	M0	C
	T2, T3	N2a	M0	C
	T1,T2	N2b	M0	C
IIIC	T4a	N2a	M0	C
	T3, T4b	N2b	M0	C
	T4b	N1,N2	M0	C
IVA	jedes T	jedes N	M1a	(D)
IVB	jedes T	jedes N	M1b	(D)

Tabelle 1: Übersicht über UICC-Stadium, TNM-Klassifikation und Dukes-Stadium

Zusätzlich existiert die Residualtumor-Klassifikation (R-Klassifikation), die einen mikroskopischen Resttumor nach erfolgter Behandlung mit R1 und einen makroskopisch sichtbaren Resttumor mit R2 bezeichnet. Findet sich kein Residualtumor so wird dies mit R0 bezeichnet. Diese Einteilung stellt einen der wichtigsten Prognosefaktoren dar [Compton 2003] und unterscheidet kurative Eingriffe (R0) von primär palliativen (R1, R2).

1.7 Genetische Stabilität

Überexpression von Onkogenen, Mutationen von Tumorsuppressorgenen oder der Kontrollverlust über den Zellzyklus können die genetische Stabilität einer Zelle gefährden, in dem vermehrt Fehler bei der Replikation der DNA im Rahmen der Zellteilung auftreten und nur unvollständig oder gar nicht von zellulären Reparaturmechanismen beseitigt werden können. Die Akkumulation derartiger

Fehler führt zur genomischen Instabilität. Es werden Fehler einzelner Basenpaare als Mikrosatelliteninstabilität (MSI) bezeichnet und von Fehlern der strukturellen Integrität einzelner Chromosomen (chromosomale Instabilität, CIN) unterschieden [Holinski-Feder 2010].

Für die Entstehung eines kolorektalen Karzinoms in der Adenom-Karzinom-Sequenz sind inzwischen verschiedene molekulare „Pathways“ analysiert worden [Jass 2007]. Die wesentlichen Unterschiede stellen entweder das Auftreten einer chromosomalen Instabilität (CIN), das Vorhandensein von Mikrosatelliteninstabilität (MSI) oder ein erhöhter Anteil an methylierter DNA (epigenetische Instabilität) dar.

DNA-Abschnitte, die besonders häufig von verstärkter Methylierung betroffen sind, liegen oft in der Nähe von Promotoren, die sowohl die Aktivierung als auch die Inaktivierung eines Gen steuern können. Eine Methylierung führt in der Regel zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, was mit einer Beschleunigung der Karzinogenese einhergeht [Jass 2002, 2007, Issa 2004].

Zu den Formen der genetischen Instabilität gehört neben der chromosomalen Instabilität (CIN) die Mikrosatelliteninstabilität (MSI-Pathway), welche sich in ca. 14% der sporadischen kolorektalen Karzinome zeigt [Holinski-Feder 2010]. Durch Inaktivierung eines Mismatch-Reparaturgens kommt es nach DNA-Schädigung im folgenden Replikationsschritt nicht zur Fehlerkorrektur innerhalb der DNA. Dies kann weitere Genmutationen zur Folge haben (Bsp. *APC*, *K-ras*) und eine Beschleunigung der Adenom-Karzinom-Sequenz von durchschnittlich 10 Jahren [Schlag 2006] auf 1-2 Jahre ermöglichen [Jass 2002].

Im Rahmen der chromosomalen Instabilität (CIN-Pathway) werden molekular-pathologische Genveränderungen in einem Mehrschrittmodell beschrieben, die bereits 1990 von Fearon und Vogelstein als Adenom-Karzinom-Sequenz bezeichnet wurden (siehe auch 1.3 Ätiologie und Pathogenese). Es werden Veränderungen in 4-6 Genen proklamiert, um die Karzinogenese ausgehend von einem dysplastischen Epithel über Adenome hin zu einem invasiven kolorektalen Tumor zu ermöglichen [Fearon und Vogelstein 1990].

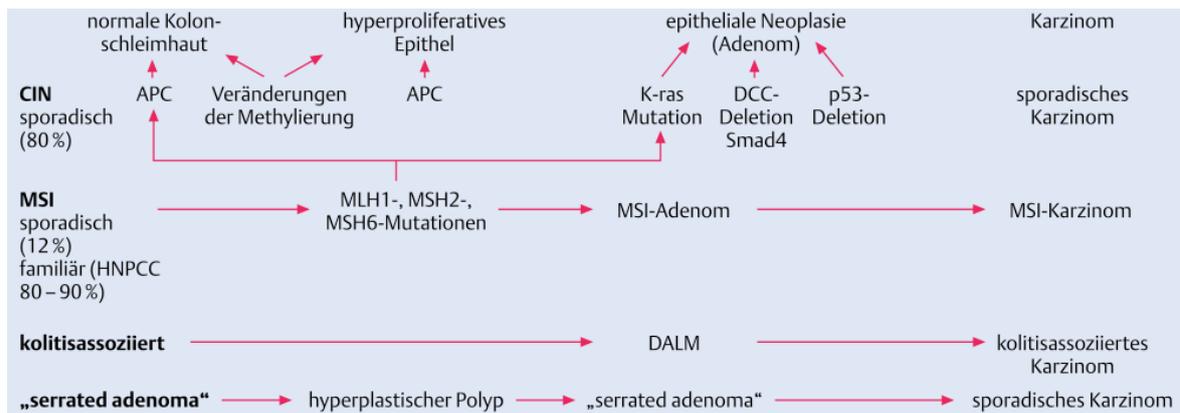


Abb. 1: Multistep-Karzinogenese des kolorektalen Karzinoms (modifiziert nach Fearon und Vogelstein 1990, Siegenthaler und Blum 2006)

Genetische Instabilität kann so im Laufe von mehreren meiotischen Zellteilungen zu erheblichen Variationen im DNA-Gehalt eines einzelnen Zellkerns führen, die sich dann in detektierbaren Abweichungen vom physiologischen nukleären DNA-Gehalt widerspiegeln können. Caspersson et al. konnten diese als Aneuploidie beschriebenen Veränderungen erstmals nachweisen [Caspersson 1979]. Neuere Techniken wie das Chromosomen-Banding, die komparative genomische Hybridisierung (CGH), das spektrale Karyotypisieren (SKY) und die Multicolour-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung erlauben heute eine noch höhere Auflösung als die Betrachtung des nukleären DNA-Gehaltes, zum Beispiel auf chromosomaler und subchromosomaler Ebene.

1.8 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

1969 wurde die erste In-situ-Hybridisierung (ISH) zur Chromosomenanalyse noch mittels radioaktiv markierter Proben durchgeführt [Pardue 1969, John 1969, Gall 1969]. Rudkin und Stollar führten 1977 die ersten Hybridisierungen mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Proben durch [Rudkin 1977] und etablierten damit die FISH-Technik. Cremer et al. gelang es 1986 mithilfe von Zentromer-spezifischen Proben (siehe Abb. 2b), die FISH-Technik auch für Interphasekerne zugänglich zu machen [Cremer 1986]. Diese Weiterentwicklung ermöglichte die direkte Anwendung an frischem oder archiviertem Gewebematerial ohne vorausgehende Zellkultur.

Das Prinzip der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung besteht in der Hybridisierung einer DNA-Probe mit eingebautem Reportermolekül, z.B. einem Protein wie Biotin oder Digoxigenin, zum komplementären chromosomalen Locus und an-

schliessender Detektion des Haptens mit einem ausgewählten Fluorochrom. Die Multi-colour-FISH ermöglicht die zeitgleiche Hybridisierung verschiedener Proben unter Verwendung verschiedenfarbiger Fluoreszenzfarbstoffe.

FISH-Proben sind hoch spezifisch für ihre Ziel-DNA-Sequenz [McNiel 2000] und können in vier Haupttypen unterschieden werden:

Gen-spezifische Proben, Zentromer-Proben, Gesamtgenom-DNA-Proben und Chromosom-spezifische Proben. Auf die beiden Letztgenannten soll in diesem Zusammenhang nicht näher eingegangen werden, da sie in der vorliegenden Arbeit nicht verwendet wurden.

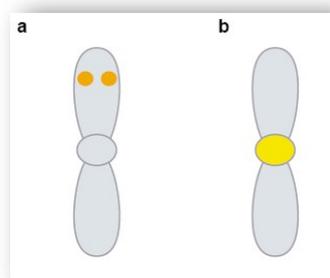
Gen-spezifische Proben (a)

Diese Proben hybridisieren mit spezifischen Nukleinsäuresequenzen innerhalb der Chromosomen. Ein Beispiel für derartige Proben sind neben „yeast artificial chromosome (YAC) probes“ die hier eingesetzten „bacterial artificial chromosome (BAC) probes“ [O'Connor 1989].

Zentromer-Proben (b)

Repetitive DNA-Basenpaar-Sequenzen, wie die A-T-reichen Tandem-repeats im Zentromerbereich eines Chromosoms, bilden das Hybridisierungsziel dieser Proben. Eingesetzt werden Zentromer-Proben wie z.B. in dieser Studie für die Darstellung numerischer Chromosomenaberrationen in Interphasenuclei aber auch für die Identifikation von Marker-Chromosomen.

Abbildung 2: Modifiziert aus Expert Reviews in Molecular Medicine ©2000 Cambridge University Press



Beispiele verschiedener FISH-Proben:

- a** Gen-spezifische Proben binden spezifische Nukleinsäure-Sequenzen auf beiden Chromatiden eines Chromosoms
- b** Zentromer – Proben binden an repetitive Sequenzen, die spezifisch für die Zentromerregion eines Chromosoms sind

Hybridisierungs-Probepanel

Für die vorliegende Arbeit wurden drei FISH-Probepanel mit jeweils zwei Gen-spezifischen-Proben und einer Zentromer-Probe (CEP) zusammengestellt. Ausschlaggebend für die Auswahl der Genorte waren Literaturrecherchen und Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe [Ried 1996, Habermann 2003, Platzer 2002], die zeigen konnten, dass die Aneuploidie kolorektaler Karzinome auf die

Amplifikation und Deletion einzelner Chromosomen bzw. Chromosomenarme zurückzuführen ist. Ein für kolorektale Karzinome spezifisches Verteilungsmuster chromosomaler Aberrationen zeigt Amplifikationen der Chromosomen 7 und 20 bereits im Adenomstadium. Der Übergang in ein invasives Karzinom wird zusätzlich zu den bestehenden Amplifikationen durch weitere, multiple Aberrationen definiert (siehe auch Abbildung 3 im Anhang): Zugewinne der Chromosomen 6, 13, 20 und der Chromosomenarme 7p und 8q sowie Verluste des Chromosoms 4 und der Chromosomenarme 8p und 18q [Ried 1996, Habermann 2005]. Basierend auf diesem für kolorektale Karzinome spezifischen Muster chromosomaler Aberrationen liegt es somit nahe, dass bestimmten Genen auf derart betroffenen Chromosomen eine herausragende Bedeutung in der kolorektalen Karzinogenese zukommt. Bekannt sind erst wenige Gene mit Schlüsselfunktionen wie z.B. das Tumorsuppressor-Gen *p53* (17p13.1) oder das Onkogen *c-myc* (8q24.12). Vor diesem Hintergrund wurden die folgenden Zielgene, entsprechend ihrer möglichen Bedeutung für die kolorektale Karzinogenese, für die Hybridisierungs-Probepanel dieser Studie generiert: *SMAD7* (18q12.3), *EGFR* (7p12), *NCOA3* (20q12), *RAB20* (13q3.4).

Probepanel	Zentromerprobe Spektrum Aqua	Genprobe Spektrum Grün	Genprobe Spektrum Orange
1	CEP 18	<i>SMAD7</i>	<i>EGFR</i>
2	CEP 17	<i>NCOA3</i>	<i>p53</i>
3	CEP 17	<i>c-myc</i>	<i>RAB20</i>

Tabelle 2: Übersicht über die Hybridisierungs-Probepanel

SMAD7 (18q12.3)

Eine wichtige Rolle in der Karzinogenese spielt die Signalkaskade des Zytokins „Transforming growth factor beta“ (TGF- β). Die Funktionen des TGF- β sind vielfältig und beziehen sich auf Zellwachstum und –differenzierung, Immunmodulation und Apoptose [Hsing 1996]. Eine der am besten untersuchten Aufgaben des Zytokins ist seine Tumorsuppressor-Funktion: zu einer Blockade des Zellzyklus kommt es vor allem durch die TGF- β -vermittelte Hochregulation der Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren p15 und p21 sowie durch die Herunterregulation von Onkogenen wie z.B. *c-myc* und *ras* [Massagué 2000]. TGF- β -Signale werden über den TGF- β -Rezeptor, einen heteromeren Komplex

aus transmembranen Rezeptor Serin/Threonin-Kinasen Typ I und II, vermittelt. Nach Bindung des Liganden interagieren die Rezeptortypen I und II. Typ I wird phosphoryliert, um anschliessend selbst die DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren SMAD2 und SMAD3 zu phosphorylieren. Diese bilden mit SMAD4 einen Komplex, welcher in den Zellkern transloziert und dort das Signal der TGF- β -Kaskade auslöst [Wrana 1992].

Das Protein SMAD7 zeigt die Eigenschaft, diese Signalkaskade zu inhibieren: ein kompetitiver Antagonismus am TGF- β -Rezeptor Typ I verhindert die Phosphorylierung von SMAD2 und SMAD3 und führt damit zur Unterbrechung der Signalkaskade und somit zur Hemmung der Tumorsuppressor-Funktion von TGF- β [Zhang 2007].

Da TGF- β selbst in der Lage ist, die Expression von SMAD7 mRNA zu induzieren, ist anzunehmen, dass SMAD7 im Rahmen eines negativen Feedbacks die Signalkaskade des Transforming growth factors β kontrolliert [Nakao 1997].

EGFR (7p12)

Der „Epidermale growth factor receptor (EGFR)“, auch bekannt als HER1 oder ErbB1 gehört zur Familie der ErbB-Proteine, die wiederum der Untergruppe I der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK)-Superfamilie angehören. Bei diesem Wachstumsfaktor-Rezeptor handelt es sich um ein transmembranes Protein mit intrinsischer Tyrosin-Kinase-Aktivität [Grünwald 2003]. EGFR-Aktivierung führt zu Proliferation und Zellerhalt, Überexpression des Rezeptors kann allerdings Apoptoseresistenz und Tumorwachstum begünstigen [Roberts 2002]. Roberts et al. konnten zeigen, dass EGFR für die intestinale und besonders für die kolorektale Karzinogenese eine wichtige Rolle spielt; zusätzlich gewinnt der EGF-Rezeptor in der Entwicklung spezifischer Gentherapien an Bedeutung, wie z.B. durch den EGFR-Inhibitor Erlotinib [Herbst 2003]. Die möglichen, zukünftigen Therapieoptionen bei EGFR-positiven Karzinomen erscheinen daher vielversprechend.

NCOA3 (20q12)

Basierend auf seiner Amplifikation und Überexpression in Mamma- und Ovarialkarzinomen wurde NCOA3 (nuclear receptor coactivator) 1997 isoliert

[Anzick 1997].

Neben den genannten Tumoren werden *NCOA3*-Amplifikationen auch in Endometrium-, Magen-, Prostata-, und Hepatozellulären Karzinomen (HCC) [Wang 2002] gefunden [Zhou 2003]. *NCOA3* ist ein Transkriptionscoaktivator von im Zellkern lokalisierten Steroidrezeptoren – daher auch bekannt als „steroid receptor coactivator (SRC-3)“. Abgesehen von der spezifischen Coaktivierung des Östrogen-Rezeptors und den damit verbundenen Auswirkungen auf den weiblichen Organismus wie Ovulation, Reproduktion und östrogenvermittelte Vasoprotektion spielt *NCOA3* physiologisch in Prozessen wie Zellproliferation, -migration, -differenzierung und -wachstum eine grosse Rolle [Liao 2003].

p53 (17p13.1)

Das Tumorsuppressorprotein *p53* spielt eine essentielle Rolle in der Regulation des Zellzyklus, besonders im Übergang von der G₀- zur G₁-Phase. DNA-Schäden, z.B. durch UV-Strahlen können am „*p53*-Checkpoint“ erkannt und gegebenenfalls während eines *p53*-induzierten Zyklusarrests repariert werden. Ist eine Beseitigung des DNA-Schadens nicht möglich, so leitet *p53* bei der betreffenden Zelle die Apoptose ein.

Im Gegensatz zu den bereits beschriebenen Genorten 7p12 (*EGFR*) und 20q12 (*NCOA3*), die schon in frühen Stadien der kolorektalen Tumorentwicklung von numerischen Aberrationen betroffen sind, stellen Deletionen der 17p13-Region mit am häufigsten späte Ereignisse in der Tumorgenese dar (Risio 2003). Risio konnte zeigen, dass 17p13-Deletionen, die in frühen Stadien in 15% der Fälle auftraten auf bis zu 60% der Fälle bei fortgeschrittenen, invasiven Karzinomen anstiegen. Die daraus abzuleitende, wichtige Rolle des *p53* Tumorsuppressorgens für die Progression einer prämaligen Schleimhautläsion hin zu einem invasiven Stadium wird auch bei Ried [1996] aufgezeigt.

c-myc (8q24.12)

Neben Deletionen oder Punktmutationen in Tumorsuppressorgenen wie *p53* sind Mutationen von Onkogenen von grosser Bedeutung für die kolorektale Karzinogenese. Das bekannte Onkogen *c-myc* repräsentiert die Untergruppe der zellulären Transkriptionsfaktoren. Derartige Onkogene induzieren die Aktivierung

von weiteren Genen, welche durch Regulation und Stimulation der Zellproliferation die bestehende unkontrollierte Zellteilung im betroffenen Gewebe aufrecht erhalten.

Neben den genannten häufig während der Adenom-Karzinom-Sequenz zu beobachtenden Aberrationen der Chromosomen 6, 7, 13 und 20 sind vor allem Amplifikationen von 8q bedeutsam [Ried 1996]. Sie treten besonders häufig bei fortgeschrittenen Tumoren auf und lassen sich ebenfalls in Lebermetastasen kolorektaler Karzinome nachweisen [Platzer 2002]. Eine Amplifikation ist nicht zwangsläufig mit der Hochregulation des auf dem korrespondierenden chromosomalen Locus liegenden Gens verknüpft [Platzer 2002]. Dennoch konnten Ghadimi et al in einer CGH-Studie die prognostische Relevanz von 8q23-24 Amplifikationen für die Unterscheidung von kolorektalen Tumoren mit bzw. ohne Lymphknotenmetastasen zeigen [Ghadimi 2003]. C-myc erscheint daher als Zielgen für die Untersuchung eines Tumors auf sein Potential insbesondere zur lokalen Metastasierung geeignet.

RAB20 (13q3.4)

RAB-Proteine gehören zur Superfamilie der RAS-GTPasen. Sie existieren in allen eukaryotischen Zellen und bilden die grösste Unterart aller kleinen G-Proteine [Takai 2001]. Die Hauptfunktion der RAB-Proteine liegt in der Kontrolle des endozytotischen Vesikeltransports im Zellkern. So regulieren RAB-Proteine beispielsweise folgende Schritte: Knospung eines Vesikels von der Donatormembran, Leiten des Vesikels zur Akzeptormembran, Andocken des Vesikels und anschliessende Verschmelzung mit der Akzeptormembran [Takai 2001].

Die Bedeutung von veränderten RAB-Proteinen für die Entstehung von Krankheiten ist bis auf die Beschreibung zweier genetischer Störungen wenig erforscht. Das Griscelli Syndrom Typ 2, ein Immunschwächesyndrom, und die Charcot-Marie-Tooth-Neuropathie sind kausal mit Mutationen in RAB-Genen verknüpft. Überexpression von RAB-Proteinen wurde weiterhin in Verbindung mit Schilddrüsen-, Lungen- und Gefässerkrankungen sowie einigen Krebsarten beschrieben [Stein 2003]. Über die einzelnen Funktionen der bisher über 50 bekannten RAB-Proteine ist nur wenig bekannt. Das RAB20-Protein ist in Zellen

des Intestinaltrakts vor allem an der apikalen Zellmembran lokalisiert [Lütcke 1994] und vornehmlich an Endozytose und Recycling-Vorgängen in epithelialen Zellen beteiligt [Stein 2003]. Da viele maligne Neoplasien eine erhöhte intrazelluläre Recyclingrate von Wachstumsfaktor-Rezeptoren aufweisen [Stein 2003], bietet sich das *RAB20*-Gen als interessanter Marker für die Untersuchung der kolorektalen Adenome und Karzinome besonders im Kontext zur eingesetzten EGFR-Probe an.

1.9 Laminin-5 und Cyclin A

Das wichtigste Kriterium für einen malignen Tumor ist seine Invasivität, das Durchdringen der zuvor intakten Basalmembran. Für dieses Ereignis sind Laminin-Rezeptoren von zentraler Bedeutung: über sie erfolgt die Anheftung der neoplastischen Zellen an die Basalmembran, deren Zerstörung und schließlich die Invasion. Besonders die Isoform Laminin-5 ist für die Aufrechterhaltung des Kontaktes epithelialer Zellen zur Basalmembran wichtig [Carter 1991].

Der zur Zellproliferation notwendige Durchlauf eines regelrechten Zellzyklus wird neben dem unter Kapitel 1.8.1 beschriebenen p53 auch durch Proteine wie Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen (Cdk) reguliert. Cyclin A gehört zu den sogenannten „mitotischen“ Cyclinen, da es sein Expressionsmaximum sowohl in der S- als auch in der G2-Phase erreicht und die Mitose der Zelle initiiert [Bahnassy 2004].

In einer vorangegangenen immunhistochemischen Untersuchung der eigenen Arbeitsgruppe wurden am gleichen Patientenkollektiv Expressionsmuster sowohl für Laminin-5 als auch für Cyclin A ausgewertet, die jetzt mit klinischen Daten aus der vorliegenden Studie korreliert wurden [Habermann 2001].

2 Fragestellung

Da mit dem heutigen Standard der invasiven Diagnostik noch immer bis zu 20% der kolorektalen Karzinome undetektiert bleiben, war es Ziel der vorliegenden Arbeit herauszufinden, ob bestimmte Gen-Sonden diagnostisches und prognostisches Potential besitzen, auf synchrone Karzinome hinzuweisen bzw. das Risiko für ein zukünftiges kolorektales Karzinom vorherzusagen.

Entsprechend dieser Fragestellung wurden folgende Patientengruppen retrospektiv im langjährigen Krankheitsverlauf verglichen:

Patienten mit kolorektalem Adenom aber ohne Karzinom und Patienten, bei denen sowohl ein Adenom als auch ein synchrones Karzinom gefunden wurden.

2.1 Spezielle Zielsetzungen im Einzelnen

1. In welchem Ausmaß finden sich Deletionen und Amplifikationen von für die kolorektale Karzinogenese bedeutenden Genen in prämaligen Läsionen?
2. Lassen sich genomische Aberrationen (Gen-Amplifikation/-Deletion) im Verlauf der Adenom-Karzinom-Sequenz nachvollziehen und gibt es eine Korrelation zur histopathologischen Diagnose, insbesondere dem Dysplasiegrad?
3. Finden sich charakteristische Unterschiede von Gen-Amplifikationen und/oder Deletionen in den Adenomen der Patientengruppen ohne und mit synchronem Karzinom?
4. Haben die ausgewählten Proben/ Genmarker einen diagnostischen und prognostischen Wert im Hinblick auf mögliche maligne Transformation eines Adenoms? Kann mittels Multi-FISH-Proben an prämaligen Läsionen die individuelle Risikoabschätzung für das synchrone Bestehen bzw. die Entwicklung eines kolorektalen Tumors optimiert werden?

3 Material und Methoden

3.1 Patienten

Das Untersuchungskollektiv dieser Studie umfasst Patienten mit kolorektalen Adenomen und zum Teil synchronen Karzinomen aus der Klinik für Chirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein Campus Lübeck entsprechend der Ethikvoten # 99-121 und # 07-124.

Bei allen Patienten wurde zwischen 1995 und 2000 die klinisch, endoskopisch und histopathologisch gesicherte Diagnose "kolorektales Adenom bzw. Adenom und Karzinom" gestellt.

Diese Jahrgänge wurden für die vorliegende Studie ausgewählt, um einen hinreichend langen Beobachtungszeitraum zu gewährleisten.

Gruppeneinteilung

Die Einteilung der Patienten erfolgte in die folgenden Gruppen:

- A** kein Adenom-Rezidiv im Beobachtungszeitraum und kein Karzinom; n = 8,
B Adenom-Rezidiv aber kein Karzinom im Beobachtungszeitraum; n = 10,
 ⇒ **C** kein Karzinom im Beobachtungszeitraum; n = 18
D kein Adenom-Rezidiv im Beobachtungszeitraum, aber synchrones Karzinom; n = 9,
E Adenom-Rezidiv und Karzinom im Beobachtungszeitraum; n= 14
 ⇒ **F** synchrones Karzinom im Beobachtungszeitraum; n = 23

Die klinische Verlaufsbeobachtung betrug im Durchschnitt 6,5 Jahre (4-9 Jahre).

Bei 24 Patienten traten innerhalb dieses Zeitraums Adenom-Rezidive auf, bei 23 Patienten bestand synchron zum diagnostizierten Adenom ein kolorektales Karzinom, wovon sechs Karzinompräparate in die vorliegende Untersuchung eingebunden wurden (Klinische Daten des Studienkollektivs siehe Tabelle 3 & 4 im Anhang).

3.2 Methoden

Rahmenbedingungen der Studie

Diese Studie wurde zu großen Teilen während eines Forschungssemesters im Labor von Prof. Dr. med. Thomas Ried am National Cancer Institute (NCI), National Institutes of Health (NIH) in Bethesda, Maryland, USA durchgeführt.

Alle verwendeten Paraffinschnitte wurden von Herrn Prof. Dr. med. Stefan Krüger, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck (ehem.) hinsichtlich der Morphologie und Dysplasie ohne Kenntnis der klinischen Daten klassifiziert. Dysplasiegrade wurden entsprechend der Riddell-Klassifikation (keine, moderate, schwere Dysplasie) eingeteilt [Riddell 1983].

Präparate

Von den gewonnenen Gewebeproben wurden für die histopathologische Routineuntersuchung Paraffinschnitte angefertigt. Von diesen Paraffinblöcken wurden für die vorliegende Studie drei konsekutive jeweils 4µm dicke Schnitte sowie drei zugehörige jeweils 50µm dicke Schnitte angefertigt und auf FISHER Superfrost® Objektträgern fixiert.

Klassifikationen

Für die morphologische Begutachtung und die Dysplasie-Klassifikation der Präparate wurden die 4µm Schnitte aller Adenom- und Karzinom-Präparate mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt und nach mikroskopischer Begutachtung folgendermaßen eingeteilt:

- normale Schleimhaut,
- leichte, moderate, schwere Dysplasie,
- Carcinoma in situ (Cis) und
- Kolorektales Karzinom.

Morphologisch wurden drei Typen unterschieden:

- tubuläre, tubulär-villöse und villöse Adenome.

Die Karzinome wurden entsprechend den TNM-Stadien der UICC klassifiziert (siehe Tabelle 1, Seite 10).

Immunhistochemie

In einer früheren immunhistochemischen Untersuchung der eigenen Arbeitsgruppe wurden an Präparaten des gleichen Patientenkollektivs Expressionsmuster sowohl für Laminin-5 als auch für Cyclin A ausgewertet, die jetzt mit klinischen Daten aus

der vorliegenden Studie korreliert wurden. [Habermann 2001] Der Prozentsatz angefärbter Zellen pro Präparat hinsichtlich einer Immunreaktivität war grundlegend für die folgende Einteilung:

Kategorie 0: keine spezifische Antikörperreaktion

Kategorie 1: <20% Immunreaktivität

Kategorie 2: 20-50% Immunreaktivität

Kategorie 3: > 50% Immunreaktivität.

Modifizierte Hedley-Methode

Für die Multicolor-FISH-Analyse an Interphasekernen war es zunächst notwendig, einzelne Zellkerne aus ihrem Gewebeverband zu isolieren und auf einem Objektträger als sogenannte „Single-layer-Preparation“ (Einzellzelllage) aufzubringen.

Zu diesem Zweck wurde die bei Heiden beschriebene Hedley-Methode [Heiden 1991] für die vorliegende Studie modifiziert angewandt (Protokoll s. Abschnitt 8.2.1): Pro Präparat wurden zwei 50µm Schnitte in Xylol entparaffiniert, in einer absteigenden Ethanolreihe und Aqua destillata rehydratisiert und anschliessend mit 500µl Protease (0,1%, Typ XXIV, Bacterial Sigma in Dulbecco's 1xPBS, Life Technologies) für 45 - 70 Minuten bei 45°C inkubiert. Um optimale Resultate zu erzielen, wurden die Quantität und Qualität der Kerne sowie die Menge des verbliebenen Zytoplasmas mit DAPI-Sulphorodamin (1mM DAPI, Sigma D-9542, 5mM Solphorodamin, Sigma S-7635) im Fluoreszenzmikroskop (Leica) beurteilt.

Erschienen die Kerne intakt mit möglichst wenig Zytoplasmasaum, so wurde die Reaktion mit 500µl 1xPBS (KD-Medical) gestoppt. Anschliessend wurde jede Probe durch eine 30µm Nylonmembran (DAKO CN 051) gefiltert. Verblieben nach dem Filtern noch Präparatereste, so wurden diese, entsprechende des modifizierten Hedley-Protokolls, nochmals für 45 Minuten mit 500µl Protease verdaut. Dieses Vorgehen führte zu besserer Qualität und höherer Quantität der Kerne.

Die Filtrate wurden für 5 Minuten mit 3000 rpm abzentrifugiert und danach mit 1xPBS resuspendiert. Pro Cytospin wurden 80µl der Kernsuspension in einer Shannon Cytospin®3-Zentrifuge für 5 Minuten mit 1700 rpm auf einen FISHER

Superfrost® Objektträger aufzentrifugiert und in einer aufsteigenden Ethanolreihe fixiert.

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Für die Multi-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wird zunächst reine DNA, in diesem Fall aus BAC-clones, isoliert. Es folgt der Schritt des „DNA-Labeling“ durch enzymatische Reaktionen wie z.B. die Nick-Translation.

Während der Nick-Translation führt die Exonuklease-Aktivität einer zugegebenen DNA-Polymerase zu Einzelstrangbrüchen in der Proben-DNA; zusätzlich wird ein Nukleotid an der Bruchstelle entfernt. Es entsteht eine Lücke (engl. = nick), in die ein Biotin- oder Digoxigenin-gebundenes Nukleotid durch die DNA-Polymerase eingesetzt wird. Der intakte DNA-Einzelstrang wird dabei als Matrize benutzt. Zu den fertigen Proben wird menschliche Cot-1-DNA gemischt. Sie enthält die repetitiven Sequenzen des Genoms, mit welchen sie nach Denaturieren des Gemisches Hybride bildet und so störende Hintergrundsignale verhindert, die durch unspezifisches Hybridisieren der FISH-Probe mit eben diesen repetitiven Sequenzen entstehen.

Zur eigentlichen Hybridisierung zwischen markierter DNA-Probe und Untersuchungsmaterial kommt es nach erfolgter Denaturierung innerhalb von 16-48 Stunden. Zuvor müssen alle DNA-Doppelstränge als Einzelstränge vorliegen.

Die Detektion der FISH-Probe erlaubt die Visualisierung der Ziel-DNA-Sequenzen. Bei indirekt markierten FISH-Proben wie sie in dieser Studie für die Gen-spezifischen Proben verwendet wurden, müssen die Reportermoleküle Biotin bzw. Digoxigenin mit Fluorochrom-gebundenem Avidin (Spektrum Grün) bzw. Anti-Digoxigenin (Spektrum Orange) detektiert werden. Die direkt markierten Zentromer-Proben bedurften keiner anschliessenden Detektion.

Probenvorbereitung

Die Auswahl der drei Probepanel basiert auf aktuellen CGH-Resultaten [Habermann 2003].

Für die DNA-Extraktion wurden folgende Bakterienklone aus der Human BAC Library des Rosswell Park Institutes (RPCI) 11 ausgewählt:

Probe panel	Zentromer-probe	Genprobe 1			Genprobe 2		
		Gen	Lokalisation	BAC	Gen	Lokalisation	BAC
I	CEP 18 (Aqua)	SMAD 7 (Grün)	18q21.1	748M14 716L10 15F12 756O18 8L20	EGFR (Orange)	7p12	805M4 775L16
II	CEP 17 (Aqua)	NCOA 3 (Grün)	20q12	456N23 109C3	TP 53 (Orange)	17p13.1	199F11 186B7 404G1
III	CEP 17 (Aqua)	MYC (Grün)	8q24.21	CTD 20256O22 (Invitrogen)	RAB 20 (Orange)	13q3.4	212E4 120J20

Tabelle 5: Detaillierte Aufstellung der Genproben für die einzelnen Probepanel

Alle BAC-clones wurden bei BACPAC Resources, Oakland, CA, USA geordert.

Die DNA-Extraktionen wurden mittels des QIAGEN® Plasmid Maxi Kit 25 nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach dem Anzüchten der BAC-clones in 3ml Starterkulturen (3ml autoklaviertes Standard Luria Bertani (LB) Medium und 3µl Chloramphenicol (20mg/ml)) wurden diese 1:500 verdünnt (+500µl Chloramphenicol) und für 12 bis 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Abzentrifugieren bei 4°C mit 7500 rpm für 15 Minuten wurden die Pellets zunächst mit 20ml Resuspensionspuffer aufgelöst, dann mit 20ml Lyse-Puffer für 5 Minuten bei Raumtemperatur und anschliessend mit 20ml eisgekühltem Neutralisationspuffer für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgten zwei Zentrifugationsschritte bei 4°C mit 12500 rpm für je 30 Minuten. Der Überstand wurde auf eine mit 10ml QBT-Puffer equilibrierte QIAGEN 500 Filtersäule gegeben. Nach zwei Waschschritten mit jeweils 30ml Waschpuffer folgte die Elution der DNA mit 5x 3ml QF-Puffer (65°C). Das Eluat wurde mit 10,5ml Isopropanol präzipitiert. Die Suspension wurde anschliessend bei 4°C mit 12500 rpm für 30 Minuten zentrifugiert, das DNA-Pellet mit 5ml 70% Ethanol gewaschen und nochmals bei 4°C mit 12500 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet luftgetrocknet und in Aqua destillata resuspendiert.

Die erzielte DNA-Konzentration wurde mit einem NanoDrop® ND-1000-Spektrophotometer gemessen. Für die anschliessende Nick-Translation der Proben war eine Konzentration von mindestens 30ng/µl erforderlich.

Nick-Translation

Die Nick-Translation ermöglicht eine simultane Fragmentierung und Fluoreszenzmarkierung der DNA. Hierfür wurden im Einzelnen 2µg der jeweiligen DNA-Probe, 10µl 10X Nick-Translationspuffer, 10µl dNTP (Böhringer, Mannheim), 10µl 0,1M Mercaptoethanol und je nach gewünschtem Fluoreszenzfarbstoff 4µl Biotin-16-dUTP (Spectrum green, Böhringer) bzw. 4µl Digoxigenin-11-dUTP (Spectrum Orange, Böhringer) mit Aqua dest. auf 94µl aufgefüllt und mit 2µl Polymerase (Kornberg, Böhringer Mannheim) + 4µl DNase I (1mg/ml) 1:1000 (Böhringer) bei 15°C für 1,5 Stunden im Wasserbad inkubiert.

Um die gewünschte Länge der DNA-Fragmente von 500-900bp überprüfen zu können, wurden 4µl der jeweiligen DNA-Probe mit 1µl Gelladepuffer (Quality Biological, USA) auf ein Agarosegel (1% Agarosegel in 1X TAE-Puffer) aufgetragen und bei 100V für 30-40 Minuten aufgetrennt. Als Grössenstandard diente der 100bp-Marker (GIBCO BRL®, USA) und der DNA/HindIII-Marker (GIBCO BRL®, USA). Das Gel wurde anschliessend mit Ethydiumbromid (Research Genetics) gefärbt und auf einem UV-Transluminator analysiert.

Für die Zusammenstellung der einzelnen Proben-Panels wurden von den entsprechenden Nick-translatierten DNA-Proben jeweils 20 - 40µl zusammen mit 30 - 50µl Cot-1-DNA und 1-2µl Lachssperma sowie Natrium-Acetat und 100% Ethanol bei -80°C für 30 min präzipitiert. Die präzipitierte DNA wurde danach bei 4°C mit 14000 rpm für 30 Minuten abzentrifugiert. Das gewonnene DNA-Pellet wurde getrocknet und mit 20µl deionisiertem Formamid (pH=7,0; Ambion, USA) bei 37°C für 30 Minuten aufgelöst. Mit zusätzlich 20µl Master Mix wurde die DNA für 5 Minuten bei 80°C denaturiert. Das Vortemperein geschah bei 37°C für 10 Minuten. Von der jeweiligen Zentromerprobe (CEP 18 Spectrum Aqua, Vysis für Probepanel 1, CEP 17, Spectrum Aqua, Vysis für Panel 2 und 3) wurde 1µl / 10µl DNA separat bei 80°C für 5 Minuten denaturiert bevor die vorgewärmte DNA-Probe dazugegeben wurde.

Hybridisierung

Die vorbereiteten Cytospin-Objektträger (s. Abschnitt 3.2.4) wurden für 5 Minuten in 2xSSC (Roche) bei Raumtemperatur equilibriert, mit 200µl Pepsin (Sigma

P6887) in 0,01M HCl bei 37°C inkubiert, zweimal für je 5 Minuten in 1xPBS gewaschen und in aufsteigender Ethanolreihe fixiert. Die Cytospins wurden mit 120µl 70% deionisiertem Formamid/ 2xSSC für 4 Minuten bei 80°C denaturiert und in einer eisgekühlten aufsteigenden Ethanolreihe dehydratisiert.

Anschliessend wurden 5µl der vorbereiteten Proben (DNA + CEP) auf jeden Objektträger pipettiert, mit Deckgläschen abgedeckt und mit Fixogum (Marabu) versiegelt. Über Nacht wurden die Slides in einer feuchten, lichtdichten Kammer bei 37°C hybridisiert.

Detektion

Nach abgeschlossener Hybridisierung wurden die Cytospin-Objektträger 3x5 Minuten in 50% Formamid/ 2X SSC (pH=7-7,5; 45°C) und anschliessend 3x5 Minuten in 0,1X SSC (60°C) gewaschen. Nach Equilibrierung in 4X SSC/ 0,1% Tween 20 (45°C) wurden die Cytospins für 30 Minuten bei 37°C mit 120µl Blockierungslösung (3% BSA/ 4X SSC/ 0,1% Tween 20) inkubiert.

Für die durch die Nick-Translation indirekt mit Biotin bzw. Digoxigenin versetzten Proben wurden folgende Antikörperschichten (jeweils 1:200 Verdünnung in in 1% BSA/ 4X SSC/ 0,1% Tween 20) angesetzt:

1.Schicht: Avidin-FITC (1:200) + Mouse-Anti-Digoxigenin (Sigma)

2.Schicht: Rabbit-Anti-Mouse-TRITC (Sigma)

Jede Antikörper-Schicht wurde separat für 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Zwischendurch und abschliessend wurden die Objektträger für 3x5 Minuten in 4X SSC/ 0,1% Tween 20 (45°C) gewaschen. Nach fünfminütiger Gegenfärbung mit DAPI, einem weiteren Waschschrift mit 2X SSC für 5 Minuten und Fixierung in einer aufsteigenden Ethanolreihe wurden die Slides in 35µl Antifade-Lösung eingedeckt.

Alle Aufnahmen der Fluoreszenz-in-situ hybridisierten Objektträger wurden mit einer CCD-Kamera und einem mit optischen Filtern für DAPI, Spectrum Aqua, Spectrum Green und Spectrum Orange (Chroma Technologies, Rockingham, VT, USA) ausgestatteten DM-RXA Fluoreszenz-Mikroskop (Leica, Wetzlar, 40x Immersionsobjektiv) aufgenommen. Für die Multifocus-Aufnahme der Spektren Aqua, Green und Orange wurde die Software Qfluoro (Leica, UK) verwendet.

Pro Patientenfall und Probe-Panel wurden 20 Aufnahmen gemacht, um für die Analyse der FISH-Signale 100-500 Zellkerne auszählen zu können.

Feulgen-Färbung und DNA-Zytometrie

Die Methode der Feulgen-Färbung basiert auf einer Reaktion von farblosem Schiff'schen Reagenz mit Aldehydgruppen, die zu violettgefärbten Verbindungen führt [Feulgen und Rosenberg 1924]. Um den DNA-Gehalt einer Zelle messen zu können, wird das stöchiometrische Bindungsverhalten der Schiff'schen Base an die Aldehydgruppen der Desoxyribose-Moleküle ausgenutzt: Saure Hydrolyse der DNA führt zur Spaltung der Doppelhelix sowie zur Entfernung der Purinbasen Adenin und Guanin, wodurch die Aldehydgruppen des DNA-Gerüsts zur Reaktion mit der Schiff'schen Base frei werden. Jedes Basenpaar liefert also eine Aldehydgruppe für die Feulgenreaktion, die sich daher sehr für die quantitative Erfassung des DNA-Gehalts einzelner Zellen eignet.

Das Schiff'sche Reagenz wurde mit 5g Pararosanilin (Basic Fuchsin, Aldrich) in 150ml HCl und 5g Kaliumpyrosulfit in 850ml Aqua dest. angesetzt. Anschliessend wurden 3g Aktivkohle zugefügt und die Lösung zweimal filtriert.

Die zu färbenden Cytospin-Slides wurden über Nacht in 4% Formaldehyd refixiert, anschliessend in Leitungswasser gespült und vor der Färbung für 60 Minuten in 5M HCl hydrolysiert. Die Färbung im Schiff'schen Reagenz wurde für 120 Minuten im Dunkeln durchgeführt. Das nach der Färbung nicht stöchiometrisch gebundene Reagenz wurde mit Leitungswasser und Natriumpyrosulfit-Lösung ausgewaschen bevor die Präparate in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydratisiert, im Xylobad gereinigt und mit Entellan eingedeckt wurden.

Die Messung des DNA-Gehalts der einzelnen Zellkerne auf den Objektträgern wurde anschliessend mit der Methode der statischen Bildanalyse durchgeführt. Dabei wird ein computergestützt bestimmter Extinktionskoeffizient der gefärbten Zellen in einen Ploidiegrad umgerechnet. Als Referenzzellen wurden für die interne Eichung jeweils 30 Lymphozyten des jeweiligen Präparates mit dem Ploidiegrad 2c (diploid) ausgewählt. Für jedes Präparat wurden dann ca. 200 Zellen selektiert gemessen, die in der histomorphologischen Begutachtung als Adenom- bzw. Karzinomzellen imponierten.

Errechnete DNA-Profile wurden entsprechend der Auer-Klassifikation eingeteilt:

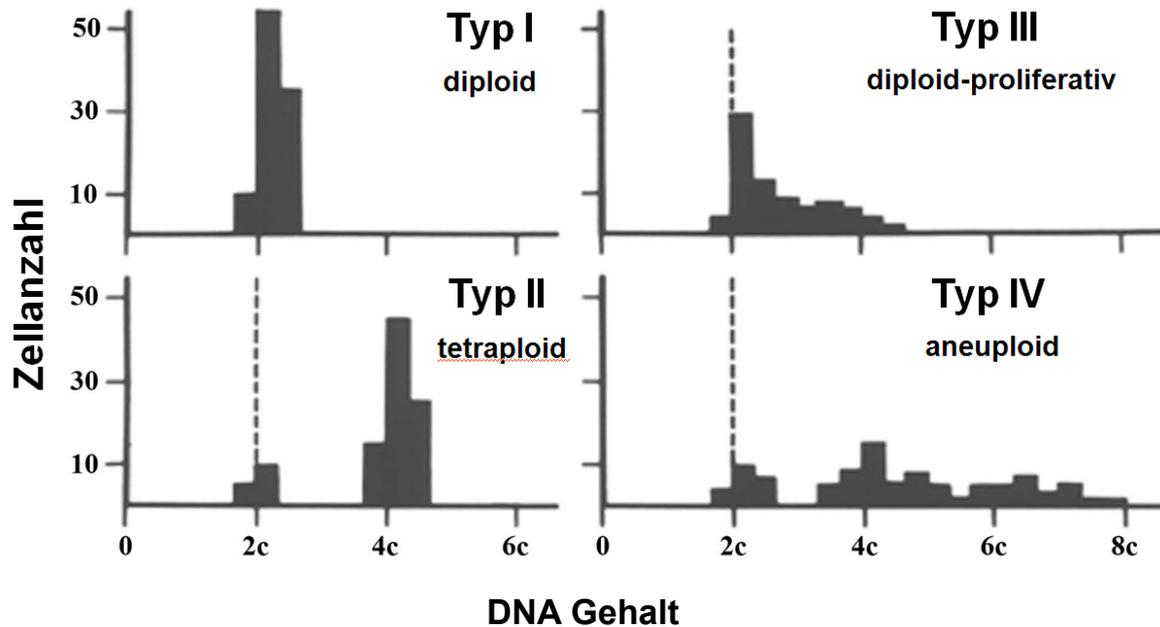


Abbildung 4: nach G. Auer 1980

- Typ I: Histogramme mit Einzelpeak bei 1,5c-2,5c (Zellzahl-Anteil mit DNA-Gehalt > 2,5c liegt unter 10%)
- Typ II: Histogramme mit Einzelpeak in der tetraploiden Region bei 3,5c-4,5c oder Peaks in diploider und tetraploider Region (Zellzahl-Anteil über 90%, Zellanteil mit DNA-Gehalt zwischen di- und tetraploid und > 4,5c liegt unter 10%)
- Typ III: hochproliferative Zellen mit DNA-Gehalt zwischen di- und tetraploid, aber nur wenige mit Peaks > 4,5c (Zellzahl-Anteil unter 5%)
- Typ I – III charakterisieren euploide Zellpopulationen.
- Typ IV: Aneuploide Zellverbände mit einem DNA-Gehalt von > 4,5c (Zellzahlanteil >5%)

Statistische Evaluationsmethoden

Die statistische Auswertung der Daten dieser Studie erfolgte durch Frau Dr. S. Freitag-Wolf aus dem Institut für Medizinische Informatik und Statistik der Universität Kiel.

Die explorative Datenanalyse wurde mittels Chi-Quadrat-Test, Wilcoxon-Rangsummentest und dem Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho bezüglich der 16 untersuchten Parameter, einschliesslich Multi-FISH-Genproben, Ploidie-

analyse und klinischer Daten, durchgeführt.

Überlebensraten der vier unterschiedlichen Patientengruppen wurden nach Kaplan-Meier beschrieben und mittels Logranktest verglichen.

Die Annahme einer Normalverteilung der genetischen Instabilitätsindices war nicht gefährdet (Shapiro-Wilks-Test), so dass die Entwicklung diploider über tetraploide hin zu aneuploiden Fällen mit einseitigem t-Test verglichen werden konnte. Alle anderen Tests waren zweiseitig.

Als statistisch signifikant galt jeweils eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$.

4 Ergebnisse

Kolorektale Adenome werden als prämaligene Läsionen verstanden. Dennoch entarten nicht alle Adenome und so war es Ziel der vorliegenden Studie herauszufinden, ob sich ein individuelles Entartungsrisiko vorhersagen lässt. Hierfür wurden mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung spezifische Gen-Sonden in Form von drei Panels für Chromosomenregionen angewandt, die für das kolorektale Karzinom spezifische numerische Aberrationen (Amplifikationen bzw. Deletionen) aufzeigen.

4.1 Panel 1 (CEP 18, *SMAD7*, *EGFR*)

Die Anzahl der Fluoreszenzsignale der Genmarker *SMAD7* und *EGFR* wurden ausgezählt und bezüglich der Zentromerprobe CEP18 analysiert. Für das Hybridisierungspanel 1 wurden insgesamt 12562 Zellkerne ausgezählt (4503 aus 18 Adenompräparaten der Gruppe C, 6090 aus 23 Adenompräparaten der Gruppe F, sowie zusätzlich 1969 Karzinomzellen).

Die Zentromerprobe CEP 18 hybridisiert auf das Chromosom 18 und wurde als Ploidiekontrolle in diesem Panel verwendet, um Aussagen über Genamplifikation bzw. -deletion von *SMAD7* und *EGFR* zu erlauben. So zeigte sich für Zellen mit genetischer Stabilität (Signalmuster 2/2/2) eine hochsignifikante Korrelation zwischen Signalgleichheit von CEP18 und *SMAD7* sowie CEP 18 und *EGFR* ($p < 0,01$). Dieses drückte sich auch in einem entsprechenden Ploidiegrad von 2c (diploid) in der DNA-Zytometrie aus. Im Gegensatz dazu konnten bei einem Zugewinn an *EGFR*-Signalen verglichen mit CEP 18-Signalen deutlich größere Zahlenwerte für die Stammzelllinie gemessen werden ($p = 0,019$).

Um einen näheren Zusammenhang zwischen Signalanzahl und Ploidiestatus zu evaluieren, wurde die Anzahl der unterschiedlichen Fluoreszenzmuster (Pattern) pro Präparat durch die Anzahl der ausgezählten Zellkerne dividiert und so ein Instabilitätsindex errechnet. Das Normalmuster (2/2/2) für jeweils zwei Signale der *SMAD7*-, *EGFR*- und Zentromerproben CEP18 wurde nicht mit eingeschlossen, sondern nur davon abweichende Muster betrachtet.

Die Höhe des Instabilitätsindex für Panel 1 gibt so die Abweichung von der genetischen Stabilität an. Für Adenompräparate der Gruppe B und E konnte ein signifikant höherer Index berechnet werden als für die Präparate ohne Adenom-

Rezidiv (Gruppe A+D; $p = 0,037$).

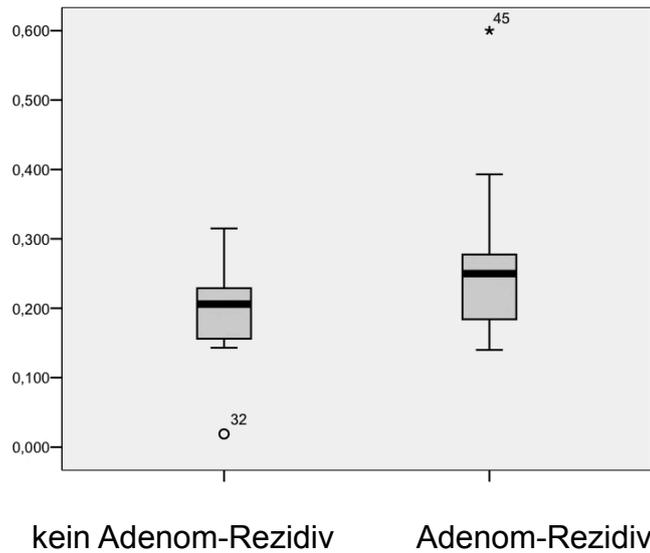


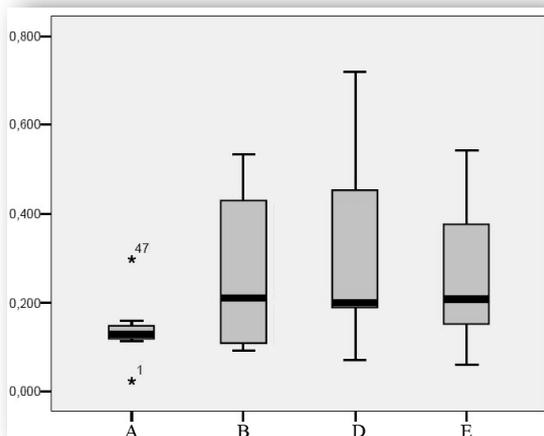
Abbildung 5: Instabilitätsindex Panel 1 in Abhängigkeit von evtl. vorhandenen Adenom-Rezidiven

4.2 Panel 2 (CEP 17, *NCOA3*, *p53*)

Für die Analyse des Hybridisierungspanel 2 wurden die Anzahl der Fluoreszenzsignale der Marker *NCOA3* und *p53* bezüglich der Zentromerprobe CEP17 ausgewertet. Es wurden insgesamt 6726 Zellkerne ausgezählt (2889 Kerne der Patientengruppe C, 3139 aus der Gruppe F, sowie zusätzlich 698 Karzinomzellen).

NCOA3-Signale

Amplifikationen des *NCOA3* Gens wurden häufiger in den Gruppen D und E mit synchronem Karzinom gefunden (26,9%) als in Gruppe A und B, die keine Karzinome aufwiesen (20,1%; $p = 0,058$; s. Abbildung 6).



- A: Patienten ohne Adenom-Rezidiv und ohne Karzinom
- B: Patienten mit Adenom-Rezidiv, ohne Karzinom
- D: Patienten ohne Adenom-Rezidiv, mit Karzinom
- E: Patienten mit Adenom-Rezidiv und Karzinom

Abb. 6: Häufigkeit von *NCOA3*-Amplifikationen je Patientengruppe

In den Karzinomen selbst fanden sich *NCOA3*-Amplifikationen in bis zu 33,4% der Zellen. Ebenfalls zeigte sich eine signifikante Anhäufung von *NCOA3*-Signalen in aneuploiden Zellen ($p = 0,04$; s. Abbildung 7); in diesen Fällen zeigten sich auch erhöhte Werte für die DNA-Stammlinie ($P=0,023$).

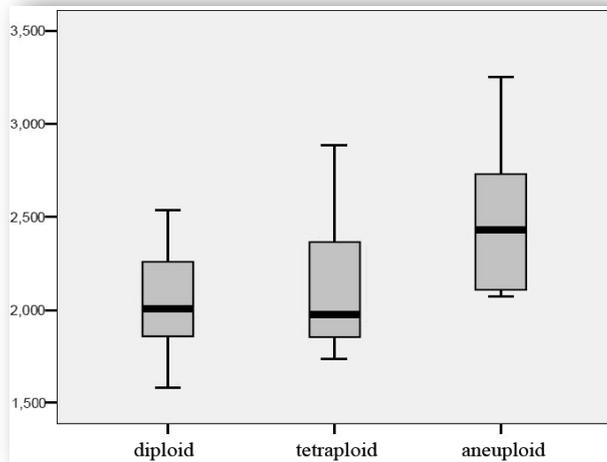


Abbildung 7: Häufigkeit von *NCOA3*-Amplifikationen in Abhängigkeit vom Ploidiegrad

Eine gleiche Anzahl an Signalen für CEP17 und *NCOA3* reflektierte genetische Stabilität. Patienten deren Proben diese Konstellation aufwiesen, zeigten eine deutlich längere Adenomrezidivfreie Zeit.

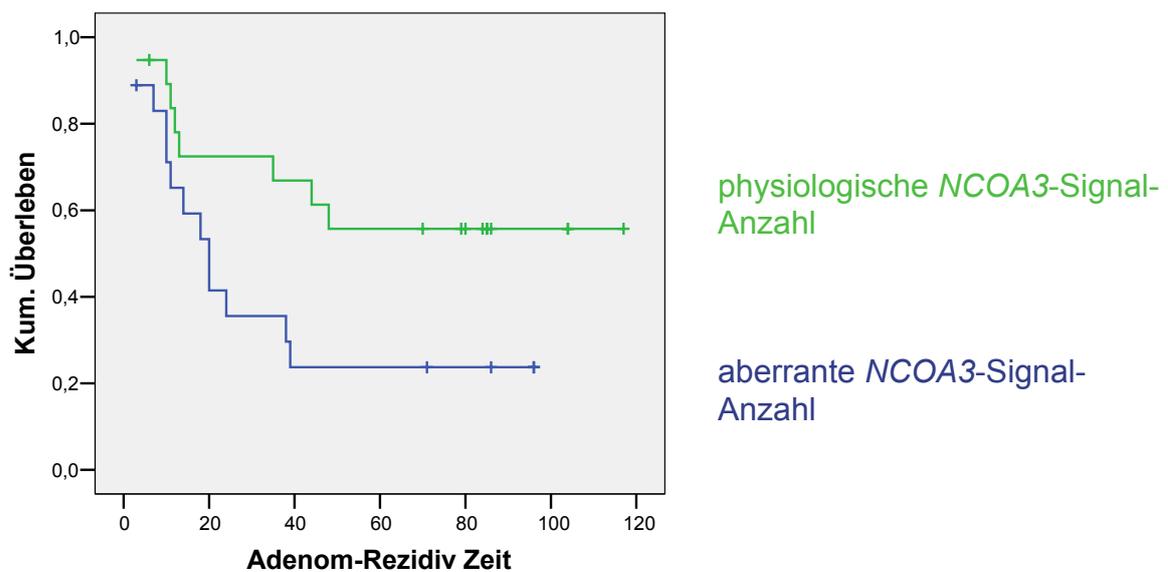


Abbildung 8: Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit von der Adenom-Rezidiv Zeit

p53-Signale

Genomische Stabilität zeigte sich signifikant häufiger in diploiden Adenomen ($p=0,04$); ein *p53*-Verlust trat hingegen häufiger in aneuploiden Zellen auf ($p=0,029$; s. Abb 9).

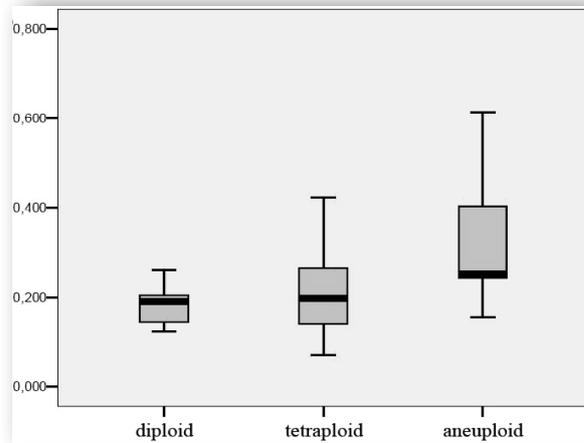


Abbildung 9: p53-Verlust in Abhängigkeit vom Ploidiegrad

Im Vergleich der Gruppen C und F zeigte sich ein signifikanter Allelverlust des Tumorsuppressorgens *p53* in der Patientengruppe mit synchronem Karzinom. Der Anteil des *p53*-Markers mit weniger als zwei Signalen pro Zellkern steigt in der Gruppe F auf 23,2% - in Gruppe C sind es 14,8% ($p=0,045$).

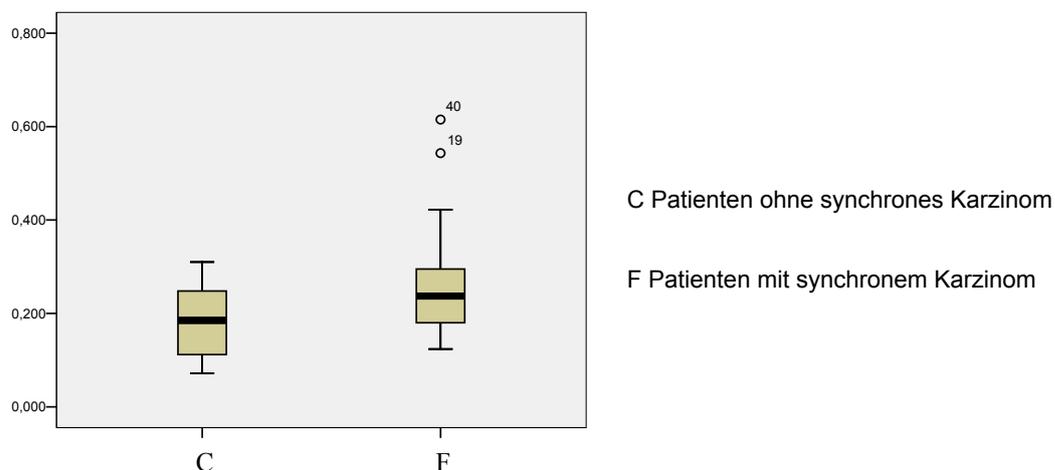


Abbildung 10: p53-Verlust korreliert mit dem Auftreten synchroner Karzinome

Eine Darstellung der Hybridisierungsergebnisse (Panel 2) euploider und aneuploider Adenome im Vergleich findet sich in der folgenden Abbildung 11, Teilbild A und C.

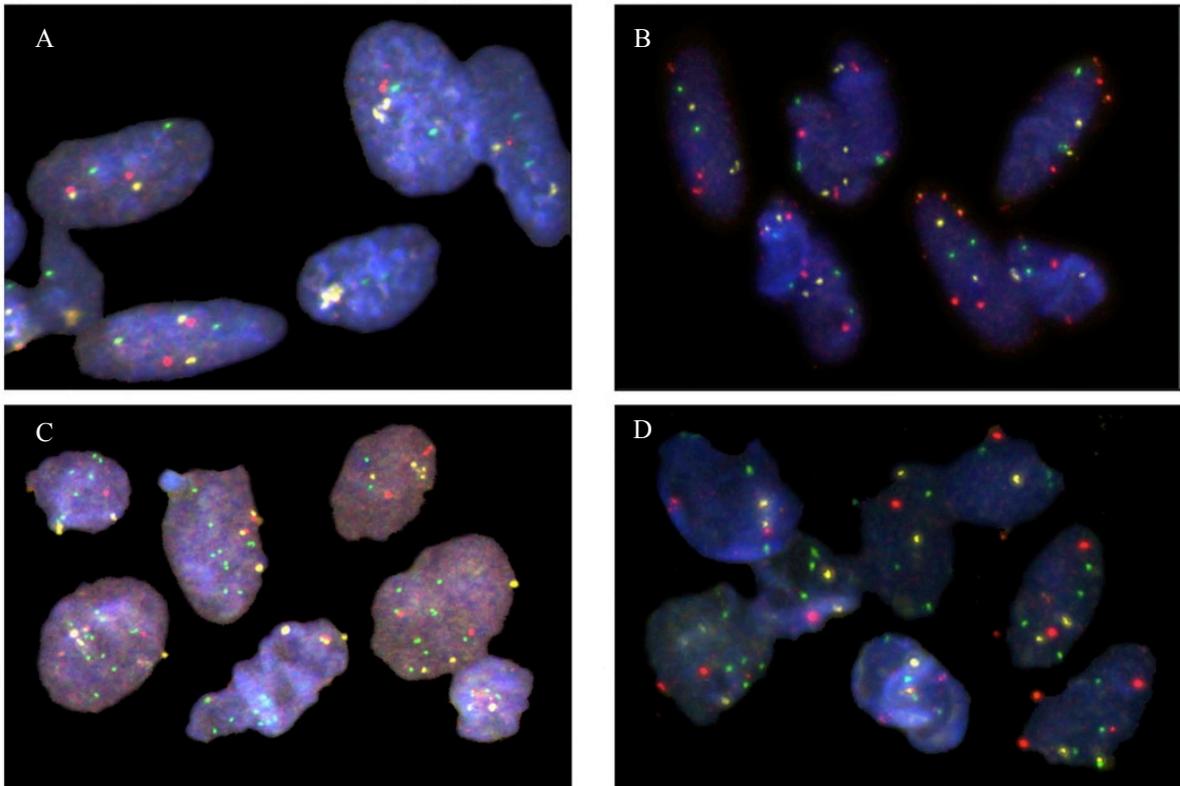


Abbildung 11: FISH euploider und aneuploider Adenome im Vergleich

Physiologische Signalanzahl der FISH-Proben aus Panel 2 an diploiden **A** bzw. aneuploiden **C** Adenomzellen: CEP 17 gelb, NCOA3 grün, p53 rot. Physiologische Signalanzahl der FISH-Proben aus Panel 3 an diploiden **B** bzw. aneuploiden **D** Adenomzellen: CEP 17 gelb, c-myc grün, RAB20 rot

4.3 Panel 3 (CEP 17, c-myc, RAB20)

10335 Zellkerne wurden für das Probepanel 3 ausgezählt (4230 aus Gruppe C, 4032 aus Gruppe F, sowie zusätzlich 2073 Karzinomzellen) und hinsichtlich der Signalanzahl für c-myc und RAB20 analysiert. Als Ploidiemarker fungierte die Zentromerprobe CEP17.

C-myc-Signale

Das Onkogen c-myc fand sich mit erhöhter Signalanzahl vor allem in aneuploiden Zellen ($p = 0,029$). Aufgeschlüsselt nach Patientengruppen fanden sich c-myc-Amplifikationen in 21,4% der Adenome von Patienten ohne synchrones Karzinom aber in 31,3% aller Adenome der Patienten mit Karzinom ($p = 0,256$).

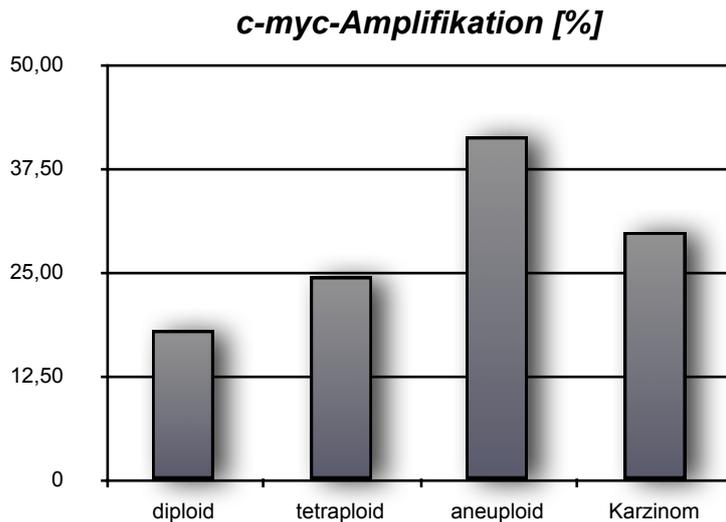


Abbildung 12: C-myc-Amplifikationen in Abhängigkeit vom Ploidiegrad in Adenomen und in Karzinomen

Im Hinblick auf den zweiten in diesem Probenpanel verwandten Genmarker zeigte sich eine gleichsinnige Tendenz der Signalanzahlen von *c-myc* und *RAB20* in allen untersuchten Patientengruppen ($p < 0,01$).

RAB20

RAB20-Amplifikationen korrelierten signifikant mit erhöhten Werten der DNA-Stammlinien ($p < 0,05$). Eine Darstellung der Hybridisierungsergebnisse (Panel 3) euploider und aneuploider Adenome im Vergleich findet sich in Abbildung 11 B & D auf Seite 34.

4.4 Vergleich von Adenomen und synchronen Karzinomen

Zwischen den Patientengruppen zeigte sich eine Zunahme von *SMAD7*-Kopienzahlen in der Karzinomgruppe (siehe Abbildung 13 Panel 1). *EGFR*-Amplifikationen unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Patientengruppen; sie traten durchschnittlich in 36,2% aller Adenome und in 44% aller Karzinompräparate auf. Die Tatsache, dass in über einem Drittel aller Adenome jedoch derartige Aberrationen gefunden wurden, verdeutlicht die Häufigkeit der *EGFR*-Amplifikationen in der frühen kolorektalen Karzinogenese (Abbildung 13 Panel 1).

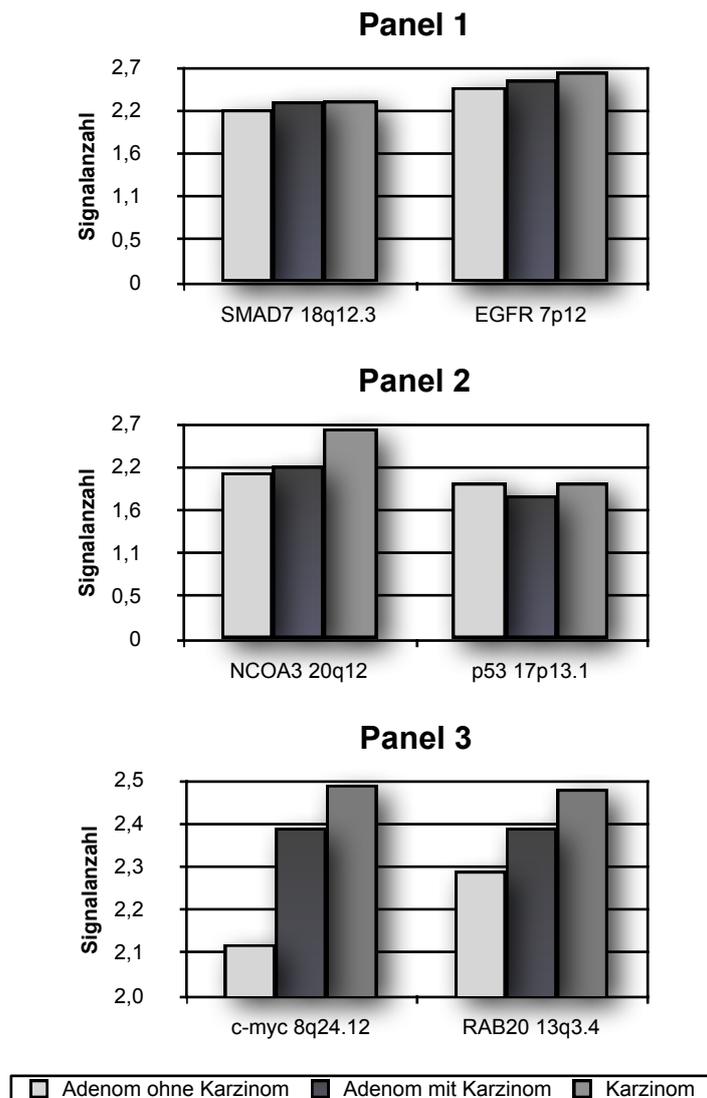


Abbildung 13: durchschnittliche Signalanzahl je Genprobe, Patientengruppe und Hybridisierungs-panel (ohne Normalmuster 2/2/2).

In der c-myc-Auswertung wurde ein Patient mit bis zu 30 Signalen pro Zelle aus dieser Übersicht ausgeschlossen.

Amplifikationen des Markers *NCOA3* wurden in 20,1% aller Adenome von Patienten ohne Karzinom, jedoch in 26,9% aller Adenompräparate von Patienten mit Karzinom gefunden und traten in den entsprechenden Karzinompräparaten in 33,4% auf ($p=0,12$ bzw. $p=0,278$). Durchschnittlich konnten 3,5 *NCOA3*-Kopien in den Karzinomzellen gezählt werden. Dies stellt die höchste numerische Aberration unter allen hier untersuchten Genproben dar (Abb. 13 Panel 2).

Verluste des Tumorsuppressorgens *p53* stiegen von 14,8% in Adenomen der Gruppe ohne Karzinom auf 23,2% in Adenomen der Patienten mit Karzinom an

($p=0,045$). Eine *p53*-Deletion war in den zugehörigen Karzinomzellen in 20,2% zu beobachten ($p=0,057$).

C-myc-Amplifikationen zeigten sich in 21,4% aller Adenome der Patientengruppe ohne synchrones Karzinom und in 31,3% aller Adenome der Gruppe mit synchronem Karzinom ($p=0,256$). In den untersuchten synchronen Karzinomen selbst fanden sich *c-myc*-Amplifikationen in 36,4% aller Zellen ($p=0,013$). Die durchschnittlichen *c-myc*-Signalanzahlen erzielten die zweithöchste numerische Aberration in der Karzinomgruppe (Abb. 13 Panel 3 Seite 36).

Bezüglich *RAB20*-Amplifikationen konnte zwar ein Trend aber keine Signifikanz zwischen den Patientengruppen gefunden werden: in 34,3% aller Adenome und in 41,4% der Karzinome wurden Amplifikationen gefunden (Abb. 13 Panel 3 Seite 36). Als Fallbeispiel sind die Marker *c-myc* und *RAB20* in Abbildung 14 im Anhang dargestellt.

4.5 Instabilitätsindices in Abhängigkeit vom Ploidiestatus

Zusätzlich zu den Korrelationen der einzelnen Genproben mit dem Ploidiestatus der Präparate wurde ebenfalls jeder genomische Instabilitätsindex (Berechnung siehe 4.2) in Abhängigkeit vom Ploidiegrad evaluiert.

Für alle drei Probenpanel zeigte sich ein ansteigender Instabilitätsindex bezüglich diploider, tetraploider und aneuploider Präparate (siehe Tabelle 6 und 7 im Anhang). Die größten Unterschiede zeigten sich beim Vergleich diploider bzw. tetraploider mit aneuploiden Fällen für Panel 2 (diploid versus aneuploid, $p=0,0105$; tetraploid versus aneuploid, $p=0,0145$) und Panel 3 (diploid versus aneuploid, $p=0,017$).

4.6 Panelübergreifende Korrelationen

Nach panelübergreifender Analyse zeigten sich folgende Korrelationen auf einem Signifikanzniveau von $p<0,05$:

C-myc-Amplifikationen korrelierten positiv mit Amplifikationen des Markers *RAB20*. Auch Zugewinne des *NCOA3*-Gens zeigten eine positive Korrelation sowohl mit *c-myc*- und *RAB20*-Amplifikationen als auch mit Zugewinnen des *EGFR*-Markers. Zusammenfassend ergab sich eine enge Korrelation derjenigen Markergene, deren zugehörige Chromosomenregionen durch Zugewinne und Amplifikationen in

kolorektalen Adenomen und Karzinomen gekennzeichnet sind (siehe Abbildung 3 im Anhang).

Eine Ausnahme stellt der Marker *SMAD7* auf Chromosom 18q21.1 dar. Üblicherweise zeigt diese Chromosomenregion Verluste in kolorektalen Karzinomen und - seltener- Adenomen. Die vorliegende Arbeit zeigte Zugewinne von *SMAD7* bei gleichzeitigen *NCOA3*-Amplifikationen ($p < 0,01$). Im Gegensatz dazu liessen sich Zusammenhänge zwischen *SMAD7*-Deletionen und *RAB20*-Amplifikationen einerseits sowie *p53*-Deletionen andererseits ($p < 0,01$) darstellen. Letzteres wird unterstützt durch die positive Korrelation der Signalanzahlen für *SMAD7* und *p53* ($p < 0,01$).

4.7 Analyse der klinischen Parameter

Korrelation der FISH-Signalanzahl mit der Größe der Adenome

Die Signalanzahl für *SMAD7* korrelierte signifikant mit der Grösse der untersuchten Adenome: mit zunehmendem Durchmesser stieg auch die *SMAD7*-Signalanzahl ($p = 0,017$). Die Adenomgröße korrelierte ebenfalls positiv mit dem Auftreten von Aneuploidie innerhalb des untersuchten Präparates ($p = 0,044$). *RAB20*-Amplifikationen wurden hingegen häufiger in kleinen Adenomen gefunden ($p < 0,01$). Für alle anderen Marker fanden sich keine signifikanten Zusammenhänge zur Größe der Adenome.

Analysen bezüglich des histologischen Typs der Adenome

Die Einzelanalyse der Marker aus dem zweiten Probepanel (CEP 17, *NCOA3*, *p53*) ergab signifikante Zusammenhänge zwischen *NCOA3*-Amplifikationen und histologischem Wachstumstyp der untersuchten Adenome. Da von den villösen Adenomtypen, die biologisch über das höchste Malignitätspotential verfügen, nur zwei Präparate in die Studie eingeschlossen werden konnten, wurden diese mit den tubulo-villösen Adenomen zusammengefasst und den tubulären Adenomen gegenübergestellt. Es zeigte sich ein signifikant häufigeres Auftreten von *NCOA3*-Amplifikationen in tubulo-villösen und villösen Adenomen als in tubulären Adenomen ($p = 0,024$; Abbildung 15 im Anhang).

Wie in Abschnitt 4.2 beschrieben, wurde auch für das Panel 2 ein Instabilitätsindex errechnet. Genetische Stabilität zeigt sich in Ploidieanalysen durch das Auftreten

von diploiden oder tetraploiden Adenomen mit Stammlinien von 2c bzw. 4c. Diese Adenome wurden in der vorliegenden Analyse als euploide Präparate zusammengefasst und den aneuploiden gegenübergestellt. Niedrige Werte des Instabilitätsindex korrelierten mit dem Vorkommen euploider Adenome, während hohe Werte in diesem Index mit aneuploiden Adenomen einhergingen ($p=0,04$).

Analyse bezüglich des Dysplasiegrades

Bei Sortierung der untersuchten Präparate nach ihrem Dysplasiegrad zeigten sich Unterschiede im Ausmaß der *RAB20*-Amplifikationen zwischen den einzelnen Dysplasiegraden (siehe Abbildung 16 im Anhang): mittelgradig dysplastische Adenome wiesen die meisten Amplifikationen auf (36,81%). Zusammen mit den hochgradig dysplastischen Adenomen (35,16% *RAB20*-Amplifikationen) unterschieden sie sich damit deutlich von geringgradig dysplastischen Adenomen (16,61%, $p=0,002$). Weiterhin grenzen sie sich signifikant von Carcinoma in situ-Präparaten ab, deren Zellen eine Amplifikationsrate von 21,41% zeigten ($p=0,009$).

Andere Marker erzielten keine signifikanten Ergebnisse bezüglich des Dysplasiegrades.

Genetische Stabilität in Abhängigkeit vom histologischen Wachstumstyp der Adenome

Wie unter 4.2 beschrieben, wurde ebenfalls für das Panel 3 der vorliegenden Studie ein Instabilitätsindex berechnet. Es zeigte sich ein signifikant häufigeres Auftreten von genetisch stabilen Zellen in tubulären Adenomen ($p=0,015$). Genetisch instabile Zellen waren dagegen häufiger in tubulo-villösen und villösen Adenomen zu finden (siehe Abbildung 17 im Anhang).

Assoziation zwischen Dysplasiegrad und histologischem Typ der Adenome

Unter den für diese Studie ausgewählten Präparaten zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen Dysplasiegrad der Adenome einerseits und ihrem histologischen Wachstumstyp andererseits ($p=0,004$).

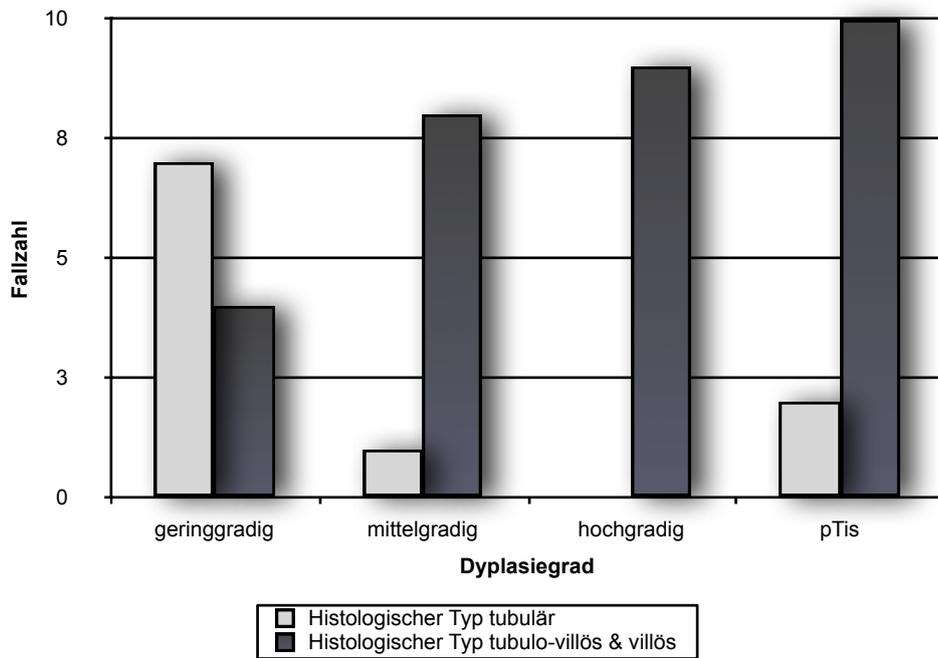


Abbildung 18: Dysplasiegrad in Abhängigkeit vom histologischen Wachstumstyp

70% der tubulären Adenome zeigten einen geringen Dysplasiegrad, wohingegen 54,8% der tubulo-villösen und villösen Adenome mittelgradige bis hochgradige Dysplasien präsentierten (versus 10% bei den tubulären Adenomen). Mit 32,3% aller untersuchten Präparate wiesen die tubulo-villösen und villösen Adenome häufiger Anteile von in-situ-Karzinomen auf. Bei den tubulären Adenomen waren es hingegen nur 20%.

Dysplasiegrad und Ploidiestatus in Abhängigkeit von der anatomischen Lokalisation

Es wurden in dieser Studie Adenome aus drei Abschnitten des Kolorektums analysiert:

1. Coecum bis einschliesslich Colon transversum
2. linke Flexur bis einschliesslich Colon sigmoideum
3. Rektum

Diese differenzierte Unterteilung ergab keine Unterschiede bezüglich der Dysplasiegrade. Wurde allerdings eine Unterteilung in die klinisch relevanten Gruppen Kolon- und Rektumkarzinome vorgenommen, zeigten sich signifikante Unterschiede ($p=0,026$):

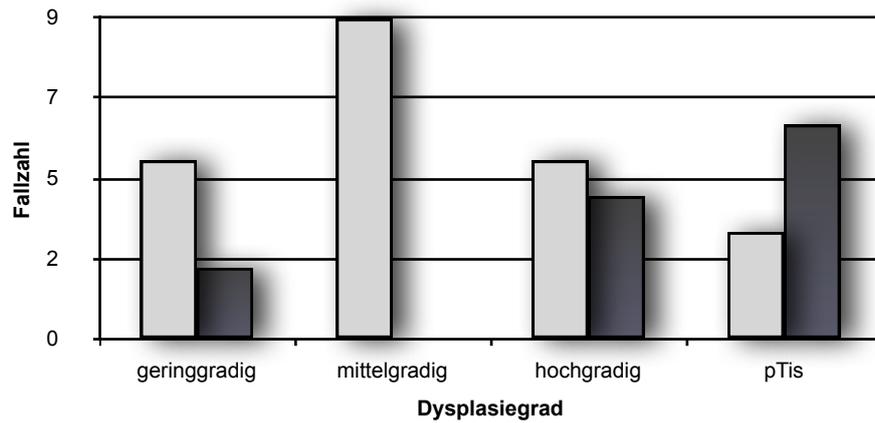


Abbildung 19 a: Dysplasiegrad in Abhängigkeit der anatomischen Lokalisation

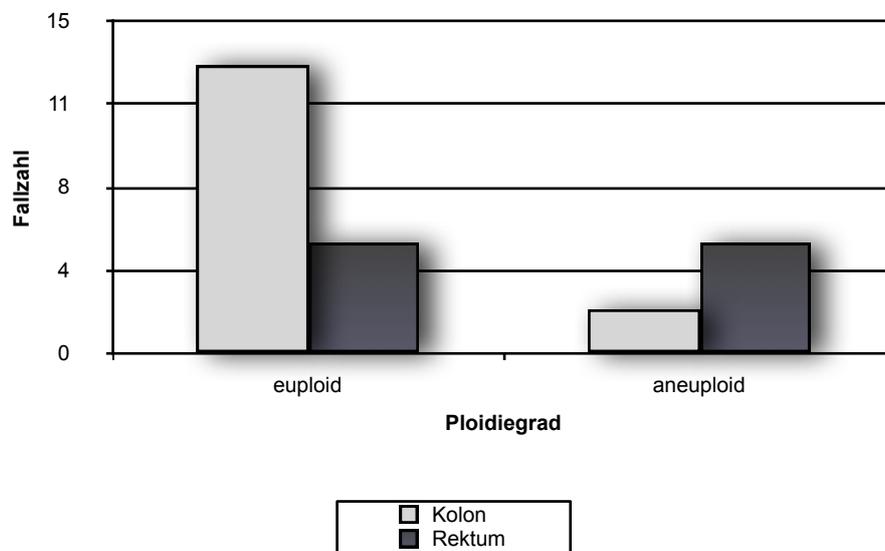


Abbildung 19 b: Euploidie bzw. Aneuploidie in Abhängigkeit von der anatomischen Lokalisation

Hochgradig entartete Adenome und in-situ-Karzinome fanden sich häufiger im Rektum, wohingegen Adenome mit geringeren Dysplasiegraden häufiger im Kolon zu finden sind. Gleichermäßen wurden aneuploide Adenome häufiger im Rektum als im Kolon gefunden ($p=0,045$).

Cyclin-A- und Laminin-5-Expressionsanalyse bezüglich des Dysplasiegrades und des histologischen Wachstumstyps der Adenome

Die aus einer vorangegangenen Untersuchung der eigenen Arbeitsgruppe erhaltenen Ergebnisse für die Expressionsmuster von Cyclin-A und Laminin-5 wurden mit dem Dysplasiegrad der einzelnen Adenome korreliert. Es zeigt sich eine signifikante Hochregulation der Expression von Cyclin-A und Laminin-5 vor allem in hochgradig dysplastischen Adenomen ($p=0,001$) und Carcinoma-in-situ-Präparaten ($p=0,002$). Eine geringe bis moderate Laminin-5-Expression (Immunreaktivität in 1-50% aller Zellen) konnte signifikant häufiger in tubulo-villösen und villösen als in tubulären Adenomen gefunden werden (87,1% vs. 40%, $p=0,01$). Eine starke Laminin-5 Immunreaktion zeigt sich hingegen ausschliesslich in tubulo-villösen oder villösen Adenomen (siehe Abbildung 20 im Anhang). Zwischen den Patientengruppen mit bzw. ohne synchrones Karzinom konnte kein Unterschied bezüglich der Laminin-5- und Cyclin A-Immunreaktion gefunden werden.

5 Diskussion

Die kolorektale Karzinogenese wird bestimmt durch Akkumulation chromosomaler Imbalancen und Aneuploidie in einem Mehrstufenprozess. Um derartige chromosomale Veränderungen als Muster aufzudecken und die Dynamik genomischer Aberrationen zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Studie FISH-Proben ausgewählt, die auf aberranten Chromosomen lokalisiert sind (*EGFR*, *c-myc*, *p53*, *SMAD7*, *NCOA3*, *RAB20*) und daher für die kolorektale Karzinogenese von besonderer Bedeutung zu sein scheinen. Aberrationen der entsprechenden Kopienanzahlen wurden mittels Multi-Colour-FISH an Interphasenuclei von 41 Adenompräparaten und sechs synchronen Karzinomen untersucht.

5.1 Panel 1 (CEP 18, *SMAD 7*, *EGFR*)

SMAD7 ist ein inhibitorisches SMAD-Protein, das vor allem die Tumorsuppressorfunktion des Zytokins TGF- β hemmt. Eine Überexpression von *SMAD7*, auch verursacht durch eine Genamplifikation, kann somit zu einem unregelmäßigen Zellwachstum und vermehrter Proliferation führen, die nicht mehr durch TGF- β -induzierten G1-Arrest bzw. Apoptose reguliert werden kann [Boulay 2003].

Im untersuchten Kollektiv der vorliegenden Studie konnten in großen Adenomen vermehrt *SMAD7*-Amplifikationen gefunden werden. *SMAD7* scheint somit möglicherweise für die Proliferation bzw. das Größenwachstum von Adenomen von Bedeutung zu sein. Da die zunehmende Größe eines kolorektalen Adenoms einen Risikofaktor für die Entwicklung eines invasiven Karzinoms darstellt, könnte *SMAD7* einen wichtigen Marker für die individuelle Risikoabschätzung darstellen. Ähnlich der bekannten Verluste des Tumorsuppressorgens *p53* im Verlaufe einer malignen Transformation, zeigten sich aber auch Deletionstendenzen, die das *SMAD7*-Gen betrafen.

Boulay und Mitarbeiter konnten zu diesen gegensätzlichen Tendenzen in einer Studie zeigen, dass *SMAD7* in 48% der untersuchten kolorektalen Tumoren Deletionen aufweist, überraschenderweise aber in 10% Amplifikationen gefunden wurden (Vergleichsmarker in 4-7%) [Boulay 2001]. In einer weiteren Studie konnten Boulay et al. zeigen, dass die bekannten Deletionen der Chromosomenregion 18q21 vor allem die Gene *SMAD2* und *SMAD4* betrifft, sich für das inhibitorische *SMAD7* aber sogar eine „Dosis-Wirkungs-Beziehung“ bezüglich

eines schlechteren Outcomes bei Amplifikation herstellen lässt [Boulay 2003]. Während die Einzelanalyse der Aberrationen von *SMAD7* und *EGFR* keine Unterschiede zwischen Adenomen ohne und mit synchronem Karzinom aufzeigen konnte, wurden durch die Berechnung des Instabilitätsindex Gegensätze deutlich: Patienten mit synchronen kolorektalen Karzinomen zeigten eine signifikant erhöhte genomische Instabilität.

Die Aktivierung des Transmembranproteins EGFR führt über die intrinsische Tyrosin-Kinase-Aktivität zu Zellproliferation [Grünwald 2003]. Überexpression von *EGFR* resultiert in einer Resistenz der Zelle gegenüber regulären Apoptose-signalen und ermöglicht daher eine gesteigerte Proliferation bzw. Wachstum, welches einen elementaren Bestandteil kolorektaler Karzinogenese darstellt [Grünwald 2003, Roberts 2002]. Die hier gezeigten *EGFR*-Amplifikationen deuten somit auf Zellen mit erhöhtem Wachstumspotential hin. Interessanterweise waren diese Amplifikationen mit Deletionen von *SMAD7* verknüpft.

5.2 Panel 2 (CEP 17, *NCOA3*, *p53*)

In der vorliegenden Studie unterschieden sich die Patientengruppen mit bzw. ohne synchrones Karzinom deutlich in ihren genomischen Instabilitätsindices voneinander. Aberrationen der Marker *NCOA3* und *p53* korrelierten mit erhöhten DNA-Stammlinien.

NCOA3

Mit *NCOA3* wurde ein Genmarker untersucht, dessen Chromosomenlokalisierung die Region mit den häufigsten Amplifikationen in CGH-Studien an sporadischen kolorektalen Karzinomen darstellt [Ried 1996]. Bisher sind keine FISH-Untersuchungen an prä-malignen Läsionen des Kolorektums für *NCOA3* bekannt. In Studien an kolorektalen Karzinomen zeigten sich in 10% [Xie 2005] bzw. in 13% [Zeng 2005] der Karzinome eine Amplifikation des *NCOA3*-Gens.

Sakakura et al. [Sakakura 2000] konnten in einer FISH-Untersuchung an Magen-Karzinomen hochgradige *NCOA3*-Amplifikationen (mindestens sechs Kopien) in 7% und geringgradige Zugewinne (weniger als sechs Kopien) des Proteins in 33% ihrer Proben nachweisen. Ausserdem zeigten sie, dass in allen Fällen eine Überexpression des *NCOA3*-Genprodukts vorlag. Das Auftreten der *NCOA3*-

Amplifikationen korrelierte mit dem Vorhandensein von Lymphknoten- und Lebermetastasen sowie einer insgesamt schlechteren Prognose.

In der vorliegenden Studie traten *NCOA3*-Amplifikationen in 57,9% der Adenomträger (Gruppe B und D) auf, die ein Adenomrezidiv entwickelten. Patienten ohne Adenomrezidive zeigten nur in 42,1% der Adenomzellen eine *NCOA3*-Amplifikation. Bezüglich des Vorhandenseins eines synchronen Karzinoms unterschieden sich die Patientengruppen ebenfalls deutlich: in Adenomen von Patienten ohne Karzinom fanden sich *NCOA3*-Amplifikationen in 20,1%, in Adenomen von Karzinompatienten hingegen in 26,9% und in den korrespondierenden Karziomen bis zu 33,4%. Fünf der sechs Karzinompräparate zeigten ausserdem Lymphknotenmetastasen.

Henke et al konnte 2004 in einer Studie an Pankreas-Karzinom-Präparaten zeigen, dass eine Amplifikation des *NCOA3*-Gens ein frühes Ereignis im Rahmen der Karzinogenese darstellt, da diese Aberration auch schon in Vorläuferstadien des Pankreas-Karzinoms gefunden wurden.[Henke 2004] Die vorliegende Studie zeigt das Auftreten von *NCOA3*-Zugewinnen ebenfalls schon auf der Stufe von prämaligen Läsionen und lässt annehmen, dass diese Amplifikation durch eine gesteigerte Zellproliferation zur Adenomrezidivbildung beiträgt.

Das prognostische Potential dieses Markers lässt die Adenom-Rezidiv-Zeitanalyse erkennen: Patienten mit physiologischen *NCOA3*-Gen-Kopienzahlen zeigten eine signifikant längere Zeitspanne bis zum Auftreten eines Adenomrezidivs als Patienten, in deren Adenomen aberrante *NCOA3*-Signale gefunden wurden.

Die Korrelation von *NCOA3* mit den Markern *RAB20*, *EGFR* und *c-myc* weist auf eine gewichtige Rolle des *NCOA3*-Gens im Rahmen der kolorektalen Karzinogenese hin. Die detektierten Amplifikationen vor allem in aneuploiden Zellen sind in ihrem Ausmaß vergleichbar mit denen des Onkogens *c-myc* und des Wachstumsfaktorrezeptors *EGFR*.

NCOA3-Amplifikationen könnten somit helfen, das individuelle Adenom-Rezidiv-Risiko besser abschätzen zu können.

p53

Die Analyse der *p53*-Fluoreszenzsignale reflektiert den Funktionsverlust dieses Tumorsuppressors. Durch Deletion dieses Gens besteht im Fall des *p53* kein

ausreichender Schutz mehr vor DNA-Schäden. Durch Fehlen von Reparationsmechanismen kommt es so frühzeitig zur Entartung der betroffenen Zellen.

Dies spiegelt sich deutlich in der Betrachtung des Ploidiegrades wider: je mehr ein Zellverband von *p53*-Deletionen betroffen ist, umso mehr besteht die Tendenz zur Aneuploidie. Bei Risio et al. zeigten 15% der untersuchten Frühkarzinome und 60% der fortgeschrittenen Tumoren einen *p53*-Verlust [Risio 2003]. In der hier durchgeführten Untersuchung finden sich bis zu über 23% *p53*-Verluste bereits in Adenomzellen. Gemäß des Auftretens von *p53*-Deletionen bereits in Adenomen, scheinen diese auch den Entwicklungsschritt vom Adenom zum Karzinom zu katalysieren (Abb. 13 Panel 2, Seite 41).

Somit bestätigt die vorliegende Studie die Schlüsselrolle des *p53* für die kolorektale Karzinogenese und zeigt darüber hinaus auch die Eignung, diesen als Fluoreszenzmarker für genetische Instabilität verwenden zu können.

5.3 Panel 3 (CEP 17, *c-myc*, *RAB20*)

C-myc

Entsprechend der Onkogen-Funktion des *c-myc*-Proteins war zu vermuten, dass sich in genetisch instabilen Zellverbänden, z.B. in aneuploiden Adenomen, möglicherweise Amplifikationen dieser Region in der FISH-Untersuchung zeigen. Dies war bei 41,34% der Adenomzellen mit einem Ploidiegrad größer als 4c der Fall; wohingegen in diploiden Zellkernen nur 18,02% Amplifikationen und in tetraploiden Zellkernen 24,49% *c-myc*-Zugewinne gefunden wurden. Patienten mit synchronem Karzinom zeigten deutlich häufiger einen Zugewinn des Markers *c-myc* in ihren Adenomzellen.

Damit scheint sich *c-myc* nicht nur als Marker zu eignen, um das lokale Metastasierungspotential eines Tumors zu prognostizieren (siehe unter 1.8.1), sondern ermöglicht auch die Abschätzung der Gefahr einer malignen Transformation in prämaligen Läsionen. Für das hepatozelluläre Karzinom (HCC) haben Wang et al *c-myc* sowie *NCOA3* als Marker für eine schlechte Prognose propagiert [Wang 2002]. In ihrer Tissue-Microarray- und FISH-Studie konnten sie zeigen, dass *c-myc*- und *NCOA3*-Amplifikationen vor allem bei multiplen, rezidivierenden und metastasierenden Karzinomen mit schlechter Prognose auftraten.

RAB20

Über die Funktion der RAS-GTPase RAB20 ist wenig in Bezug auf die kolorektale Karzinogenese bekannt. Das Protein spielt vor allem beim endozytotischen Vesikeltransport eine Rolle, ist aber bisher nicht in Studien an Neoplasien untersucht worden. In der vorliegenden Arbeit zeigten sich signifikant mehr *RAB20*-Amplifikationen in mittelgradig dysplastischen Adenomen im Vergleich zu hoch- oder geringgradigen Dysplasien. Insgesamt fanden sich in 34,2% aller untersuchter Adenomzellen *RAB20*-Amplifikationen, was vergleichbar ist mit der detektierten Häufigkeit an *EGFR*-Amplifikationen, die mit 36,2% den Höchstwert in dieser Studie darstellen.

Die Beobachtung, dass in mittelgradig dysplastischen Adenomzellen in mehr als einem Drittel *RAB20* amplifiziert vorliegt, könnte auf die Bedeutung eines gesteigerten intrazellulären Recyclingvorgangs für z.B. Wachstumsfaktor-Rezeptoren im Bezug auf die erhöhte Zellproliferation und Desintegration bei der Entwicklung eines hochgradig dysplastischen Adenoms hinweisen. Damit wäre die *RAB20*-Amplifikation als besonders frühes Ereignis in der Adenom-Karzinom-Sequenz zu werten.

Auffällig wenig zeigten sich Amplifikationen in den Carcinoma in situ-Präparaten. Sie stellen histopathologisch den Übergang vom benignen ins maligne Wachstum dar, da sie trotz ihrer hochgradigen Gewebeveränderungen ihre Basalmembran noch nicht überschritten haben, es also noch kein invasives Wachstum in benachbarte Strukturen gibt. Für diesen bedeutsamen Schritt in der Karzinogenese, das Durchbrechen der Basalmembran per se, scheint eine Wachstums- und Zellproliferationsaktivierung durch das RAB20-Protein daher nur von untergeordneter Wichtigkeit zu sein. Andererseits mag die kleine Fallzahl gerade dieser Gruppe (n=11) Carcinoma in situ mit RAB 20-Amplifikationen unterrepräsentieren.

5.4 Cyclin-A und Laminin-5

Mit Cyclin-A wurde ein Protein untersucht, welches im Zellzyklus die Mitosephase initiiert [Sherr 1993]. Somit werden durch eine positive Immunreaktion Zellen angezeigt, die den Zellzyklus durchlaufen und für die Proliferation von entscheidender Bedeutung sind [Zindy et al 1992]. Laminin-5 hingegen ist ein

Bestandteil der Basalmembran. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen selbst Laminin-5 produzieren können, um somit besser an die Basalmembran zu binden und sie dann durchdringen zu können [Santamato 2011]. Damit kann eine positive Laminin-5-Immunreaktion auf ein erhöhtes Invasionspotential hinweisen.

Eine gesteigerte Immunreaktivität für Cyclin A und Laminin-5 konnte in dieser Arbeit hauptsächlich in hochgradig dysplastischen Adenomen und Carcinoma-in-situ-Präparaten gefunden werden.

Li et al. beschrieben ebenfalls eine ansteigende Expression von Cyclin-A vom normalen Gewebe über die Hyperplasie und das Adenom hin zum Karzinom. Ausserdem konnte dieselbe Arbeitsgruppe einen höheren Expressionsgrad bei schweren als bei mittel- oder geringgradigen Dysplasien nachweisen [Li 2002]. Zusätzlich wurde eine Cyclin-A-Überexpression als signifikanter Marker für eine ungünstige Prognose beschrieben [Nozoe 2004].

Veränderungen der Laminin-5-Struktur, speziell der Gamma-2-Kette, wurden bereits im Verlauf der Adenom-Karzinom-Sequenz beschrieben [Richter 2005]. Dabei konnten bereits bei geringgradig dysplastischen Adenomen zwei Phänomene gefunden werden. Zum einen trat ein Lokalisationswechsel von der luminalen Seite des Adenoms hin zu seiner Basis auf, zum anderen zeigte sich ein Funktionswechsel vom sogenannten Ankerprotein zum Migrationsfaktor. Richter et al konnten daraufhin Adenome mit unterschiedlich hohem Invasionspotential voneinander unterscheiden [Richter 2005].

Diese Studie beschränkte sich auf die Auswertung der Expression von Laminin-5, unabhängig von der Lokalisation und konnte ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Dysplasiegraden der untersuchten Adenome aufzeigen, womit das maligne Potential dieser Neoplasien differenzierter definiert werden konnte. Ausserdem fand sich eine Korrelation zwischen erhöhter Laminin-5-Expression und einem villösen Wachstumsmuster.

Die hier vorgelegten Ergebnisse verdeutlichen den Zusammenhang zwischen gesteigerter Cyclin A- und Laminin-5-Immunreaktivität mit deutlich erhöhter Proliferationstendenz bzw. erhöhtem Malignitätspotential. Jedoch konnten keine Unterschiede zwischen den Patienten mit oder ohne synchrones Karzinom gefunden werden.

5.5 Fazit

Eine zunehmende Adenomgröße, eine villöse Histologie und hochgradige Dysplasien der hier untersuchten Adenome korrelierten mit erhöhten DNA-Stammlinien, Amplifikationen von *EGFR*, *c-myc*, *NCOA3* und *RAB20* sowie mit einer zunehmenden genomischen Instabilität gekennzeichnet durch hohe Instabilitätsindices für Panel 3. Die histopathologischen Klassifikationen allein zeigten hierbei kein prognostisches Potential für die Risikoabschätzung eines Adenomrezidivs und/ oder eines drohenden bzw. synchronen Karzinoms.

Die Ploidie-Analyse als alleiniges Messinstrument für chromosomale Instabilität ist insofern nicht uneingeschränkt anwendbar, da sich beispielsweise durch balancierte Translokationen falsch negative Ergebnisse erzielen lassen.

Amplifikationen von *EGFR*, *c-myc*, *NCOA3* und *RAB20* haben in dem untersuchten Kollektiv auf ein erhöhtes Risiko für Adenomrezidive und das Vorhandensein synchroner Karzinome hingewiesen. Die Detektion dieser Aberrationen mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung könnte somit zusätzlich zur histopathologischen Routinebeurteilung zur individuellen Risikoabschätzung beitragen und sollten in weiteren, prospektiven Studien validiert werden.

5.6 Ausblick

Etwa 80% aller kolorektalen Karzinome entstehen sporadisch entsprechend der Adenom-Karzinom-Sequenz [Hauser 2004]. Hierbei entwickeln sich aus den adenomatös veränderten Epithelien über Dysplasien invasive Karzinome. Werden Adenome des Kolorektums frühzeitig erkannt und entfernt, so liegt die Heilungschance bei über 90% [Hauser 2004].

Das derzeit durchgeführte Screeningprogramm umfasst einen Test auf okkultes Blut im Stuhl (FOBT - Haemoccult®) sowie eine Koloskopie, die für Patienten ohne Risikoanamnese aber erst ab dem 50. Lebensjahr empfohlen wird. Fünf bis zehn Prozent der Bevölkerung weisen aber schon ab dem 40. Lebensjahr kolorektale Adenome auf.

Diese Tatsache zusammen mit der begrenzten prognostischen Aussagekraft aller Standarduntersuchungsverfahren und der histopathologischen Befundung [Burgart 2002], sowie der Tatsache, dass kleinere Adenome (< 10mm) koloskopisch in 15-20% der Fälle übersehen werden [Menardo 2005] und Karzinome in 2-6%

unentdeckt bleiben können [Bressler 2007], machen die Notwendigkeit zusätzlicher objektiver Marker offensichtlich.

Die in der vorliegenden Arbeit als signifikant ausgewerteten Genmarker können als Risikoparameter sowohl zur Diskriminierung von Adenomen ohne bzw. mit synchronem Karzinom (*p53*), als auch zur Risikostratifizierung drohender Adenomrezidive (*NCOA3*) und konsekutiver Karzinomentwicklung (*SMAD7*, *EGFR*, *c-myc*, *RAB20*) gewertet werden. Sie können zusammengefasst in einem multi-FISH-Probepanel an klinischem Material eingesetzt werden und so helfen, die histopathologische Begutachtung in ihrer prognostischen Aussagekraft zu verstärken.

Zur individuellen Risikoabschätzung bei mittelgradig dysplastischen, kleinen Adenomen scheint sich besonders *RAB20* als Prognosemarker zu eignen, dessen Validität wie auch die der erstgenannten Genproben in prospektiven Studien geprüft werden sollte.

6 Zusammenfassung

Kolorektale Adenome stellen in über 80% die Ausgangslage für die Entwicklung kolorektaler Karzinome dar. Die Aussagekraft der bislang verwendeten klinischen und histopathologischen Parameter ist hinsichtlich der Angabe individueller Wahrscheinlichkeiten einer malignen Transformation begrenzt. Vor diesem Hintergrund war es Ziel der Arbeit, zusätzliche prognostische Marker für die kolorektale Karzinogenese entlang der Adenom-Karzinom-Sequenz zu finden.

Es wurden insgesamt 18 Adenome von Patienten ohne synchrones Karzinom (6,5 Jahre Follow-up), 23 Adenome von Karzinom-Patienten und 6 korrespondierende Karzinome untersucht. In allen Präparaten wurde der DNA-Gehalt zur Bestimmung des Ploidiegrades gemessen.

Für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wurden mit *SMAD 7*, *EGFR*, *p53*, *NCOA3*, *RAB20* und *c-myc* in der kolorektalen Karzinogenese bedeutende Genmarker ausgewählt. Als Ploidiekontrolle wurden die Zentromerproben für Chromosom 17 bzw. 18 eingesetzt.

Ein erhöhter genomischer Instabilitätsindex von Zentromerprobe 17, *SMAD 7* und *EGFR* sowie *p53*-Deletionen und *c-myc*-Amplifikationen fanden sich signifikant häufiger bei Patienten mit synchronem Karzinom ($p < 0,05$). Diploide *NCOA3*-Signalanzahlen waren mit längerem Adenomrezidiv-freiem Überleben assoziiert ($p = 0,042$). Zusätzlich korrelierten *NCOA3*-, *c-myc*-, *EGFR*- und *RAB20*-Amplifikationen sowie *p53*-Deletionen mit erhöhten DNA-Stammlinien bzw. Aneuploidie in den untersuchten Adenomen ($p < 0,05$). Aberrationen von *NCOA3*, *c-myc* und *RAB20* waren darüber hinaus mit villösen Wachstumsmustern der Adenome assoziiert ($p < 0,05$). *RAB20*-Amplifikationen zeigten eine hoch-signifikante Korrelation zu hochgradig dysplastischen Adenomen ($p = 0,002$).

Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse scheinen ergänzend zur histopathologischen Untersuchung vorbestehender kolorektaler Adenome Analysen auf *EGFR*-, *c-myc*-, *NCOA3*- und *RAB20*-Amplifikationen sowie die DNA-Zytometrie von zusätzlichem prognostischen Wert für die individuelle Risikoabschätzung hinsichtlich des Bestehens von synchronen Karzinomen und/ oder hinsichtlich des Rezidivrisikos von Adenomen und somit einer drohenden malignen Transformation zu sein.

7 Literaturverzeichnis

1. Ackroyd, F.W. & Hedberg, S.E. Colonic Polyps. *Ann Rev Med* **36**, 619-25 (1985).
2. Anzick, S.L. et al. AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* **277**, 965-8 (1997).
3. Auer, G., Caspersson, T.o., Wallgren, A.S. DNA content and survival in mammary carcinoma. *Anal Quant Cytol* **2**, 161-5 (1980)
4. Bahnassy, A.A. et al. Cyclin A and cyclin D I as significant prognostic markers in colorectal cancer patients. *BMC Gastroenterology* **4** (2004).
5. Bernstein, C., Bernstein, H., Garewal, H., et al. A bile acid-induced apoptosis assay for colon cancer risk and associated quality control studies. *Cancer Research* **59**, 2353-7 (1999).
6. Bernstein, C.N., Blanchard, J.F., Kliewer, E. & Wajda, A. Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population based study. *Cancer* **91**, 854-62 (2001).
7. Bomme, L., Bardi, G., Pandi, N. Clonal karyotypic abnormalities in colorectal adenomas: clues to the early genetic events in the adenoma-carcinoma-sequence. *Genes Chromosomes Cancer* **10**, 190-6 (1994).
8. Boulay, J.L. et al. Combined copy status of 18q21 genes on colorectal cancer shows frequent retention of SMAD7. *Genes Chromosomes Cancer* **31**, 240-7 (2001).
9. Boulay, J.L. et al. SMAD7 is a prognostic marker in patients with colorectal cancer. *Int J Cancer* **104**, 446-9 (2003).
10. Bressler, B. et al Rates of new or missed colorectal cancers after colonoscopy and their risk factors: a population-based analysis. *Gastroenterol* **132**, 96-102 (2007).
11. Brown, M.O., Lanier, A.P. & Becker, T.M. Colorectal cancer incidence and survival among Alaska Natives. *Int J Epidemiol* **27**, 388-96 (1998).
12. Burgart, L.J. Colorectal polyps and other precursor lesions. Need for an expanded view. *Gastroenterol Clin Noth Am* **31**, 959-70 (2002).
13. Carter, W.G., Ryan, M.C., Gahr, P.J. Epilegrin, a new cell adhesion ligand for integrin alpha 3 beta 1 in epithelial basement membranes. *Cell*, **65**, 599-610 (1991)

14. Caspersson, T.O. Quantitative tumor cytochemistry - G.H.A. Clowes Memorial Letter. *Cancer Research* **39**, 2341-5 (1979).
15. Cho, K.R. & Vogelstein, B. Genetic alterations in the adenoma-carcinoma-sequence. *Cancer* **Sept 15;70 (6 Suppl)**, 1727-31 (1992).
16. Compton, C.C., et al. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* **124**, 979-94 (2000).
17. Compton, C.C. Colorectal carcinoma: diagnostic, prognostic, and molecular features. *Mod Pathol* **16**, 376-88 (2003).
18. COST. A comparison of laparoscopically assisted and open colectomy for colon cancer. *N Engl J Med* **350**, 2050-59 (2004).
19. Cremer, T. et al. Detection of chromosome aberrations in the human interphase nucleus by visualization of specific target DNAs with radioactive and non-radioactive in situ hybridization techniques: diagnosis of trisomy 18 with probe L1.84. *Hum Genet* **74**, 346-52 (1986).
20. de Meester, C. & Gerber, G.B. The role of cooked food mutagens as possible etiological agents in human cancer: a critical appraisal of recent epidemiological investigations. *Rev Epidemiol Sante Publique* **43(2)**, 147-61 (1995).
21. DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles & Practice of Oncology, Eighth Edition Lippincott, Williams & Wilkins (2008)
22. Dukes, C.E., et al. The classification of cancer of the rectum. *The Journal of Pathology and Bacteriology* **35**, 323-332 (1932).
23. Eickhoff, A. & Riemann, J.F. Klinische Fortschritte in der Gastroenterologie. *Dtsch Med Wochenschr* **131**, 1452-55 (2006).
24. Fearon, E.R. & Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**, 759-67 (1990).
25. Fleischer, D.E., et al. Detection and surveillance of colorectal cancer. *JAMA* **261**, 580-5 (1989).
26. Fodde, R., et al. Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat Cell Biol* **3**, 433-8 (2001).
27. Fodde, R. The APC gene in colorectal cancer. *Eur J Cancer* **38**, 867-71 (2002).

28. Forozan, F., Karhu, R., Kononen, J., Kallioniemi, A. & Kallioniemi, O.P. Genome screening by comparative genomic hybridization. *Trends Genet* **13**, 405-9 (1997).
29. Fransohoff, D.F. Colon Cancer Screening in 2005: Status and Challenges. *Gastroenterology* **128**, 1685-95 (2005).
30. Fuchs, C.S., et al. A prospective study of family history and the risk of colorectal cancer. *N Engl J Med* **331**, 1669-74 (1994).
31. Gall, J.G. & Pardue, M.L. Formation and detection of RNA-DNA hybrids in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* **63**, 378-83 (1969).
32. Gerhardsson de Verdier, M., Hagman, U. & Peters, R.K., et al. Meat, cooking methods and colorectal cancer: a case-referent study in Stockholm. *Int J Cancer* **49**, 520-5 (1991).
33. Ghadimi, B.M. et al. Gain of Chromosome 8q23-24 Is a Predictive Marker for Lymph Node Positivity in Colorectal Cancer. *Clin Cancer Research* **9**, 1808-40 (2003).
34. Glinghammar, B., Holmberg, K. & Rafter, J. Effects of colonic luminal components on AP-1-dependent gene transcription in cultured human colon carcinoma cells. *Carcinogenesis* **20**, 969-76 (1999).
35. Goh, V., Halligan, S. & Bartram, C.I. Local radiological staging of rectal cancer. *Clin Radiol* **59**, 215-26 (2004).
36. Greene, F.L., Steward, A.K. & Wieand, H.S. A new TNM staging strategy for node-positive (stage III) colon cancer: an analysis of 50,042 patients. *Ann Surg* **236**, 416-21; discussion 421 (2002).
37. Grünwald, V. & Hidalgo, M. Development of the Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitor OSI-774. *Seminars in Oncology* **30**, 23-31 (2003).
38. Gunderson, L.L., Haddock, M.G. & Schild, S.E. Rectal cancer: preoperative versus postoperative irradiation as component of adjuvant treatment. *Semin Rad Oncol* **13**, 419-32 (2003).
39. Habermann, J.K. et al. Ulcerative colitis and colorectal carcinoma: DNA-profile, laminin-5 gamma2 chain and cyclin A expression as early markers for risk assessment. *Scand J Gastroenterol* **36**, 751-8 (2001).
40. Habermann, J.K. Colorectal Cancer: Genome, Transcriptome and Proteome Dynamics, PhD-Thesis, Karolinska Institute Stockholm (2005).

41. Habermann, J.K. Et al. Stage-specific alterations of the genome, transcriptome, and proteome during colorectal carcinogenesis. *Genes Chromosomes Cancer* **46**, 10-26 (2007)
42. Habermann, J.K. et al. Pronounced chromosomal instability and multiple gene amplifications characterize ulcerative colitis-associated colorectal carcinomas. *Cancer Genetics and Cytogenetics* **147**, 9-17 (2003).
43. Half, E.E. & Bresalier, R.S. Clinical management of hereditary colorectal cancer syndroms. *Curr Opin Gastroenterol* **20**, 32-42 (2004).
44. Hauser, H. Das Kolorektale Karzinom - Teil 1: Epidemiologie, Präkanzerosen, Primär- und Sekundärprävention. *Journal für Gastroenterologische und Hepatologische Erkrankungen* **2**, 6-11 (2004).
45. Henke, R.T. et al. Overexpression of the nuclear receptor coactivator AIB1 (SRC-3) during progression of pancreatic adenocarcinoma. *Clin Cancer Research* **10**, 6134-42 (2004).
46. Heiden, T., Wang, N. & Tribukait, B. An improved Hedley method for preparation of paraffin-embedded tissues for flow cytometric analysis of ploidy and S-phase. *Cytometry* **12**, 614-621 (1991).
47. Herbst, R.S. Erlotinib (Tarceva): An Update on the Clinical Trial Program. *Semin Oncol* **30**, 34-46 (2003).
48. Holinski-Feder, E., Morak, M. Hyperplastische Ploypen, sessile serratierte Adenome, konventionelle Adenome: Molekulare Pathways und deren klinische Relevanz. *J Gastroenterol Hepatol Erkr*, **8**, 18-25 (2010)
49. Hurlstone, D.P., Cross, S.S., Slater, R., Sanders, D.S. & Brown, S. Detecting diminutive colorectal lesions at colonoscopy: a randomised controlled trial of pan-colic versus targeted chromoscopy. *Gut* **53**, 376-80 (2004).
50. Hsing, A.Y. et.al. Regulation of apoptosis induced by transforming growth factor-beta1 in nontumorigenic and tumorigenic rat prostatic epithelial cell lines. *Cancer Res* **56**, 5146-9 (1996)
51. Issa, J.P. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer*, **4**, 988-93 (2004)
52. Jass, J.R., Sobin, L.H. Histological typing of intestinal tumours. WHO International Histological Classification of Tumours, 2nd Edition. Springer(1989)

53. Jass, J. R., Young, J., Leggett, B.A. Evolution of colorectal cancer: change of pace and achange of direction. *J Gastroenterol Hepatol*, **17**, 17-26 (2002)
54. Jass, J. R. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathol*, **50**, 113-30 (2007)
55. John, H.A., Birnstiel, M.L. & Jones, K.W. RNA-DNA hybrid molecules at the cytological level. *Nature* **223**, 582-7 (1969).
56. Kiesslich, R., Fritsch, J. & Holtmann, M., et al. Methylene blue-aided chromoendoscopy for the detection of intraepithelial neoplasia and colon cancer in ulcerative colitis. *Gastroenterology* **124**, 880-88 (2003).
57. Kinkel, K., Lu, Y., Both, M., Warren, R.S. & Thoeni, R.F. Detection of hepatic metastases from cancers of the gastrointestinal tract by using non-invasive imaging methods (US, CT, MRI imaging, PET): a meta analysis. *Radiology* **224**, 748-56 (2002).
58. Knuutila, S.e.a. DNA copy number amplifications in human neoplasms: review of comparative genomic hybridization studies. *Am J Pathol* **152**, 1107-23 (1998).
59. Landis, S.H., Murray, T., Bolden, S. & Wingo, P.A. Cancer statistics 1998. *CA Cancer J Clin* **48**, 6-29 (1998).
60. Lee, S.K., Kim, H.J., Kim, J.W. & Lee, J.W. Steroid Receptor Coactivator-1 and its Family Members Differentially Regulate Transactivation by the Tumor Suppressor Protein p53. *Molecular Endocrinology*, 1924-33 (1999).
61. Li, J.Q. et al. Cyclin A correlates with carcinogenesis and metastasis, and p27 (kip1) correlates with lymphatic invasion, in colorectal neoplasms. *Hum Pathol* **33**, 1006-15 (2002).
62. Liao, L. et al. Molecular structure and biological function of the cancer-amplified nuclear receptor coactivator SRC-3/AIB1. *J Steroid Biochem & Molecul Biology* **83**, 3-14 (2003).
63. Lütcke, A. et al. Cloning and subcellular localization of novel rab proteins reveals polarized and cell type-specific expression. *J. Cell Sci* **107**, 3437-48 (1994).
64. Lynch, H.T. & de la Chapelle, A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* **348**, 919-32 (2003).

65. Martenson, J.A., Willett, C.G. & Sargent, D.J., et al. Phase III study of adjuvant chemotherapy and radiation therapy compared with chemotherapy alone in the surgical adjuvant treatment of colon cancer: results of the intergroup protocol 0130. *J Clin Oncol* **22**, 3277-83 (2004).
66. Massagué, J., Blain, S.W., Lo, R.S. TGF β Signaling in Growth Control, Cancer and Heritable Disorders, *Cell* **103**, 295-309 (2000)
67. McNeil, N. & Ried, T. Novel molecular cytogenetic techniques for identifying complex chromosomal rearrangements: technology and applications in molecular medicine. *Expert Rev Mol Med* **14**, 1-14 (2000).
68. Menardo, G. Sensitivity of diagnostic examinations for colorectal polyps. in *Techniques on Coloproctology* Vol. 8 273-5 (2004).
69. Muller, A.D. & Sonnenberg, A. Protection by endoscopy against death from colorectal cancer. A case-control study among veterans. *Arch Intern Med* **155**, 1741-8 (1995).
70. Nakao, A. et al. Identification of SMAD7, a TGF- β -inducible antagonist of TGF- β -signaling. *Nature* **389**, 631-635 (1997).
71. Newcomb, P.A., Norfleet, R.G., Storer, B.E., Surawicz, T.S. & Marcus, P.M. Screening sigmoidoscopy and colorectal cancer mortality. *J Natl Cancer Inst* **84**, 1572-5 (1992).
72. Ng, S.S.W., Tsao, M.S., Nicklee, T. & Hedley, D.W. Effects of the Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitor OSI-774, Tarceva, on Downstream Signaling Pathways and Apoptosis in Human Pancreatic Adenocarcinoma. *Molecular Cancer Therapeutics* **1**, 777-83 (2002).
73. Nozoe, T., Inutsuka, S., Honda, M., Ezaki, T. & Korenaga, D. Clinicopathologic significance of cyclin A expression in colorectal carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* **23**, 127-33 (2004).
74. O'Connell, J.B., Maggard, M.A. & Ko, C.Y. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *J Natl Cancer Inst* **96**, 1420-5 (2004).
75. O'Connor, M., Pfeifer, M., Bender, W. Construction of large DNA segments in *Escherichia coli*, *Science*, **16**, 1307-12 (1989)
76. Pardue, M.L. & Gall, J.G. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* **64**, 600-4 (1969).

77. Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J. & Pisani, P. Global cancer statistics 2002. *CA Cancer J Clin* **55**, 74-108 (2005).
78. Platzer, P. et al. Silence of Chromosomal Amplifications in Colon Cancer. *Cancer Research* **62**, 1134-38 (2002).
79. Potter, J.D. Colorectal cancer: molecules and populations. *J Natl Cancer Inst* **91**, 916-32 (1999).
80. Ransohoff, D.F. Colon Cancer Screening in 2005: Status and Challenges. *Gastroenterology* **128**, 1685-1695 (2005).
81. Richter, K. et al. Kette von Laminin-5 ein Promotor in der kolorektalen Adenom-Karzinom-Sequenz? in *Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie* (München, 2005).
82. Riddell, R.H., Goldman, H., Ransohoff, D.F. Dysplasia in inflammatory bowel disease: standardized classification with provisional clinical applications. *Human Pathology* **14**, 931-68 (1983)
83. Ried, T., et al. Comparative genomic hybridization reveals a specific pattern of chromosomal gains and losses during the genesis of colorectal tumors. *Genes Chromosomes Cancer* **10**, 234-45 (1996).
84. Ried, T., Heselmeyer-Haddad, K., Blegen, H., Schrock, E. & Auer, G. Genetic changes defining the genesis, progression, and malignancy potential in solid human tumors: a phenotype/ genotype correlation. *Genes Chromosomes Cancer* **25**, 195-204 (1999).
85. Rigas, B., Goldman, I.S. & Levine, L. Altered eicosanoid levels in human colon cancer. *J Lab Clin Med* **122**, 518-23 (1993).
86. Risio, M., Casorzo, L., Chiecchio, L., de Rosa, G. & Rossini, F.P. Deletions of 17p are associated with transition from early to advanced colorectal cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics* **147**, 44-49 (2003).
87. Roberts, B.R. et al. Importance of epidermal growth factor receptor signaling in establishment of adenomas and maintenance of carcinomas during intestinal tumorigenesis. *PNAS* **99**, 1521-6 (2002).
88. Roberts-Thomson, I.C., Ryan, P. & Khoo, K.K., et al. Diet, acetylator phenotype, and risk of colorectal neoplasia. *Lancet* **347**, 1372-4 (1996).
89. Rubio, C.A. et al. The vienna classification applied to colorectal adenomas. *J Gastroenterol Hepatol* **11**, 1697-703 (2006).

90. Rudkin, G.T. & Stollar, B.D. High resolution detection of DNA-RNA hybrids in situ by indirect immunofluorescence. *Nature* **265**, 472-3 (1977).
91. Saha, S., Dan, A.G., Beutler, T. et al. Sentinel lymph node mapping technique in colon cancer. *Semin Oncol* **31**, 374-81 (2004).
92. Sakakura, C. et al. Amplification and Over-expression of the AIB1 Nuclear Receptor Co-activator gene in Primary Gastric Cancers. *Int J Cancer* **89**, 217-23 (2000).
93. Santamato, A. et al. Hepatic stellate cells stimulate HCC cell migration via laminin-5 production. *Clin Sci (Lond.)* **121**, 159-68 (2011)
94. Schlag, P.M. Das Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz - ein Zwischenruf *Chirurg* **77**, 1061-1062 (2006) Springer Verlag
95. Selby, J.V., Friedman, G.D., Quesenberry, C.P. & Weiss, N.S. A case-control study of screening sigmoidoscopy and mortality from colorectal cancer. *N Engl J Med* **326**, 653-7 (1992).
96. Sherr, C.J. Mammalian G1 cyclins *Cell*, **73**, 1059-65 (1993)
97. Skibber, J.M., Minsky, B.D. & Hoff, P.M. Cancers of the Gastrointestinal Tract - Cancer of the Colon. in *Cancer: Principles and Practice of Oncology, 6th Edition* (Lippincott Williams & Wilkins, 2001).
98. Slattery, M.L.e.a. Energy balance and colon cancer - beyond physical activity. *Cancer Research* **57**, 75-80 (1997).
99. Sobin, L.H. & Wittekind, C. UICC: TNM classification of malignant tumours. *London: John Wiley & Sons 6th edition*(2002).
100. Stearns, M.W., Jr. Staging colonic and rectal cancer. *Int Adv Surg Oncol* **4**, 189-208 (1981).
101. Stein, M.-P., Dong, J. & Wandinger-Ness, A. Rab proteins and endocytotic trafficking: potential targets for therapeutic intervention. *Advanced Drug Delivery Reviews* **55**, 1421-37 (2003).
102. Suzuki, K. & Bruce, W.R. Increase by deoxycholic acid of the colonic nuclear damage induced by known carcinogens in C57BL/6J mice. *J Natl Cancer Inst* **76**, 1129-32 (1986).
103. Szarka, C.E., Pfeiffer, G.R. Hum ST, et al. Glutathione S-transferase activity and glutathione S-transferase mu expression in subjects with risk for colorectal cancer. *Cancer Research* **55**, 2789-93 (1995).

104. Takai, Sasaki & Matozaki. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* **81**, 153-208 (2001).
105. Towler, B. et al. A systematic review of the effects of screening for colorectal cancer using the faecal occult blood test, hemoccult. *BMJ* **317**, 559-65 (1998).
106. Vogelstein, B. & Kinzler, K.W. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* **10**, 789-99 (2004).
107. Walsh, J.M., Terdiman, J.P. Colorectal cancer screening: scientific review. *JAMA* **289**, 1288-1296 (2003).
108. Walsh, J.M. & Terdiman, J.P. Colorectal cancer screening: clinical applications. *JAMA* **289**, 1297-1302 (2003).
109. Weitz, J. et al. Colorectal cancer. *Lancet* **365**, 153-65 (2005).
110. Welfare, M.R., Cooper, J., Bassendine, M.F. & Daly, A.K. Relationship between acetylator status, smoking, and diet and colorectal cancer risk in the north-east of England. *Carcinogenesis* **18**, 1351-4 (1997).
111. Wheeler, J.M. Epigenetics, mismatch repair genes and colorectal cancer. *Ann R Coll Surg Engl* **87**, 15-20 (2005).
112. Willett, W.C., Stampfer, M.J., Colditz, G.A., Rosner, B.A. & Speizer, F.E. Relation of meat, fat and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. *N Engl J Med* **323**, 1664-72 (1990).
113. Wilmink, A.B. Overview of the epidemiology of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* **40**, 483-93 (1997).
114. Wittekind, Chr., Meyer, H.J. TNM: Klassifikation maligner Tumoren, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; Auflage: 7. Auflage (21. Januar 2010)
115. Wrana, J. L., et al. TGF β signals through a heteromeric protein kinase receptor complex, *Cell*, **71**, 1003-1014 (1992)
116. Xie, D. et al. Correlation of AIB1 overexpression with advanced clinical stage of human colorectal carcinoma. *Hum Pathol* **36**, 777-83 (2005).
117. Zeng, S.D. et al. Expression and amplification of steroid receptor coactivator-3 gene on colorectal carcinoma and its clinicopathological significance. *Zhonghua, Wei, Chang, Wai, Ke, Za, Zhi* **8**, 67-70 (2005).
118. Zhang, S. et al. Smad7 Antagonizes Transforming Growth Factor β Signaling in the Nucleus by Interfering with Functional Smad-DNA Complex Formation. *Mol and Cell Biol*, **27**, 4488-4499 (2007)

119. Zhou, G., Hashimoto, Y., Kwak, I., Tsai, S.Y. & Tsai, M.J. Role of the Steroid Receptor Coactivator SRC-3 in Cell Growth. *Molecular and Cellular Biology* **23**, 7742-55 (2003).
120. Zindy, F. et al. Cyclin A is required in S phase in normal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **182**, 1144-54 (1992)

8 Anhang

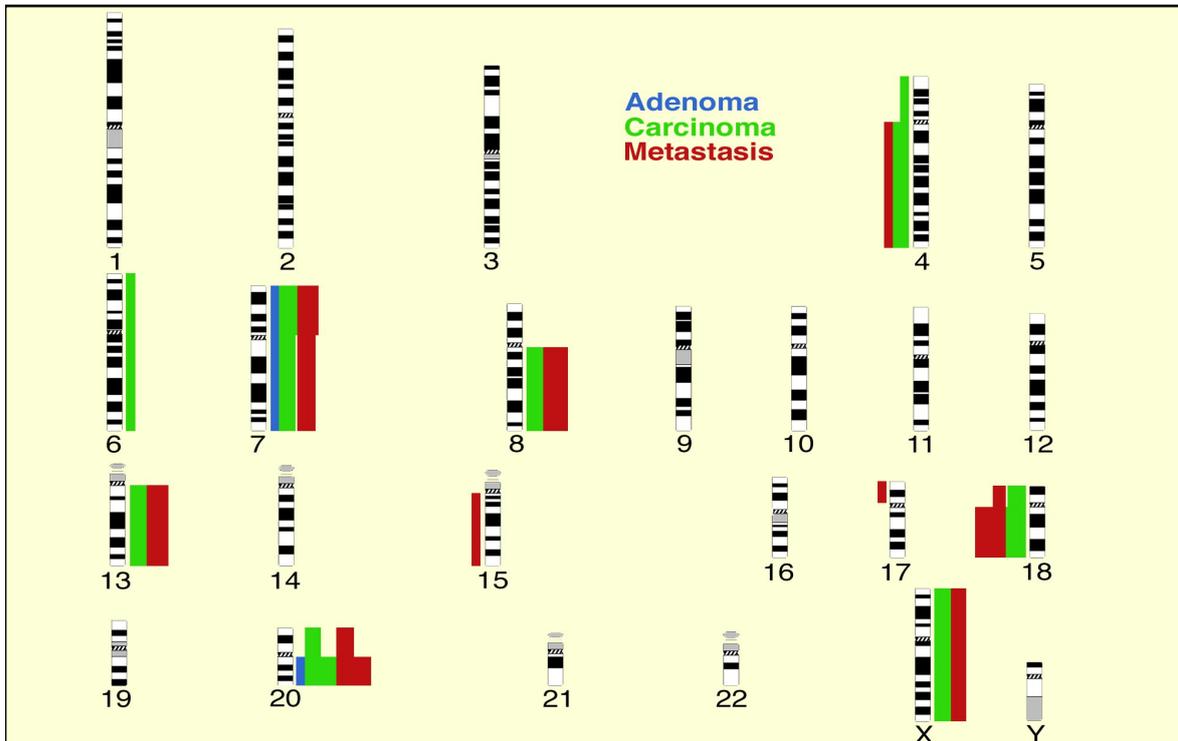
8.1 Verzeichnis der Abbildungen, Tabellen und Kasuistiken

Abbildungen

Abbildung 1: Multistep Karzinogenese des kolorektalen Karzinoms, Seite 17

Abbildung 2: Beispiele verschiedener FISH-Proben, Seite 18

Abbildung 3: Vergleich genomischer Imbalanzen in sporadischen Adenomen, Karzinomen und Lebermetastasen



Graphische Darstellung von Amplifikationen (rechts vom Chromosom) oder Deletionen (links vom Chromosom aufgezeichnet) von Chromosomen oder Chromosomenarmen; in Adenomen **blau**, in Karzinomen **grün** und in Lebermetastasen **rot**. Die Balkendicke korreliert mit der Anzahl der Imbalanzen bezogen auf die Fallzahl von zehn [Habermann 2007].

Abbildung 4: Auer-Klassifikation, Seite 33

Abbildung 5: Instabilitätsindex Panel 1 in Abhängigkeit von evtl. vorhandenen Adenom-Rezidiven, Seite 36

Abbildung 6: Häufigkeit von NCOA3-Amplifikationen je Patientengruppe, Seite 36

Abbildung 7: Häufigkeit von NCOA3-Amplifikationen in Abhängigkeit vom Ploidiegrad, Seite 37

Abbildung 8: Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit von der Adenom-Rezidiv Zeit, Seite 37

Abbildung 9: p53-Verlust in Abhängigkeit vom Ploidiegrad, Seite 38

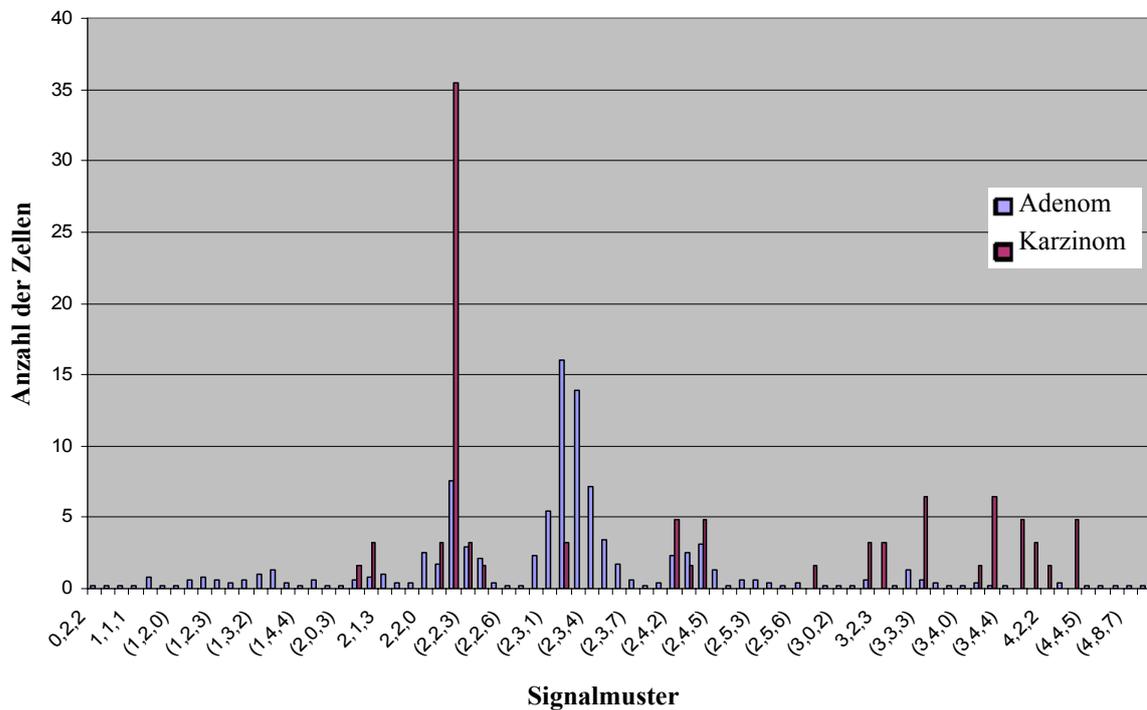
Abbildung 10: p53-Verlust korreliert mit dem Auftreten synchroner Karzinome, Seite 38

Abbildung 11: FISH euploider und aneuploider Adenome im Vergleich, Seite 39

Abbildung 12: C-myc-Amplifikationen in Abhängigkeit vom Ploidiegrad, Seite 40

Abbildung 13: durchschnittliche Signalanzahl je Genprobe, Patientengruppe und Hybridisierungs-panel, Seite 41

Abbildung 14: Vergleich tubulo-villöses Colon-Adenom mit mittelgradiger Dysplasie und synchrones Karzinom Panel 3 (CEP17, *c-myc*, *RAB20*)



Beispiel ansteigender Kopienanzahl für MYC und RAB 20 vom Adenom zum synchronen Karzinom als Darstellung clonaler Zellen mit aberranter Kopienanzahl. Fallbeispiel einer 73 jährigen Adenom-Patientin mit Adenomrezidiv nach 10 Monaten und synchronem Karzinom.

Abbildung 15: *NCOA3*-Amplifikationen in Abhängigkeit vom histologischen Typ

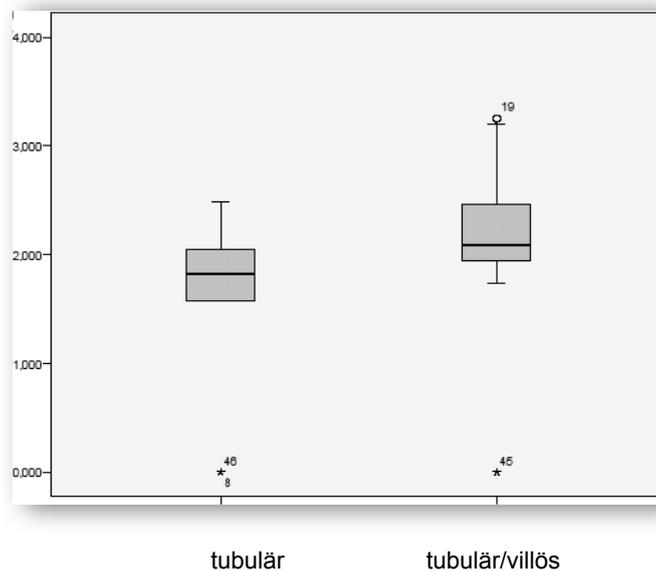


Abbildung 16: RAB20-Amplifikationen bezüglich des Dysplasiegrades

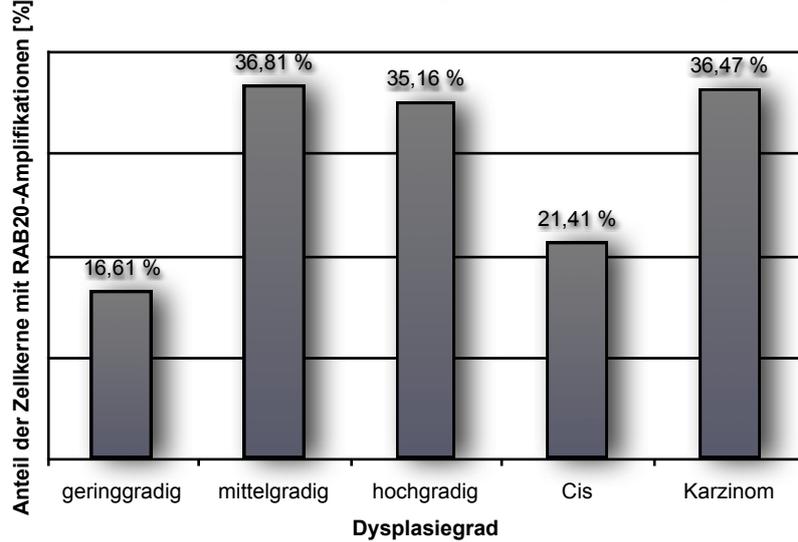


Abbildung 17: Instabilitätsindex Panel 3 in Abhängigkeit vom histologischen Typ

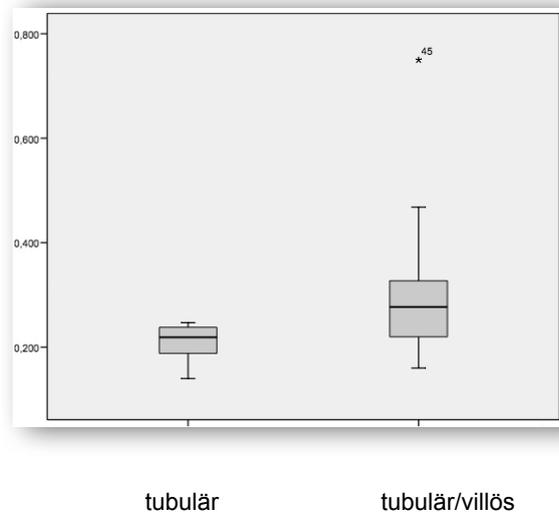
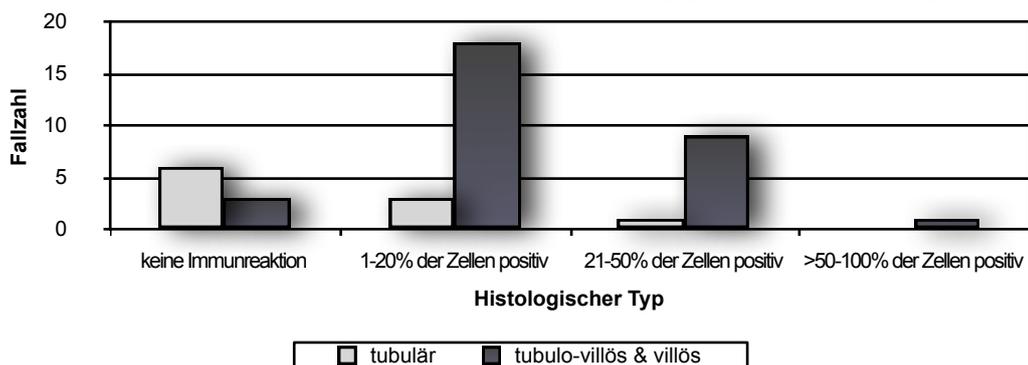


Abbildung 18: Dysplasiegrad in Abhängigkeit vom histologischen Wachstumstyp, Seite 45

Abbildung 19: (a & b) Dysplasiegrad in Abhängigkeit vom histologischen Wachstumstyp, Seite 46

Abbildung 20: Laminin-5-Immunreaktivität in Abhängigkeit vom histologischen Typ



Tabellen

Tabelle 1: Übersicht über UICC-Stadium, TNM-Klassifikation und Dukes-Stadium, Seite 15

Tabelle 2: Übersicht über die Hybridisierungs-Probepanel, Seite 19

Tabelle 3: Klinische Daten

Nr	m/w	Alter	Gruppe	Adenom & Karzinom	Adenom - Rezidiv	Beobachtungszeitraum (Monate)	Dysplasiegrad	Histologie	Lokalisation	Größe (mm)	Synchr. Adenome
1	m	57	A	nein	nein	104	lowgrade	tubulär	Transversum	2	2
2	m	70	A	nein	nein	85	lowgrade	tubulär	linke Flexur	2	nein
3	w	70	A	nein	nein	71	lowgrade	tubulär	Descendens	1	nein
4	m	69	A	nein	nein	70	lowgrade	tubulovillös	Sigma	12	4
5	w	82	A	nein	nein	6	highgrade	tubulovillös	Sigma	10	nein
6	w	78	A	nein	nein	117	pTis	tubulovillös	Rectum	17	3
7	m	79	A	nein	nein	104	pTis	tubulovillös	Coecum	60	3
8	w	67	A	nein	nein	71	pTis	tubulovillös	Sigma	9	nein
9	w	65	B	nein	Monat 38	91	lowgrade	villös	Rectum	20	nein
10	w	62	B	nein	Monat 35	92	lowgrade	tubulovillös	Sigma	10	5
11	w	59	B	nein	Monat 39	89	lowgrade	tubulovillös	Transversum	7	2
12	w	59	B	nein	Monat 3	73	lowgrade	tubulovillös	Sigma	2	nein
13	w	64	B	nein	Monat 48	101	highgrade	villös	Rectum	140	nein
14	w	76	B	nein	Monat 3	119	pTis	tubulovillös	Rectum	20	nein
15	m	82	B	nein	Monat 18	111	pTis	tubulär	Rectum	3	2
16	m	66	B	nein	Monat 14	101	pTis	tubulär	k.A.	18	nein
17	m	77	B	nein	Monate 12 & 21	80	pTis	tubulovillös	Rectum	17	nein
18	m	78	B	nein	Monat 3	68	pTis	tubulovillös	k.A.	8	3
19	w	85	D	pT4,N2,M X; G3	nein	86	lowgrade	tubulovillös	k.A.	12	3
20	m	72	D	pT4,N1,M X; G2	nein	86	lowgrade	tubulovillös	Rectum	2	2
21	w	61	D	pT4,N0,M X; G2	nein	85	lowgrade	tubulovillös	k.A.	10	nein
22	m	65	D	pT3,N1,M X; G3	nein	80	lowgrade	tubulär	rechte Flexur	6	nein
23	w	75	D	pTis;G3	nein	96	lowgrade	tubulovillös	Sigma	20	3
24	m	68	D	pTis;G3	nein	3	lowgrade	tubulovillös	Transversum	2	2
25	w	75	D	pTis;G3	nein	96	highgrade	tubulovillös	rechte Flexur	3	3
26	m	59	D	pTis; G3	nein	84	highgrade	tubulovillös	Rectum	18	5
27	w	68	D	pT3,N1,M X; G2	nein	79	pTis	tubulovillös	k.A.	16	3
28	m	78	E	pTis; G3	Monat 36	36	lowgrade	tubulär	Sigma	3	nein
29	m	56	E	pT3,N2,M X; G2	Monat 10	10	lowgrade	tubulär	Sigma	5	2
30	m	78	E	pT4,N1,M X; G2	Monat 24	24	lowgrade	tubulär	k.A.	5	2
31	m	67	E	pT2,N1,M X; G2	Monat 44	44	lowgrade	tubulär	k.A.	4	nein

Nr	m/w	Alter	Gruppe	Adenom & Karzinom	Adenom - Rezidiv	Beobachtungszeitraum (Monate)	Dysplasiegrad	Histologie	Lokalisation	Größe (mm)	Synchr. Adenome
32	w	70	E	pT3,N1,MX; G2	Monate 11 & 24	24	lowgrade	tubulovillös	Coecum	10	2
33	w	73	E	pT1;G2	Monat 10	10	lowgrade	tubulovillös	Sigma	16	2
34	w	77	E	pT1;G2	Monat 13	13	highgrade	tubulovillös	Ascendens	27	nein
35	w	44	E	pTis;G3	Monat 11	11	highgrade	tubulovillös	Rectum	30	2
36	m	76	E	pTis;G3	Monat 20	20	highgrade	tubulovillös	Rectum	70	nein
37	m	76	E	pTis;G3	Monat 20	20	highgrade	tubulovillös	Rectum	30	5
38	m	67	E	pTis;G3	Monat 10	10	highgrade	tubulovillös	Descendens	31	3
39	w	58	E	pT1;G2	Monat 24	24	pTis	tubulovillös	Rectum	20	nein
40	w	59	E	pTis,N0,MX;G3	Monate 17 & 18	18	pTis	tubulovillös	Sigma	70	nein
41	m	75	E	pT3,N0,MX; G2	Monat 7	7	pTis	tubulovillös	Rectum	28	nein

Tabelle 4: Klinische Daten des Studienkollektivs

Gruppe	Definition	Geschlecht		Alter (Jahre)	synchrone Adenome	Rezidivfreies Überleben (Monate)
		m	w			
A (n=8)	kein Karzinom, kein Adenomrezidiv	4	4	71,5 (57-82)	1,5 (2-4)	78,5 (6-117)
B (n=10)	kein Karzinom, aber Adenomrezidiv	4	6	68,8 (59-82)	1,5 (2-5)	21,3 (3-48)
C (n=18)	kein Karzinom	8	10	70 (57-82)	1,5	46,7 (3-117)
D (n=9)	synchrone Karzinom, aber kein Adenomrezidiv	4	5	69,8 (61-85)	2,3 (2-5)	77,2 (3-96)
E (n=14)	synchrone Karzinom und Adenomrezidiv	8	6	88,1 (44-78)	1,3 (2-5)	18,4 (7-44)
F (n=23)	synchrone Karzinom	12	11	68,8 (44-85)	1,7	41,4 (3-96)

Tabelle 5: Detaillierte Aufstellung der Genproben für die einzelnen Probenpanel, Seite 29

Tabelle 6: Korrelation der Instabilitätsindices aller Panel mit den Ploidiegraden

DNA Ploidie	Panel 1 Instabilitätsindex (Durchschnitt)	Panel 2 Instabilitätsindex (Durchschnitt)	Panel 3 Instabilitätsindex (Durchschnitt)
Diploid	0,2196	0,2343	0,2460
Tetraploid	0,2258	0,2346	0,2698
Aneuploid	0,2507	0,3100	0,3330

Tabelle 7: Genomische Instabilitätsindizes und Immunhistochemie

Nr	m/w	Alter (Jahre)	Gruppe	Ploidie	Stammlinie	Genomischer Instabilitätsindex			Ln-5	Cy A
						Panel 1	Panel 2	Panel 3		
1	m	57	A	k.A.	k.A.	0,214	0,366	0,14	0	1
2	m	70	A	k.A.	k.A.	0,232	0,23	0,247	0	1
3	w	70	A	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	0,238	0	1
4	m	69	A	I	1,83	0,158	0,195	0,277	2	3
5	w	82	A	II	2,03	0,154	0,26	0,327	1	2
6	w	78	A	I	2,03	0,17	0,257	0,22	1	2
7	m	79	A	I	1,91	0,226	0,229	0,25	3	2
8	w	67	A	II	1,99	0,223	0,202	0,25	2	1
9	w	65	B	I	1,86	0,165	0,292	0,192	0	1
10	w	62	B	II	1,94	0,146	0,204	0,175	1	1
11	w	59	B	II	2,11	0,271	0,167	0,367	1	1
12	w	59	B	k.A.	k.A.	0,245	0,354	0,226	1	2
13	w	64	B	I	1,96	0,291	0,247	0,231	2	2
14	w	76	B	III	3,13	0,331	0,343	0,391	2	2
15	m	82	B	k.A.	k.A.	0,267	0,191	0,175	1	2
16	m	66	B	II	1,77	0,25	0,21	k.A.	2	2
17	m	77	B	II	1,92	0,214	0,323	0,167	1	2
18	m	78	B	I	1,86	0,284	0,274	0,322	2	3
19	w	85	D	k.A.	k.A.	0,198	0,225	0,246	1	1
20	m	72	D	k.A.	k.A.	0,019	0,264	0,292	0	1
21	w	61	D	I	1,92	0,315	0,205	0,424	1	1
22	m	65	D	k.A.	k.A.	0,143	0,163	0,244	1	1
23	w	75	D	III	3,01	0,241	0,243	0,315	1	3
24	m	68	D	I	1,89	0,216	0,296	0,276	1	1
25	w	75	D	II	1,99	0,282	0,257	0,397	0	2
26	m	59	D	III	3,25	0,154	0,156	0,182	1	1
27	w	68	D	I	1,83	0,168	0,178	k.A.	2	2
28	m	78	E	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	0,208	0	1
29	m	56	E	I	1,89	0,165	0,25	0,219	0	1
30	m	78	E	II	1,79	0,261	0,288	0,226	0	1
31	m	67	E	I	1,82	0,14	0,116	0,188	1	1
32	w	70	E	II	1,85	0,268	0,216	0,311	1	1
33	w	73	E	I	2,01	0,177	0,325	0,16	2	1
34	w	77	E	II	1,87	0,189	0,219	0,208	1	2
35	w	44	E	III	3,47	0,333	0,344	0,292	1	1

Nr	m/w	Alter (Jahre)	Gruppe	Ploidie	Stammlinie	Genomischer Instabilitätsindex			Ln-5	Cy A
						Panel 1	Panel 2	Panel 3		
36	m	76	E	I	1,92	0,393	0,2	0,194	1	2
37	m	76	E	I	1,94	0,207	0,216	k.A.	1	1
38	m	67	E	III	3,42	0,267	0,322	0,387	1	1
39	w	58	E	III	3,62	0,179	0,369	0,296	2	3
40	w	59	E	k.A.	k.A.	0,6	k.A.	0,75	2	1
41	m	75	E	III	3,11	0,25	0,393	0,468	1	2

m männlich, w weiblich, k.A. keine Angabe, Ln-5 Laminin 5, Cy A Cyclin A; genomische Instabilitätsindices ohne das physiologische Muster (2/2/2).

8.2 Protokolle

Alle verwendeten Protokolle für die Arbeitsschritte Nick-Translation, DNA-Präzipitation, Objektträger-Denaturierung und Hybridisierung sowie Detektion wurden in Kurzform im Kapitel Material und Methoden beschrieben. Eine ausführliche Darstellung ist auf folgender Internetseite nachzulesen:

<http://www.riedlab.nci.nih.gov/protocols.asp> (letzter Zugriff 31.07.2011).

Die im Internet niedergelegte und im *Laboratory of Thomas Ried* praktizierte Hedley-Methode wurde für die vorliegende Arbeit in den Schritten 6., 8., 10. und 11. entscheidend modifiziert und soll daher kurz protokolliert werden

Modifizierte Hedley-Technik

1. Ein bis drei 50µm-Schnitte eines Präparates von überschüssigem Paraffin befreien und mit 1ml Xylol für 3x20 Minuten entparaffinieren
2. Xylol abgiessen, in absteigender Ethanolreihe (100%, 90%, 70%, 50%) für jeweils 5 Minuten rehydratisieren
3. Präparate in 50% Ethanol 20 Minuten mit 14000rpm zentrifugieren
4. Ethanol abgiessen, mit 1ml Aqua dest. für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
5. für 15 Minuten mit 14000rpm zentrifugieren
6. Aqua dest. abgiessen, 500µl 0,1% Protease in 1X PBS zugeben und für 45 - 70 Minuten bei 45°C im Schüttel-Wasserbad inkubieren
7. Anschliessend Kerndesintegration überprüfen: einen Tropfen der Kernsuspension mit einem Tropfen DAPI-Sulpharodamin auf einem Objektträger vermischen und im Fluoreszenz-Mikroskop folgende Kriterien prüfen:
 - a) Quantität: ca. 30 Kerne pro Gesichtsfeld (25x Vergrößerung)
 - b) Möglichst wenig Zytoplasma und intakte Kernstruktur
 - c) Fluoreszenzintensität des DAPI-Sulpharodamin: je stärker umso weniger störende Proteine sind vorhanden
8. Falls die oben genannten Kriterien nicht optimal erscheinen wird die Inkubationszeit für 10-30 Minuten verlängert
9. Beenden der Protease-Reaktion mit 500µl 1X PBS
10. Kernsuspension auf einen 30µm Nylonfilter geben und das Filtrat auf Eis stellen. Sollte nach diesem Filtrationsschritt noch Gewebematerial verblieben sein, so kann ein weiterer Proteaseverdau durchgeführt werden (Schritte 6-10 wiederholen)
11. Filtrat für 5 Minuten mit 3000rpm abzentrifugieren und Überstand bis auf 100µl abgiessen
12. Kernpellet vorsichtig im verbliebenen Volumen resuspendieren, ggf. Konzentration mit 1X PBS verdünnen
13. Pro Cytospin je 80µl der Suspension mit einer Shannon Cytospin®3 Zentrifuge mit 1700rpm für 5 Minuten auf Objektträger aufzentrifugieren
14. Objektträger in aufsteigender Ethanolreihe (70%, 90%, 100%) dehydratisieren, an der Luft trocknen und mit hygroskopischen Pellets lichtgeschützt aufbewahren

Das Vorgehen zur DNA-Extraktion ist nicht Bestandteil der Protokollsammlung des *Laboratory of Thomas Ried* und wird somit hier kurz aufgeführt.

DNA-Extraktion (QIAGEN Supplementary Protocol for Isolation of large-construct DNA 09/2001)

Falls notwendig SDS-Präzipitate im Puffer P2 durch Erwärmen auf 37°C auflösen, Puffer P3 vor Gebrauch auf 4°C abkühlen und Elution-Puffer QF vor Gebrauch auf 65°C erwärmen.

1. Starterkultur ansetzen: 3ml LB-Medium, 3µl Chloramphenicol, gewünschter Bakterienklon für 8 Stunden bei 37°C im Schüttler inkubieren
2. Starterkultur 1:500 mit autoklaviertem LB-Medium verdünnen, 500µl Chloramphenicol zugeben, über Nacht (12-16 Stunden) im Inkubatorschüttler bei 37°C inkubieren
3. 15 Minuten bei 4°C mit 7500rpm abzentrifugieren
4. Pellet in 20ml Puffer P1 auflösen
5. 20ml Puffer P2 zufügen, vorsichtig mischen und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
6. 20ml gekühlten Puffer P3 zugeben und 10 Minuten auf Eis inkubieren
7. 30 Minuten bei 4°C mit 11500rpm zentrifugieren; um einen klaren Überstand zu gewährleisten wird ein 2. Mal in einem sauberen Probengeäß für 15 Minuten bei 4°C mit 11500 rpm zentrifugiert
8. QIAGEN-Filtersäule mit 10ml Puffer QBT equilibrieren
9. Probe von Schritt 7 auf die Säule geben
10. Filtersäule zweimal mit je 30ml Waschpuffer QC spülen
11. DNA mit 5x3ml Elution-Puffer QF (65°C) eluieren
12. Präzipitation der DNA aus dem Eluat mit 10,5ml Isopropanol; vorsichtig mischen und für 30 Minuten bei 4°C mit 12500rpm zentrifugieren
13. DNA-Pellet mit 5ml 70% Ethanol waschen, für 30 Minuten bei 4°C mit 1400rpm zentrifugieren und Überstand vorsichtig absaugen
14. DNA-Pellet lufttrocknen und in 450µl Aqua dest. auflösen

Feulgen-Färbung

Pararosanilin ist stark kanzerogen, direkten Kontakt meiden!

1. Tag: 1,5g Pararosanilin in 150ml HCl auflösen (2 Liter Flasche mit braunem Glas verwenden)
2,5g Kaliumpyrosulfit in 850ml Aqua dest. auflösen und zur sauren Pararosanilin-Lösung geben, leicht schütteln → Schiff'sches Reagenz
Flasche in Alufolie verpacken und über Nacht bei Raumtemperatur stehen lassen
2. Tag: Alufolie entfernen, 3g Aktivkohle zum angesetzten Schiff'schen Reagenz hinzufügen und mindestens 4 Minuten gut schütteln
Lösung zweimal filtrieren, das Filtrat sollte zuletzt transparent-rosa sein
Flasche mit Alufolie verpacken und bei 4°C aufbewahren (Lösung ist maximal 3 Tage verwendbar)
Objektträger derweil über Nacht in 4% Formaldehyd reflexieren

- 3.Tag: Präparate in Leitungswasser spülen, bis kein Formaldehydgeruch mehr abgegeben wird
 Objektträger in 5M HCl für 60 Minuten bei Raumtemperatur hydrolysieren
 dreimal vorsichtig in Aqua dest. spülen
 Inkubation im Schiff'schen Reagenz für 120 Minuten in lichtgeschützter
 Küvette in Leitungswasser spülen, bis keine Farbe mehr abgegeben wird
 für 3x 10 Minuten in frischer Natriumpyrosulfit-Lösung waschen
 Objektträger für 5 Minuten unter fließendem Leitungswasser spülen
 für je 5 Minuten in aufsteigender Ethanolreihe dehydratisieren (70%, 90%,
 90%, 100%, 100%)
 Reinigung für 5 Minuten im Xylolbad
 Eindecken mit Entellan

8.3 Reagenzien, Geräte und Verbrauchsmaterialien

Reagenzien und Lösungen

Reagenz / Lösung	Hersteller / Katalog-Nr.
Standard Luria Bertani (LB) Medium	Q-BIOgene, Katalog-Nr.: 3002-031
Chloramphenicol (20mg/ ml)	Sigma
QIAGEN Plasmid Maxi Kit (25)	QIAGEN; Katalog-Nr.: 12163
0,1% Protease Typ XXIV, Bacterial	Sigma, P-8038
DAPI-Lösung	Sigma D-9542
Sulphorodamine-Lösung	Sigma S-7635
1xPBS pH=7,4	KD Medical, Katalog-Nr.: RGF-3210
Biotin-16-dUTP	Boehringer Mannheim/ Kat.nr.:1093070
Bovine serum Albumin (BSA)	Roche, Indianapolis, IN, USA Kat.nr.: 9048-46-8
DIG-11-dUTP	Boehringer Mannheim/ Kat.nr.: 1093088
dATP, dTTP, dGTP, dCTP	Boehringer Mannheim/ Kat.nr.: 105 1440, 105 1458, 105 1466, 105 1482
DNase I (bovine pancreas) 100mg	Boehringer Mannheim/ Kat.nr.: 104 159
Agarose	Invitrogen
EDTA 0,5M	Quality Biological, Inc., Kat.nr. 351-027-100
Glycerin	Invitrogen, Kat.nr. 15514-011
Lambda Hind III DNA-Marker	GIBCO BRL- life technologies Kat.nr.: 10382-028
100bp-Marker	GIBCO BRL – life technologies Kat.Nr.: 15628-019
Gelladepuffer	Quality Biological, Inc. Kat.nr.: 351-028-030
Ethydiumbromid	Research Genetics, Kat.nr.: 750007
Magnesium-Chlorid 0,5M	Quality Biological, Inc., Kat.nr.340-034-060
Polymerase (Kornberg)	Boehringer Mannheim/ Kat.nr.: 104 485
Natrium-Chlorid 1M	Quality Biological, Inc., Kat.nr. 351-036-101
Tris-HCl 1M, pH=8,0	Quality Biological, Inc., Kat.nr. 351-006-101
Dextransulfat (50%)	Intergen, Kat.nr.: S 4030

Reagenz / Lösung	Hersteller / Katalog-Nr.
Entionisiertes Formamid	Ambion, Kat.nr.: 9342
Human Cot-1© DNA (1mg/ml)	GIBCO BRL, Kat.nr.: 15279-001, 500µg
Salmon Testes DNA	Sigma Molecular Biology, Kat.nr.: D-7657
1M HCl	Fisher Scientific, Kat.nr. SA48-500
3M Na-Acetat (pH=5,2)	Quality Biological, Kat.nr.: 351-035-060
20X SSC	Roche, Kat.nr.: 1666 681
Avidin-FITC	Vector, Kat.nr.: A-2011
Maus Anti-Digoxigenin	Sigma, Kat.nr.: D 8156
CEP©17 Spectrum Aqua	Vysis, Kat.nr.: 32-131017
CEP©18 Spectrum Aqua	Vysis, Kat.nr.; 32-131018
Tween 20	Sigma
Pepsin	Sigma, Kat.nr.: P 6887, 5g
Pararosanilin, Basic Fuchsin	Aldrich, 85,734-3
Kaliumpyrosulfit	
Aktivkohle	
Formaldehyd 4%	
Salzsäure 5M	
Entellan (Brechungsindex 1,490-1,500)	MERCK 1.07961.0100

Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät / Material	Hersteller
Reagenzröhrchen: 14ml FALCON® 2059	Becton Dickinson Labware, NJ, USA
Incubator – Shaker (37°C) Series 25	New Brunswick Scientific CO., Inc., Edison, NJ, USA
Zentrifuge: BeckmanCoulter® AvantiJ25	Bioresearch Information, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA
Zentrifuge: Eppendorf Centrifuge 5417 R	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Eppendorf-Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Wasserbäder (37°C, 45°C, 60°C), VWR Scientific Products, Nr. 1245	VWR International, West Chester, PA, USA
Parafilm M	American National Can™, Chicago
Thermo Shanon Cytospin® 3	Thermo Electron Corporation Headquarters, Waltham, MA, USA
Elektrophoresekammer BioRad Modell 200	Bio-Rad Laboratories Headquarters, CA 94547, USA
Phasenkontrastmikroskop Zeiss	Carl Zeiss, Oberkochen, Germany
FISHER Microscope Slides Superfrost®	FISHER Scientific, FISHER Research, Pittsburg, PA 15275, USA
Deckgläser	VWR Scientific
Marabu Fixogum Rubber Cement	Marabuwerte GmbH & Co KG 71732 Tamm, Germany
Fluoreszenzmikroskop Leica	
Inverted Mikroskop Leitz DM IRBE	

9 Danksagungen

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. H.-P. Bruch für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seiner Klinik durchführen zu können.

Herrn PD Dr. Dr. Jens Habermann danke ich für die Vergabe des Themas und die Betreuung meiner Arbeit in Lübeck und in Washington D.C. ebenso, wie für zahlreiche Gespräche, Anregungen, Diskussionen und die persönliche Unterstützung, die meine Forschungsarbeit entscheidend geprägt haben.

Bei Gisela Grosser-Pape, Elke Gheribi, Vera Grobleben und Regina Kaatz bedanke ich mich für die großartige Hilfe im Rahmen der Präparatesammlung, Färbung und DNA-Zytometrie.

Prof. Dr. Thomas Ried hat mich sehr großzügig und fachkundig in seinem Labor in Maryland aufgenommen und unterstützt; Linda Barenboim, Dr. Kerstin Heselmeyer-Haddad, Dr. Hessed M. Padilla-Nash, Danny Wangsa, Nicole McNiel, Madhvi Upender und Kundan Sengupta standen mir jederzeit insbesondere für die Hybridisierungen mit exzellentem Rat und Hilfe bei der Versuchsdurchführung zur Seite. Ihnen allen gilt mein besonderer Dank.

Buddy Chen und Joseph Cheng danke ich für den IT Support.

Ich danke Marco Gerling für die gemeinsame Zeit im Riedlab, all die anregenden Gespräche auch ausserhalb der fokussierten Arbeit und die Unterstützung bei der DNA-Zytometrie.

Bei Prof. Dr. St. Krüger möchte ich mich für die Unterstützung bei der Auswahl der Präparate sowie für die histopathologische Befundung bedanken.

Dr. Sandra Freitag-Wolf danke ich für die Anfertigung der statistischen Analysen.

Franziska Kopp danke ich sehr für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Fritz Andreas Meyn gilt mein großer Dank für seine uneingeschränkte Hilfe und persönliche Unterstützung im Bereich IT und Layout.

Bei meinen Freunden möchte ich mich für ihre Ausdauer, mich immer wieder zu motivieren, mein Fortkommen zu unterstützen, mich zur rechten Zeit mit anderen wichtigen Dingen abzulenken und mich während einer persönlich sehr schweren Zeit zu unterstützen besonders bedanken.

Meiner Familie danke ich für das Ermöglichen einer mehrmonatigen Forschung im Ausland, den immerwährenden Glauben an meine Fähigkeiten und die unerlässliche emotionale Unterstützung.

10 Lebenslauf

Constanze Ariane Brucker
28. Dezember 1980
Senior-Starke-Weg 27, 21684 Stade



Schulbildung

1987 - 1991 Grundschule Horneburg
1991 - 1993 Orientierungsstufe Horneburg
1993 - 2000 Gymnasium Athenaeum Stade

Medizinische Ausbildung

08/2000 - 01/2003 Praktikum der Krankenpflege,
Elbe Klinikum Stade

2001 - 2003 Vorklinisches Studium
Ludwig-Maximilians Universität München

2003 - 2007 Klinisches Studium
Universität Lübeck
04-10/2004 Forschungssemester National
Cancer Institute, NIH, Bethesda, MD, USA

Praktisches Jahr

Klinik für Pädiatrie, Westküstenklinikum Heide
Universitätsklinik für Viszerale- und
Transplantationschirurgie, Inselspital Bern,
Schweiz
Kinderchirurgische Klinik, Kantonsspital Luzern,
Schweiz
Dept. of Emergency Medicine, St. Michael's
Hospital, Toronto, ON, Kanada
Dept. of Critical Care Medicine, Mount Sinai
Hospital, Toronto, ON, Kanada
Klinik für Innere Medizin, Klinikum Neustadt

Ärztliche Tätigkeit

seit 01/2008 Assistenzärztin der Klinik für
Anästhesiologie und Intensivmedizin
Elbe Klinikum Stade

07/2011 Anerkennung der Zusatzbezeichnung
Notfallmedizin

11 Publikationsliste

J K Habermann*, C A Brucker*, S Freitag-Wolf,

K Heselmeyer-Haddad, St Krüger, L Barenboim, T Downing, H P Bruch, G Auer,

U J Roblick and Th Ried

Genomic instability and oncogene amplifications in colorectal adenomas predict recurrence and synchronous carcinoma Modern Pathology (2010), 1-14

* = geteilte Erstautorenschaft

C. Brucker, Dr. B. Fritzsche, Dr. Dr U.J. Roblick, Dr. Dr. J.K. Habermann Chirurgisches Forschungslabor, Klinik für Chirurgie, Ratzeburger Allee 160, 23538 Lübeck Direktor: Prof. Dr. H.-P. Bruch Doktorandentag Universität Lübeck 2007

DNA-Sonden zur Krebsrisikoberurteilung von Darmpolypen

http://www.uni-luebeck.de/fileadmin/old_meddek/pdf/studierende/UnilmDialog2007/DarmpolypenBrucker.pdf

J K Habermann*, C A Brucker*, S Freitag-Wolf,

K Heselmeyer-Haddad, St Krüger, L Barenboim, T Downing, H P Bruch, G Auer,

U J Roblick and Th Ried

Genomic instability and oncogene amplifications in colorectal adenomas predict recurrence and synchronous carcinoma

Posterbeitrag auf der 22. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik (GFH), Regensburg, 16.-18.03.2011

* = geteilte Erstautorenschaft

J K Habermann*, C A Brucker*, S Freitag-Wolf,

K Heselmeyer-Haddad, St Krüger, L Barenboim, T Downing, H P Bruch, G Auer,

U J Roblick and Th Ried

Genomic instability and oncogene amplifications in colorectal adenomas predict recurrence and synchronous carcinoma

Postervortrag, 187. Tagung der Vereinigung Nordwestdeutscher Chirurgen, Stralsund, 02.-04.06.2011

* = geteilte Erstautorenschaft

J K Habermann*, C A Brucker*, S Freitag-Wolf,

K Heselmeyer-Haddad, St Krüger, L Barenboim, T Downing, H P Bruch, G Auer,

U J Roblick and Th Ried

Genomic instability and oncogene amplifications in colorectal adenomas predict recurrence and synchronous carcinoma

Poster Award, Viszeralmedizin Leipzig, 14.-17.09.2011

* = geteilte Erstautorenschaft

J K Habermann*, C A Brucker*, S Freitag-Wolf,

K Heselmeyer-Haddad, St Krüger, L Barenboim, T Downing, H P Bruch, G Auer,

U J Roblick and Th Ried

Individual risk assessment of adenoma recurrence and synchronous carcinomas by FISH-probe panels

Chirurgische Forschungstage Dresden, 22.-24.09.2011

* = geteilte Erstautorenschaft