

Aus dem Institut für Pathologie  
Der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Prof. Dr. H.E. Gabbert

**GENETISCHE INSTABILITÄT  
BEIM KOLOREKTALEN KARZINOM**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

vorgelegt von

**Sonja Michaelis**

2002

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr.med. Dr.phil. Alfons Labisch, M.A.  
Dekan

Referent: Priv.-Doz. Dr. W. Müller  
Korreferentin: Priv.-Doz. Dr. G. Möslein

**Für meine Eltern.**

# Inhaltsverzeichnis

## 1 Einleitung

1.1	Das kolorektale Karzinom	1
1.2	Molekulare Karzinogenese des kolorektalen Karzinoms	2
1.3	Genetische Instabilität	4
1.4	Mikrosatelliteninstabilität (MSI)	4
1.5	Komparative genomische Hybridisierung (CGH)	6
1.6	Das FHIT-Gen	7
1.7	Das PTEN-Gen	7
1.8	Fragestellung und Ziel der vorliegenden Arbeit	8

## 2 Material und Methoden

2.1	<i>Material</i>	9
2.1.1	Untersuchtes Patientenkollektiv	9
2.2	<i>Methoden</i>	9
2.2.1	Histopathologische Untersuchungen	9
2.2.2	Immunhistochemische Methoden	11
2.2.3	Molekularpathologische Methoden	11
2.2.3.1	DNA-Extraktion	11
2.2.3.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	12
2.2.3.3	Mikrosatellitenanalyse	13
2.2.3.4	Komparative genomische Hybridisierung (CGH)	14
2.2.3.4.1	Hybridisierung und Hybridisierungsnachweis	14
2.2.3.4.2	Bildanalytische Auswertung der Hybridisierungsreaktion	15

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	
3.1	<i>Komparative genomische Hybridisierung (CGH)</i>	17
3.1.1	Häufigkeit genetischer Aberrationen in kolorekalem Karzinomen	17
3.1.2	Korrelation mit histopathologischen Parametern	23
3.2	<i>Mikrosatelliteninstabilität (MSI)</i>	25
3.2.1	MSI-Häufigkeit im kolorektalen Karzinom	25
3.2.2	Korrelation der MSI mit histopathologischen Parametern	27
3.3	<i>Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen</i>	28
3.4	<i>Verlust der Heterozygotie (LOH) im Bereich des FHIT- und PTEN-Gens beim kolorektalen Karzinom</i>	30
3.4.1	LOH-Häufigkeit des FHIT-Gens	30
3.4.2	LOH-Häufigkeit des PTEN-Gens	30
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	
4.1	Komparative genomische Hybridisierung (CGH)	31
4.2	FHIT-Gen	37
4.3	PTEN-Gen	38
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	39
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	40
<b>7</b>	<b>Abkürzungen</b>	46
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	47
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b>	48

# 1 Einleitung

## 1.1 Das kolorektale Karzinom

Mit einer Häufigkeit von ca. 50 000 Neuerkrankungen pro Jahr ist das kolorektale Karzinom in der BRD eine der häufigsten Tumorerkrankungen. Es stellt etwa ein Drittel aller Krebserkrankungen dar, wobei Männer etwa 1,4 mal häufiger betroffen sind als Frauen. Das kolorektale Karzinom ist bei Männern der dritthäufigste Tumor und bei Frauen der zweithäufigste, wobei der Häufigkeitsgipfel um das siebte Lebensjahrzehnt liegt. Die Inzidenz nimmt nach dem 50. Lebensjahr exponentiell zu. Besonders in den westlichen Industriestaaten ist ein Anstieg der Inzidenz zu beobachten (Dunlop, 1992) wenn auch die Mortalitätsrate in den letzten Jahren insbesondere bei Frauen gesunken ist (Mayer, 1998).

Die Ätiologie des kolorektalen Karzinoms beruht sowohl auf endogenen als auch auf exogenen Faktoren, wobei es sich bei den letzteren häufig um ernährungsbedingte Einflüsse handelt. Besonders die fettreiche und fleischreiche Kost sowie Übergewicht werden als Risikofaktoren für das kolorektale Karzinom angesehen. Im Gegensatz dazu erscheint die faserreiche Kost und die schnelle Stuhlpassage das Risiko eher minimieren zu können. Die endogenen Faktoren beruhen auf genetischen Defekten, die spontan erworben werden können oder vererbt sind.

Anhand von Forschungsergebnissen der letzten Jahre hat man erkannt, daß 50% aller kolorektalen Karzinome spontan ohne familiäre Häufung auftreten. Besonders in dieser Gruppe mißt man den exogenen Risikofaktoren eine hohe Bedeutung bei. Die andere Hälfte der kolorektalen Karzinome dagegen weist eine familiäre Häufung auf. Man unterscheidet hier einen polygenen Vererbungsweg, der 40% aller kolorektalen Karzinome ausmacht und einen autosomal dominanten, der nur bei 10 % aller kolorektalen Karzinome zu finden ist.

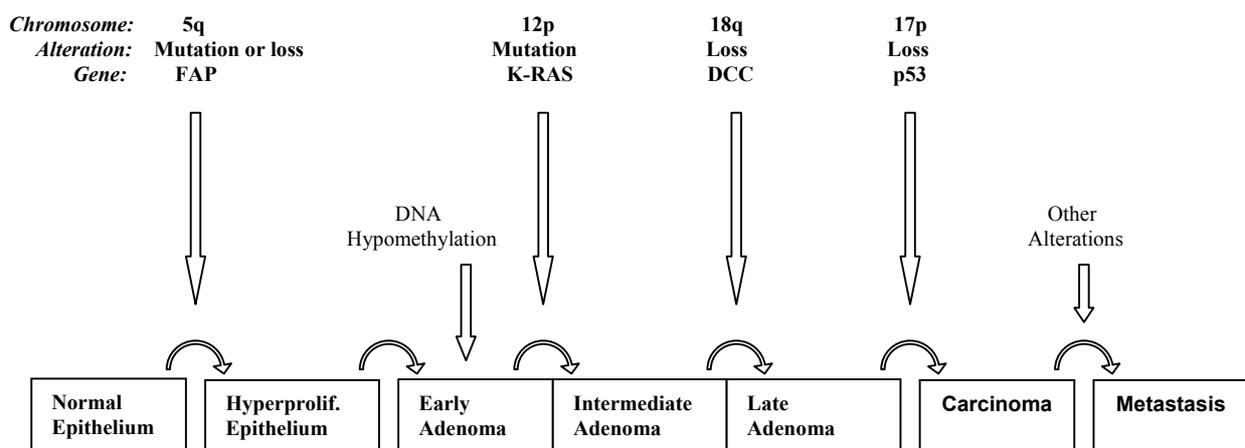
Im Falle der polygenen Vererbung läßt sich zwar eine familiäre Häufung nachweisen aber wie der Begriff „polygen“ bereits vermuten läßt, findet man Defekte an verschiedenen Stellen im Genom. Im Gegensatz dazu, kennt man bei den autosomal dominant vererbten hereditären Krebsyndromen den genetischen Defekt. Man unterscheidet zwischen der familiären adenomatösen Polyposis (FAP), die 1% aller kolorektalen Karzinome ausmacht und einen Defekt im APC-Gen zeigt. Sowie dem nicht-Polyposis assoziierten Kolonkarzinom (HNPCC), das Mutationen in den sog. Mismatch Repair (MMR) Genen aufweist und an der Gesamtzahl der kolorektalen Karzinome mit ca. 5% beteiligt ist (Guanti, et al. 2000).

## 1.2 Molekulare Karzinogenese des kolorektalen Karzinoms

Molekularpathologisch entwickelt sich die kolorektale Karzinogenese u.a. durch eine schrittweise Akkumulation von Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen, wobei es zur Aktivierung der ersten und zur Inaktivierung der zweiten kommt.

Klinische und histopathologische Studien haben gezeigt, daß vielen wenn nicht sogar allen malignen kolorektalen Karzinomen eine präkanzeröse benigne adenomatöse Veränderung der Kolonschleimhaut vorausgeht (Sugarbaker, 1985). 1990 wurde von Fearon & Vogelstein ein Modell zur Karzinogenese von Kolonkarzinomen entwickelt. Es besagt, daß sukzessive genetische Alterationen bestimmter Gene (APC, k-Ras, DCC, p53) zu einer Proliferation der Dickdarmschleimhaut führen. Diese bedingt charakteristischer Weise zunächst eine Adenomentwicklung und erst nach diesem Stadium kommt es zur neoplastischen Transformation. Somit wurde von Fearon und Vogelstein der Begriff der „Adenom-Karzinom-Sequenz“ geprägt (Fearon et al., 1990). Dieses Modell hat trotz neuer molekularbiologischer Erkenntnisse der letzten 12 Jahre bis heute Bestand.

**Abbildung 1:** Genetisches Modell zur Karzinogenese des kolorektalen Karzinoms  
(nach der Originalpublikation von Fearon et al., 1990).



Da das kolorektale Karzinom vielfältige Veränderungen auf molekulargenetischer Ebene aufweist, ist es besonders für die Erforschung der Karzinomentwicklungen beim Menschen geeignet. Da sowohl hereditäre wie exogene Faktoren an der Ätiologie des kolorektalen Karzinoms beteiligt sind, können neben den vererbten auch die erworbenen genetischen Defekten näher analysiert werden.

Gegen Ende der 80er Jahren erkannte man die Bedeutung von Punktmutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen als in verschiedenen Labors Gene (p53 und APC), die an der Karzinogenese von gastrointestinalen Tumoren beteiligt sind, identifiziert wurden (Baker et al., 1989; Kinzler et al., 1991).

Darüber hinaus wurden in den letzten Jahren zelleigene Reparatursysteme (sog. Mismatch-Repair) untersucht, durch deren Ausfall ebenfalls die Karzinogenese bedingt sein kann.

Bei der Untersuchung von kolorektalen Karzinomen und kleinen Adenomen fand man eine monoklonale Proliferation der Zellen, so daß man davon ausgehen kann, daß sich der Tumor aus einer Stammzelle entwickelt. Diese wiederum wird durch die Mutationen determiniert, die ihr einen Wachstumsvorteil gegenüber den anderen Zellen verleiht. Sie ist somit die dominierende Zelle, die die Grundlage für die monoklonale Neoplasie darstellt (Fearon, 1990).

Wichtige Tumorsuppressorgene, die durch ihren Aktivitätsverlust die Tumorentstehung begünstigen sind u.a. das APC-Gen, das p53-Gen und das DCC-Gen. Ein für das kolorektale Karzinom typisches Tumoronkogen dagegen ist das RAS-Gen.

Verschiedene Studien lassen auch eine Rolle des FHIT, fragile histidin triad, (Thiagalingam et al., 1996; Chen et al., 1997) und PTEN, putative protein tyrosine phosphatase, (Zhou et al., 2002; Dicuonzo et al., 2001; Wang et al., 1998 ) Gens in der Karzinogenese des kolorektalen Karzinoms vermuten.

### **1.3 Genetische Instabilität**

Schon seit längerem deuten zahlreiche Befunde darauf hin, daß die genetische Instabilität eine der zentralen molekularpathologischen Eigenschaften der Krebszelle ist, die nicht nur für die Entstehung, sondern auch für den weiteren raschen Progreß des neoplastischen Wachstums verantwortlich ist (Loeb, 1991; Hartwell, 1992). Dabei lassen sich Manifestationen dieser genetischen Instabilität der Tumorzellen sowohl auf chromosomaler als auch auf DNA-Ebene nachweisen. Auf chromosomaler Ebene führt eine Störung der Chromosomenverteilung auf die Tochterzellen zu Aneuploidie, die für eine gesteigerte Mutabilität der aneuploiden Zellen verantwortlich gemacht wird (Orr-Weaver et al., 1998; Paulovich et al., 1997). Des weiteren kann es zu Deletionen oder Amplifikationen von Chromosomenabschnitten kommen. Auf DNA-Ebene ist neben Punktmutation, Deletion und Veränderungen des Methylierungsstatus der DNA insbesondere das Phänomen der Mikrosatelliteninstabilität (MSI) zu erwähnen, dem Veränderungen im Bereich sog. DNA-Reparaturgene zugrunde liegen.

### **1.4 Mikrosatelliteninstabilität (MSI)**

Fast gleichzeitig berichteten 1993 drei Forschergruppen über ungewöhnliche somatische Mutationen, die man in 10-15% der spontanen und in etwa 90% der hereditären kolorektalen Karzinome fand (Ionov et al., 1993; Aaltonen et al., 1993; Thibodeau et al., 1993).

Es handelte sich um repetitive Nukleotidsequenzen (Mikrosatelliten) der DNA, in denen während der DNA-Replikation von neoplastischen Zellen Fehler auftraten.

Mikrosatelliten sind kurze repetitive DNA-Sequenzen, die sowohl in kodierenden (Exons) wie auch in nicht-kodierenden (Introns) Bereichen vorkommen. Die auftretenden Fehler waren nun dadurch gekennzeichnet, daß es zu Veränderungen in der Längensquenz der DNA kam. Da es sich also um veränderte Mikrosatelliten handelte, wurde der Begriff der Mikrosatelliteninstabilität geprägt (Thibodeau et al., 1993).

Die Mikrosatelliten bilden die häufigste Form repetitiver DNA im eukaryonten Genom.

Man unterscheidet zwischen Mononukleotidrepeats (z.B. (A)<sub>n</sub>) und Dinukleotidrepeats (z.B. (CA)<sub>n</sub>), wobei die erst genannten anfälliger sind für die MSI. Die Cytosin-Adenin-Sequenzen ((CA)<sub>n</sub>) sind die häufigsten unter den Dinukleotidrepeats und mit 50.000-100.000 Wiederholungen über das gesamte Genom verteilt (Gyapay et al., 1994).

Wie später erkannt wurde, ist die MSI der phänotypische Marker für die Mutationen in einem Reparatursystem, das normalerweise während der DNA-Replikation aktiv ist. Es handelt sich um defekte MMR-Gene, die die MSI hervorrufen (Rüschoff et al., 1995). Soweit bekannte MMR-Gene sind MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 und MLH3, wobei besonders den Genen MLH1 und MSH2 eine wichtige Bedeutung bei dem hereditären Krebsyndrom HNPCC zukommt (Kruschewski et al., 2002).

Die Entdeckung der Mikrosatelliten vor wenigen Jahren, bietet seit dem einen neuen Weg der Tumorkarzinogenese, und die Möglichkeit Hochrisikopatienten (HNPCC) für ein kolorektales Karzinom frühzeitig zu erkennen.

Die zeitliche Reihenfolge der beschriebenen Veränderungen ist von Tumor zu Tumor unterschiedlich. Allerdings lassen sich die genetischen Defekte den bereits erwähnten drei Gruppen (sporadisch, hereditär, familiär) von kolorektalen Karzinomen zuordnen.

So kommt es bei den *sporadischen* Tumoren im Laufe des Lebens eines Menschen zu einer spontanen somatischen Mutation eines Gens, das an der Karzinogenese beteiligt ist (in 80% der Fälle Mutationen im APC-Gen und in 10% Mutationen in den MMR-Genen).

Bei den *hereditären* Tumoren werden diese Defekte vererbt, d.h., es liegt eine Keimbahnmutation vor. In dieser Gruppe der autosomal dominant vererbten Tumoren findet man spezifische Mutationen bestimmter Gene. So z.B. liegt dem HNPCC-Syndrom eine Schädigung der Mismatch-repair-Gene zu Grunde und der FAP eine Mutation des APC-Gens. Bei den *polygenen* familiären Tumoren dagegen sind es in der Regel mehrere Gene, die aus dieser Kette beschädigt sind, ohne daß sich die Mutationen immer auf bestimmte Gene beziehen müssen.

Eine weitere Studie zeigte, daß je mehr genetische Veränderungen ein Tumor aufweist, desto aggressiver sein Verhalten im klinischen Verlauf ist (Rüschoff et al., 1995).

## 1.5 Komparative genomische Hybridisierung (CGH)

Wie bereits erwähnt finden genetische Veränderungen sowohl auf DNA-Ebene wie auch auf chromosomaler Ebene statt. Mittels der komparativen genomischen Hybridisierung (CGH) können Veränderungen am Chromosom genau erfaßt werden. Die CGH stellt eine Methode dar, die eine Suche nach möglichen Genorten, die überzufällig häufig bei bestimmten Tumoren betroffen sind, stark vereinfachen kann. So kann durch die CGH in einem einzigen Experiment das gesamte Genom einer Tumorzelle auf mögliche Verluste (Deletionen) und Zugewinne (Amplifikationen) untersucht werden. Sie ist daher eine sehr geeignete Screening-Methode, auf deren Ergebnissen aufbauend anschließend einzelne Chromosomen gezielt, beispielsweise durch Mikrosatellitenanalyse, auf Allelverluste untersucht werden können. Ein weiterer Vorteil der CGH besteht darin, daß diese Untersuchung auch an formalinfixiertem, paraffineingebettetem Tumorgewebe möglich ist, und daher auch archiviertes Material retrospektiver Studien dieser Methode zugänglich sind (Kallioniemi et al., 1994a; Isola et al., 1994).

Es wurden bereits von unterschiedlichen Arbeitsgruppen CGH-Analysen an kolorektalen Karzinomen vorgenommen. So fanden sich z.B. Veränderungen auf Chromosom 12 im Bereich von K-ras, und in Tumorsuppressorgenen auf den Chromosomen 5, 17 und 18 (Fearon et al., 1990). Diese Beobachtungen bestätigten die Erkenntnisse, daß genau an den Stellen der Chromosomen 17 und 18 die Gene p53 und DCC lokalisiert und im kolorektalen Karzinom inaktiviert sind, und somit ein Einfluß auf die Tumorentstehung gegeben ist ( Baker et al., 1989; Fearon et al., 1990).

## 1.6 Das FHIT-Gen

Chromosomen weisen an unterschiedlichen Stellen fragile Abschnitte auf, an denen es besonders häufig zu Brüchen oder anderen Veränderungen in der chromosomalen Struktur kommen kann. Eine dieser sog. „fragile sites“ ist auf Chromosom 3p14.2 lokalisiert und an dieser Stelle wurde auch das FHIT (fragile histidine triad)-Gen identifiziert (Le Beau et al., 1998). Interessanter Weise zeigt dieses Gen in vielen unterschiedlichen Tumoren eine genetische Instabilität. Wobei das FHIT-Gen eine Rolle in der Zellzyklusregulation und der DNA-Replikation zu spielen scheint.

Zahlreiche Untersuchungen lassen vermuten, daß es sich hierbei um ein Tumorsupressorgen handelt. So ist das Gen an der Stelle des Genoms lokalisiert, die bekannt ist für Veränderungen bei verschiedenen Karzinomen. Es wurden Deletionen des FHIT-Exons beschrieben und auch fehlerhafte FHIT-Transkriptionsprodukte wurden besonders bei gastrointestinalen (Thiagalingam et al., 1996; Chen et al., 1997; Hibi et al., 1997) sowie bei Tumoren des Respirationstraktes (Le Beau, 1998) identifiziert.

Fehlende Proteinexpression des FHIT-Gens findet sich u.a. bei gastrointestinalen Tumoren. Im Falle des kolorektalen Karzinoms konnte von Mori et al. (2001) gezeigt werden, daß besonders im fortgeschrittenen Tumor (Dukes C und D) die Proteinexpression vermindert ist.

## 1.7 Das PTEN-Gen

Das PTEN-Gen ist ein Tumorsupressorgen, daß auf Chromosom 10q23.3 lokalisiert ist. Mutationen dieses Gens finden sich besonders häufig beim Cowden-Syndrom (Wang et al., 1998), Glioblastomen, Mammakarzinomen (Zysman et al., 2002), Prostatakarzinomen (Li et al., 1997), Schilddrüsenkarzinomen, Melanomen, Endometriumkarzinomen, Ovarialkarzinomen (Mutter, 2001) und weniger häufig in Non-Hodgkin-Lymphomen (Scarisbrick et al., 2000).

Die Inaktivierung des PTEN-Gens hat nicht bei jedem Tumor die gleichen Folgen. So kommt es beim Endometriumkarzinom eher einem „gatekeeper“ gleich und ist für die Initiation des Tumors verantwortlich. Wogegen es beim Prostata-Karzinom und dem Melanom für die Metastasierung verantwortlich ist und somit erst an einem wesentlich späteren Punkt in der Karzinomentwicklung wichtig wird (Mutter et al., 2001). PTEN scheint das Zellwachstum und somit die Tumorzellinvasion und die Metastasenentwicklung zu regulieren.

## **1.8 Fragestellung und Ziel der vorliegenden Arbeit**

Ziel der vorliegenden Arbeit waren Untersuchungen zur genetischen Instabilität des Dickdarmkarzinoms und deren Relevanz für die Tumorprogression und Lymphknoten-Metastasierung.

Hierzu wurde eine Serie von 36 kolorektalen Karzinomen mittels komparativer genomischer Hybridisierung (CGH) untersucht. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Identifizierung von Genorten als Grundlage für weiterführende Untersuchungen potentieller Kandidatengene, die für die Entstehung und Tumorbilogie des Dickdarmkarzinoms eine Rolle spielen könnten. Darüber hinaus wurde die mögliche Bedeutung allelischer Imbalancen im Sinne von Verlusten der Heterozygotie (LOH) im Bereich der vermutlichen Tumorsuppressorgene FHIT und PTEN für die Karzinogenese des kolorektalen Karzinoms untersucht.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Untersuchtes Patientenkollektiv**

Retrospektiv untersucht wurde eine Serie von 36 Patienten, die im Zeitraum von 1997 bis 1999 wegen eines kolorektalen Karzinoms operiert wurden.

Von den 36 untersuchten Patienten waren 21 männlich und 15 weiblich. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 66 Jahre (range: 38-80).

### **2.2 Methoden**

#### **2.2.1 Histopathologische Untersuchungen**

Es wurde Material von 36 unterschiedlichen kolorektalen Karzinomen untersucht. Durchschnittlich lagen 3 (2-5) Paraffinblöcke pro Tumor vor, von denen Paraffinschnitte angefertigt wurden, die routinemäßig mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt wurden.

Histologisch wurden die Tumoren bezüglich der Tumorstadien nach der TNM-Klassifikation der UICC (1987) unterteilt.

Folgende Parameter wurden erhoben:

- Infiltrationstiefe des Tumors (pT-Kategorie)
- Lymphknotenbefall (pN-Kategorie)
- Differenzierungsgrad der Tumoren (Grading)

Zum Zeitpunkt der Operation konnte lediglich bei 1 Patienten das Vorliegen von Fernmetastasen histologisch verifiziert werden, daher wurde dieser Parameter (pM-Kategorie) von der weiteren statistischen Analyse ausgeschlossen.

**Tabelle 1:** Patientendaten

<b>Fall</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter</b>	<b>pT</b>	<b>pN</b>	<b>G</b>	<b>Lokalisation</b>
Col 14	M	80	pT3	pN2	G2	Rektum
Col 16	W	66	pT2	pN0	G2	Colon ascendens
Col 36	M	52	pT4	pN2	G2	Colon descendens
Col 40	M	83	pT3	pN1	G2	Rektum
Col 42	W	83	pT3	pN0	G2	Sigma
Col 44	M	33	pT3	pN0	G2	Rektum
Col 46	W	67	pT3	pN0	G3	Colon ascendens
Col 50	M	66	pT3	pN1	G3	Colon descendens
Col 52	W	68	pT3	pN1	G3	Rektum
Col 54	M	69	pT4	pN0	G2	Colon descendens
Col 58	W	57	pT3	pN2	G3	Colon ascendens
Col 60	W	76	pT3	pN0	G2	Sigma
Col 74	M	56	pT3	pN1	G3	Rektum
Col 76	W	77	pT4	pN0	G2	Colon ascendens
Col 78	M	76	pT3	pN0	G2	Colon ascendens
Col 80	M	68	pT4	pN2	G3	Rektum
Col 82	W	75	pT4	pN2	G3	Colon ascendens
Col 84	M	79	pT3	pN0	G3	Rektum
Col 86	M	62	pT3	pN2	G2	Rektum
Col 90	W	57	pT4	pN0	G2	Colon descendens
Col 92	M	68	pT2	pN0	G2	Rektum
Col 96	M	66	pT3	pN1	G3	Colon ascendens
Col 102	M	67	pT2	pN0	G2	Rektum
Col 106	M	50	pT4	pN0	G2	Colon ascendens
Col 108	W	65	pT3	pN1	G2	Colon ascendens
Col 114	M	88	pT4	pN2	G2	Sigma
Col 116	W	63	pT2	pN0	G2	Colon descendens
Col 118	M	61	pT3	pN0	G2	Rektum
Col 124	M	53	pT3	pN2	G3	Sigma
Col 128	M	68	pT3	pN2	G3	Sigma
Col 134	W	58	pT1	pN1	G3	Colon ascendens
Col 136	M	61	pT3	pN1	G2	Rektum
Col 138	M	39	pT3	pN0	G3	Colon descendens
Col 142	W	63	pT2	pN0	G2	Colon transversum
Col 144	W	74	pT3	pN2	G2	Rektum
Col 216	W	71	pT3	pN0	G2	Colon ascendens

## **2.2.2 Immunhistochemische Methode**

Die Expression der Mismatch Repair Gene MSH2 und MLH1 wurde mit Hilfe spezifischer immunhistochemischer Antikörper untersucht. Dabei wurde für den MSH2 Antikörper eine Verdünnung von 1:80 (Firma Pharmingen) und für MLH1 eine Verdünnung von 1:60 (Firma Calbiochem) gewählt. In allen Fällen erfolgte der immunhistochemische Nachweis an Paraffinblöcken, die jeweils sowohl Tumor als auch Normalgewebe erfaßten. Die Schnitte wurden bei 60°C über Nacht inkubiert, entparaffiniert und in der absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Die endogene Peroxidaseaktivität durch 10 minütige Inkubation in 3%-igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> blockiert. Die notwendige Vorbehandlung der Schnitte in der Mikrowelle erfolgte jeweils in 10 mM Zitratpuffer (pH 6,0). Nach Blockierung unspezifischer Bindungen mit 5%-igem Normalserum wurde der Primärantikörper bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach 30 minütiger Inkubation mit einem Sekundärantikörper wurde für 1 Stunde eine Avidin-Biotin-Komplex-Reaktion (Hsu et al., 1981) mit dem ABC-Elite.Kit (Fa. Vector) durchgeführt. Anschließend wurde das Reaktionsprodukt durch Immersion mit Diaminobenzidintetrachlorid (Fa. Sigma) und Gegenfärbung mit Hämatoxylin sichtbar gemacht. Als Positivkontrolle diente jeweils das miterfaßte Normalgewebe. Als Negativkontrolle wurde der Primärantikörper durch 5%-iges Serumalbumin ersetzt.

## **2.2.3 Molekularpathologische Methoden**

### **2.2.3.1 DNA-Extraktion**

Für die molekularpathologischen Untersuchungen wurde Gewebe von 36 Tumoren aus dem Zeitraum von 1997 bis 1999 zur DNA-Präparation gewonnen. Dazu wurden jeweils vier bis fünf ca. 5 mm<sup>2</sup> große Proben normaler, tumorfreier Kolonschleimhaut und vier bis fünf ähnlich große Proben aus dem Tumorgewebe entnommen und innerhalb von 30 Minuten nach der Operation sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Parallel zu den Entnahmestellen wurden Gefrierschnitte angefertigt, um den Anteil der Tumorzellen in den Gewebeproben zu überprüfen. Für die weitere molekularpathologische Aufarbeitung wurden nur diejenigen Proben verwendet, die einen Tumoranteil von mindestens 70% enthielten.

Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem QIAamp-Tissue-Kit der Fa. Qiagen (Valencia, CA, USA). Dazu wurde das Frischmaterial in ca. 3 mal 3 mm große Stücke geschnitten, mit 220 µl ATL-Puffer und 24µl Proteinase K (25 mg/ml) versetzt und für 2-3 Tage bei 55 Grad Celsius

inkubiert. Anschließend wurde das lysierte Gewebe über das Säulensystem des Tissue-Kits mit AL-Puffer und dem Waschpuffer (AW-Puffer) aufgereinigt. Die DNA wurde bei 70°C mit Hilfe des AE-Puffers aus den Säulen gewaschen, und somit gleichzeitig in diesem gelöst. Die Reinheit und Konzentration der DNA wurde mit Hilfe eines Photometers überprüft.

### **2.2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Um die gewünschten DNA-Fragmente im Bereich der jeweils untersuchten Marker auf Mikrosatelliteninstabilitäten beurteilen zu können, wurden diese Abschnitte der Tumor- und Normal-DNA mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert.

Für die PCR wurden Reagenzien des DNA-Polymerase-Kits der Fa. Quiagen eingesetzt.

Dabei wurde die PCR jeweils mit einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt, und jeder Reaktionsansatz enthielt ca. 200 ng DNA. Die beiden Primer für das 3'- und das 5'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Stranges wurden auf 200 nM eingestellt und dem Ansatz je 0,5 µl zugesetzt.

Für die PCR wurden die nachfolgenden Reaktionsbedingungen (Tabelle 2) ausgewählt. Nach einer vierminütigen Denaturierungsphase bei 94 °C wurden je nach Primer 40 bzw. 35 Zyklen durchgeführt. Diese bestehen aus einem Denaturierungsschritt (1 Min. bei 94 °C), der Annealing-Phase (45 Sek. bei 55 bzw. 58°C) und der Elongationsphase (1 Min. bei 72°C). Abschließend erfolgt eine letzte siebenminütige Elongation bei 72°C.

Zur Überprüfung der PCR-Bedingungen, wurden von jedem Reaktionsansatz 2 Kontrollen mitgeführt. Eine Negativkontrolle zum Ausschluß einer Kontamination mit Fremd-DNA sowie eine Positivkontrolle, die DNA von hoher Qualität enthielt. Die PCR-Produkte wurden in einem Agarosegel nachgewiesen und bei gelungener Amplifikation der DNA-Fragmente zur genaueren Analyse auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurden die Gele jeweils mit der Fertiglösung SequaGel-8 (Fa. Biozym, Hessisch-Oldendorf) hergestellt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel einer Silberfärbung unterzogen und in einem Gelrockner auf Whatman-Papier vakuumgetrocknet.

### 2.2.3.3 Mikrosatellitenanalyse

Für die Mikrosatellitenanalyse wurden 8 Dinukleotid-Marker (CA)<sub>n</sub> und 1 Mononukleotid-Marker (A)<sub>n</sub> untersucht, die unterschiedliche Loci auf insgesamt 4 Chromosomen erfaßten (Tabelle 2). Dabei werden mit den Dinukleotid-Markern die Gene FHIT (auf 3p14.2, Le Beau et al., 1998), PTEN (auf 10q23, Mutter et al., 2001) und hMSH6 (auf 2p16, Wagner et al., 2001) amplifiziert und mit dem Mononukleotid-Marker BAT 25 ein Teil der Intronsequenz des c-kit-Oncogens (auf 4q12, Parson et al., 1995). Die Instabilität der untersuchten Mikrosatellitenmarker äußert sich in einem veränderten Laufverhalten der Tumor-DNA im Vergleich zur Normal-DNA des gleichen Patienten. Dabei führen die in der Tumor-DNA eingeführten Änderungen der repetitiven Sequenzen, sog. Mikrosatelliten, zu einem Motilitäts-Shift der Banden.

Darüber hinaus wurden diejenigen Fälle, bei denen keine Mikrosatelliteninstabilitäten in Bereich der untersuchten Marker vorlag, auf einen möglichen Verlust der Heterozygotie (LOH) im Bereich der untersuchten Genorte analysiert. Dabei wurde ein solcher LOH als sichtbarer Verlust der Bandenintensität von mindestens 50% im Vergleich zur Normal-DNA definiert.

**Tabelle 2:** Primereigenschaften und PCR-Bedingungen.

Marker	Lokalisation	Primersequenz	Annealing, °C	Zyklen	Repeat
D3S1234	3p21.1-14.2	5'CCTGTGAGACAAAGCAAGAC 5'GACATTAGCCACAGGGCTAA	58	35	(CA) <sub>n</sub>
D3S1300	3p21.1-14.2	5'AGCTCACATTCTAGTCAGCCT 5'GCCAATTCCCCAGATG	58	35	(CA) <sub>n</sub>
D3S1313	3p21.1-14.2	5'CCCCTTGAAAATCACTG 5'CCATGAATAAGCCTTGCC	55	40	(CA) <sub>n</sub>
D10S209	10q24-q26	5'CAAATGTGCTCATATCCTGC 5'CCCATCAGTAGTAAAGGGGC	58	40	(CA) <sub>n</sub>
D10S212	10pter-10qter	5'GAAGTAAAGCAAGTTCTATCCACG 5'TCTGTGTACGTTGAAAATCCC	58	40	(CA) <sub>n</sub>
D10S212	10q22-q23	5'TGGCATCATTCTGGGGA 5'GCTTTACGTTTCTTCACATGGT	58	40	(CA) <sub>n</sub>
D10S587	10pter-10qter	5'CCCAGATTCATGGCTTTC 5'TTCTGCTGACACGGGC	58	40	(CA) <sub>n</sub>
D2S123	2p16	5'AAACAGGATGCCTGCCTTTA 5'GGACTTTCCACCTATGGGAC	58	35	(CA) <sub>n</sub>
BAT-25	Intron c-kit	5'TCGCCTCCAAGAATGTAAGT 5'TCTGCATTTAACTATGGCTC	58	35	(A) <sub>n</sub>

### **2.2.3.4 Komparativ genomische Hybridisierung (CGH)**

Die komparativ genomische Hybridisierung beruht auf dem Prinzip der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung. Dabei stellt die aus dem Tumorgewebe extrahierte und zu analysierende genomische Tumor-DNA die sog. Test-DNA dar, während die zweite DNA-Probe aus normaler (gesunder) DNA als sog. Referenz-DNA dient. Beide DNA-Probe werden in einem Mischungsverhältnis von 1 zu 1 auf normale Metaphasen-Chromosomen in Anwesenheit unmarkierter humaner Cot-1-DNA, die unerwünschte Hybridisierung zentromerischer und heterochromatischer Regionen verhindern soll (Kallioniemi et al., 1992 und 1994 b,c) hybridisiert.

Die zu gleichen Anteilen eingesetzten Test- und Referenz-DNA-Fragmente konkurrieren um die Bindungsstellen der entsprechenden homologen DNA-Sequenzen normaler Metaphasechromosomen. Je nach Kopiezahl der zugehörigen DNA-Sequenz in den beiden DNA-Proben werden die chromosomalen Anbindungsstellen entweder von der Test-DNA (Amplifikation der Test-DNA) oder von der Referenz-DNA (Deletion der Test-DNA) besetzt. Diese unterschiedliche Hybridisierungsrate wird durch vorherige Markierung der Test- und Referenz-DNA mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen sichtbar gemacht. Die Signalstärke entlang der Achse der einzelnen Chromosomen wird bildanalytisch gemessen und verrechnet sowie anschließend mit einem Profil der Fluoreszenzratio dargestellt. Im Normalfall liegen gleiche Abschnitte der Test- und der Referenz-DNA in gleicher Kopiezahl vor. Für diese Abschnitte liegen dann auch gleiche Fluoreszenzwerte vor, und die Fluoreszenzratio ergibt den Wert 1.

#### **2.2.3.4.1 Hybridisierung und Hybridisierungsnachweis**

Die Markierung der DNA-Fragmente erfolgt mittels Nick-Translation für die Test-DNA mit dem sog. Biotin-Nick-Translationsmix und für die Referenz-DNA mit dem DIG-Nick-Translationsmix der Fa. Boehringer-Mannheim. Dabei wurde jeweils 1µg der Test- und Referenz-DNA eingesetzt (für weitere Einzelheiten wird auch das ausführliche Protokoll des Herstellers verwiesen).

Je 30 µl der biotinylierten Test-DNA sowie 25 µl der digoxigenierten Referenz-DNA wurden mit 30 µl Cot1-DNA und 5 µl Lachs-Sperma-DNA gemischt und mit 300 µl 100%-igem ETOH gefällt.

Diese Lösung wurde bei 80°C für 30 Minuten präzipitiert und anschließend für 30 Minuten bei 13 000 rpm abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde bei 37 °C getrocknet und anschließend in 5 µl deionisiertem Formamid resuspendiert. Nach Zugabe von 5 µl Mastermix (20%-iges Dextransulfat in 2fach SSC) wurden die Proben bei 75°C für 5 Minuten im Wasserbad denaturiert und anschließend für 45 Minuten bei 37°C inkubiert.

Zur Hybridisierung wurden die DNA-Proben vollständig auf die Objektträger mit den Metaphasenchromosomen (Fa. Vysis) aufgetropft. Danach wurde ein 18 x 18 mm großes Deckgläschen luftblasenfrei aufgelegt und mit Fixogum luftdicht abgeklebt. In einer Stahlwanne schwimmend wurden die Präparate bei 37°C für 4-5 Tage hybridisiert.

Anschließend wurden die Objektträger in 50 %-igem Formamid/2fach SSC (bei 45°C) und 0,1fach SSC (bei 60°C) stringent gewaschen, um die unspezifischen Bindungen zu lösen. Die biotinylierten Fragmente der Tumor-DNA (Test-DNA) und die digoxigenierten Fragmente der Normal-DNA (Referenz-DNA) wurden mit Avidin-FITC (1:200; grüne Fluoreszenz) und Antidigoxigenin-TRITC (1:40; rote Fluoreszenz, Fa. Boehringer Mannheim) gleichzeitig nachgewiesen, nachdem zuvor unspezifische Bindungsstellen mit 3%-igem Rinderserum-Albumin (BSA) abgesättigt wurden. Die Metaphasen-Chromosomen wurden anschließend für die Karyotypisierung mit DAPI (4,6 Diamidino-2-Phenylindol) für 10 Minuten gegengefärbt (0,8 µg/ml) und anschließend mit Antifading-Puffer (Fa. Vector) eingedeckelt.

#### **2.2.3.4.2 Bildanalytische Auswertung der Hybridisierungsreaktion**

Die weitere Analyse der fluoreszenzmarkierten Metaphasen-Präparate wurde an einem Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss-Axiophot) durchgeführt. An dieses waren ein externes Filterrad, das über eine Auswertungs-Software gesteuert wurde, und eine CCD-Videokamera, zur Übertagung der aufgenommenen Bilder angeschlossen. Die digitale Bildanalyse der aufgenommenen FITC- und TRITC-Fluoreszenz sowie der DAPI-Färbung erfolgte mit dem Hard- und Softwarepaket der Firma Applied Imaging (Version 2.21). Bei jedem untersuchten Kolonkarzinom wurden durchschnittlich 13 Metaphasen (range: 10-15) ausgewertet. Dabei wurden nur die Metaphasen aufgenommen, bei denen die Anzahl der Chromosomen möglichst hoch war, die einzelnen der Chromosomen sich nicht überkreuzten oder zu klein waren.

Die grüne Fluoreszenz der FITC-markierten Chromosomenabschnitte (Test-DNA) und die rote Fluoreszenz der TRITC-markierten Chromosomenabschnitte (Referenz-DNA) sowie die DAPI-gefärbten Chromosomen wurden getrennt von einander aufgenommen.

Nachdem die Centromere und die Achsen der Chromosomen überprüft wurden erfolgt die genaue Karyotypisierung. Danach erhält man das Fluoreszenzratio-Profil, das sich aus den verrechneten FITC- und TRITC-Markierungen ergibt. Für den Fall, daß die Test- und die Referenz-DNA aus dem gleichen Gewebe stammen, liegen gleiche Abschnitte der Test- und der Referenz-DNA in gleicher Kopiezahl vor. Somit ergeben sich dann auch für beide DNA's gleiche Fluoreszenzwerte, und die Fluoreszenzratio ergibt folglich den Wert 1. Bei einem Verlust (sog. „loss“) von Abschnitten der Tumor- DNA (z.B. durch die Deletion bestimmter Gene) überwiegt die Rotfluoreszenz der hybridisierten Referenz-DNA, und das Ratio-Profil sinkt unter den Wert 1. Bei einem Zugewinn (sog. „gain“) von DNA-Sequenzen der Tumor-DNA (z.B. durch die Amplifikation bestimmter Gene) überwiegt die Fluoreszenz der Tumor-DNA (grün) und das Ratio-Profil steigt auf einen Wert größer als 1. Dabei wurden lediglich Veränderungen gewertet, die den unteren Schwellenwert von 0,75 bzw. den oberen von 1,25 des Fluoreszenzratio-Profiles unter- bzw. überschritten. Eine Überschreitung des Ratio-Profiles über den Wert 2 wurde als sog. Hyperamplifikation gewertet (du Manoir et al., 1995a,b; Piper et al., 1995; Lundsteen et al., 1995).

Aufgrund CG-reicher Regionen sind die kurze Arme von Chromosom 1 (1p-ter) Chromosom 6 und 17 sowie die gesamten Chromosomen 19 und 22 nur eingeschränkt beurteilbar (Kallioniemi et al., 1994a; Isola et al., 1995). Daher wurden diese Regionen sowie das X- und das Y-Chromosom bei der Analyse nicht berücksichtigt. Da auch die perizentromeren Regionen während der Hybridisierungsreaktionen durch die Cot1-DNA geblockt werden, und im Bereich der Telomeren die Fluoreszenzintensität graduell abnehmen, wurden diese Chromosomenabschnitte von der Auswertung ebenfalls ausgeschlossen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Komparative genomische Hybridisierung (CGH)

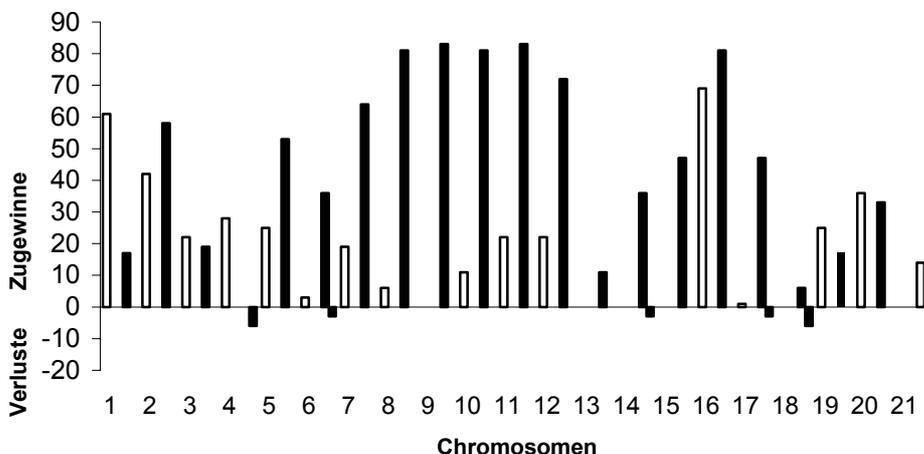
##### 3.1.1 Häufigkeit genetischer Aberrationen in kolorektalen Karzinomen

Bei allen 36 untersuchten Kolonkarzinomen konnten in der CGH-Analyse, mit einer mittleren Anzahl von 11 Zugewinnen (range: 1-33), DNA-Veränderungen nachgewiesen werden (Tabelle 3), während Verluste sehr viel seltener auftraten (range: 0-2).

Ohne Ausnahme waren alle Chromosomen betroffen, allerdings mit deutlich unterschiedlicher Häufigkeit (Abbildung 2). Die häufigsten in der CGH-Analyse entdeckten Zugewinne traten auf dem langen Arm der Chromosomen 2, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16 und 22 auf.

Eine umschriebene high-level Amplifikation ließ sich bei 38,8% (n=14) der untersuchten Kolonkarzinome im Bereich des langen Arms von Chromosom 20 nachweisen wobei in 2 Fällen zusätzlich auch der kurze Arm betroffen war (Tabelle 4). Weitere high-level Amplifikationen fanden sich nur in geringer Anzahl auf den Chromosomen 16q (2 Fälle), 16p (1 Fall), 17q (1 Fall), 21q (1 Fall) und 22q (1 Fall).

**Abbildung 2:** Prozentualer Anteil von Zugewinnen und Verluste auf den einzelnen Chromosomen. Die hellen Balken zeigen die Veränderungen an den kurzen und die dunklen auf den langen Armen.

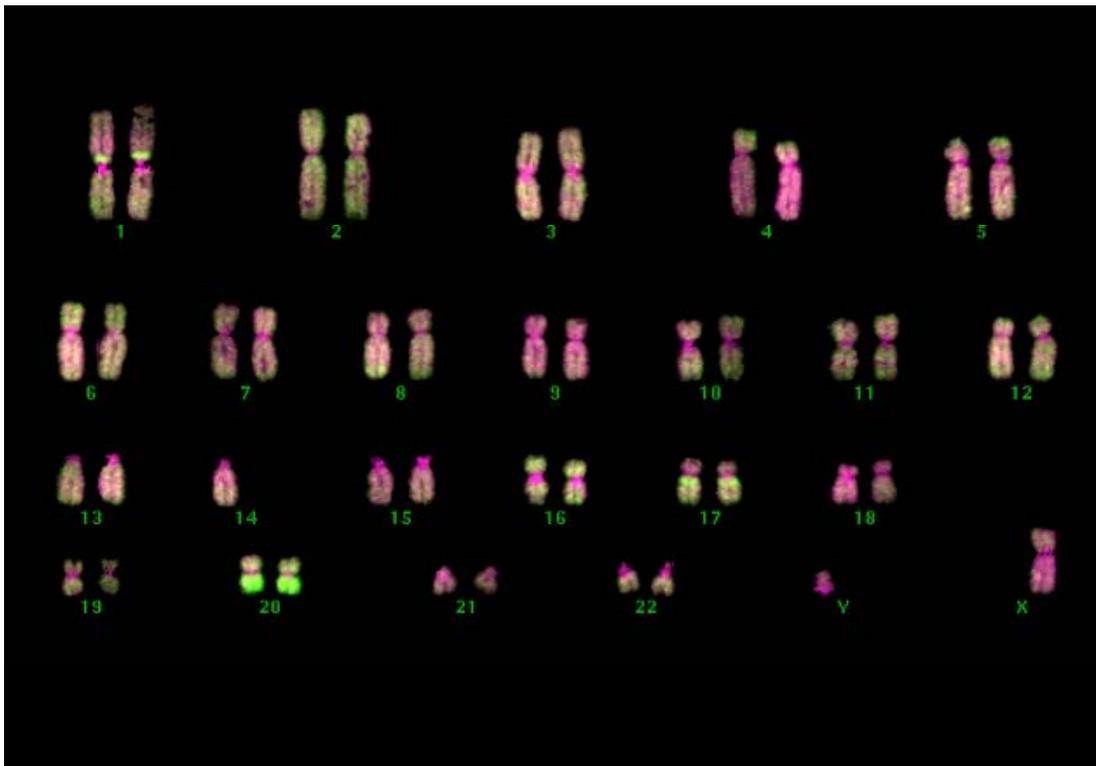


**Tabelle 3:** DNA-Veränderungen bei 36 Kolonkarzinomen in der CGH-Analyse.

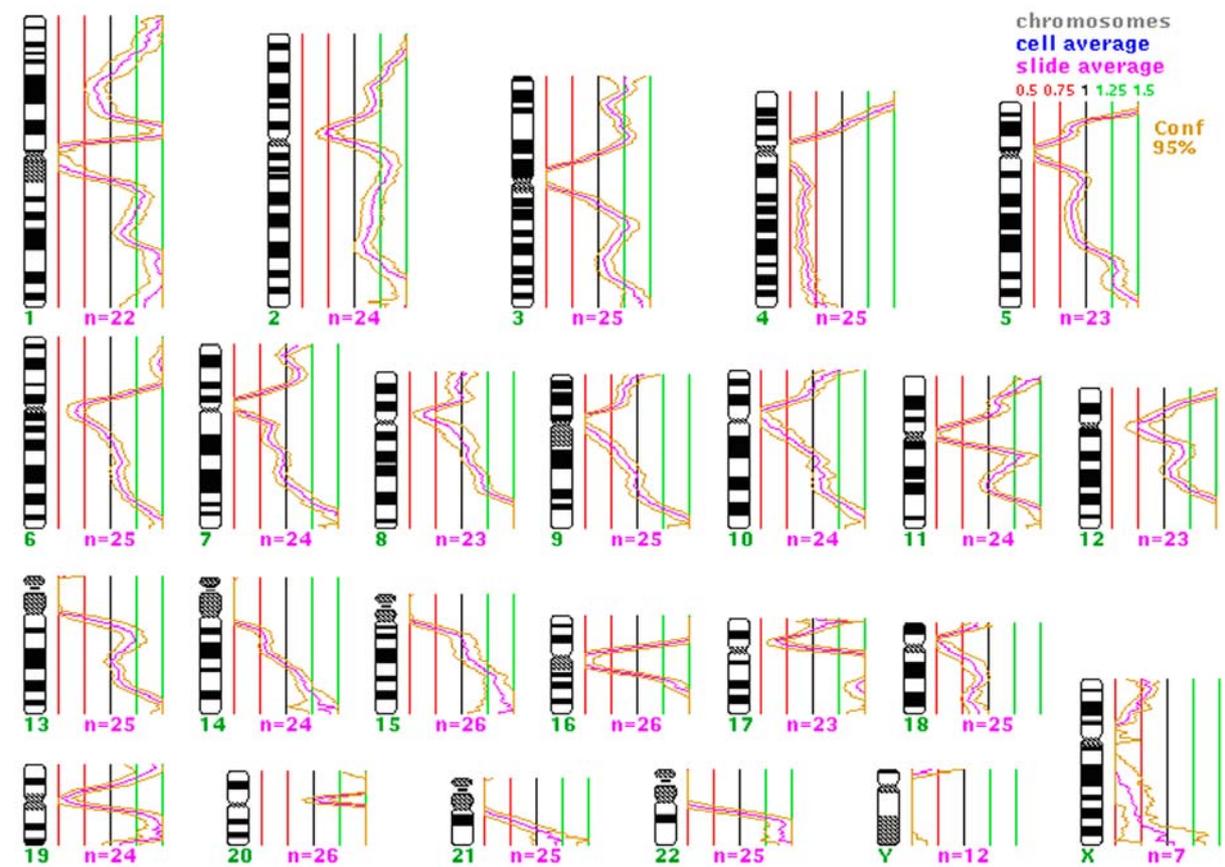
Fall	Zugewinne	Verluste
Col 14	2p16-25, 2q23-32, 2q35-36, 7p13-22, 7q35-36, 8q21.3-24.3, 10q22-26, 11p15, 11q23-25, 13q13-34, 16p13.1-13.3, 16q22-24, <b>20q11.2-13.3</b> , 20p12-13	
Col 16	5p15.3, 8q24.2-24.3, 9q34, 11q23-25, 12p13, 12q24.1-24.3, 15q25-26, 16q23-24, 20q12-13.3	
Col 36	1q32-41, 2q35-37, 3q13.3-29, 5q34-35, 6q24-26, 7q13-22, 8q23-24.2, 9q31-34, 10q24-26, 12q23-24.3, 16q23-24, 17q12-23	
Col 40	3q13.3-24, 5q31-35, 7q34-36, 9q31-34, 10p23-26, 11p15, 11q23-25, 14q31-32, 16p13.1-13.3, 16q23-24, 17q25, 19p13.3, 20q12-13, 22q13	
Col 42	3p14-26, 3q13.3, 8q24.1-24.3, 9q32.34, 11q23-25, 13q12-21, 16p13.1-13.3, 17q12-21, 20q13.2-13.3	
Col 44	1p32-36, 2p24-25, 5q33-35, 6p24-25, 6q26-27, 7q33-36, 8q23-24.3, 9q32-34, 10q25-26, 11q23-25, 12q23-24.3, 13q32-34, 14q31-32, 15q22-25, 16p 12-13.3, 16q22-24, 19p13.2-13.3, 19q13.1-13.3, <b>20q12-13.3</b> , 22q11.2-13	
Col 46	1p32-35, 2q33-36, 3p24-26, 5q34-35, 6p23-25, 6q25-27, 7q32-36, 9q21-33, 10q22-24, 11q22-23, 12q21-23, 14q21-32, <b>16q13-22</b> , 17q12-24, 19q13.1-13.3, <b>20q13.2</b> , <b>21q22</b> , <b>22q13</b>	
Col 50	1p31-36.3, 1q31-44, 2p21-25, 2q34-37, 6q24-27, 7q313-36, 8q23-24.3, 9q13-34, 10q24-26, 11q23-25, 12q23-24.3, 13q31-34, 14q21-32, 15q21-26, <b>16p12-13.3</b> , <b>16q21-24</b> , 20q11.2-13.3, 22q11.2-13	
Col 52	2q34-37, 4p15.3-16, 5q34-35, 6q22-27, 7q31-36, 8q24.1-24.3, 9q22-34, 10p13-15, 12q23-24.3, 13q32-34, 14q21-32, 15q22-26, 16p12-13.3, 16q13-24, <b>17q24-25</b> , 18q12-22, 20p12-13, 20q12-13.3, 22q12-13	
Col 54	1p32-36.3, 2p21-25, 2q35-37, 3p14-26, 3q28-29, 5q33-35, 6q25-27, 7p13-22, 7q31-36, 8q24.1-24.3, 9q31-34, 10q24-26, 11p14-15, 11q12-13, 12q23-24.3, 13q12-14, 14q31-32, 16p12-13.3, 16q22-24, 17p12-13, 17q12-25, 19p13.1-13.3, 19q12-13.4, 20p11.1-13, <b>20q11.2-13.3</b>	
Col 58	2p21-25, 2q33-37, 3p13-26, 3q13.3-24, 4p16, 15p15.1-15.3, 5q31-35, 7p14-21, 7q31-36, 8q23-24.3, 9q22-34, 10p12-15, 10q21-26, 11p14-15, 11q22-25, 12p12-13, 16q21-24, 20p11.2-13.3, 21q21-22	
Col 60	1q32-44, 2q35-37, 3p14-26, 5q31-35, 6q24-27, 7q32-36, 8q23-24.3, 9q22-34, 10q24-26, 11q22-25, 12q22-24.3, 13q31-34, 16p12-13.3, 16q21-24, 20p11.2-13, <b>20q12-13.3</b> , 21q21-22	4q12-28
Col 74	2q34-37, 5p15.2-15.3, 7q31-36, 8q22-24.3, 9q21-34, 10p12-15, 10q21-26, 11p12-14, 11q23-25, 12p12-13, 12q22-24.3, 16p12-13.3, 16q21-24, 20q11.2-13.3	
Col 76	2p21-25, 2q35-37, 3p14-26, 4p15.2-16, 5p15.2-15.3, 6q24-27, 7q31-36, 8q23-24.3, 13q32-34, 14q21-13.3, 15q22-26, 16p12-13.3, 16q13-24, 20p12-13, 20q12-13.3	17q11.2-25, 18q11.2-23
Col 78	2p22-25, 2q33-37, 4p16, 5p15.2-15.3, 5q31-35, 6q25-27, 7p13-22, 8p12-23, 8q21.3-24.3, 9q31-34, 10q24-26, 11q23-25, 12p12-13, 12q13-24.3, 15q22-26, 16q22-24, 17q24-25, 20p12-13, 20q11.2-13.3, 21q21-22	

Fall	Zugewinne	Verluste
Col 80	2q35-37, 4p16, 5p15.2-15.3, 5q34-35, 7q34-36, 8q24.1-24.3, 9q32-34, 10q25-26, 11p14-15, 11q23-25, 12q23-24.3, 15q22-26, 16p12-13.3, 16q22-24, 17q24-25, 20p12-13, <b>20q12-13.3</b> , 21q22	
Col 82	1p34.2-36.3, 4p16, 8q24.1-24.3, 9q32-34, 10q24-25, 12q23-24.2, 16p12-13.3, 16q22-24, 19q13.1-13.3, 20q11.2-13.2	
Col 84	1p63.1-36.3, 2p23-25, 2q37, 4p16, 7q36, 8q21.1-24.3, 9q31-34 10q 23-26, 11q23-35, 12p13, 16q23-24, 20q11.2-13.3	
Col 86	1p36.1-36.3, 1q32-42, 2q35-36, 3q27-29, 4p15.3-16, 5p15.1-15.3 5q34-35, 6p21.1-25, 6q25-27, 7q34-36, 8q23-24.3, 10q25-26 11q23-25, 12q23-24.3, 13q32-34, 16p12-13.3, 16q21-24, 17q 11.2-25, 19q 13.1-13.3, 20p11.2-13, <b>20q11.1-13.3</b>	4q12-33
Col 90	1p32-36.3, 1q32-42, 2p23-25, 5q31-34, 7q32-36, 8q23-24.3, 9q31-34, 10q24-26, 11q23-25, 12q23-24.2, 14q31, 16p13.1-13.3, 19p13.1-13.2, 19q13.1-13.3, 20q12-13.2, 22q12-13	6q12-16
Col 92	2p23-25, 2q36-37, 4p16, 6p21.3, 6q25-27, 7q34-36, 8q23-24.2, 9q31-34, 10q24-26, 11p15, 11q23-25, 12q23-24.3, 14q24-32, 16p13.1-13.3, 16q21-24, 17q21-25, <b>20q11.2-13.3</b>	
Col 96	1p34.1-36.3, 5q35, 7q32-36, 8q23, 10q24-26, 11q23-25, 12q23-24.2, 15q22-25, 16p13.2, 1812-21, 20q12-13.2, 22q12-13	
Col 102	1p33-36.2, 10q25-26, 11q23-25, 16p13.1-13.3, <b>20p11.2-13,</b> <b>20q11.2-13.3</b>	
Col 106	2p23-25, 2q35-37, 5q34-35, 7q36, 8q23-24.3, 9q22-34, 10q25-26, 11q23-25, 12p13, 12q22-24.3, 15q22-24, 16p13.1-13.3, 16q22-24, 17q24-25, 20p12-13, <b>20q12-13.3</b>	
Col 108	8q24.2-24.3, 9q32-34, 10q25-26, 11q23-25, 12q24.1-24.3, 15q24-26, 20q13.1-13.2	
Col 114	2p23-25, 2q35-37, 5q35, 7p14-22, 7q32-36, 8q12-24.3, 9q22-34, 10q24-26, 11q13, 12p13, 12q22-24.3, 14q31, 16p12-13.3, 16q22-24, 20q11.2-13.3	18q22
Col 116	1p36.1-36.2, <b>20p11.2-13, 20q11.2-13.3</b>	
Col 118	1q31-41, 2p13-25, 2q33, 5p15.1, 6q23-27, 7q31-36, 8q23-24.3, 9q22-34, 10q24-26, 15q22-25, 16q22-24, <b>20q11.2-13.3</b>	14q11.2-21
Col 124	1p33-36.3, 3p14-21, 5q23-35, 8q24.1-24.3, 9q32-34, 10q26, 11q23-24, 15q21-26, 16p13.3-13.1, 16q23-24, 17q24, 19q13.1-13.2, 20q11.2-13.1	
Col 128	1p34.2-36.3, 2q37, 8q24.1-24.2, 9q34, 10q26, 11q23-24, 12q23-24.3, 14q31, 15q21-25, 16p13.1-13.3, 16q22-24, 17q12-24, 20q11.2-13.3	
Col 134	1p34.1-36.3, 9q34, 12q23-24.2, 15q22-24, 16q23-24, 17q24-25, 19q13.1-13.3, 20q12-13.2	
Col 136	1p32-36.3, 5q31-35, 8q23-24.1, 9q32-34, 11q23-25, 12q23-24.2 14q31, 15q22-25, 16p12-13.3, 17q21-24, 19q13.1-13.3	
Col 138	1p33-36.3, 2p22-25, 2q35-37, 4p16, 5p15.3, 8p24.1-24.3, 9q31-34, 10q24-26, 11p14-15, 11q23-25, 12q22-24.3, 14q23-32, 15q22-25, 16q22-24, 17q21-24, 20q11.2-13.2	
Col 142	2p23-25, 5q31-34, 9q31-34, 10q25-26, 11q23-24, 12q23-24.2, 15q22-25, 16p13.1-13.3, 16q22-24, <b>20q11.2-13.3</b>	
Col 144	3p13-26, 3q26.3-29, 7p14-22, 7q21-36, 8q21.3-24.3, 9q32-34 10q24-26, 11q23-25, 12q24.1-24.3, 13q12-21, 16p13.1-13.3 16q22-24, 20p12-13, <b>20q11.2-13.3</b> , 22q 11.2-13	
Col 216	2q36-37, 5q31-35, 7p15, 7q31-36, 8q21.3-24.3, 10q24-26 11q23-25, 16p12-13.3, 16q21-24	

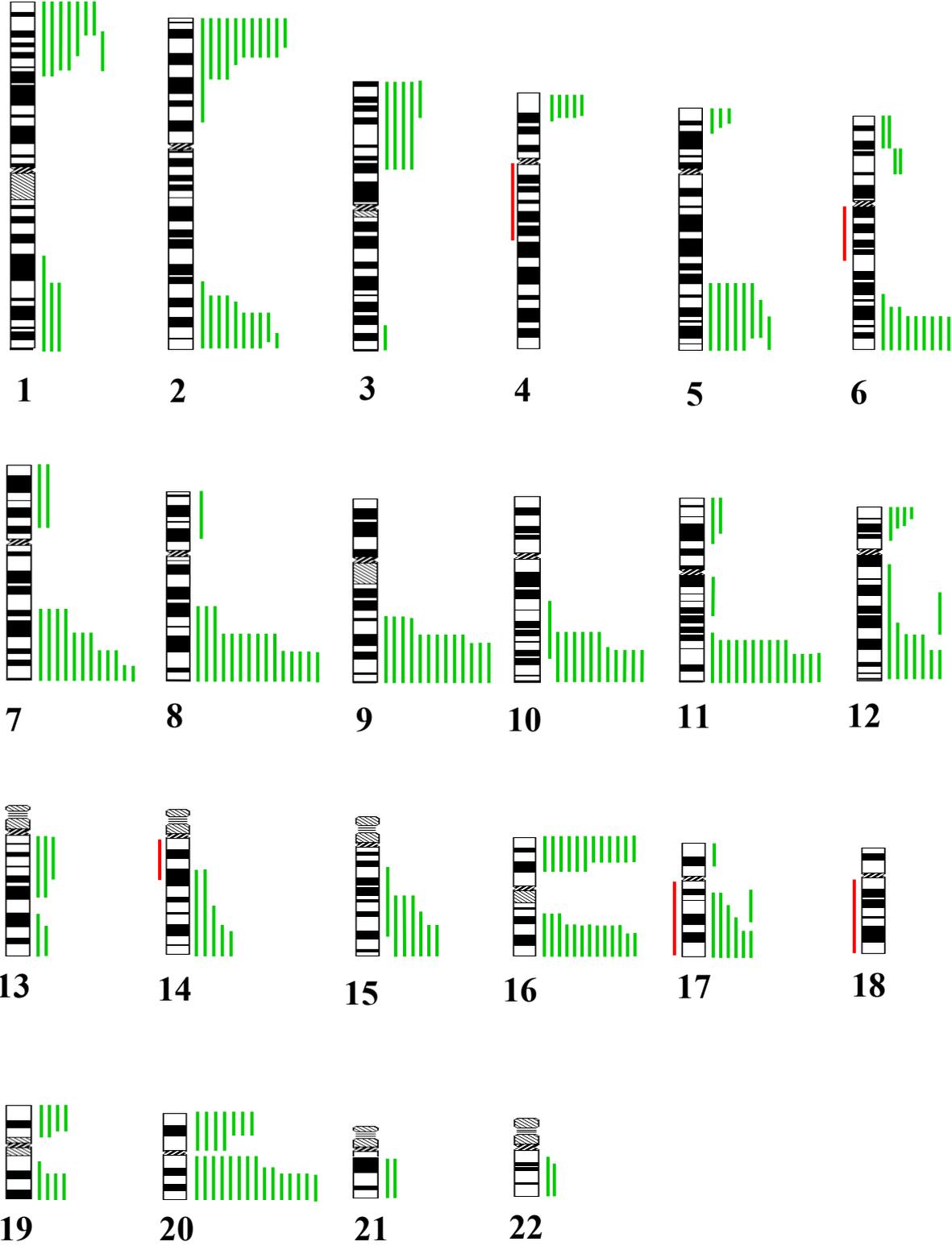
**Abbildung 3:** RATIO (FITC/TRITC) CGH-Karyogramm.



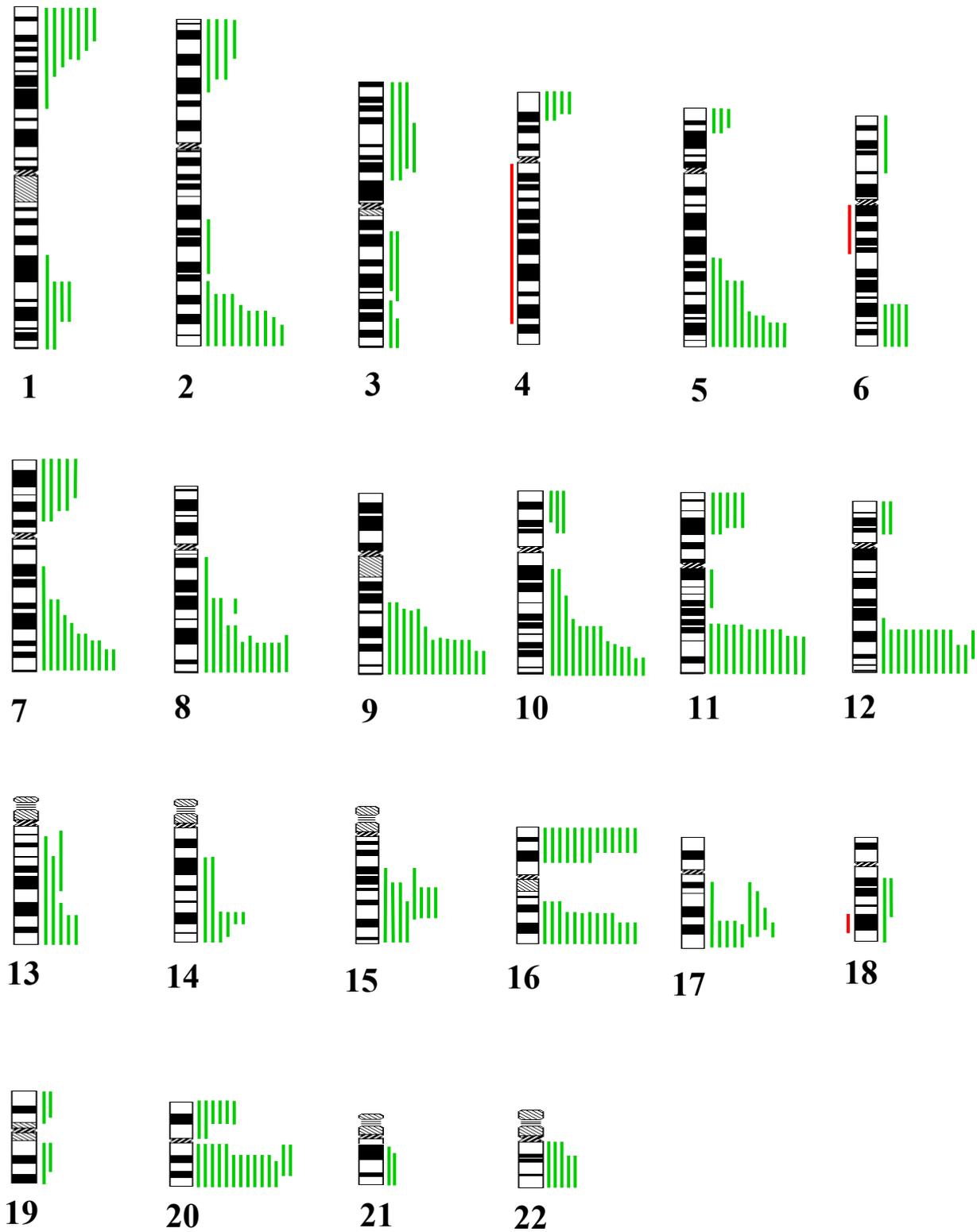
**Abbildung 4:** CGH-Summenkaryogramm. Aus 13 Metaphasen errechnete mittlere Verhältnisprofile.



**Abbildung 5:** Zugewinne (grüne Balken) und Verluste (rote Balken) an Chromosomen von kolorektalen Karzinomen ohne Lymphknotenmetastasen (n = 18).



**Abbildung 6:** Zugewinne (grüne Balken) und Verluste (rote Balken) an Chromosomen von kolorektalen Karzinomen mit Lymphknotenmetastasen (n = 18).



**Tabelle 4:** Die häufigsten in der CGH-Analyse entdeckten Zugewinne und high-level-Amplifikationen sowie sämtliche Verluste bei 36 Kolonkarzinomen.

<b>Zugewinne</b>		<b>High-level Amplifikation</b>		<b>Verluste</b>	
Lokalisation <sup>1</sup>	n (%)	Lokalisation <sup>1</sup>	n (%)	Lokalisation	n (%)
20q 12-13	33 (92%)	20q 11-13	14 (39%)	4q 12-28	2 (6%)
16q 22-24	29 (81%)	20p 11-13	2 (6%)	18q 22	2 (6%)
9q 31-34	29 (81%)	16q 22	2 (6%)	6q 12-16	1 (3%)
8q 23-24	29 (81%)	16p 12-13	1 (3%)	14q 11-21	1 (3%)
10q 24-26	28 (78%)	17q 24-25	1 (3%)	17q 11-25	1 (3%)
11q 23-25	27 (75%)	21q 22	1 (3%)		
12q 23-24	25 (69%)	22q 13	1 (3%)		
16p 12-13	24 (67%)				
7q 31-36	22 (61%)				
2q 35-37	20 (56%)				

<sup>1</sup> minimale gemeinsame Regionen

### 3.1.2 Korrelation mit histopathologischen Parametern

Hinsichtlich der Häufigkeit und Verteilung der unterschiedlichen DNA-Veränderungen ließen sich bezüglich der Lymphknotenmetastasen keine signifikanten Unterschiede nachweisen. So traten bei Tumoren ohne Lymphknotenmetastasierung und solchen der Stadien pN1 oder pN2 DNA-Veränderungen in ähnlicher Frequenz und Verteilung auf (Tabelle 5, Abb. 5 und 6).

In Bezug auf die Invasionstiefe zeigte sich allerdings, daß alle Tumoren die einen Verlust von genetischem Material aufwiesen sich auch in einem fortgeschrittenen Tumorstadium (pT3/pT4) befanden. Ebenso zeigte sich, daß es sich bei den Karzinomen mit einem Zugewinn in einem höheren Prozentsatz um pT3/pT4-Stadien handelte als um Frühkarzinome bzw. wenig fortgeschrittene Tumoren (pT1/pT2).

Wie bei den Lymphknotenmetastasen konnte man auch das Grading der Tumoren nicht mit bestimmten genetischen Veränderungen korrelieren. Unter den untersuchten Fällen fanden sich lediglich G2 bzw. G3 Tumoren, die in gleicher Verteilung zahlreiche wie auch wenige Zugewinnen aufwiesen. Tumoren mit Verlusten waren allerdings alle im Stadium G2.

**Tabelle 5:** Korrelation der häufigsten DNA-Veränderungen mit histopathologischen Parametern.

	Genort	Invasionstiefe		Lymphknotenbefall		Differenzierungsgrad	
		pT1/pT2 (n=5) n (%)	pT3/T4 (n=31) n (%)	pN0 (n=18) n (%)	pN1/N2 (n=18) n (%)	G2 (n=23) n (%)	G3 (n=13) n (%)
<b>Verlust</b>	4q 12-28	-	2 (6%)	1 (6%)	1 (6%)	2 (9%)	-
	18q 22	-	2 (6%)	1 (6%)	1 (6%)	2 (9%)	-
	6q 12-16	-	1 (3%)	1 (6%)	-	1 (4%)	-
	14q 11-21	-	1 (3%)	1 (6%)	-	1 (4%)	-
	17q 11-25	-	1 (3%)	1 (6%)	-	1 (4%)	-
<b>Zugewinn</b>	20q 12-13	5 (100%)	28 (90%)	16 (89%)	17 (94%)	20 (87%)	12 (92%)
	16q 22-24	3 (60%)	26 (84%)	14 (87%)	15 (83%)	17 (74%)	12 (92%)
	9q 31-34	3 (60%)	26 (84%)	14 (87%)	15 (83%)	17 (74%)	11 (85%)
	8q 23-24	1 (20%)	28 (90%)	13 (72%)	16 (89%)	19 (83%)	9 (69%)
	10q 24-26	3 (60%)	25 (81%)	14 (87%)	14 (78%)	17 (74%)	11 (85%)
	11q 23-25	3 (60%)	24 (77%)	14 (87%)	13 (72%)	19 (83%)	10 (77%)
	12q 24-24	3 (60%)	22 (71%)	11 (61%)	14 (78%)	14 (61%)	10 (77%)
	16p 12-13	3 (60%)	21 (68%)	10 (56%)	14 (78%)	17 (74%)	7 (54%)
	7q 31-36	1 (20%)	21 (68%)	10 (56%)	12 (67%)	15 (65%)	8 (62%)
	2q 35-37	1 (20%)	19 (61%)	10 (56%)	19 (56%)	12 (52%)	9 (69%)

## **3.2 Mikrosatelliteninstabilität (MSI)**

### **3.2.1 MSI-Häufigkeit im kolorektalen Karzinom**

Während bei 86% (n=31) der untersuchten Tumoren keine MSI nachweisbar war, konnte bei 5 Tumoren bei mindestens einem der untersuchten Marker eine MSI nachgewiesen werden. Bei 3 dieser Tumoren waren je 1 locus, 3 loci oder 6 loci betroffen und bei 2 weiteren Tumoren je 7 loci (Tabelle 6). Somit konnte bei 4 Tumoren (11%) definitionsgemäß eine hohe MSI (> 30% der untersuchten Marker instabil) nachgewiesen werden, während 1 Tumor eine niedrige MSI (< 30% der untersuchten Marker instabil) aufwies (Tabelle 6).

Mit jedem der verwendeten Markern konnte in mindestens einem Fall (range: 1-4) eine MSI nachgewiesen werden. Die meisten Veränderungen fanden sich im PTEN (14%) und FHIT-Locus (11%), für die allerdings auch mindestens 3 Marker verwendet wurden. Für den MSH6-Locus und das Intron-c-kit konnte mit je einem Marker in 9% bzw. 6% eine MSI gezeigt werden.

**Tabelle 6:** Verteilung der MSI und LOH bei 36 untersuchten Kolonkarzinomen mit 9 unterschiedlichen Markern.

Lfd. Nr.	D3S1313	D3S1300	D3S1234	D10S209	D10S212	D10S215	D10S587	BAT-25	D2S123
Col 14	2	1	1	1	2	2	2	1	1
Col 16	1	2	2	2	2	2	2	1	2
Col 26	2	1	1	2	2	2	2	1	2
Col 36	2	1	1	2	1	2	1	1	2
Col 40	2	1	1	2	2	2	2	1	1
Col 42	1	2	2	1	2	1	2	2	1
Col 44	MSI	1	MSI	MSI	MSI	2	MSI	MSI	MSI
Col 46	MSI	MSI	MSI	2	MSI	2	MSI	MSI	MSI
Col 50	1	2	2	1	1	2	2	1	2
Col 52	2	2	2	1	1	1	2	1	2
Col 54	2	2	2	LOH	2	LOH	1	1	2
Col 58	1	2	2	1	2	2	2	1	1
Col 60	1	2	2	1	1	2	2	2	1
Col 74	2	2	2	1	2	2	2	1	2
Col 76	1	1	2	1	2	2	2	1	2
Col 78	1	2	2	1	2	1	2	1	1
Col 80	2	2	2	1	2	2	2	1	1
Col 82	1	1	2	1	1	2	2	1	1
Col 84	MSI	MSI	MSI	1	MSI	2	MSI	2	MSI
Col 86	1	MSI	2	1	2	MSI	MSI	2	LOH
Col 90	1	2	1	2	2	LOH	2	1	2
Col 92	2	2	2	2	2	2	2	1	1
Col 96	1	2	2	2	2	2	2	1	1
Col 102	2	2	2	1	2	MSI	1	1	1
Col 106	2	2	2	2	1	2	2	1	2
Col 108	1	2	2	2	2	1	2	1	2
Col 114	1	2	2	2	2	2	2	1	1
Col 116	1	2	2	2	2	2	1	1	2
Col 118	1	1	2	2	1	2	1	1	2
Col 124	1	1	2	2	2	2	2	1	2
Col 128	1	1	2	2	2	2	2	1	2
Col 134	1	1	2	2	1	2	2	1	2
Col 136	2	1	2	2	2	2	2	1	1
Col 138	1	1	2	2	1	2	1	1	1
Col 142	2	1	2	2	2	2	2	1	1
Col 144	1	1	2	2	1	2	2	1	1
Col 216	2	2	2	2	1	2	2	1	2

1: homozygot

2: heterozygot

### 3.2.2 Korrelation der MSI mit histopathologischen Parametern

Von den 36 untersuchten Tumoren zeigten nur 5 eine MSI (14%). Davon befand sich ein Tumor (MSI low) im pT2-Stadium und 4 Tumoren (MSI high) im pT3-Stadium. Bezüglich des Alters der Patienten fand sich, daß bis auf eine Ausnahme alle Patienten mit einer MSI älter als 60 Jahre waren. Ebenso zeigte sich für das Geschlecht, daß bis auf eine Ausnahme nur Männer von einer MSI betroffen waren. Auf Grund der geringen Fallzahl der MSI positiven Tumoren lassen sich die Ergebnisse allerdings nicht als statistisch signifikant einstufen (Tabelle 7).

**Tabelle 7:** Mikrosatelliteninstabilität (MSI) und Korrelation mit histopathologischen Parametern bei 36 untersuchten Kolonkarzinomen.

	(n)	MSS (0 loci)/ MSI low (<30%) (n=32)	MSI high (>30%) (n=4)
<b>Differenzierungsgrad</b>			
G1/G2	23	21 (66%)	2 (50%)
G3/G4	13	11 (34%)	2 (50%)
<b>pT-Kategorie</b>			
pT1/pT2	6	6 (19%)	-
pT3/pT4	30	26 (81%)	4 (100%)
<b>pN-Kategorie</b>			
Nodal negativ	18	15 (46%)	3 (75%)
Nodal positiv	18	17 (53%)	1 (25%)

### 3.3 Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen

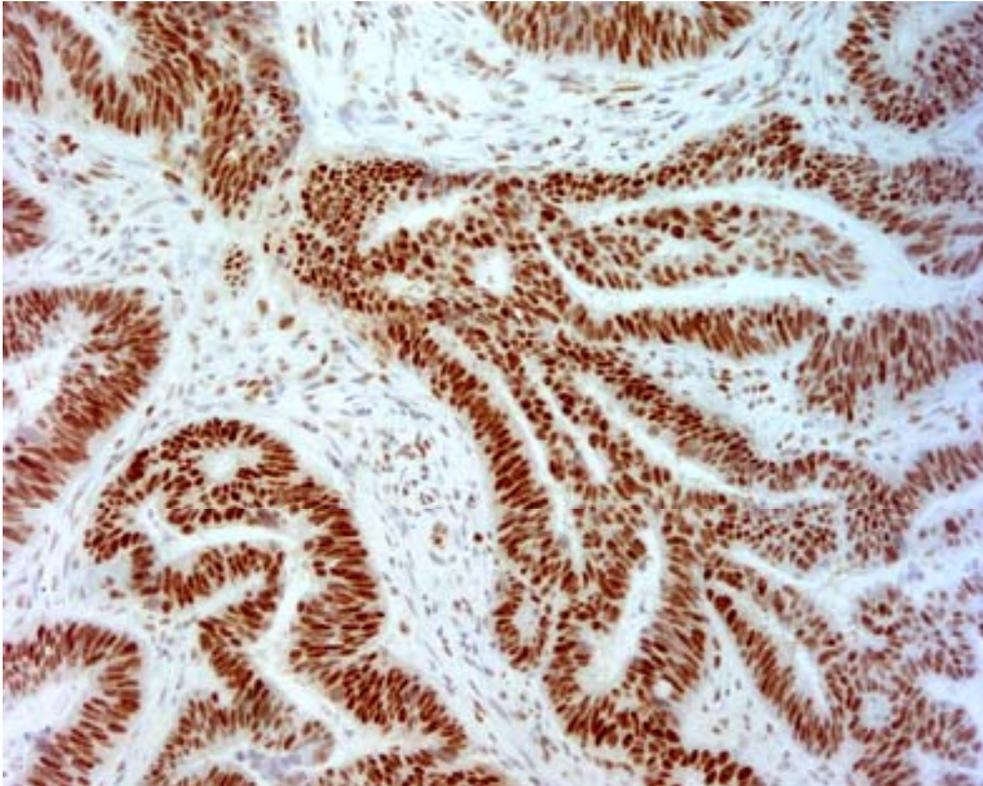
Von den 36 untersuchten kolorektalen Karzinomen fand sich bei einem Tumor ein Verlust der MLH1-Expression (Col 44) in den Tumorzellen und bei zwei Tumoren ein Verlust der MSH2-Expression (Col 46 und 50).

Tabelle 9 zeigt eine Zusammenfassung der nachgewiesenen molekularpathologischen und immunhistochemischen Veränderungen in sechs ausgewählten Fällen.

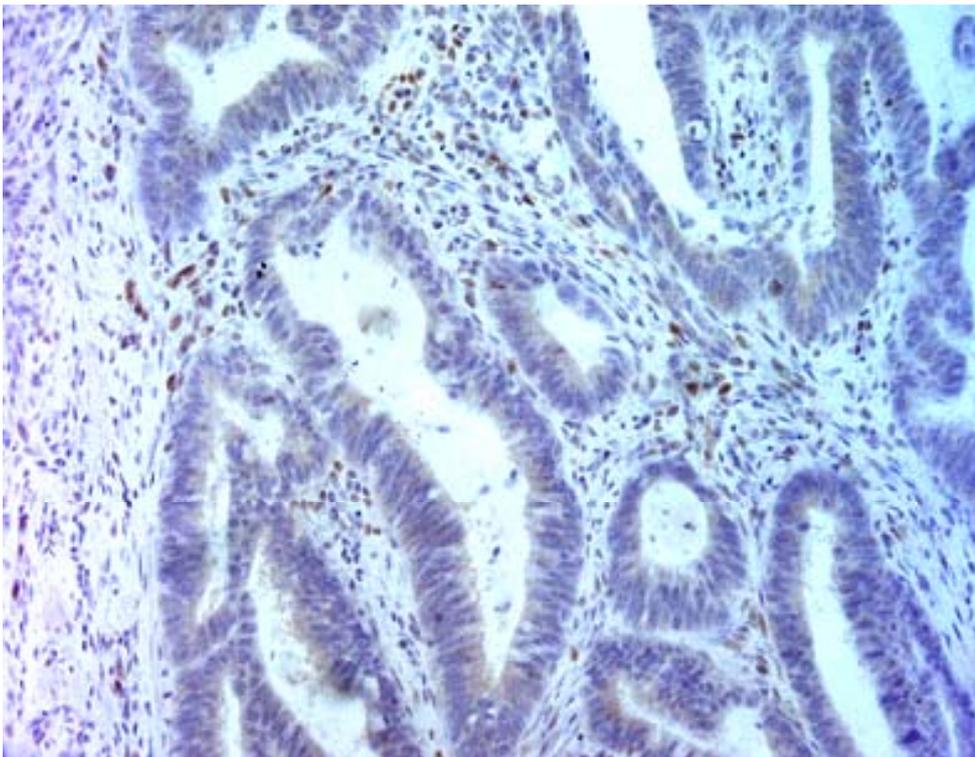
**Tabelle 9:**

Fall	MSI	Zugewinne in der CGH	Immunhistologie MMR-Gene	TNM-Stadium	Alter	Lokalisation
Col 44	MSI high	15	MLH1 neg.	pT3 pN0 G2	33	Rektum
Col 46	MSI high	14	MSH2 neg.	pT3 pN0 G3	67	Kolon
Col 50	MSS	16	MSH2 neg.	pT3 pN1 G3	66	Kolon
Col 84	MSI high	11	pos.	pT3 pN0 G3	79	Rektum
Col 86	MSI high	18	pos.	pT3 pN2 G2	62	Rektum
Col 102	MSI low	6	pos.	pT2 pN0 G2	67	Rektum

**Abbildung 7:** Immunhistochemie eines MLH1 pos. kolorektalen Karzinoms.



**Abbildung 8:** Immunhistochemie eines MSH2 neg. kolorektalen Karzinoms.



### 3.4 Verlust der Heterozygotie (LOH) im Bereich des FHIT- und PTEN-Gens beim kolorektalen Karzinom

#### 3.4.1 LOH-Häufigkeit des FHIT-Gens

Von den 36 untersuchten Tumoren waren 44% informativ für den locus D3S1313, 61% für D3S1300 und 89% für den locus D3S1234. Bei Kombination aller 3 untersuchten Mikrosatellitenmarker waren 100% der untersuchten Tumoren informativ für mindestens einen der Marker. Allerdings konnte ein LOH im Bereich des FHIT-Gens bei keinem der untersuchten Tumoren mit diesen Markern nachgewiesen werden (Tabelle 8).

#### 3.4.2 LOH-Häufigkeit des PTEN-Gens

Hinsichtlich des PTEN-Gens waren 23 der 36 untersuchten Tumoren informativ für den locus D10S209, 24 für D10S212, 33 für D10S215 und 31 für D10S587. Auch hier waren bei Kombination der 4 Marker alle Tumoren informativ für den PTEN-locus. Bei einem der 36 untersuchten Tumoren konnte mit den Markern D10S209 und D10S215 ein LOH nachgewiesen werden. Wobei der Marker D10S215 auch bei einem weiteren Tumor einen Verlust zeigen konnte (Tabelle 8).

**Tabelle 8:** LOH-Häufigkeit im Bereich der verwendeten Marker.

locus	informativ (n)	LOH (%)
D3S1313	16	-
D3S1300	22	-
D3S1234	32	-
D10S209	23	3%
D10S212	24	-
D10S215	33	5,50%
D10S587	31	-
BAT-25	6	-
D2S123	21	3%

## 4 Diskussion

Genetische Instabilität stellt eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung eines malignen Tumors dar. Es konnte gezeigt werden, daß diese Entwicklung in mehreren Schritten abläuft (Fearon et al., 1990), und genetische Veränderungen in Tumoronkogenen sowie Tumorsuppressorgenen auftreten.

In der vorliegenden Untersuchung wurde zum Einen die CGH verwendet, um chromosomale Aberrationen in kolorektalen Karzinomen nachzuweisen, wobei sowohl MSI-positive wie auch MSI-negative Tumoren analysiert wurden. Zum Anderen wurde die genetische Instabilität wichtiger Onkogene mittels Analyse der MSI evaluiert.

### 4.1 Komparative genomische Hybridisierung (CGH)

In den letzten Jahren ist eine Reihe von Publikationen erschienen, die mit der CGH-Analyse an unterschiedlichen Tumoren nicht nur unterschiedliche Muster chromosomaler Aberrationen nachweisen konnten, sondern in Tumoren der Harnblase (Richter et al., 1997; Simon et al., 1998), Niere (Moch et al., 1996; Jiang et al., 1998), Lunge (Petersen et al., 1998) und Mammakarzinomen (Isola et al., 1995) bestimmte Aberrationen auch mit der Tumorprogression oder Prognose korrelieren konnten.

Auch beim kolorektalen Karzinom liegen hierzu Studien vor, die eine Korrelation zwischen chromosomalen Aberrationen und Metastasierung (Knosel et al., 2002; Aragane et al., 2001; Korn et al., 1999) sowie der Tumorprogression (Meijer et al., 1998; Willenbacher et al., 1999) zeigen konnten.

In der vorliegenden Untersuchung waren bei sämtlichen 36 untersuchten kolorektalen Karzinomen chromosomale Veränderungen nachweisbar, wobei es sich vor allem um DNA-Zugewinne handelt, während Verluste, in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Rooney (2001) und Meijer (1998), sehr viel seltener zu beobachten waren. Von den Verlusten waren bevorzugt die Chromosomen 4q und 18q betroffen, während insbesondere die Chromosomen 20, 16, 9, 8, 10 und 11 in 75-92% der Tumoren Zugewinne aufwiesen. Diese chromosomalen Veränderungen korrelierten weder mit der Invasionstiefe (pT-Kategorie) noch mit dem Lymphknotenbefall (pN-Kategorie). Dies weist darauf hin, daß bei

kolorektalen Karzinomen eine genomische Instabilität mit unterschiedlichen Zugewinnen oder Verlusten bereits früh in der Tumorentwicklung auftreten kann.

Vergleicht man die vorliegenden Ergebnisse mit denen in der Literatur beschriebenen, so zeigt sich eine hohe Übereinstimmung besonders in Bezug auf Zugewinne an den Chromosomen 20q, 8q und 7q (Tab. 11). Dagegen konnten die häufig (bis 70%) beschriebenen Zugewinne auf Chromosom 13 nur in einer geringeren Fallzahl (30%) in der vorliegenden Untersuchung bestätigt werden. Die überdurchschnittliche Alteration von Chromosom 10q (Zugewinne in bis zu 78%) wurde bislang in der Literatur nicht beschrieben. Allerdings stimmen unsere Ergebnisse in 4 Fällen (16p, 9q, 8q, 7q) mit denen, an 54 fortgeschrittenen kolorektalen Karzinomen, von Knosel ermittelten Ergebnissen überein und ebenso zeigen sich 3 Übereinstimmungen (20q, 12q, 16p) mit den Ergebnissen von Nakao (1998), der ausschließlich gut differenzierte kolorektale Karzinome untersuchte. Letzteres zeigt, daß die von uns in fortgeschrittenen (pT3-pT4) kolorektalen Karzinomen identifizierten Veränderungen auch in früheren Neoplasien zu finden sind.

In Bezug auf die Verluste konnten alle in der vorliegenden Untersuchung beschriebenen Aberrationen auch in anderen Studien gezeigt werden (Tab.11). Eine hohe Übereinstimmung findet sich für Verluste an Chromosom 18q (Jen et al., 1994; Ooi et al., 1996; Meijer et al., 1998; Knosel et al., 2002). Jen et al. zeigte in seiner Arbeit, daß ein Verlust von 18q mit einer schlechteren Prognose einhergeht. So war die 5-Jahresüberlebensrate bei Patienten ohne Hinweis auf einen Allelverlust in diesem Bereich bei 93%, wogegen Patienten, deren Tumoren einen solchen Verlust aufwiesen nur eine Überlebensrate von 54% hatten. In der vorliegenden Arbeit wurde im Bereich von 18q ein Verlust bei 2 der untersuchten Tumoren (Col 76 und Col 114) gefunden, die sich beide im pT4 Stadium befanden. Diese Daten können somit ebenfalls ein Hinweis auf eine schlechtere Prognose sein.

**Tabelle 10:** Vergleich der chromosomalen Veränderungen mit dem Tumorstadium.

<b>Tumorstadium</b>	<b>durchschnittliche Anzahl der Zugewinne in der CGH</b>	<b>durchschnittliche Anzahl der Verluste in der CGH</b>
pT1/T2	8	0,2
pT3/T4	14	0,2
pN0	13	0,3
pN1-3	13	0,1

**Tabelle 11:** Zusammenfassung verschiedener in der Literatur beschriebenen Zugewinne und Verluste in der CGH im Vergleich mit den eigenen Ergebnissen.

<b>Literatur</b>	<b>n</b>	<b>Zugewinne</b>	<b>Verluste</b>
Schlegel et al., 1995	18	7, 13, 20q	17, 18, 9p
Ried et al., 1996	16	1, 13, 20, 7p, 8q	4, 8p, 18q
Paredes-Zaglul et al., 1998	10	20q, 13q, 19	18q, 17p, 18q, 8p, 5q
Nakao et al., 1998	9	11p, 12q, 16p, 20p, 20q	18q, 22q
Meijer et al., 1998	14	13q, 7p, 7q, 8q, 20q	18q, 4q, 8p
De Angelis et al., 1998	45	20q, 5p, 6p, 7, 8q, 13q, 17q, 19, x	18q, 1p, 3p, 4, 5q, 6q, 8p, 9p, 10, 15q, 17p
Nakao et al., 2001	35	6q, 7q, 8q, 9p, 13q, 20p, 20q	17p, 18p, 18q, 22q
Knosel et al., 2002	54	7q, 16p, 19p, 9q, 19q, 13q, 17q, 22q, 8q, 1q	18q, 4q, 4p, 5q, 1p, 21q, 6q, 3p, 8p, 9p, 11q, 14q
<b>eigene Ergebnisse</b>	36	20q, 16q, 9q, 8q, 10q, 11q, 12q, 16p, 7q, 2q	4q, 18q, 6q, 14q, 17q

Bezüglich der in dem vorliegenden Patientenkollektiv gefundenen Veränderungen ist bekannt, daß in diesen Chromosomenabschnitten eine Reihe von Genen lokalisiert ist, die für Signaltransduktionsfaktoren, Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren sowie für Tumorsuppressorgene kodieren und somit für die Tumorprogression und Prognose von Bedeutung sind (Tab.12). Dies trifft besonders für die Chromosomen 10, 11, 12, 16, 18 und 20 zu, für die in der vorliegenden Untersuchung gehäuft chromosomale Aberrationen nachgewiesen werden konnten. Die häufigsten genetischen Veränderungen betrafen Zugewinne und high-level Amplifikationen im Bereich von 20q12-13 und 16q 22-24. Für Chromosom 20q ließen sich diese Ergebnisse auch von zahlreichen anderen Autoren bestätigen, die ebenfalls in diesem Abschnitt mit hoher Frequenz Amplifikationen beim kolorektalen Karzinom nachweisen konnten (siehe Tab.11). Aragane (2001) und Korn (1999) zeigten, daß besonders bei kolorektalen Karzinomen mit Lebermetastasen Amplifikationen im Bereich von 20q zu finden sind. Ähnliche Befunde konnten auch bei Mamma- und Magenkarzinomen mit hoher Frequenz nachgewiesen werden (Kallioniemi et al., 1994; Noguchi et al., 2001). Wenn auch diesem Chromosomenabschnitt noch keine bestimmten Kandidatengene zugeordnet werden konnten, so weisen diese Befunde jedoch darauf hin, daß es sich hierbei um Abschnitte handeln könnte, in denen bislang noch unbekannte, für die Entstehung und das Fortschreiten unter anderem auch von kolorektalen Karzinomen, bedeutsame Gene lokalisiert sein können.

Die in der vorliegenden Untersuchung nachgewiesenen Veränderungen auf Chromosom 10q und 16q sind bislang noch nicht beschrieben worden. Allerdings konnten Auffälligkeiten dieser Regionen schon in anderen Tumoren gezeigt werden. So konnten Li und seine Mitarbeiter (1997) für das Tumorsuppressorgen PTEN (10q23) Mutationen bei Glioblastomen (31%), bei Prostatakarzinomen (100%) und bei Mammakarzinomen (6%) nachweisen. CGH-Analysen am Mammakarzinom zeigten Amplifikationen im Bereich von 10q26, einer Region, die für den Rezeptor eines Wachstumsfaktors (FGFR2) kodiert (Heiskanen et al., 2001). Für das Chromosom 16q wird das Gen LZ16 beschrieben (Human genome resources, National Center for Biotechnology Information), das für ein Protein (nasopharyngeal carcinoma susceptibility protein) kodiert, das für die Entstehung des Nasopharynxkarzinom von Bedeutung zu sein scheint. Unsere Ergebnisse könnten somit ein Hinweis darauf sein, daß auch beim kolorektalen Karzinom Veränderungen im Bereich von 10q und 16q eine Rolle spielen.

Im Bereich von 11q und 12q liegen verschieden Gene wie Cyclin D1, VEGF-B und erbB-3, die ebenfalls auf die Karzinogenese und die Tumorprogression des kolorektalen Karzinoms einen Einfluß haben könnten.

Des Weiteren kann der, auch in der vorliegenden Arbeit beschriebene, Verlust von genetischem Material im Bereich von 18q zu einem Ausfall des Tumorsuppressorgens DCC führen, welcher wiederum die Tumorentstehung bzw. Progression fördert (Huerta et al., 2001).

**Tabelle 12:** Häufig von Zugewinnen und Verlusten betroffene chromosomale Abschnitte bei 36 kolorektalen Karzinomen in Bezug zu bislang bekannten Genen.

Lokalisation	bislang bekannte Gene
<i>Zugewinne</i>	
20q	AIB, E2F-1, MMP-9
16q	CNMG1, E2F4, LZ16
9q	PBX3
8q	LYN
10q	PTEN, RET
11q	Cyclin D1, int-2, hast-2, MMPs, VEGF-B
12q	CDK-2, CDK-4, MDM-2, IGF-1, erbB-3
16p	TGFB111
7q	CDK-5, HGF, c-met
2q	STAT1
<i>Verluste</i>	
4q	SAS10
18q	DCC, SDCCAG 33

Zur Erfassung einer möglichen MSI in den analysierten Tumoren wurden diese zusätzlich mittels Mikrosatellitenmarkern untersucht. Von den 36 kolorektalen Karzinomen, die im Rahmen dieser Arbeit analysiert wurden, zeigten 14% eine MSI. Dieser Prozentsatz deckt sich mit den Ergebnissen von Lothe (1997), der zeigen konnte, daß im Gegensatz zu HNPCC-assoziierten Tumoren, bei denen eine MSI in 90% der Fälle zu beobachten war, bei spontanen kolorektalen Karzinomen diese Veränderung nur in 15% der untersuchten Fälle nachgewiesen werden konnten. In der vorliegenden CGH-Analyse konnte gezeigt werden, daß MSI-positive und MSI-negative Tumoren (sowie Tumoren mit oder ohne Expression von MMR-Proteinen) keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Verteilung und Häufigkeit chromosomaler Aberrationen aufwiesen. Einschränkend sei jedoch hier auf die geringe Fallzahl ( $n = 5$ ) MSI-positiver hingewiesen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden CGH-Analyse, daß es beim kolorektalen Karzinom zur Akkumulation von chromosomalen Aberrationen kommt, wobei Zugewinne wesentlich häufiger auftreten als Verluste. Eine Korrelation des chromosomalen Aberrationsmusters mit der Tumorprogression ließ sich in der vorliegenden Untersuchung nicht nachweisen. Ob die hier für das kolorektale Karzinom gehäuft nachgewiesenen Veränderungen tatsächlich Genorte einschließen, die in der Karzinogenese des kolorektalen Karzinoms eine Rolle spielen, läßt sich allein aus der CGH-Analyse noch nicht ableiten, und bedarf einer genaueren Charakterisierung durch weitere Untersuchungen. Allerdings beinhalten die betroffenen Chromosomenabschnitte eine Reihe möglicher Kandidatengene (Tabelle 12), die für die Tumorbiologie eine entscheidende Rolle spielen könnten.

## 4.2 FHIT-Gen

Das humane Fhit-Protein (fragile histidine triad), wird durch das Tumorsuppressorgen FHIT kodiert (Lisitsyn et al., 1995). Obwohl seine genaue Funktion bislang nicht geklärt werden konnte, scheint des FHIT-Gen an der Zellzyklusregulation und der DNA-Replikation beteiligt zu sein. Es konnte im menschlichen Genom im Bereich einer relativ häufig betroffenen Bruchstelle (sog. „fragile site“) auf dem kurzen Arm von Chromosom 3 (3p14.2) lokalisiert werden. Homozygote Deletionen im FHIT- Locus wurden bei verschiedenen Tumoren, wie z.B. dem Ösophagus-, Magen-, Kolon-, Brust-, Nieren-, und Lungentumoren gefunden (Barnes et al., 1996; Druck et al., 1997).

Eine enge Korrelation zwischen einem Verlust der Heterozygotie (LOH) in Bereich des FHIT-Gens konnte zumindest beim Bronchialkarzinom und bei Kopf-Halstumoren nachgewiesen werden, die unterstreichen, daß der Verlust eines FHIT-Allels einen frühen und wichtigen Schritt in der Karzinogenese dieser Malignome darstellt (Virigilo et al., 1996; Mao et al., 1996; Sozzi et al., 1997).

In der vorliegenden Arbeit konnte kein LOH des FHIT-Gens in den untersuchten kolorektalen Karzinomen gefunden werden. Diese Resultate sind in Übereinstimmung mit verschiedenen Arbeiten zum Kolon-, Ovarial- und Endometriumkarzinom die zeigen, daß Aberrationen im Bereich des FHIT- Gens, wenn überhaupt, dann nur in kleinen Subgruppen eine mögliche Rolle für Entstehung und Fortschreiten dieser Tumoren spielen (Thiagalingam et al., 1996; Hendricks et al., 1997; Frank et al., 1997; Hadaczek et al., 2001). Eine andere Arbeit konnte zeigen, daß Mutationen im FHIT-Gen nur in 13% der kolorektalen Karzinome vorkommen, und daß in diesen Fällen ein Verlust von Exon 4 vorliegt. Darüber hinaus scheinen diese Tumoren besonders häufig im unteren Rektumbereich vorzukommen (Kenji et al., 1997). Allerdings konnte ebenfalls gezeigt werden, daß Veränderungen im FHIT-Gen möglicherweise auch in nicht-kanzerösem Gewebe vorkommen und sie somit nicht kausal mit der Tumorentstehung verknüpft sind (Chen et al., 1997). Es wäre somit möglich, daß das FHIT-Gen nur sehr nahe am Ort des Geschehens liegt, selber aber nicht das Ziel für Mutationen ist, die zu klonalen Veränderungen führen (Thiagalinam et al., 1996; Druck et al., 1997; Boldog et. al, 1997). Nach den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchungen scheinen allelische Imbalancen im Bereich des FHIT-Gens beim kolorektalen Karzinom somit keine zentrale Rolle zu spielen.

### 4.3 PTEN-Gen

Ein weiteres Gen, das im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, ist das Tumorsuppressorgen PTEN, das auf Chromosom 10q23 lokalisiert ist. Von 36 spontanen kolorektalen Karzinomen zeigten nur 2 Tumoren (6%) einen LOH im PTEN Locus (Marker D10S209 und D10S215). In Bezug auf die Relevanz von PTEN für die kolorektale Karzinogenese findet man in der Literatur unterschiedliche Angaben. So gibt es einerseits Hinweise, daß Verluste bzw. Mutationen bei kolorektalen Karzinomen keine Rolle spielen (Taniyama et al., 2001; Negoro et al., 2000). Andererseits konnten Arbeitsgruppen zeigen, daß es in Zusammenhang mit einem Ausfall der MMR-Gene bzw. einer MSI zu einem gehäuften Auftreten von Mutationen im PTEN-Locus bei kolorektalen Karzinomen kommen kann (Dicuonzo et al., 2001; Shin et al., 2001). In der vorliegenden Untersuchung konnte nur bei drei Tumoren immunhistochemisch ein Verlust der MMR-Proteinexpression nachgewiesen werden. Dabei zeigten die beiden Tumoren mit LOH im Bereich des PTEN-Gens immunhistochemisch keine Verluste der MMR-Proteinexpression.

Des weitern postulieren Frayling und seine Mitarbeiter (1997), daß beim spontanen kolorektalen Karzinom Allelverluste nahe dem PTEN Locus (Marker D10S220, D10S201) in etwa 30% der Fälle zu finden sind, Mutationen des PTEN-Gens jedoch nur selten auftreten (Wang et al., 1998).

In Bezug auf andere Karzinome zeigten Li und seine Mitarbeiter (1997), daß Verluste im PTEN-Locus bei 31% der von ihnen untersuchten Glioblastome, in 100% der Prostatakarzinome und in 6% der Mammakarzinome zu finden waren. Diese unterschiedlichen LOH-Frequenzen schienen aber erst in späteren Tumorstadien aufzutreten. Auch in der vorliegenden Untersuchung wurden allelische Imbalancen nur in pT3 und pT4 Tumoren gefunden.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung daraufhin, daß allelischen Imbalancen im Bereich des PTEN-Gens beim kolorektalen Karzinom, wenn überhaupt, dann nur eine untergeordnete Rolle im Rahmen der Tumorentstehung zuzukommen scheint.

## 5 Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom stellt in Deutschland eine der häufigsten Tumorerkrankungen dar. In der Pathogenese dieser Erkrankung wird sowohl der chromosomalen Instabilität als auch der Mikrosatelliteninstabilität (MSI), eine entscheidende Rolle zugesprochen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung des Musters chromosomaler Alterationen in 36 kolorektalen Karzinomen mittels komparativer genomischer Hybridisierung (CGH) sowie der Nachweis der MSI. Darüber hinaus wurde der immun-histochemische Nachweis der Proteinexpression der MMR-Gene MLH1 und MSH2 durchgeführt.

Bei sämtlichen untersuchten Kolonkarzinomen waren Veränderungen nachweisbar, die vorwiegend Zugewinnen entsprachen, während Verluste sehr viel seltener zu beobachten waren. Insbesondere die Chromosomen 20, 16, 9, 8, 10 und 11 wiesen in 75%-92% der Tumoren Zugewinne auf. Eine Korrelation dieser Veränderungen konnte jedoch weder mit der Tumorprogression (pT- und pN-Stadium) noch mit dem Differenzierungsgrad der Tumoren nachgewiesen werden. Auch zwischen Tumoren mit MSI und solchen ohne fand sich kein signifikanter Unterschied im Muster der jeweiligen Veränderungen in der CGH-Analyse. Die Untersuchungen der Tumorsuppressorgene PTEN und FHIT zeigten nur in zwei Fällen einen LOH im Bereich des PTEN-Gens. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchungen scheinen allelische Imbalancen im Bereich des FHIT-Gens beim kolorektalen Karzinom somit keine wesentliche Rolle zu spielen.

Zusammenfassend konnten in der vorliegenden Untersuchung eine Reihe beim kolorektalen Karzinom bislang noch nicht bekannter chromosomaler Aberrationen nachgewiesen werden. Ob die hier für das kolorektale Karzinom gehäuft nachgewiesenen Veränderungen tatsächlich Genorte einschließen, die in der Karzinogenese des kolorektalen Karzinoms eine Rolle spielen, läßt sich allein aus der CGH-Analyse noch nicht ableiten, und bedarf einer genaueren Charakterisierung durch weitere Untersuchungen.

## 6 Literaturverzeichnis

**Aaltonen LA**, Peltomaki P, Mecklin JP, Jarvinen H, Jass JR, Green JS, Lynch HT, Watson P, Tallqvist G, Juhol M and et al. Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Cancer Research* 1994; 54: 1645-1648.

**Aragane H**, Sakakura C, Nakanishi M, Yasuoka R, Fujita Y, Taniguchi H, Hagiwara A, Yamaguchi T, Abe T, Inazawa J, Yamagishi H. Chromosomal aberrations in colorectal cancers and liver metastases analyzed by comparative genomic hybridization. *Int J Cancer* 2001 Dec 1;94(5):623-629.

**Baker SJ**, Fearon ER, Nigro JM, Hammlton SR, Preisinger AC, Jessup JM, Tuinen P, van Ledbetter DH, Barker DF, Nakamura Y, White R and Vogelstein B. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 1989; 244: 217-221.

**Chen YJ**, Chen PH, Lee MD, Chang JG. Aberrant FHIT transcripts in cancerous and corresponding non-cancerous lesions of the digestive tract. *Int J Cancer* 1997; 72(6): 955-958.

**De Angelis PM**, Clausen OP, Schjolberg A, Stokke T. Chromosomal gains and losses in primary colorectal carcinomas detected by CGH and their associations with tumour DNA ploidy, genotypes and phenotypes. *Br J Cancer* 1999 May; 80(3-4):526-535.

**Dicuonzo G**, Angeletti S, Garcia-Foncillas J, Brugarolas A, Okrouzhnov Y, Santini D, Tonini G, Lorino G, De Cesaris M, Baldi A. Colorectal carcinomas and PTEN/MMAC1 gene mutations. *Clin Cancer Res* 2001 Dec;7(12):4049-4053.

**Druck T**, Hadaczek P, Fu TB, Ohta M, Siprashvili Z, Baffa R, Negrini M, Kastury K, Veronese ML, Rosen D, Rothstein J, McCue P, Cotticelli MG, Inoue H, Croce CM, Huebner K. Structure and expression of the human FHIT gene in normal and tumor cells. *Cancer Res* 1997; 57(3): 504-512.

**Dunlop, M.G.** Screening for large bowel neoplasms in individuals with a family history of colorectal cancer. *Br J Surg* 1992; 79:488-494.

**Fearon ER** and Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-767.

**Frank S**, Muller J, Plaschke J, Hahn M, Hampl J, Hampl M, Pistorius S, Schackert G, Schackert HK. The putative tumor suppressor gene FHIT at 3p14.2 is rarely affected by loss of heterozygosity in primary human brain tumors. *Cancer Res* 1997; 57(13): 2638-2641.

**Frayling IM**, Bodmer WF, Tomlinson IP. Allele loss in colorectal cancer at the Cowden disease/juvenile polyposis locus on 10q. *Cancer Genet Cytogenet* 1997; 97(1): 64-69.

**Guanti G**, Bukvic N. Hereditary colorectal cancer syndromes. *Acta Chir Iugosl* 2000;47(4 Suppl 1):23-5.

**Gyapay G**, Morissette J, Vignal A, Dib C, Fizames C, Millasseau P, Marc S, Bernardi G, Lathrop M, Weissenbach J. The 1993-94 Genethon human genetic linkage map. *Nat Genet* 1994; 7(2 Spec No): 246-339.

**Hadaczek P**, Debniak T, Kurzawski G, Jakubowska A, Huzarski T, Huebner K, Lubinski J. Fhit protein expression in hereditary and sporadic colorectal cancers. *Pol J Pathol* 2001; 52(3): 125-132.

**Hartwell L**. Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. *Cell* 1992; 71(4): 543-546.

**Heiskanen M**, Kononen J, Barlund M, Torhorst J, Sauter G, Kallioniemi A, Kallioniemi O. CGH, cDNA and tissue microarray analyses implicate FGFR2 amplification in a small subset of breast tumors. *Anal Cell Pathol* 2001;22(4):229-234.

**Hendricks DT**, Taylor R, Reed M, Birrer MJ. FHIT gene expression in human ovarian, endometrial, and cervical cancer cell lines. *Cancer Res* 1997; 57(11): 2112-2115.

**Hibi K**, Taguchi M, Nakamura H, Hirai A, Fujikake Y, Matsui T, Kasai Y, Akiyama S, Ito K, Takagi H. Alternative splicing of the FHIT gene in colorectal cancers. *Jpn J Cancer Res* 1997; 88(4): 385-388.

**Hsu SM**, Raine L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 1981; 29(11): 1349-1353.

**Ionov Y**, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D and Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993; 363: 558-561.

**Isola J**, DeVries S, Chu L, Ghazvini S, Waldman F. Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. *Am J Pathol* 1994; 145(6): 1301-1308.

**Isola J**, Kallioniemi OP, Chu LW, Fuqua SA, Hilsenbeck SG, Osborne CK, Waldman FM. Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization predict outcome in node-negative breast cancer. *Am J Pathol* 1995; 147(4):905-911.

**Jen J**, Kim H, Piantadosi S, Liu Z-F, Levitt RC, Sistonen P, Kinzler KW, Vogelstein B, Hamilton SR. Allelic loss of chromosome 18q and progression in colorectal cancer. *NEJM* 1994; 331: 213-221.

**Jiang F**, Richter J, Schraml P, Bubendorf L, Gasser T, Sauter G, Mihatsch MJ, Moch H. Chromosomal imbalances in papillary renal cell carcinoma: genetic differences between histological subtypes. *Am J Pathol* 1998; 153(5):1467-1473.

**Kallioniemi A**, Kallioniemi OP, Piper J, Tanner M, Stokke T, Chen L, Smith HS, Pinkel D, Gray JW, Waldman FM. Detection and mapping of amplified DNA sequences in breast cancer by comparative genomic hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(6):2156-2160.

- Kallioniemi A**, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F and Pinkel D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* (Washington DC) 1992; 258:818-821.
- Kinzler KW**, Nillbert MC, Vogelstein B, Bryan TM, Levy D, Smith KJ, Preisinger AC, Hammilton SR, Hedge P, Markham A, Groffen J, Boguski MS, Altschul SF, Horii A, Ando H, Miyoshi Y, Miki Y, Nishisho I and Nakamura Y. Identification of gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. *Science* 1991; 253: 661-665.
- Knosel T**, Petersen S, Schwabe H, Schluns K, Stein U, Schlag PM, Dietel M, Petersen I. Incidence of chromosomal imbalances in advanced colorectal carcinomas and their metastases. *Virchows Arch* 2002; 440(2):187-194.
- Knudson AG**. Antioncogenes and human cancer. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 1993; 90:10914-10921.
- Korn WM**, Yasutake T, Kuo WL, Warren RS, Collins C, Tomita M, Gray J, Waldman FM. Chromosome arm 20q gains and other genomic alterations in colorectal cancer metastatic to liver, as analyzed by comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1999; 25(2):82-90.
- Kruschewski M**, Noske A, Haier J, Runkel N, Anagnostopoulos Y, Buhr HJ. Is reduced expression of mismatch repair genes MLH1 and MSH2 in patients with sporadic colorectal cancer related to their prognosis? *Clin Exp Metastasis* 2002;19(1):71-7.
- Le Beau MM**, Drabkin H, Glover TW, Gemmil R, Rassool FV, McKeithan TW, Smith DI. An FHIT tumor suppressor gene? *Genes, Chromosomes & Cancer* 1998; 21: 281-289.
- Lisitsyn NA**, Lisitsina NM, Dalbagni G, Barker P, Sanchez CA, Gnarra J, Linehan WM, Reid BJ, Wigler MH. Comparative genomic analysis of tumors: detection of DNA losses and amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(1): 151-155.
- Loeb LA**. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res* 1991; 51(12): 3075-3079.
- Lothe RA**. Microsatellite instability in human solid tumors. *Mol.Med.Today* 1997; 3: 61-68.
- Lothe RA**, Peltomaki P, Meling GI, Aaltonen LA, Nystrom-Lathi M, Pylkkänen L, Heimdal K, Andersen TI, Moller P, Rognum TO, Fossa SD, Haldorsen T, Langmark F, Brogger A, de la Chapelle A, Borresen AL. Genomic instability in colorectal cancer: relationship of clinicopathological variables and family history. *Cancer Res* 1993; 53: 5849-5852.
- Lundsteen C**, Maahr J, Christensen B, Bryndorf T, Bentz M, Lichter P, Gerdes T. Image analysis in comparative genomic hybridization. *Cytometry* 1995 Jan 1;19(1):42-50.
- du Manoir S**, Kallioniemi OP, Lichter P, Piper J, Benedetti PA, Carothers AD, Fantes JA, Garcia-Sagredo JM, Gerdes T, Giollant M, et al. Hardware and software requirements for quantitative analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* 1995 Jan 1;19(1):4-9.

**du Manoir S**, Speicher MR, Joos S, Schröck E, Popp S, Döhner H, Kovacs G, Robert-Nicoud M, Lichter P and Cremer T. Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. *Hum Genet* 1993; 90: 590-610.

**Mao L**, Fan YH, Lotan R, Hong WK. Frequent abnormalities of FHIT, a candidate tumor suppressor gene, in head and neck cancer cell lines. *Cancer Res* 1996; 56(22): 5128-31.

**Mayer RJ**. Harrison's Principles of Internal Medicine. 14. Auflage 1998; 571.

**Meijer GA**, Hermsen MAJA, Baak JPA, van Diest PJ, Meuwissen SGM, Belien JAM, Hoovers JMN, Joenje H, Snijders PJF, Walboomers JMM. Progression from colorectal adenoma to carcinoma is associated with non-random chromosomal gains as detected by comparative genomic hybridization. *J Clin Pathol* 1998; 51: 901-909.

**Moch H**, Presti JC Jr, Sauter G, Buchholz N, Jordan P, Mihatsch MJ, Waldman FM. Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization are associated with clinical outcome in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 1996; 56(1): 27-30.

**Mori M**, Mimori K, Masuda T, Yoshinaga K, Yamashita K, Matsuyama A, Inoue H. Absence of MSH2 protein expression is associated with alteration in the FHIT locus and Fhit protein expression in colorectal carcinoma. *Cancer Research* 2001; 61: 7379-7382.

**Mutter GL**. PTEN, a Protean Tumor Suppressor. *American Journal of Pathology* 2001; 158 (6): 1859-1898.

**Nakao K**, Shibusawa M, Tsunoda A, Yoshizawa H, Murakami M, Kusano M, Uesugi N, Sasaki K. Genetic changes in primary colorectal cancer by comparative genomic hybridization. *Surg Today* 1998; 28(5):567-569.

**Negoro K**, Takahashi S, Kinouchi Y, Takagi S, Hiwatashi N, Ichinohasama R, Shimosegawa T, Toyota T. Analysis of the PTEN gene mutation in polyposis syndromes and sporadic gastrointestinal tumors in Japanese patients. *Dis Colon Rectum* 2000; 43(10 Suppl): S29-33.

**Noguchi T**, Wirtz HC, Michaelis S, Gabbert HE, Mueller W. Chromosomal imbalances in gastric cancer. Correlation with histologic subtypes and tumor progression. *Am J Clin Pathol* 2001; 115(6):828-834.

**Ooi A**, Huang CD, Mai M and Nakanishi I. Numerical chromosome alteration in colorectal carcinomas detected by fluorescence in situ hybridization. *Virchows Arch* 1996; 428: 243-251.

**Orr-Weaver TL**, Weinberg RA. A checkpoint on the road to cancer. *Nature* 1998; 392 (6673): 223-224.

**Paredes-Zaglul A**, Kang JJ, Essig Y-P, Mao W, Irby R, Wloch M, Yeatman TJ. Analysis of colorectal cancer by comparative genomic hybridization: evidence for induction of the metastatic phenotype by loss of tumor suppressor genes. *Clinical Cancer Research* 1998; 4: 879-886.

**Paulovich AG**, Toczyski DP, Hartwell LH. When checkpoints fail. *Cell*; 88(3): 315-21.

**Petersen S**, Rudolf J, Bockmuhl U, Gellert K, Wolf G, Dietel M, Petersen I. Distinct regions of allelic imbalance on chromosome 10q22-q26 in squamous cell carcinomas of the lung. *Oncogene*. 1998; 17(4): 449-54.

**Piper J**, Rutovitz D, Sudar D, Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D. Computer image analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* 1995 Jan 1;19(1):10-26.

**Richter J**, Jiang F, Gorog JP, Sartorius G, Egenter C, Gasser TC, Moch H, Mihatsch MJ, Sauter G. Marked genetic differences between stage pTa and stage pT1 papillary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 1997; 57(14):2860-2864.

**Ried T**, Knutzen R, Steinbeck R, Blegen H, Schröck E, Heselmeyer K, du Manoir S, Auer G. Comparative genomic hybridization reveals a specific pattern of chromosomal gains and losses during the genesis of colorectal tumors. *Genes, Chromosomes and Cancer* 1996; 15: 234-245.

**Rooney PH**, Boonsong A, McKay JA, Marsh S, Stevenson DA, Murray GI, Curran S, Haites NE, Cassidy J, McLeod HL. Colorectal cancer genomics: evidence for multiple genotypes which influence survival. *Br J Cancer* 2001; 85(10):1492-1498.

**Rüschhoff, J.**, Bocker, T., Schlegel, J., Stumm, G. und Hofstaedter, F. Microsatellite instability: new aspects in the carcinogenesis of colorectal carcinoma. *Virchows Arch* 1995; 426: 215-222.

**Scarrisbrick JJ**, Woolford AJ, Russel-Jones R, Whittaker SJ. Loss of heterozygosity on 10q and microsatellite instability in advanced stages of primary cutaneous T-cell lymphoma and possible association with homozygous deletion of PTEN. *Blood* 2000; 95(9): 2937-2942.

**Schlegel J**, Bocker T, Zirngibl H, Hofstädter F, Rüschhoff J. Detection of microsatellite instability in human colorectal carcinomas using a non-radioactive PCR-based screening technique. *Virchows Archive* 1995; 426: 223-227.

**Schlegel J**, Stumm G, Scherthan H, Bocker T, Zirngibl H, Rüschhoff J and Hofstädter F. Comparative Genomic in Situ Hybridization of Colon Carcinomas with Replication Error. *Cancer Research* 1995, 55: 6002-6005.

**Shin KH**, Park YJ, Park JG. PTEN gene mutations in colorectal cancers displaying microsatellite instability. *Cancer Lett* 2001; 174(2):189-194.

**Simon R**, Burger H, Brinkschmidt C, Bocker W, Hertle L, Terpe HJ. Chromosomal aberrations associated with invasion in papillary superficial bladder cancer. *J Pathol* 1998; 185(4): 345-351.

**Sozzi G**, Sard L, De Gregorio L, Marchetti A, Musso K, Buttitta F, Tornielli S, Pellegrini S, Veronese ML, Manenti G, Incarbone M, Chella A, Angeletti CA, Pastorino U, Huebner K, Bevilacqua G, Pilotti S, Croce CM, Pierotti MA. Association between cigarette smoking and FHIT gene alterations in lung cancer. *Cancer Res* 1997; 57(11): 2121-2123.

**Sugarbaker PH**. Role of carcinoembryonic antigen assay in the management of cancer. *Adv Immun Cancer Ther* 1985;1:167-93.

**Taniyama K**, Goodison S, Ito R, Bookstein R, Miyoshi N, Tahara E, Tarin D, Urquidi V. PTEN expression is maintained in sporadic colorectal tumours. *J Pathol* 2001; 194(3): 341-348.

**Thiagalingam S**, Lisitsyn NA, Hamaguchi M, Wigler MH, Willson JK, Markowitz SD, Leach FS, Kinzler KW, Vogelstein B. Evaluation of the FHIT gene in colorectal cancers. *Cancer Res* 1996; 56(13): 2936-2939.

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

**Virgilio L**, Shuster M, Gollin SM, Veronese ML, Ohta M, Huebner K, Croce CM. FHIT gene alterations in head and neck squamous cell carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(18): 9770-9775.

**Wang ZJ**, Taylor F, Churchman M, Norbury G, Tomlinson I. Genetic pathways of colorectal carcinogenesis rarely involve the PTEN and LKB1 genes outside the inherited hamartoma syndromes. *Am J Pathol* 1998;153(2):363-366.

**Willenbacher RF**, Aust DE, Chang CG, Zelman SJ, Ferrell LD, Moore DH 2nd, Waldman FM. Genomic instability is an early event during the progression pathway of ulcerative-colitis-related neoplasia. *Am J Pathol* 1999; 154(6): 1825-1830.

**Zhou XP**, Kuismanen S, Nystrom-Lahti M, Peltomaki P, Eng C. Distinct PTEN mutational spectra in hereditary non-polyposis colon cancer syndrome-related endometrial carcinomas compared to sporadic microsatellite unstable tumors. *Hum Mol Genet* 2002; 11(4):445-450.

**Zysman MA**, Chapman WB, Bapat B. Considerations when analyzing the methylation status of PTEN tumor suppressor gene. *Am J Pathol* 2002; 160(3): 795-800.

## 7 Abkürzungen

CGH:	Comparative genomic hybridization
FAP:	Familial adenomatous polyposis
FHIT:	Fragile histidine triad
HNPCC:	Hereditary nonpolyposis associated colorectal cancer
IHC:	Immunhistochemie
LOH:	Loss of heterozygosity
MSI:	Mikrosatelliteninstabilität
MSS:	Mikrosatellitenstabilität
PCR:	Polymerase chain reaction
PTEN:	Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10

## 8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die mir geholfen haben die vorliegende Arbeit zu erstellen.

Dem Direktor des Instituts für Pathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Herrn Prof. Dr. H.E. Gabbert danke ich, daß ich die Möglichkeit hatte diese Arbeit an seinem Institut durchführen zu können.

Meinem Doktorvater Herrn PD Dr. W. Müller danke ich für die Bereitstellung des wissenschaftlichen Themenbereichs sowie für seine Unterstützung bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit.

Frau PD Dr. G. Möslein danke ich für die Übernahme der Korreferates.

Außerdem danke ich Herrn Dr. C. Wirtz, der mich während meiner praktischen wissenschaftlichen Arbeit unterstützt hat.

Des weiteren danke ich Herrn PD Dr. W. Kempf und Herrn Dr. G. Marra für die Bearbeitung der immunhistochemischen Abbildungen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. W. Kempf darüber hinaus auch für seine fachliche Unterstützung.

Sehr dankbar bin ich außerdem meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht und mich in dieser Zeit immer unterstützt haben.

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Sonja Michaelis  
Nationalität: deutsch  
Zivilstand: ledig  
Konfession: katholisch

### Schulbildung

1981-1985: Besuch der Grundschule in Düsseldorf, Deutschland  
1985-1991: Besuch des Schloss Gymnasiums Benrath in Düsseldorf, Deutschland  
1991-1992: Austauschschülerin in Michigan, USA, und Besuch der Goodrich High School  
1992: High School Abschluss (Graduation) in Michigan, USA  
1992-1994: Besuch des Schloss Gymnasiums Benrath in Düsseldorf, Deutschland  
1994: Abitur

### Studium

10/1994: Beginn des Medizinstudiums an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Deutschland  
8/1996: Physikum  
2/1997: Beginn der Promotionsarbeit am Institut für Pathologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Deutschland  
Direktor: Prof. Dr. H.E. Gabbert  
Thema: Genetische Instabilität im kolorektalen Karzinom  
8/1997: 1. Staatsexamen  
9/1997: Famulatur am Institut für Pathologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Deutschland  
Direktor: Prof. Dr. H.E. Gabbert  
9/1998: Famulatur an der Klinik für Dermatologie der Charité Berlin, Deutschland  
Direktor: Prof. Dr. W. Sterry  
8/1999: Famulatur in der chirurgischen Abteilung am Evangelischen Krankenhaus in Düsseldorf, Deutschland  
9/1999: Famulatur an der Klinik für Dermatologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Deutschland  
Direktor: Prof. Dr. T. Rutziska

- 4/2000: 2. Staatsexamen
- 5/2000: Beginn des Praktischen Jahres
1. Terial: Klinik für Dermatologie am UniversitätsSpital Zürich, Schweiz  
Direktor: Prof. Dr. G. Burg
  2. Terial: Klinik für Innere Medizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Deutschland  
Direktor: Prof. Dr. D. Häusinger
  3. Terial: Klinik für Chirurgie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Deutschland  
Direktor: Prof. Dr. H.D. Röher
- 6/2001: 3. Staatsexamen und Abschluss des Medizinstudiums an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Deutschland

### **Beruflicher Werdegang**

- seit 9/2001: Ärztin im Praktikum an der Klinik für Dermatologie am UniversitätsSpital Zürich, Schweiz  
Direktor: Prof. Dr. G. Burg