

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. B. Göke

# **Die Methylierung von NEUROG-1 ist ein diagnostischer Marker im Serum von Patienten mit kolorektalen Karzinomen**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von  
**Konstanze Rahmig**

aus  
Annaberg-Buchholz

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Frank T. Kolligs

Mitberichtersteller: Priv. Doz. Dr. Arno Graser  
Priv. Doz. Dr. Michael S. Kasperek  
Priv. Doz. Dr. Max Schnurr

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. A. Herbst

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser,  
FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 03.05.2012

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich vor allem bei Herrn Prof. Frank T. Kolligs für seine stets konstruktive und motivierende Kritik sowie seinem gesamten Laborteam für die sehr gute, kompetente und letztlich zielführende Unterstützung sehr herzlich bedanken.

Besonderer Dank muss außerdem meinem wissenschaftlichen Betreuer, Herrn Dr. Andreas Herbst, zuteil werden, der durch sein großes Engagement ebenfalls wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat.

Stellvertretend sei hier auch aus dem Laborteam Frau Andrea Ofner genannt, ohne deren auf langjähriger Erfahrung basierende, praktische Anleitungen diese Arbeit nicht realisierbar gewesen wäre.

Für die Hilfestellung bei der statistischen Auswertung durch Herrn Dr. Crispin und die durch Frau Dr. Stieber bereitgestellten Patientenproben sei ebenfalls ganz herzlich gedankt.

Letztlich wäre dieser Arbeit ohne die Serumproben der vielen Patienten und die korrespondierenden Patientendaten, die freundlicherweise von der Maria-Theresia-Klinik München zur Verfügung gestellt wurden, jegliche Grundlage genommen; daher allen Beteiligten vielen Dank.

Bedanken möchte ich mich nicht zuletzt bei meiner Familie, besonders bei meinem Lebensgefährten, der mich tatkräftig mit stetiger Motivation und vor allem bei der graphischen Aufarbeitung der Daten unterstützt hat.

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....

Danksagung.....

### 1 Einleitung

1.1 Aktuelle Zahlen zum kolorektalen Karzinom.....	1
1.2 Genese des kolorektalen Karzinoms.....	3
1.2.1 genetische Ursachen der Karzinogenese.....	3
1.2.2 Epigenetische Veränderungen.....	6
1.3 Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms nach UICC-Stadien.....	8
1.4 Detektion und ihre Sensitivität / Spezifität.....	8
1.4.1 Darmkrebsvorsorge in Deutschland.....	8
1.4.1.1 Koloskopie.....	9
1.4.1.2 Fäkaler okkultter Bluttest (FOBT).....	11
1.4.2 Alternative Nachweismethoden.....	13
1.4.2.1 virtuelle Koloskopie.....	13
1.4.2.2 Stuhltests.....	14
1.4.2.3 Bluttests – allgemeine Aspekte.....	16
1.5 Serummarker.....	18
1.5.1 APC (Adenomatous Polyposis coli)-Gen .....	19
1.5.2 CDH-1 (Cadherin-1).....	19

1.5.3	HLTF.....	20
1.5.4	hMLH1.....	20
1.5.5	HPP1/TPEF.....	21
1.5.6	MDR-1.....	22
1.5.7	MGMT.....	22
1.5.8	p16 <sup>INK4A</sup> .....	23
1.5.9	TIMP-3.....	24
1.6	CIMP-Panel (CpG-Island Methylator Phenotype).....	25
1.6.1	CACNA1G.....	26
1.6.2	IGF-2.....	26
1.6.3	NEUROG-1.....	27
1.6.4	RUNX-3.....	27
1.6.5	SOCS-1.....	28
1.7	Ziele dieser Arbeit.....	28
<b>2 Materialien und Methoden</b>		
2.1	Probenmaterial.....	32
2.1.1	Gewinnung.....	32
2.1.2	Aufbereitung der Serumproben.....	32
2.1.2.1	DNA-Isolation.....	32
2.1.2.2	Bisulfit-Behandlung.....	33
2.2	Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCR).....	34

2.2.1	Methylierungsspezifische PCR (MSP).....	34
2.2.1.1	Methylierungsspezifische Primer und Sonden.....	34
2.2.1.2	Reaktionsbedingungen der MSP.....	36
2.2.2	quantitative Real-time PCR.....	37
2.2.2.1	Allgemeine Funktionsweise.....	37
2.3	Quantifizierung der Ergebnisse.....	38
2.3.1	Threshold-Cycle (Ct).....	38
2.3.2	Standardkurven.....	39
2.3.3	Berechnung der Template-Menge.....	40
2.4	Normalisierung der ermittelten Templatemenen mittels Referenzgen.....	41
2.4.1	Referenzgen ALU-C4.....	41
2.4.2	Normalisierungsberechnung.....	41
2.5	Inter-Intra-Assay.....	42
2.6	Patientenkollektive (Sets).....	42
2.6.1	Trainings-Set.....	42
2.6.2	Tumorstaging-Set.....	43
2.6.3	Test-Set.....	43
2.6.4	Flow-Chart (Gesamtaufbau).....	44
2.6.5	Tumor-Serum-Korrelationsset.....	45
2.7	Statistische Analyse.....	46

**3 Ergebnisse**

3.1 Methodische Entwicklung.....	47
3.1.1 Inter-Intra-Assay.....	47
3.2 Trainings-Set.....	49
3.3 Tumorstaging-Set.....	55
3.4 Test-Set .....	57
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>61</b>
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>71</b>
<b>6 Anhang.....</b>	<b>72</b>
<b>7 Quellenverzeichnis.....</b>	<b>74</b>
<b>8 Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>88</b>
<b>9 Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>90</b>
<b>10 Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>91</b>

# 1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit möchte die Möglichkeit der Detektion von DNA-Molekülen im Serum und deren epigenetische Veränderungen im Rahmen maligner und prämaligener Prozesse untersuchen. Ziel ist die Untersuchung der Möglichkeit, mit Hilfe des Nachweises von DNA-Methylierung im Serum, Darmkrebs im asymptomatischen Stadium zu detektieren.

## 1.1 Aktuelle Zahlen zum kolorektalen Karzinom

Kolorektale Karzinome sind die am zweithäufigsten auftretenden Karzinome in der gesamten westlichen Welt und damit auch in Deutschland (Jemal et al., 2004; GEKID and RKI 2008). In Europa erkranken laut der *United European Gastroenterology Federation (UEGF)*, 2006 jährlich etwa 300.000 Menschen. Damit liegt diese Tumorentität noch vor dem Bronchialkarzinom (UEGF 2006). Die weltweite Inzidenz wird auf eine Million Neuerkrankungen pro Jahr geschätzt. Im europaweiten Vergleich stand die Inzidenz der kolorektalen Karzinome in Deutschland in einer Schätzung von *GLOBOCAN 2002* für Frauen an erster und für Männer an vierter Stelle (GEKID und RKI 2008). Weiterhin verstirbt von allen weltweit an dieser Krankheit leidenden Menschen jeder Dritte (Jemal et al., 2008). Der prozentuale Anteil von Darmkrebsneuerkrankungen in Deutschland lag nach einer Schätzung des Robert-Koch-Instituts im Jahr 2006 für Frauen bei 16,2% und für Männer sogar bei 17,5%, was einer jährlichen Neuerkrankungsrate von etwa 73.000 für beide Geschlechter gemeinsam entspricht (GEKID und RKI 2008) (*Abbildung 1.1*). Die Mortalität wurde 2006 für Frauen mit 12,4% bzw. für Männer mit 14,3% angegeben und lag damit auf Platz 2 der Krebssterbefälle in Deutschland nach Mamma-/ bzw. Bronchialkarzinomen. Dabei erkranken Männer im Mittel mit 69, Frauen mit 75 Jahren. Seit Mitte der 70er Jahre nehmen die Mortalitätsraten im Kontrast zur Entwicklung der Inzidenz stetig ab.



Dennoch liegt die relative 5-Jahres-Überlebensrate bei nur 60% für Männer und Frauen (GEKID und RKI 2008). Diese Zahlen verdeutlichen, dass kolorektale Karzinome auch in Zukunft eine enorme soziomedizinische und sozioökonomische Bedeutung für die Bevölkerung sowohl in Deutschland als auch weltweit haben werden und sich zur Senkung der Morbidität und Mortalität die dringende Notwendigkeit einer frühest möglichen Detektion und Therapie ergibt. Bereits Arbeiten von *Selby* und *Winawer* in den Jahren 1992 / 1993 zeigten, dass die frühe Erkennung und nachfolgende interventionelle Abtragung von Polypen das Risiko an kolorektalen Karzinomen zu erkranken, reduziert (Selby et al.,1992; Winawer et al.,1993).

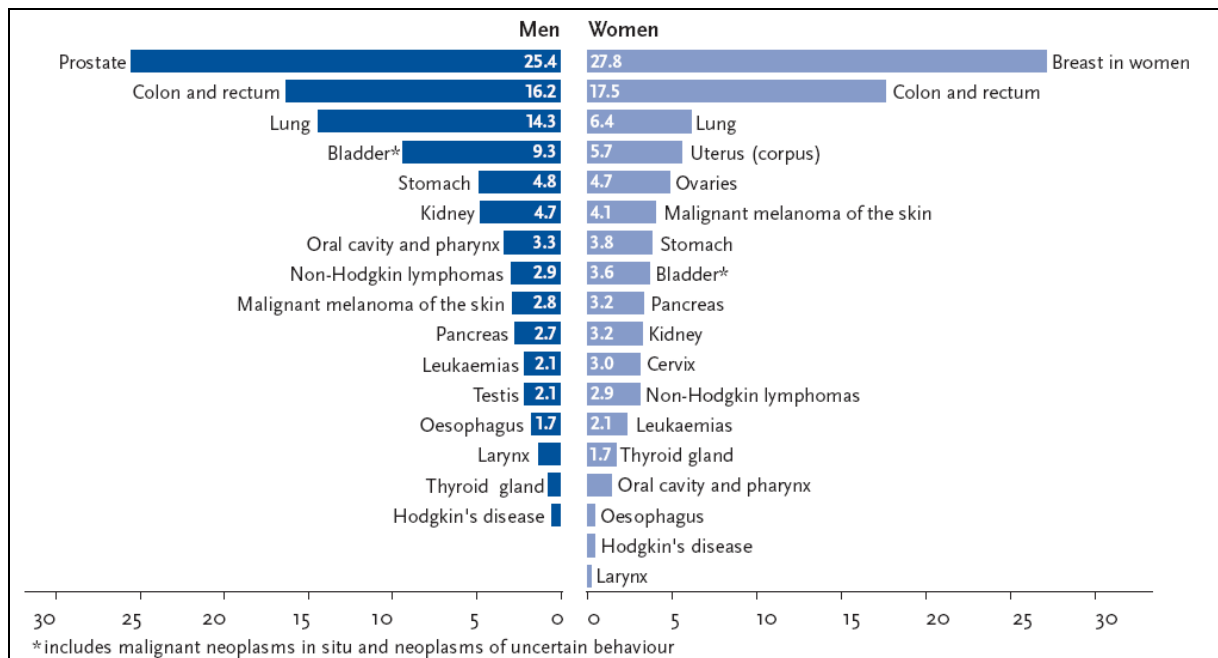


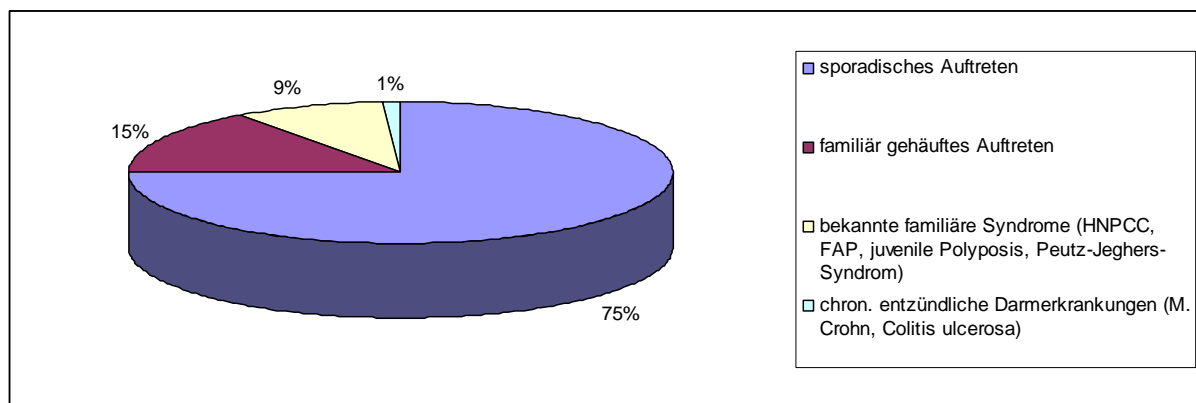
Abbildung 1.1: Prozentualer Anteil kolorektaler und anderer Karzinome im Bezug auf alle neu aufgetretenen Malignomfälle 2008

## 1.2 Genese des kolorektalen Karzinoms

Nach bisherigen wissenschaftlichen Erkenntnissen sind im Wesentlichen die im Folgenden genannten Pathogeneseformen für das kolorektale Karzinom bekannt:

1. sporadisch auftretende Karzinome;
2. familiär gehäuft auftretende Karzinome, exklusive der unter 3. genannten Syndrome;
3. aufgrund von familiären Syndromen entstandene Karzinome (Familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), juvenile Polyposis, Hereditäre non-polypöse Carcinomatosis Coli (HNPCC), Peutz-Jeghers-Syndrom);
4. für das Karzinom prädisponierende chron. entzündliche Darmerkrankungen (CED).

Die folgende Abbildung zeigt die Verteilung der unterschiedlichen Pathogenese-Formen des kolorektalen Karzinoms:



Quelle: Hisamuddin I. et al. Genetics of Colorectal Cancer. *MedGenMed*. 2004;6.

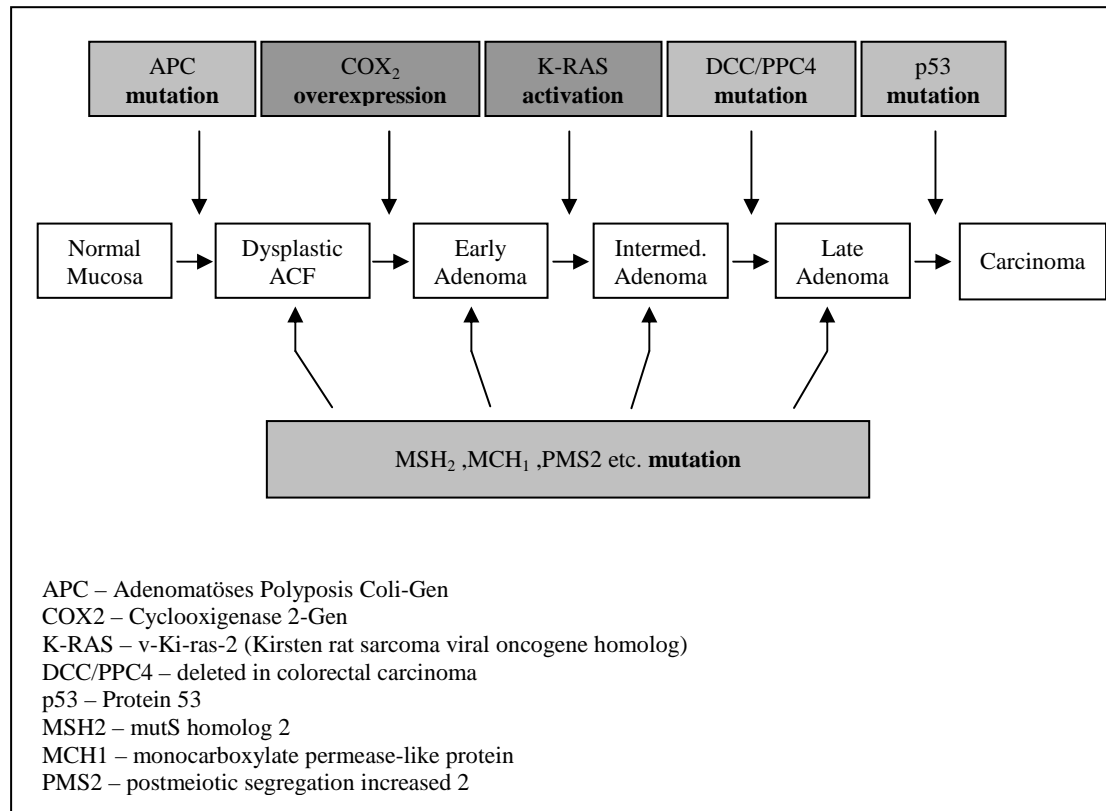
Abbildung 1.2: Genese des kolorektalen Karzinoms

### 1.2.1 Genetische Ursachen der Karzinogenese

Das am häufigsten auftretende sporadische Karzinom umfasst bis zu 80% aller kolorektalen Karzinomentitäten und ist durch das Vorkommen im Alter von über 50 Jahren ohne das Vorhandensein prädisponierender Faktoren charakterisiert (Hisamuddin et al., 2004).

*Fearon* und *Vogelstein* präsentierten bereits 1990 erstmals ein Modell, dass die Entstehung kolorektaler Karzinome als stufenweisen Prozess beschreibt (Fearon und Vogelstein 1990).

Dabei ist das entstandene Karzinom Folge multipler Mutationen in Genen resultierend zum einen in der Inaktivierung von Tumorsuppressor-Genen (wie z.B. APC; *hell* dargestellt) und zum anderen in der Aktivierung von Protoonkogenen (COX-2; K-RAS; *dunkel* dargestellt) (Hisamuddin et al., 2004). Wie nachfolgende Abbildung zeigt, verläuft die Karzinogenese über zwei verschiedene Signalwege:



Quelle: modifiziertes Modell nach Fearon E.R., Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990: 61; 759-767. (Hisamuddin et al., 2004)

### Abbildung 1.3: Kolorektale Karzinogenese nach dem Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz

Ein Signalweg verläuft über die Inaktivierung von APC, welches bei der Familiären Adenomatösen Polyposis (FAP) bereits in der Keimbahn mutiert ist. Die Tumorsuppressoren DCC/DPC4 und p53 sind zusätzlich häufig von Inaktivierung betroffen.

Der zweite Signalweg umfasst die Inaktivierung von DNA-Reparatur-Genen, wie hMSH2, hMLH1 oder PMS2 und Prototyp für diesen Mikrosatelliteninstabilitätsweg ist das Hereditäre Non-Polypöse Kolonkarzinomsyndrom (HNPCC). Er ist charakterisiert durch eine steigende Zahl intragenetischer Mutationen in kurzen, repetitiven Sequenzen, auch bekannt als Mikrosatelliten, deren Folge die Verlängerung dieser Sequenzen und die Mikrosatelliteninstabilität (MSI) ist (Middledorp et al., 2008).

Insgesamt können so in ca. 80% aller sporadischen kolorektalen Karzinome Mutationen im APC-Gen und in einem großen Teil der verbleibenden Fälle im sporadisch auftretenden Karzinom mit Mikrosatelliten-instabilität wird hMLH1 methyliert. Dieses Modell der kolorektalen Tumorgenese wurde auch als „Adenom-Karzinom-Sequenz“ bekannt (Fearon und Vogelstein 1990).

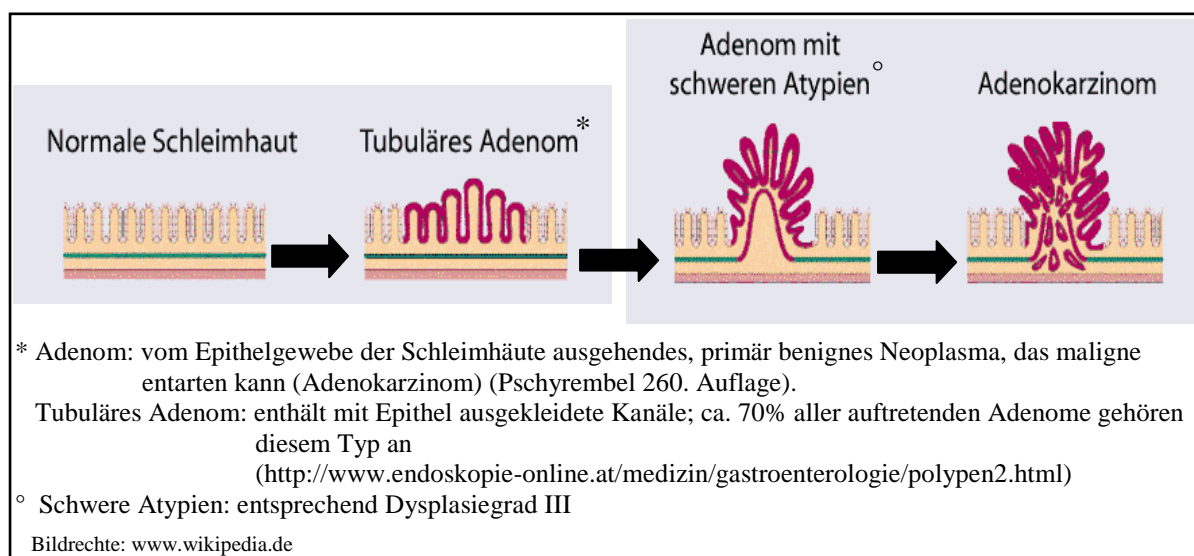


Abbildung 1.4: Hypothese der Karzinomentstehung nach B. Vogelstein  
 („Adenom-Karzinom-Sequenz“)

Die Mechanismen, die zur Entstehung der Tumorformation führen sind damit den im Rahmen familiärer Syndrome entstandenen ähnlich und können durch „Knudson`s 2-Hit-Hypothese“ noch genauer erläutert werden: Demnach sind für die generelle Entwicklung von Malignomen sowohl eine Mutation in den somatischen Zellen, als auch eine in den Keimbahnzellen in jeweils einem Allel notwendig.

In den vererbbaeren Fällen weisen **alle** somatischen Zellen diese Mutation auf, wohingegen in den sporadisch auftretenden Fällen nur **ein** somatischer Zellklon die Veränderung trägt (Knudson et al., 1993). Der Verlust entweder des maternalen oder paternalen Allels von Tumorsuppressor-Gen-Loci zusätzlich zu einem bereits durch andere Prozesse wie z.B. Punktmutationen anormal veränderten Allel wird als eines der Schlüsselereignisse in der kolorektalen Karzinogenese angenommen (Vogelstein et al., 1989) (Fearon et al., 1995). Promotormethylierung kann dabei entweder als erster oder zweiter Einflussfaktor („Hit“) auf die humane DNA wirken (Esteller et al. und Lander et al., 2001). Damit geht die Heterozygotie in den somatischen Zellen für dieses Merkmal verloren (= LOH- loss of heterocytosity).

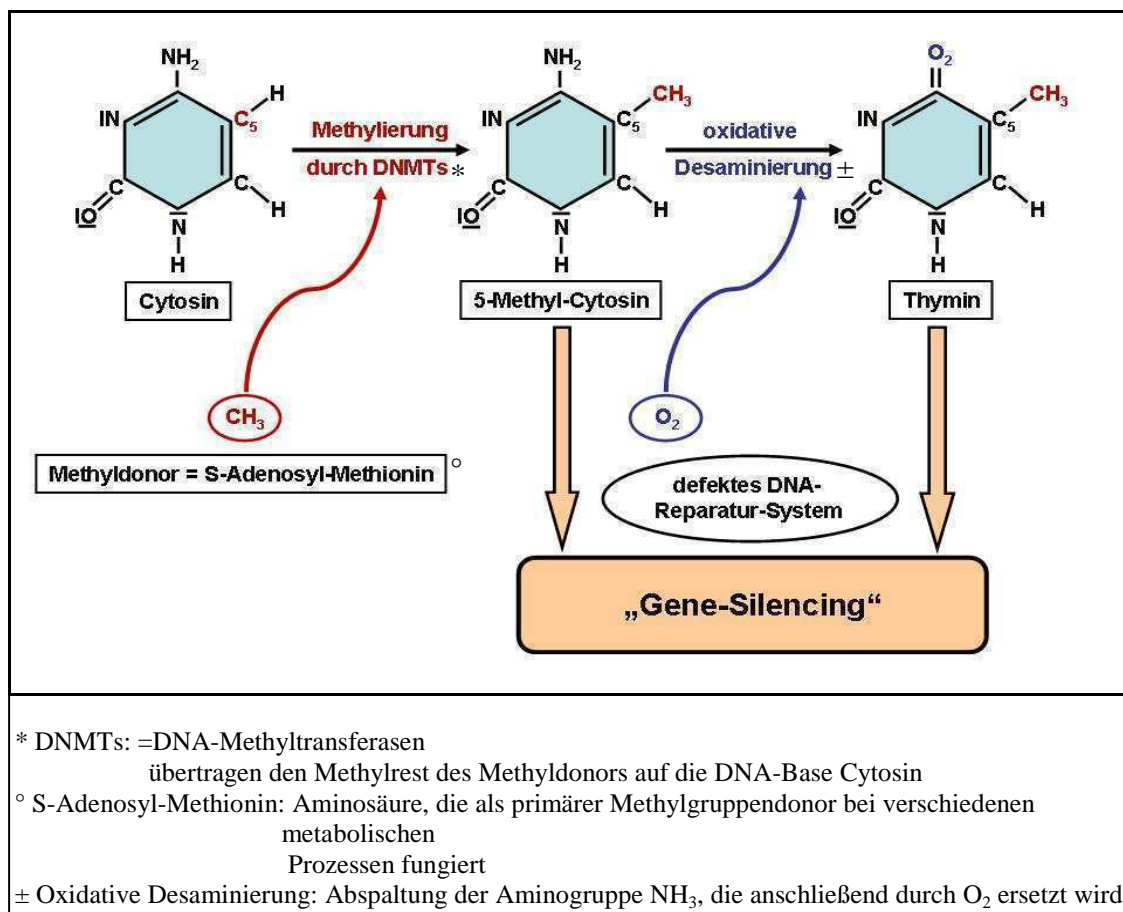
LOH führt wie die oben bereits beschriebene Mikrosatelliten-Instabilität zu genetischer Instabilität (Middledorp et al., 2008). Diese gesamte Variationsbreite genetischer Veränderungen kann zur Inaktivierung von Tumorsuppressor-Genen oder vorherrschender Aktivierung von Onkogenen führen, die der Zelle einen Wachstums- und Überlebensvorteil sichern (Kim et al., 2005).

## 1.2.2 Epigenetische Veränderungen

Der Begriff „epigenetisch“ beschreibt ein bestimmtes, vererbbares Muster der Genexpression, das jedoch nicht auf Veränderungen der primären Nukleotidsequenz der DNA beruht (Bird et al., 2002; Russo et al., 1996). Dieses Muster entsteht u.a. durch Methylierung der Promotorregion eines Gens, dem Bereich in dem die Transkription von DNA in RNA beginnt. Methylierung heißt, rein chemisch gesehen, die Übertragung eines Methyl-Restes (-CH<sub>3</sub>) auf das 5. Kohlenstoffatom der DNA-Base Cytosin, die dann als „fünfte“ Base der DNA zu Methyl-Cytosin modifiziert wird. Als Methyl-donor wirkt hierbei die Aminosäure S-Adenosyl-Methionin, während die Übertragung auf das Cytosin-Molekül durch DNA-Methyltransferasen (DNMTs), v.a. durch DNMT1 katalysiert wird (Russo et al., 1996) (Rhee et al., 2002). Diese Modifikation ist in menschlicher DNA nur im Bereich eines Cytosins möglich, das einer Guanosen-Base in der Basensequenz vorausgeht. Wenn diese Cytosin-Guanosen-Dinukleotide innerhalb einer 0,5 bis 2 Kb umfassenden DNA-Sequenz einen Gesamtanteil an allen DNA-Basen von > 60% aufweisen, definiert sich daraus der Begriff der CpG-Insel (Rashid et al., 2004). Gleichzeitig neigt das methylierte Cytosin als chemisch relativ instabile Base dazu, zu desaminieren, d.h. den am 4. Kohlenstoffatom gebundenen Aminrest abzuspalten und damit zu Thymin zu werden. Dieser Basenaustausch kann bei fehlender DNA-Korrektur-Funktion als Fehler im Leseraster bestehen bleiben und transkriptionelle Konsequenzen haben. Im humanen Genom sind ca. 70-80% aller, normalerweise unmethylierten, CpG-Dinukleotide von Methylierung betroffen (Ehrlich et al. 1982). Insgesamt geht man von ca. 29.000 existenten CpG-Inseln aus, die sich in der 5'-Region von etwa der Hälfte aller menschlichen Gene befinden (Russo et al., 1996; Lander et al., 2001). Die Methylierung des Cytosins innerhalb der CpG-Inseln ist durch Unterdrückung der Transkription, dem sogenannten „Gene-Silencing“, mit dem Verlust der Protein-Expression assoziiert und ist normalerweise irreversibel (Russo et al., 1996; Boyes et al., 1992). Durch diese epigenetische Veränderung entsteht im stark methylierten Anteil eines Gens inaktives Chromatin, in dem die Nukleosomen dicht gepackt vorliegen, was zur Inhibition der Replikation führt (Bird et al., 2002) (Herman et al., 2003).

Interessanterweise ist die übrige DNA in Tumorzellen bis auf die beschriebenen CpG-Inseln weitestgehend hypomethyliert (Kondo et al., 2004). Da die Promotor-Methylierung bereits in Frühstadien und prämaligen Läsionen nachgewiesen werden konnte, stellt sie einen entscheidenden Prozess in der Tumorgenese verschiedener Tumorentitäten dar (Nuovo et al., 1999). Beispiele hierfür ist die Promotormethylierung der Marker hMLH1 im Kolon, CDH1 in cervikalen Karzinomen, VHL in nephrologischen Tumoren oder BRCA in Mammakarzinomen (Toyota, Issa et al., 2005).

Die nachstehende *Abbildung 1.5* verdeutlicht noch einmal die oben beschriebenen Zusammenhänge:



*Abbildung 1.5: Umwandlung von Cytosin über 5-Methyl-Cytosin zu Thymin und dessen Auswirkungen auf die Transkription*

Dieser Prozess ist in der Vergangenheit vor allem für Tumorsuppressoren, Zellzyklus-Regulatoren, DNA-Reparatur-Gene, Transkriptionsfaktoren oder an Zelladhäsion bzw. /–invasion beteiligte Gene gezeigt worden, die unter *Punkt 2.7* noch einmal unter den aktuellen wissenschaftlichen Aspekten genauer beschrieben sind.

Sowohl die oben beschriebenen genetischen als auch die epigenetischen Prozesse sind auf komplizierte Weise miteinander verknüpft und sind sowohl für die Entstehung als auch für die Progression von Tumoren beginnend mit den frühen bis hin zu fortgeschrittenen Stadien verantwortlich (Ehrlich et al., 1982; Nuovo et al., 1999; Toyota, Issa et al., 2005).

### 1.3 Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms (UICC-Stadien)

Die Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms erfolgte u.a. durch die Union internationale contre le cancer (UICC) nach der Infiltration bestimmter anatomischer Strukturen durch den Tumor, dem Nodalstatus und der Art der Fernmetastasierung und ist als prognose-orientierte Klassifikation das weltweit das am häufigsten verwendete System (Wittekind et al., 2010).

*Tabelle 1.1: Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms nach TNM-Klassifikation*

UICC	TNM			Dukes
I	T1,T2	N0	M0	A
IIA	T3	N0	M0	B
IIB	T4	N0	M0	B
IIIA	T1,T2	N1	M0	C
IIIB	T3,T4	N1	M0	C
IIIC	jedes T	N2	M0	C
IV	jedes T	jedes N	M1	D

## 1.4 Detektion kolorektaler Karzinome zur Senkung von Morbidität und Mortalität

### 1.4.1 Darmkrebsvorsorge in Deutschland

Seit Oktober 2002 wird der Bevölkerung über 55 Jahre in Deutschland die Durchführung einer Vorsorgekoloskopie zur Früherkennung von kolorektalen Karzinomen empfohlen und als Kassenleistung übernommen. Innerhalb eines 10-Jahres-Abstandes ist dann die Inanspruchnahme einer zweiten Koloskopie möglich. Alternativ wird den Versicherten alle 2 Jahre, sowie im Zeitraum zwischen 50 und 54 Jahren jährlich, die Durchführung eines Tests auf okkultes Blut im Stuhl (FOBT) angeboten (Kassenärztliche Bundesvereinigung, 2002).

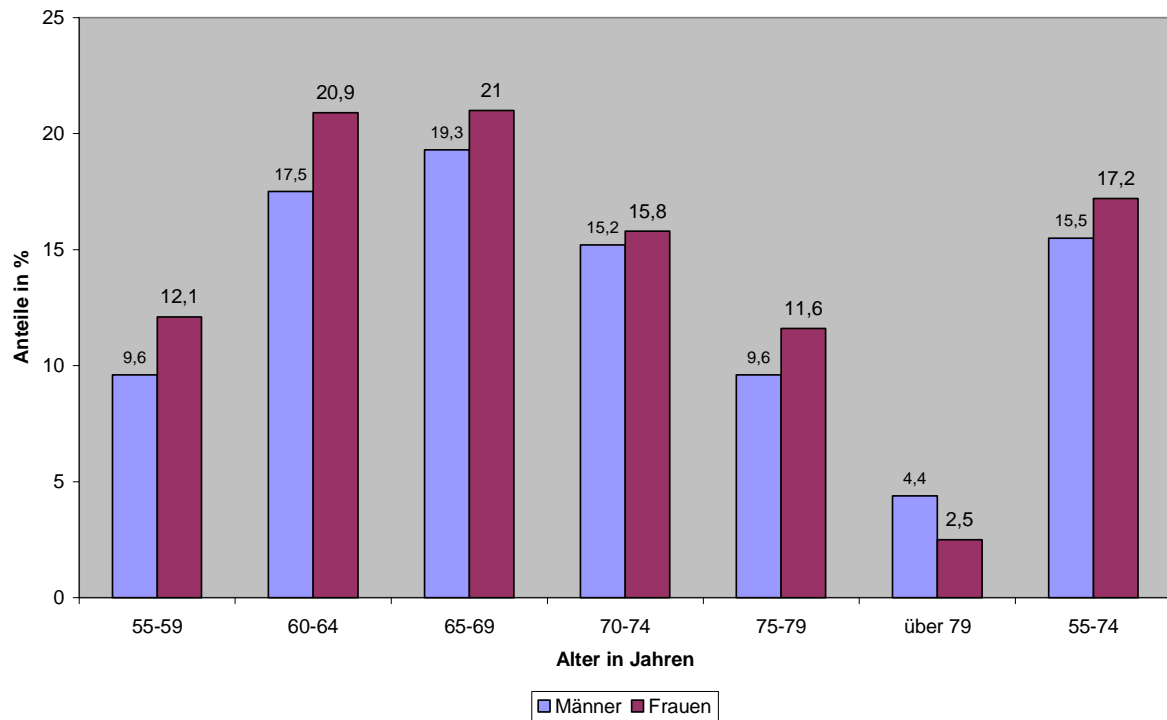
### 1.4.1.1 Koloskopie

Im Jahre 2008 haben sich laut *Zentralinstitut für die kassenärztliche Versorgung in der Bundesrepublik Deutschland (ZI)* 15,5% der anspruchsberechtigten 55-74-jährigen Männer und 17,2% der Frauen einer Früherkennungs-Koloskopie unterzogen (*Abbildung 1.6; kumulierte Teilnehmerraten*). Dabei wurden bei den teilnehmenden Männern in über 40% der Fälle ein oder mehrere makroskopisch sichtbare Polypen gefunden, Bei den teilnehmenden Frauen konnten bei etwa 30% ein oder mehrere Polypen diagnostiziert werden. (*Abbildung 1.7*). Nach histologischer Aufarbeitung fielen von allen entdeckten Polypen bei den Männern 13,6% und bei den Frauen 11,2% in die Kategorie der hyperplastischen Polypen. Von histologisch gesicherten kolorektalen Karzinomen konnten 1,3% bei den Männern und 0,7% bei den teilnehmenden Frauen detektiert werden, wovon 36,1% der Rektumkarzinome und 40,5% der Kolonkarzinome in den Stadien UICC I und II mit insgesamt günstiger Prognose erfasst werden konnten. Das Risiko einer prä- oder postinterventionell auftretenden Komplikation, wie Blutung, Perforation oder kardiopulmonalen Dysregulation lag 2008 bei 2,2/1000 Teilnehmer, wobei dieser Komplikationsrate die in der Literatur beschriebenen hohen Detektionsraten für kolorektale Karzinome, von bis zu 95%, gegenüberstehen (Mc Loughlin et al., 2006; Robinson et al.,1999).

In einer amerikanischen bzw. italienischen Multicenter-Studie konnte zudem eine Reduktion der Inzidenz kolorektaler Karzinome von 75% bis 90% in einem 5- und 10-Jahres-Follow-up gezeigt werden (Winawer et al., 1993) (Citarda et al., 2001). In Deutschland ergab eine Schätzung, die *Brenner et al., 2010* anhand aktueller Daten aus dem Nationalen Register der Früherkennungskoloskopien durchführten, dass im gesamten Bundesgebiet bis zum Ende des Jahres 2010 98.734 Tumorerkrankungen verhindert und weitere 47.168 durch Adenomentfernung in einem frühen, gut therapierbaren Stadium erfasst werden konnten. Diese Zahlen machen deutlich, dass die Vorsorge-Koloskopie einen wichtigen Beitrag im Bereich der Primär- und Sekundärprävention leistet.

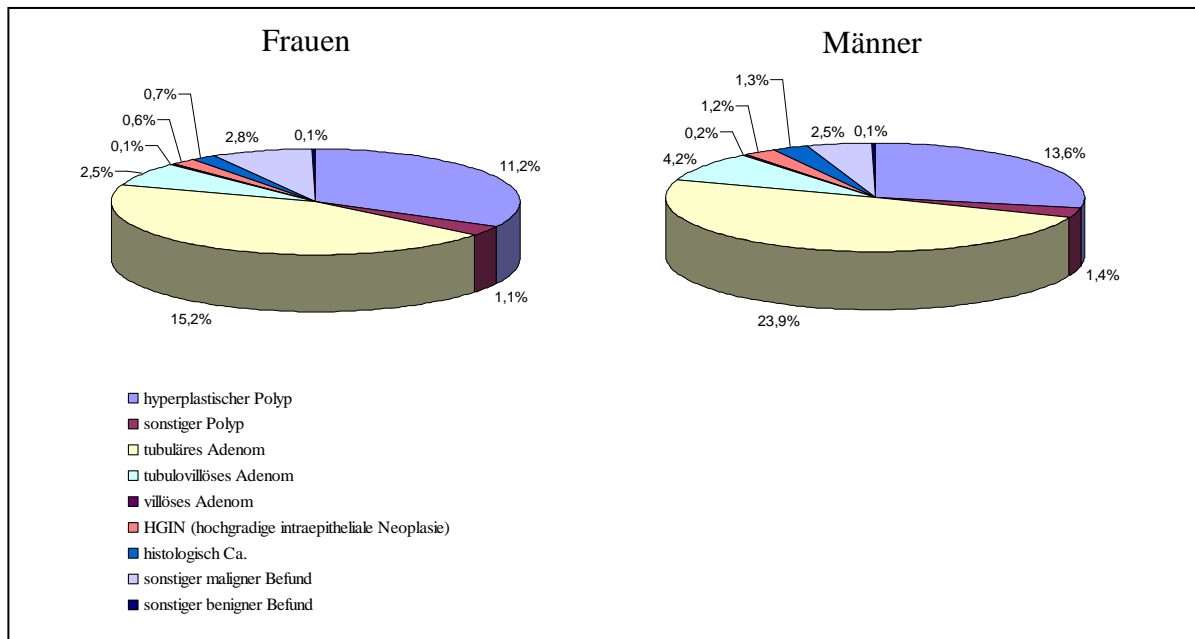
Die Beteiligung an der Vorsorge-Koloskopie ist zwar im Vergleich zu 2002 stetig angestiegen, wird jedoch laut ZI bei gleichbleibender Beteiligung bis 2013 trotz hoher Effizienz und Diagnosesicherheit nur von etwa 30% der betroffenen Altersgruppe wahrgenommen werden. Das bedeutet 70% potentielle Träger von Tumorstufen und Karzinomen, deren Beteiligungswillen vielleicht durch andere, weniger aufwändige und invasive Screening-Alternativen, wie der Test auf okkultes Blut (FOBT) oder Tumor-DNA im Stuhl, den Nachweis von Karzinom-DNA im Blut oder radiologische Verfahren erhöht werden könnte.





Quelle: Wissenschaftliche Begleitung der Früherkennungs-Koloskopie, 6. Jahresbericht 02/2010 des Zentralinstituts für die kassenärztliche Versorgung in der Bundesrepublik Deutschland.

*Abbildung 1.6: Kumulative Beteiligung der Bevölkerung an Früherkennungs-Koloskopien*



Quelle: Wissenschaftliche Begleitung der Früherkennungs-Koloskopie, 6.Jahresbericht 2010 des Zentralinstituts für die kassenärztliche Versorgung in der Bundesrepublik Deutschland.

Abbildung 1.7: Durch Früherkennungs-Koloskopien erfasste Diagnosen im Jahr 2008 (2003 – 2008 zusammengefasst) ZI 2009

### 1.4.1.2 Fäkaler okkultter Bluttest (FOBT)

In diesem Test werden 3 aufeinander folgende Stuhlproben auf mit Guajak-Harz beschichtete Felder aufgetragen und anschließend mit Wasserstoffperoxidlösung beträufelt. Aufgrund der Pseudoperoxidaseaktivität des Häm-Restes, die mittels Wasserstoffperoxid die Guajakonsäure im Guajakharz oxidiert, kommt es zur Blaufärbung des Testpapiers. So kann Blut, als eines der Kardinalsymptome bei kolorektalen Karzinomen, nachgewiesen werden. Die Sensitivität des Testes für kolorektale Karzinome ist sehr variabel, beträgt nach Untersuchungen von Allison und Lieberman u.a. zwischen 24% und 71% und ist dabei abhängig vom verwendeten Test (Allison et al., 1996), von anschließender Rehydratation (Simon et al., 1985) sowie der Anzahl der gesammelten Proben (u.a. Haemoccult® Sensa Präparateinformation). Erreicht wird mit dem FOBT etwa eine Spezifität von 90%. Für Vorstufen, wie Adenome liegt sie mit 9%-36% deutlich darunter (Winawer et al., 1993; Jemal et al., 2004; RKI, 2008; Allison et al., 1996; UEGF, 2006). Ausserdem ist der FOBT relativ störanfällig und unterliegt zahlreichen Möglichkeiten der Verfälschung. So können z.B. falsch positive Ergebnisse durch ausgeprägten Fleischgenuss (Nachweis von tierischem Häm des Myoglobins) oder andere Blutungsquellen wie z.B. aus Zahnfleisch, Nase oder Hämorrhoiden vorgetäuscht werden.

Weiterhin negativ auf die Sensitivität wirkt sich die Tatsache aus, dass Karzinome häufig nur intermittierend bluten und auch deshalb durch den Test nicht erfasst werden können. Falsch negative Ergebnisse sind durch Einnahme von Ascorbinsäure möglich, die die Peroxidase hemmt (Robinson et al., 1999). Insgesamt handelt es sich bei dem FOBT um einen bei relativ einfacher, nicht invasiver und preiswerter Anwendung wenig sensitiven Test, der jedoch bei wiederholter und breiter Anwendung die Mortalitätsrate von 15% bis zu 33% senken kann (Mc Loughlin et al., 2006; Hardcastle et al., 1996; Kronborg et al., 1996; Wilson et al., 1968). Als alternativer Nachweistest gilt der FIT (fäkaler immunochemischer Test), der gegenüber dem FOBT den entscheidenden Vorteil bietet, Globin nachzuweisen, dadurch spezifischer für humanes Hämoglobin ist und sich nicht durch ernährungsbedingte Peroxidaseschwankungen beeinflussen lässt (Caligiore et al., 1982). Für den FIT sind in einer Arbeit von Allison et al. 2007 Tumordetektionsraten von 81,8% berichtet worden, während die Sensitivität für fortgeschrittene Adenome nur 29,5% betrug und damit deutlich niedriger als die des vergleichenden FOBT war (Allison et al., 2007). Im Widerspruch dazu war der FIT gemäß einer Arbeit von Guittet et al. 2007 in der Lage, doppelt so viele fortgeschrittene Tumorstufen zu erkennen, wie der FOBT. In einer doppelblinden Studie von Brenner et al., 2009 konnten Nachweisraten von 25% bzw. 27% für fortgeschrittene Adenome bei einer Spezifität von 97% bzw. 93% in Abhängigkeit vom verwendeten Test erzielt werden und ebenfalls ein Detektionsvorteil gegenüber dem FOBT für diese Zielgruppe herausgestellt werden.

Ein ebenfalls im Stuhl (darüber hinaus auch im Blut) messbarer Parameter, der erstmals 1997 an der Universität Giessen als Tumormarker für kolorektale Karzinome getestet wurde, ist eine Isoform der Pyruvatkinase, die M2-PK (Eigenbrodt et al., 1997). Sie gilt als eines der Schlüsselenzyme im Tumormetabolismus und wurde bisher in vielen Studien evaluiert und mit den verbreiteten Tests verglichen (Ewald et al., 2005; Hardt et al., 2004; Haug et al., 2008; Shastri et al., 2008). Dabei wurden Sensitivitäten für Karzinome von 72% bis 78% bei einer Spezifität von 73% bis 93% berichtet (Osborn et al., 2005; Tonus et al., 2006). Für fortgeschrittene Adenome lagen Sensitivität und Spezifität bei unbefriedigenden 22% bzw. 82% (Haug et al., 2008). Im Blut konnte M2-PK durchschnittliche Detektionsraten für Karzinome zwischen 48% und 69% erzielen; jedoch ohne jede Nachweismöglichkeit für Adenome (Hundt et al., 2007).

## 1.4.2 Alternative Nachweismethoden

### 1.4.2.1 Virtuelle Koloskopie

Die CT- oder MRT-gestützte virtuelle Koloskopie erlaubt ohne invasiv zu sein Einblicke in das Darmlumen. Dabei wird nach vorheriger Darmreinigung, analog zur konventionellen Koloskopie, mittels CO<sub>2</sub>-Insufflation oder Raumluft über eine Rektumsonde das Darmlumen aufgebläht bzw. mit Wasser gefüllt und währenddessen CT-graphisch bzw. mittels MRT die Konturen der Darmwand aufgezeichnet. Anschließend werden die erzeugten Schnittbilder mit einer speziellen Software zu einem 3D-Modell verrechnet und erlauben so einen „virtuellen Rundgang“ durch das Kolon und die Erfassung von prä-/ malignen Läsionen.

Die entscheidenden Vorteile der virtuellen Koloskopie liegen v.a. in der angenehmeren, wenig schmerzhaften Durchführung, der Möglichkeit, sie auch bei klinisch nicht für die konventionelle Koloskopie geeigneten Patienten einsetzen zu können, der zusätzlichen Beurteilbarkeit der Bauchorgane und der Verzicht auf eine Sedierung. Die relevantesten Nachteile sind v.a. die fehlende therapeutische Interventionsfähigkeit während der Untersuchung, die interventionelle Strahlenbelastung im CT, die Dauer der MRT-Untersuchung von bis zu 30 min, sowie die mehr als doppelt so hohen Kosten. Auch bei diesem Verfahren ist wie bei der konventionellen Koloskopie die vorbereitende und für Patienten oftmals sehr belastende Reinigung des Darms entscheidend für ein zufriedenstellendes Untersuchungsergebnis. Ausserdem wird während der Untersuchung Luft oder CO<sub>2</sub> ins Darmlumen insuffliert, was oftmals auch als unangenehm empfunden wird. Bisher liegen, ähnlich wie bei der konventionellen Koloskopie, keinerlei randomisierte, kontrollierte Studien vor, die die Effizienz der CT-Kolographie im Hinblick auf die Reduktion der Mortalität kolorektaler Karzinome belegen würden (Levin et al., 2008; Baxter et al., 2009). *Cotton et al., 2004* und *Rockey et al., 2005* untersuchten die Detektion von großen Polypen und wiesen Sensitivitäten von 55% bzw. 59% nach, wobei im Screening jedoch nicht die asymptomatische Bevölkerung berücksichtigt wurde. *Pickhardt et al., 2003* untersuchten asymptomatische Erwachsene und publizierten eine Sensitivität für Polypen über 6mm von 89% und in einer weiteren Arbeit von 2005 wurde sogar eine mit der konventionellen Koloskopie vergleichbare Sensitivität für Karzinome erreicht (Halligan et al., 2005; Farrar et al., 2006). Dazu erreichte die Untersuchungsmethode in einer Studie von *White et al., 2008* eine Sensitivität und Spezifität für Polypen größer 1cm von 91% bzw. 99,2%. *Graser et al. 2008* konnten mit einer Sensitivität von 96,7% für Adenome > 5mm Größe sogar mit der konventionellen Koloskopie vergleichbare Resultate erzielen.

Zu dieser Erkenntnis kam im Jahre 2007 auch eine von *Kim et al.*, im New England Journal veröffentlichte Arbeit. Bisher beurteilte die Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselerkrankungen (DGVS) den Einsatz der CT-Kolographie als Screening-Verfahren u.a. aufgrund der unzureichenden Datenlage dennoch als nicht empfehlenswert. Für die MRT-gestützte Koloskopie sind die Detektionsraten für Polypen aufgrund der schlechteren Auflösung jedoch erst ab einer Größe von über 1 cm annähernd mit der CT-Koloskopie vergleichbar (Kerker et al., 2008).

### 1.4.2.2 Stuhltests

Molekulare Stuhltests, bei denen in den Stuhl abgegebene Tumor-DNA isoliert und anschließend mittels PCR analysiert wird, sind ein relativ neuer Ansatz zum Screening kolorektaler Karzinome. Sie können zum einen unterschieden werden nach der Detektion von genetischen Veränderungen wie Mutationen in Tumorsuppressor-Genen (K-ras, p53, APC, hMLH1 u.a.) und zum anderen nach epigenetischen Veränderungen wie z.B. Promotor-Methylierung verschiedener Gene (SFRP2, u.a.). Um eine ausreichende Sensitivität zu erreichen, muss ein Panel, bestehend aus mehreren Genen, auf Mutationen untersucht werden (Wilson et al., 1968). Zahlreiche Studien sind dazu bisher publiziert worden, die im Folgenden zur besseren Übersicht in genetische und epigenetische Veränderungen unterschieden werden:

Im Bereich der genetischen Modifikationen (Mutationen) konnten *Ahlquist et al.* bereits im Jahr 2000 mit einem Panel, bestehend aus den Genen K-ras, p53, APC und Bat-26, einem Mikrosatelliteninstabilitätsmarker, Sensitivitäten für Karzinome von bis zu 91% erzielen. Für Adenome einer Größe über 1 cm wurde eine Sensitivität von 82% erreicht, bei einer maximalen Spezifität von 93%. Bei *Koshiji et al., 2002* wurden mit einem aus 7 Genen bestehenden Markerpanel (APC, p53, DCC, hMLH1, D9S162, D9S171, und IFNA) sogar 96,7% Sensitivität und 100% Spezifität für die Detektion von Karzinomen berichtet. In einer weiteren Arbeit von *Tagore et al., 2003* konnten Mutationen in APC, p53 und K-ras in Adenomen  $\geq 1$ cm nur in 16 von 28 Fällen, entsprechend einer Sensitivität von 57,1%, nachgewiesen werden; bei *Syngal et al., 2006* betrug die Nachweisrate sogar nur 26%. Durchschnittlich geringer waren die Detektionsraten für epigenetische Veränderungen, für die mit der Untersuchung des HIC1-Promotors bzw. des SFRP2-Gens auf Hypermethylierung eine minimale und maximale Sensitivität für Karzinome von 42% bzw. 77% erreicht werden konnte (Lenhard et al., 2005; Müller et al., 2004).

Für Adenome  $\geq 1$ cm konnten Detektionsraten von 31% bei der Methylierungsanalyse des HIC1-Promotors bzw. 67% bei Untersuchung der Methylierung des  $\beta$ -Globulin-Gens publiziert werden (Lenhard et al., 2005; Leung et al., 2004). Die dazu erreichten Spezifitäten betragen für Mutationen stets über 85% und für epigenetische Veränderungen mindestens 77% (Lenhard et al., 2005; Müller et al., 2004; Ahlquist et al., 2000; Tagore et al., 2003). Insgesamt gesehen haben molekulare Stuhltests den Vorteil, nicht invasiv zu sein, relativ sensitiv kolorektale Karzinome nachzuweisen und dafür nur eine einzige Stuhlprobe zu benötigen. Bisher evaluierte Nachteile sind die Notwendigkeit eines Markerpanels in den kommerziellen Tests, die gegenüber einem Blut-basierten Test erhöhten Kosten durch die komplexere Probenaufbereitung, sowie die bisher nicht evaluierte Sensitivität für Adenome für diese Tests (Hundt et al., 2007; Kahi et al., 2008). Jeder positive Test muss außerdem durch eine Koloskopie überprüft werden (Wilson et al., 1968). Weiterhin wurde von *Osborn et al., 2005* berichtet, dass sofern Tumore veränderte Zellen abgeben und diese den Verdauungsprozess überstehen, auch Malignome, die sich oberhalb des Kolons befinden, nachgewiesen werden können. Auch die Akzeptanz eines Stuhltestes ist im Allgemeinen sicher eher kritisch zu bewerten. Zudem sind fehlerhafte Messergebnisse bei unterschiedlichen, die Biomarker bzw. deren Analyse beeinflussenden Mikrofloren im Darm möglich (Hundt et al., 2007). Aktuell wird auch dieses Testverfahren aufgrund mangelnder Daten sowohl von der *Amerikanischen Krebsgesellschaft (ACS)* als auch von der *US Multi Society Task Force on Colorectal Cancer (USMSTF)* nicht als Screeningverfahren empfohlen (ACS/USMSTF/ACR, 2008).

Tabelle 1.2: Nachweis kolorektaler Karzinome in genetischen und epigenetischen Stuhltests

	Autor (en)	genetische Tests		Autor (en)	epigenetische Tests	
		Sensitivität	Spezifität		Sensitivität	Spezifität
Karzinome	Ahlquist et al. 2000	91%	93%	Lenhard et al. 2005	42%	98%
	Koshiji et al. 2002	96,7%	100%	Müller et al. 2004	90%	77%
	Tagore et al. 2003	63,5%	96,2%	Leung et al. 2004	70%	100%
	Syngal et al. 2006	54%	----			
Adenome ≥ 1 cm	Ahlquist et al. 2000	82%	93%	Lenhard et al. 2005	31%	98%
	Tagore et al. 2003	57,1%	96,2%	Leung et al. 2004	67%	---
	Syngal et al. 2006	26%	---			

### 1.4.2.3 Bluttests – allgemeine Aspekte

Es gibt seit langem die Bestrebung, eine Nachweismöglichkeit für Tumore jeglicher Art zu finden, die als Screening eine hohe Akzeptanz in der Bevölkerung besitzt, dazu leicht und minimal invasiv zu gewinnen ist und eine hohe Aussagekraft, also maximale Sensitivität und Spezifität erreicht. Ein im Blut durchgeführter Test könnte genau diese Kriterien erfüllen und wäre zusätzlich ein sehr risikoarmes Verfahren.

Das 1965 entdeckte, später als Tumormarker genutzte Carcinoembryonale Antigen (CEA) gilt als Vorreiter auf diesem Gebiet. CEA ist ein Glykoprotein aus der Familie der Immunglobuline, dessen Serumkonzentration zumindest teilweise mit der Tumorzellmasse korreliert. CEA wird v.a. auf Zellen der Darmmukosa, des exokrinen Pankreas und der Leber exprimiert. Verfälschungen dieses Wertes ergeben sich v.a. durch dessen unspezifische Bildung auch von anderen Tumorzellen neben dem kolorektalen Karzinom, wie Mamma-, Pankreas- oder Adenokarzinom der Lunge. Ein weiterer entscheidender Nachteil bei der Bestimmung dieses Tumormarkers im Serum liegt in der Tatsache, dass er erst bei bereits fortgeschrittenen Karzinomen auftritt. Die Sensitivität von CEA für alle Tumorstadien variiert zwischen 43% und 69%. Für fortgeschrittene Stadien (Dukes D) konnten bis zu 89% Sensitivität nachgewiesen werden (Hundt et al., 2007).

Ein zusätzlich häufig bestimmter Tumormarker, ebenfalls ein Glykoprotein mit Blutgruppeneigenschaften, ist das Carbohydrat-Antigen 19-9 (CA 19-9).

Die höchste Sensitivität besitzt CA 19-9 mit 85-90% bei einer Größe  $\geq 3$  cm für Pankreaskarzinome, während die Detektionsrate für kolorektale Karzinome stark schwankt und sich in Vergleichsstudien zwischen 18% und 65% bewegte, wobei frühe Stadien (Dukes A) bzw. Adenome überhaupt nicht bzw. zu max. 4% durch den Marker erfasst wurden (Hundt et al., 2007). Falsch-positive Werte finden sich für beide Tumormarker zudem häufig bei Rauchern. Auch benigne, besonders entzündliche Erkrankungen können einen Anstieg der beschriebenen Marker verursachen, wie z.B. die Pankreatitis, Hepatitis oder chronisch entzündliche Darmerkrankungen. Somit eignen sich diese Tumormarker am ehesten für die Verlaufskontrolle nach operativer oder Radio-/ Chemotherapie jedoch keinesfalls zur Früherkennung. Aus zahlreichen Publikationen ist bekannt, dass vom jeweils vorherrschenden Tumor freie DNA ins Blut abgegeben wird (Chun et al., 2006; Chang et al., 2002; Gautschi et al., 2004). Diese Tatsache lässt sich daraus ableiten, dass freie DNA im Serum von Gesunden und Patienten mit anderen, nicht malignen Erkrankungen (wie z.B. Autoimmunerkrankungen) erniedrigt und im Gegensatz dazu bei Tumorpatienten erhöht ist (Hardt et al., 2004; Wu et al., 2002). Wahrscheinlich wird die frei zirkulierende DNA aus nekrotischen malignen Zellen freigesetzt (Diehl et al., 2005). Den Nachweis dieses kausalen Zusammenhangs haben u.a. *Umetani et al., 2006* für das kolorektale Karzinom erbracht.

Zahlreiche Arbeiten beschäftigen sich gegenwärtig damit, sowohl genetische als auch epigenetische Veränderungen, wie die Promotor-Hypermethylierung in dieser frei zirkulierenden DNA nachzuweisen (Sidransky et al., 2002; Goessl et al., 2002; Müller et al., 2003; Burchill et al., 2000). *Diehl et al., 2005* detektierten mutierte APC-Moleküle im Plasma aller Patienten mit fortgeschrittenen kolorektalen Karzinomen (definiert durch Stadium Dukes D). Aber auch bei  $> 60\%$  der frühen, kurativ therapierbaren Tumorstadien wurde mutiertes APC gefunden (Tonus et al., 2006). Eine Sensitivität von 94% bei einer Spezifität von 77% für den Nachweis von RNA eines 5-teiligen Markerpanels, bestehend aus CDA, MGC20553, BANK1, BCNP1 und MS4A1 im Serum kolorektaler Karzinompatienten publizierten *Han et al., 2008*.

Zu einem epigenetischen Ansatz, zur Messung von Promotor-Hypermethylierung im Serum, entschieden sich u.a. *Leung et al., 2005*. Sie untersuchten die 3 potentiellen Biomarker APC, hMLH1 und HLTF und konnten für die Kombination aus allen 3 Markern eine Sensitivität bzw. Spezifität für Karzinome von 57,1% bzw. 90,2% feststellen. *Wallner et al.* fanden 2006 heraus, dass die Promotormethylierung von HLTF, HPP1/TPEF und hMLH1 im Serum signifikant mit der Tumorgröße korreliert.



Für HPP1/TPEF und HLTF war sie zusätzlich konkordant zu einem höheren relativen Mortalitätsrisiko, trat häufiger bei Patienten mit positivem Nodalstatus, Fernmetastasierung und fortgeschrittenen UICC-Stadien (III bzw. IV) auf und besitzt durch die Identifikation von Patienten mit erhöhtem Mortalitätsrisiko eine erhebliche prognostische Relevanz.

Zusätzlich korrelierte der positive Nachweis von Carcinoembryonalem Antigen (CEA) signifikant mit dem Vorhandensein von HPP1/TPEF-Promotormethylierung. In dieser Arbeit konnten Sensitivitäten für Karzinome im UICC IV-Stadium von 47% für HLTF und 53% für HPP1/TPEF erreicht werden. Allerdings gelang der Nachweis von kolorektalen Frühstadien mit diesen Markern nicht.

*Lofton-Day et al.* testeten mit TMEFF2, NGFR, und SEPT9 2007 bzw. 2008 drei völlig neue Marker für die Detektion kolorektaler Karzinome im Plasma. Sie konnten für die Kombination der Tumorstadien UICC I, II und III isoliert für Septin-9 eine Sensitivität von 70% und eine Spezifität von 90% erreichen und etablierten damit einen der bis dahin besten Nachweistests für die Anwendung im Blut. Für die Frühstadien UICC I und II, deren Nachweis die größtmögliche Senkung der Mortalität versprechen dürfte, wurden jedoch auch hier nur knapp über 60% Sensitivität erreicht. In Kombination mit ALX-4, einem schon zuvor identifizierten Methylierungsmarker, konnten mit knapp 56% Sensitivität Adenome jeder Größe erfasst werden (Ebert et al., 2006; Lofton-Day et al., 2007).

Aufgrund der wenigen fundierten, bisher zu diesem Thema publizierten Arbeiten zur Identifikation von Biomarkern in Frühstadien der kolorektalen Karzinogenese waren wir speziell an dieser Fragestellung interessiert

## 1.5 Serummarker

Die Bezeichnung der im Folgenden als Serummarker beschriebenen Gene dient der Vereinfachung und bezieht sich jeweils auf die Cytosin und Guanin-reichen Abschnitte (sogenannte CpG-Inseln) im Promotorbereich. Es wurden insgesamt nur Marker ausgewählt, die in der Literatur bereits als Tumor-Suppressoren, Zellzyklus-Regulatoren, Transkriptionsfaktoren, DNA-Reparatur-Gene, als an Zelladhäsion bzw. -invasion beteiligte Proteine beschrieben wurden oder Einfluß auf Wachstum und Differenzierung haben. Durch die Inaktivierung dieser Gene z.B durch Promotor-Hypermethylierung können viele wichtige Zellprozesse beeinflusst werden, die wesentlich an der kolorektalen Karzinogenese beteiligt sind; wie im Folgenden unter den einzelnen Markern beschrieben.

### 1.5.1 APC (Adenomatous Polyposis coli)-Gen

Das APC-Gen ist lokalisiert auf Chromosom 5y q21-q22 und hat als Tumor-Suppressor-Gen wichtige Funktion in der Signaltransduktion (Wnt-Signalweg). Hierbei bildet es zusammen mit anderen Proteinen (Axin1/2, Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$ , GSK-3 $\beta$ ) einen Proteinkomplex, welcher  $\beta$ -Catenin abbaut. Beim Funktionsverlust des APC-Proteins (z.B. durch Mutation oder Promotor-Hypermethylierung im APC-Gen) sinkt die Affinität von  $\beta$ -Catenin zum abbauenden Proteinkomplex. Die Anhäufung des  $\beta$ -Catenins wirkt innerhalb der Zelle ähnlich wie die Aktivierung des Wnt-Signalwegs;  $\beta$ -Catenin wandert in den Zellkern, bindet Kofaktoren aus TCF, der LEF-Familie und führt zur Transkription von Wnt-Zielproteinen wie z.B. MYC oder CYCD1, was wiederum eine unkontrollierte Proliferation der Zelle zur Folge hat (Esteller et al., 2001; Thorstensen et al., 2003).

In über 80% aller sporadisch auftretenden kolorektalen Karzinome finden sich Mutationen des APC-Gens und in 10-32% eine Methylierung des Promotors (Esteller et al., 2000 und 2004; Hisamuddin et al., 2004). In der aktuellen Veröffentlichung von *Baylin S.B. et al., 2008* ist jedoch keine Korrelation zwischen schlechter Prognose und epigenetischen Veränderungen für APC in Kolonkarzinomen nachweisbar. *Leung et al., 2005* untersuchten die Promotor-Methylierung von APC u.a. im Serum, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen der Konzentration methylierter DNA bei Tumorpatienten gegenüber gesunden Kontrollpersonen gemessen wurde und nur in 6 % der Patientenseren methylierte DNA nachgewiesen werden konnte. Bei *Wallner et al., 2006* wurden im Serum abhängig vom Stadium der Tumorausbreitung 21% Methylierung bei Lokalbefall bzw. sogar 43% in metastasierten Stadien gefunden.

### 1.5.2 CDH-1 (Cadherin-1)

Dieses auch mit dem Proteinnamen humanes E-Cadherin bezeichnete Gen ist auf Chromosom 16q22.1 lokalisiert, ist eines der wichtigsten Moleküle der Zell-Zell-Adhäsion in epithelialen Geweben und spielt wie APC eine wichtige Rolle als Tumor-Suppressor (Pecina-Slaus et al., 2003). Weiterhin gehört es zur Familie der für Calcium-abhängige Zelladhäsions-Moleküle (CAMs) codierenden Gene und wird auf vielen verschiedenen Oberflächen exprimiert. Es ist auch bekannt, dass ein Funktionsverlust des E-Cadherin-Proteins mit dem Verlust der Epithelmorphologie, einer gesteigerten Invasivität und letztlich der Entstehung von Metastasen korreliert (Vleminsky et al., 1991; Rietmacher et al., 1995). So gilt eine unterdrückte Expression des Gens als einer der Hauptfaktoren der malignen Zelltransformation und der Tumorentwicklung und -progression.

Dies wird ermöglicht durch die Interaktion von E-Cadherin mit Komponenten des Zytoskeletts über Signaltransduktions-Kaskaden, wie dem Wnt-Signalweg. Mutationen dieses Gens wurden bereits in einigen menschlichen Tumorentitäten beschrieben, u.a. in Mamma-/ Endometrium-/ Ovarial-/ Prostata-/ und hepatozellulären Karzinomen, bei denen der Expressionsverlust z.T. mit fortgeschrittenen Tumorstadien und schlechter Prognose korrelierte (Berx et al., 1998; Giulford et al., 1999). Eine weitere Form der Expressionsregulation, die Promotor-Hypermethylierung wurde u.a. von *Tycko et al., 2000* untersucht, in denen ebenfalls der Zusammenhang zwischen Funktionsverlust des Gens und der Entstehung von Metastasen deutlich wurde. Weiterhin fanden *Tan et al., 2007* Methylierungsraten im Serum von kolorektalen Karzinompatienten von rund 18%. Außerdem wurde anhand eines Mausmodells nachgewiesen, dass die Inhibition der Promotor-Hypermethylierung die Tumorentwicklung unterdrücken kann (Conacci-Sorrell et al., 2002). Diese Zahlen belegen, dass Cadherin-1 sich als Zielmolekül für eine Antitumorthherapie eignen könnte.

### 1.5.3 HLTF

Der „**h**elicase like **t**ranscription-**F**actor“, der zur SWI/SNF-Familie, einer Gruppe Chromatin-modulierender Proteine gehört, ist ebenfalls ein Tumorsuppressorgen-Kandidat. Für dieses Gen fanden *Moinova et al., 2002* eine Methylierung in bis zu 50 % der untersuchten kolorektalen Karzinome. Außerdem erbrachte die Arbeit den Nachweis, dass durch Promotor-Methylierung sowohl das paternale als auch das maternale Allel im selben Tumor von der unterdrückten Gen-Expression betroffen ist. Weiterhin untersuchten *Leung et al., 2005* erstmals die Promotor-Methylierung von HLTF im Serum von Patienten mit kolorektalen Karzinomen und konnten einen signifikanten Unterschied in der Konzentration methylierter Serum-DNA zwischen Tumorstadien und der gesunden Kontrollgruppe nachweisen. Außerdem wurde eine enge Korrelation zwischen der Konzentration methylierter DNA und dem jeweiligen Tumorstadium festgestellt. *Wallner et al., 2006* fanden im Serum von Patienten bereits metastasierter Stadien Methylierungsraten von 50% gegenüber Lokalbefunden mit 17% Methylierung.

### 1.5.4 hMLH1

Dieses in der DNA-Reparatur fungierende Gen wurde in etwa 50% untersuchter HNPCC-Tumoren mutiert vorgefunden. Es wurde hinsichtlich einer möglichen Promotor-Methylierung u.a. von *Esteller et al., 2004* analysiert. Dabei wurden Methylierungsraten von insgesamt 15% in Zelllinien-DNA und 21% in primären Kolonkarzinomen festgestellt.

(Eine Veröffentlichung dieser Arbeitsgruppe von 2001 zeigte 44% Promotor-Methylierung in kolorektalen Primärtumoren) hMLH1 war hierbei signifikant häufiger in Tumoren methyliert (39%), die eine Mikrosatelliteninstabilität (MSI) aufwiesen. In sporadisch auftretenden kolorektalen Karzinomen gilt die unterdrückte Expression des Gens sogar als Hauptfaktor für MSI (Herman et al., 1998). Auch genetische und klinisch-pathologische Tumoreigenschaften unterlagen einer engen Korrelation mit dem Methylierungsprofil (Duval et al., 2001). Weiterhin wurde für hMLH1 bereits eine geschlechtsspezifische Methylierung zugunsten der weiblichen Betroffenen beschrieben.

Unterschiedliche Arbeitsgruppen fanden ausserdem heraus, dass sich durch induzierbare hMLH1-Expression die Sensitivität für Alkylantien, wie sie als Chemotherapeutika Anwendung finden, wieder herstellen lässt (Cejka et al., 2003). In einer Studie von *Leung et al., 2005* wurde die Promotormethylierung im Serum von kolorektalen Karzinom-Patienten untersucht; mit dem Ergebnis, dass signifikante Unterschiede bei der methylierten DNA-Konzentration zwischen Patientenserum und den gesunden Kontrollpersonen deutlich wurden. Auch Wallner et al., 2006 wiesen Promotormethylierung im Serum nach; mit Methylierungsraten von 4% bzw. 43% für Lokalbefunde bzw. bereits metastasierte Stadien.

### 1.5.5 HPP1 / TPEF

Dieses für ein Transmembran-Protein codierende Gen wurde erstmals im Jahr 2000 in Tumorgewebe von Patienten mit **hyperplastischer Polyposis** identifiziert und erhielt daher seine Bezeichnung. Es enthält neben einer der für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) ähnlichen Bindungsstelle auch zwei Follistatin-Domänen extrazellulär und wird deshalb in der Literatur auch als TPEF (**t**ransmembrane **p**rotein containing **e**pidermal growth factor and **f**ollistatin domain) bezeichnet (Young et al., 2001; Ebert et al., 2005; Sato et al., 2002).

Follistatin gehört zu einer Protein-Familie, die eine spezifische und hohe Affinität zu Activin A besitzt und in der Lage ist, dessen Funktion zu neutralisieren. Activin A ist ein wichtiger Regulator der Zellproliferation und Differenzierung, der auch eine Rolle in der Progression kolorektaler Karzinome zu spielen scheint (Kingsley et al., 1994; Sonoyama et al., 2003).

Neben diesen extrazellulär gelegenen Liganden besitzt HPP1 auch einen cytoplasmatischen G-Protein-aktivierenden Anteil. Somit hat das Protein Funktion als Wachstumsfaktor aber auch als Rezeptor im Rahmen der Signaltransduktion. Hyperplastische Polypen sind epidemiologisch gesehen eng mit der Entstehung kolorektaler Karzinome verbunden: Die im gesunden Gewebe enddifferenzierten Zellen wandern aus der Tiefe der Krypten an die Schleimhaut-Oberfläche und werden dort abgeschilfert.

In hyperplastischen Polypen hingegen verbleiben durch bisher unbekanntem Mechanismus überreife Zellen in der Mucosa, wodurch die normale Zell-Migration gestört ist. Die Folge ist eine Erhöhung des Risikos für kolorektale Karzinome. Die transkriptionelle Regulation von HPP1 wurde aus diesem Grund vielfach untersucht. Young *et al.*, 2001 fanden heraus, dass in 93% normaler Mucosa-Proben HPP1 exprimiert wurde, während dies nur in 23% kolorektaler Karzinom-Patienten der Fall war. Andererseits berichteten Ebert *et al.*, 2005, dass HPP1 in Primärtumoren mit 77% gegenüber normaler Kolonschleimhaut mit 5% häufig methyliert war. Wallner *et al.*, 2006 berichteten über die Methylierungsanalyse im Serum von kolorektalen Karzinompatienten und fanden für HPP1 13% bzw. 64% Methylierungsfrequenz in lokalisierten bzw. bereits metastasierten Tumorstadien.

### 1.5.6 MDR-1

Das humane „Multi Drug Resistance-Gen“ kodiert für das P Glykoprotein, ein Transmembran-Protein in der Funktion einer ATP-abhängigen Efflux-Pumpe. Sie dient u.a. der Entfernung intrazellulärer Chemotherapeutika in malignen Zellen und damit der Reduktion zytostatischer Aktivität aber führt z.B. auch zur Verringerung intrazellulärer Antimykotika-Spiegel in *Candida albicans* (El-Osta *et al.*, 2002; Morschhäuser *et al.*, 2007). In vielen verschiedenen Studien wurde der Zusammenhang zwischen Promotor-Methylierung und supprimierter Genexpression von MDR-1 für verschiedene Tumorentitäten beschrieben. In kolorektalen Karzinomen fanden Shannon *et al.*, 2001 bzw. Rijnsoever *et al.*, 2002 eine Methylierungsrate von 28 % bzw. 24 % und konnten ausserdem eine enge Korrelation der Tumormethylierung mit genetischen und klinisch-pathologischen Eigenschaften, wie MikrosatellitenInstabilität (MSI), histologisch schlechter Differenzierung und der Tendenz zur Lokalisation im proximalen Kolon und fortgeschrittenen Dukes-Stadien nachweisen. Weiterhin wurde für MDR-1, wie auch für p16 und MINT-2, bereits durch andere Arbeitsgruppen eine häufige Methylierung in kolorektalen Karzinomen, nicht jedoch im angrenzenden gesunden Gewebes gezeigt (Ahuja *et al.*, 1998; Toyota *et al.*, 1999).

### 1.5.7 MGMT

MGMT gehört wie hMLH1 in die Gruppe der DNA-Reparaturgene und kodiert für die O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase oder auch bekannt als O<sup>6</sup>-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase.

Die exakte Funktion des kodierten Proteins wurde zusammenfassend in einer Publikation von *Pegg et al., 2007* beschrieben und besteht darin, mutagene und zytotoxische Anhängsel, z.B. Alkylantien, von der O<sup>6</sup>-Position des Guanins zu entfernen sowie die Sensitivität von Tumoren für spezielle Chemotherapeutika zu verändern. Die Alkylierung der DNA an der O<sup>6</sup>-Position ist ein entscheidender Schritt bei der Entstehung von Mutationen in malignen Tumoren (Esteller et al., 2004). Durch veränderte DNA-Struktur und dadurch veränderte Basenpaarung wird die DNA-Replikation blockiert. Um Zellen vor diesen Läsionen zu schützen, überträgt MGMT den Alkylrest auf ein aktiviertes Cystein innerhalb seiner eigenen Sequenz. Dabei wird jeweils ein MGMT-Molekül pro Reparatur verbraucht. So ist auch die Anzahl der MGMT-Moleküle eng mit der Fähigkeit der Zelle solchen zerstörenden Einflüssen zu widerstehen, verbunden. Im umgekehrten Fall bewirkt die Inaktivierung der Genexpression z.B. durch Methylierung der Promotorregion eine Erhöhung der Sensitivität des Tumors für Chemotherapeutika. So wurden für Gliompatienten eine längere Überlebenszeit und längere Episoden bis zur Tumorprogression bei Behandlung mit einem bestimmten Zytostatikum gefunden. Deswegen wird vor allem in der zusätzlichen Antitumor-Behandlung mit dem MGMT-Inaktivator O<sup>6</sup>-Benzylguanin eine mögliche Therapiestrategie gesehen. Promotor-Hypermethylierung für MGMT wurde u.a. von *Costello et al., 1996* oder *Esteller et al., 1999* beschrieben. Insgesamt ist supprimierte Genexpression durch MGMT-Promotormethylierung in 23 verschiedenen Zelltypen menschlicher Primärtumoren nachgewiesen, mit hohen Methylierungsraten u.a. für Colon-/ , Hals-/ und Kopftumore oder Gliome. Die Messung der Methylierung des Gens in Patientenseren wurde bisher u.a. für Bronchialkarzinome, Hautmelanome und Magenkarzinome untersucht. Hierbei wurden Methylierungsraten von 66 %, 64% bzw. 32 % beschrieben. Bislang sind 5 verschiedene genetische Varianten des Gens bekannt, deren Einzeleffekte, wie z.B. der Einfluss auf die generelle Anfälligkeit für Tumore oder die Ansprechbarkeit auf eine Chemotherapie trotz zahlreicher Studien bislang unklar bleiben (*Pegg et al., 2007*). Das Gen ist bisherigen Arbeiten zufolge in ca. 40 % der untersuchten kolorektaler Karzinome und in ebenfalls etwa 40% der Adenome methyliert; eine Beobachtung, die den Rückschluss zulässt, dass es sich bei der Methylierung um ein frühes Ereignis in der Tumorgenese handelt (*Qi et al., 2005*; *Esteller et al., 2001*).

### 1.5.8 p16<sup>INK4A</sup>

Dieses Gen fungiert ebenfalls als Tumorsuppressor und kodiert für den Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitor 2A, weshalb es auch als CDKN2A bekannt ist.

Cyclin-abhängige Kinasen stellen Zellzyklus-Regulatoren dar, die verschiedene Enzyme durch Phosphorylierung aktivieren können und als Gegenregulatoren bestimmte Inhibitoren besitzen. Hypermethylierung des p16-Promotors und daraus folgende Suppression der Transkription wurde bereits in vielen Tumorentitäten gefunden, u.a. in Bronchial-/ und hepatozellulären Karzinomen, Gliomen, Kopf-/ und Halstumoren, bestimmten Leukämiearten, sowie kolorektalen Karzinomen (Merlot et al., 1995; Zhang et al., 2008; Hsiao et al., 2008).

Für letztere wiesen *Wallner et al., 2006* im Serum Methylierungsraten von 25 % bzw. 64 % für Lokalbefunde bzw. bereits metastasierte Stadien nach und *Tan SH., et al. 2007* fanden sogar über 70% Methylierung. Zum Vergleich zeigten *Esteller et al., 2001* in einer großen Studie in primären kolorektalen Karzinomen nur 37 % Methylierung. In Adenomen wurden für p16 bisher nur im Gewebe jedoch nicht im Serum betroffener Patienten Ergebnisse für Promotor-Hypermethylierung publiziert. Hier lag die Frequenz bei 29 % in tubulären Adenomen (Zou et al., 2002).

### 1.5.9 TIMP-3

Die Abkürzung TIMP steht für die Bezeichnung „Tissue Inhibitor of Metalloproteinase“. TIMP´s befinden sich im gesunden Gewebe im Gleichgewicht zu den Matrix-Metalloproteinasen (MMP), die ihrerseits Zink-abhängige Endopeptidasen darstellen und in der Lage sind extrazelluläre Matrix wie Kollagen, Gelatine oder Stromalysine zu zerstören. Durch die Eigenschaft der Proteolyse dieser extrazellulären Matrix und angrenzender Basalmembranen sind die MMP´s an essentiellen Schritten der Tumordinvasion und Metastasenentstehung beteiligt und kommunizieren mit verschiedenen biologischen Systemen wie der Zelladhäsion, dem Zytoskelett oder Wachstumsfaktoren (Zeng et al., 2001, Leeman et al., 2003). Sie bedürfen daher der strengen Regulation durch die TIMP´s. Der Verlust der Balance zwischen MMP´s und TIMP´s wird insgesamt als kausaler Faktor in der Entstehung vieler Krankheiten, die mit pathologischer Gewebsdestruktion einhergehen, angenommen (Brueckl et al.2005). Bisher wurden 4 Gene für die TIMP-Familie identifiziert (Murphy et al., 1981; Stetler-Stevenson et al., 1989; Apte et al., 1994; Greene et al., 1996). Der „Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-3“ wird in den meisten entdifferenzierten Geweben exprimiert (Wick et al., 1995). Regional erhöhte TIMP-3 mRNA-Expression wurde u.a. in mäßig bis schlecht differenzierten kolorektalen Karzinomen gefunden.

Weiterhin wurden hohe TIMP-3 Protein-Expressionsraten in Adenomen und Frühstadien kolorektaler Karzinome nachgewiesen, während sie in fortgeschrittenen Stadien herabgesetzt waren (Powe et al., 1997).

Die Funktionen von TIMP-3 umfassen neben der Inhibition der Matrix-Metalloproteinase auch die Hemmung der Angiogenese und der endothelialen Zellmigration (Anand-Apte et al., 1997). Die Induktion von Apoptose, die bisher in Prostatakarzinom-Zellen nachgewiesen wurde, könnte ebenfalls auf kolorektale Karzinome übertragbar sein (Deng et al., 2006). Die wesentlichen Auswahlkriterien für die Bestimmung dieses Markers im Serum waren neben der Funktion als wichtiger Tumorsuppressor-Kandidat auch der Nachweis der Promotor-Hypermethylierung und dem damit verbundenen Transkriptionsstopp in Primärtumoren bei gleichzeitig fehlender Methylierung im gesunden Gewebe (Bachmann et al., 1999). *Esteller et al., 2001* wiesen u.a. Methylierungsraten von 27% nach. Laut aktueller Literaturrecherche gibt es bisher keine Angaben zur Messung der Methylierung von TIMP-3 im Serum.

## 1.6 CIMP-Panel (CpG-Island Methylator Phenotype)

Das CIMP-Panel wurde ursprünglich von *Toyota et al., 1999* durch verschiedene genetische Marker definiert und zeigt einen alternativen Signalweg in der Tumorgenese. Er ist charakterisiert durch die Methylierung in multiplen CpG-Inseln von Promotorregionen in kolorektalen Adenomen und Karzinomen, die aufgrund dieser Merkmale zu einem bestimmten Subset zusammengefasst werden können (Rashid et al., 2001). Die Tatsache, dass CIMP bereits in adenomatösen Läsionen nachgewiesen werden kann, deutet darauf hin, dass es sich um einen frühen Prozess in der Karzinogenese handelt. Es wird auch angenommen, dass CIMP-Tumoren das Potential besitzen, multiple Tumorsuppressor-Gene simultan zu inaktivieren, was funktionell als äquivalent mit genetischer Instabilität gesehen wird. *Weisenberger und Ogino et al., 2006* ersetzten dieses klassische von *Toyota et al.*, propagierte Panel durch ein Anderes, bestehend aus den Markern CACNA1G, IGF-2, NEUROG-1, RUNX-3 und SOCS-1. Dieses neue Panel überzeugte gegenüber dem Klassischen v.a. durch eine bessere bimodale Verteilung, d.h. es ermöglicht eine genauere Diskriminierung zwischen Karzinomen, die das Merkmal CIMP aufweisen (CIMP<sup>+</sup>) gegenüber CIMP-negativen Tumoren (CIMP<sup>-</sup>). Als CIMP<sup>+</sup> galt in diesem Zusammenhang ein positiver Methylierungsstatus im Promotor von 3 der 5 Marker bzw. als CIMP<sup>-</sup> Methylierung der CpG-Inseln im Promotor in keinem, einem oder 2 Markern. Seither wurde in vielen Studien zur Definition von CIMP häufig dieses Panel von Surrogatmarkern herangezogen und mit anderen Markern kombiniert. *Ogino et al., 2007* z.B. differenzierten in „CIMP-high-/-“



und „CIMP-low“-Tumore und stellten als besten Einzelmarker für die Voraussage des CIMP-Status RUNX-3 heraus.

Bisher liegt jedoch keine Literatur zur Messung von CIMP als Panel im Serum vor. Aus diesem Grund wurde das von *Weisenberger et al., 2006* neu definierte CIMP-Panel in diese Arbeit integriert.

### 1.6.1 CACNA1G

Dieser spannungsabhängige Calciumkanal hat Bedeutung als Schrittmacheraktivator, in der zerebralen Signaltransduktion und Epilepsieforschung (Ernst et al., 2009). Eine Inaktivierung des Gens durch Promotormethylierung wurde von *Toyota et al.* bereits 1999 in Tumorgeweben, z. B. Kolon- / oder Magentumoren beschrieben. Somit könnte CACNA1G durch Modulation des Calciumsignalweges mit Effekten auf Zellproliferation und Apoptose ebenfalls eine wichtige Rolle in der Entstehung von Karzinomen spielen. Auch für diesen Marker liegen derzeit keine Daten für die Analyse im Serum von an kolorektalen Tumoren erkrankten Patienten vor.

### 1.6.2 IGF-2

Der insulinähnliche Wachstumsfaktor 2, auch als Somatomedin A bezeichnet, ist als Teil einer großen Superfamilie ebenfalls in zelluläre Wachstums- / und Entwicklungsvorgänge sowie spezifische Mechanismen der Immunantwort und Stoffwechselfunktionen involviert (NCBI-Gen; Wang et al., 2009).

Weiterhin scheint IGF-2 an der Tumorprogression verschiedener Karzinome beteiligt zu sein, so z.B. in Prostata, Gastrointestinaltrakt, Ovar oder Bronchialsystem (Fu et al., 2008; Wang et al., 2009; Hwang et al., 2009; Kim et al., 2009). Mit dem Methylierungsstatus in der Promotorregion von IGF-2 in kolorektalen Primärtumoren beschäftigen sich aktuelle Studien von *Nosho et al., 2009* bzw. von *Kaaks et al., 2009* mit dem Nachweis von Methylierung in Lymphozyten-DNA als Frühmarker für kolorektale Karzinome. Auch die Promotor-Methylierung dieses Gen wurde noch nicht im Serum von an Kolontumoren erkrankten Patienten untersucht.

### 1.6.3 NEUROG-1

Neurogenin 1, als Transkriptionsfaktor verantwortlich v.a. für neuronale Differenzierung und Determination wird durch seine embryonale pro-glutamaterge und anti-GABAerge Wirkung mit psychiatrischen Erkrankungen, wie Schizophrenie in Verbindung gebracht (NCBI-Gen; Ho et al., 2008). Hypermethylierung dieses Gens wurde u.a. bereits in prämaligen Läsionen des cholangiozellulären Karzinoms, Retinoblastomen, uvealen Melanomen und kolorektalen Karzinomen detektiert. (Kim et al., 2009; Cohen et al., 2008; Merhavi et al., 2007; Nosho et al., 2009) In kolorektalen Primärtumoren wurde zudem eine schlechtere Prognose mit dem in dieser Arbeit verwendeten, methylierten CIMP-Panel (inklusive NEUROG-1) assoziiert (Nosho et al., 2008). Für die Analyse dieses Biomarkers in kolorektalen Tumorseren liegen derzeit keine aktuellen Studien vor.

### 1.6.4 RUNX-3

Der runt related transcription factor 3 ist Teil einer Superfamilie, übermittelt nach Bindung an andere DNA-Moleküle (u.a. Smad 2 / 3) als Untereinheit TGF- $\beta$ -/activin-Signale und ist über diesen und andere Mechanismen in der Lage, die Transkription zu aktivieren oder zu unterdrücken ([www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/864](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/864)). Es ist auf dem Chromosom 1/p36 lokalisiert, wo bereits für andere Karzinomarten der häufige Verlust von Heterozygotie (LOH) beschrieben wurde. Bereits 2002 konnte ein Zusammenhang zwischen dem Expressionsverlust von RUNX-3 und der Entstehung von Magenkarzinomen in Zelllinien-DNA hergestellt werden (Li et al., 2002). 2007 wurde dieser potentielle Biomarker erstmals in Seren von Patienten verschiedener Tumorentitäten (Mamma, Lunge, Pankreas, Kolon, Leber, Prostata) untersucht (Tan et al., 2007; Cho et al., 2007). In kolorektalen Karzinomen konnte Promotormethylierung im Serum von 65% der Patienten nachgewiesen werden (Tan et al., 2007). Allerdings wurden in diese Studie nur Karzinome im bereits metastasierten Stadium eingeschlossen, die damit keine Aussage zur Früherkennung dieser Tumorarten zuließen. Desweiteren konnte RUNX-3 als Identifikator für kolorektale Tumoren mit Mikrosatelliteninstabilität herausgestellt werden (Ahlquist et al., 2008). Somit dürfte auch RUNX-3 als Tumorsuppressorgenkandidat wesentlichen Einfluss auf die Karzinogenese kolorektaler Neoplasien haben.

### 1.6.5 SOCS-1

Die Abkürzung SOCS-1 steht für die Bezeichnung Suppressor of Cytokin-Signaling 1 und hat mit dem Einfluss auf Zytokine wesentliche Kontrollfunktion für die Proliferation, das Wachstum und die Differenzierung von Zellen. Als Modulator der Aktion von Interferon Gamma wurde in Knockout-Mäusen gezeigt, dass er zudem verantwortlich für ein normales postnatales Wachstum und Überleben ist ([www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8651](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8651)). In bisher durchgeführten Studien konnte u.a. ein Einfluss dieses Gens auf die Entwicklung und Progression von multiplen Myelomen nachgewiesen werden (Stanganelli et al., 2009). Weiterhin spielt SOCS-1 offensichtlich eine wichtige Rolle bei der Immunmodulation von an HIV erkrankten Personen, bei denen eine verminderte Expression nachgewiesen wurde (Yadav et al., 2009). Den Methylierungsstatus von SOCS-1 untersuchten u. a. *Johan et al., 2005* in Arbeiten zur Pathogenese der akuten myeloischer Leukämie / Myelodysplastischen Syndromen. Auch in kolorektalen Karzinomen wurde die Promotor-Hypermethylierung von SOCS-1 allerdings in Zelllinien-DNA bzw. DNA von Primärtumoren nachgewiesen. (Weisenberger et al., 2006; Xu et al., 2009; Nosho et al., 2009). Damit gilt auch SOCS-1 als interessantes Tumor-Suppressorgen.

### 1.7 Ziele dieser Arbeit

Das kolorektale Karzinom ist aufgrund seiner Inzidenz und Mortalitätsrate in der westlichen Welt eines der volkswirtschaftlich und gesundheitspolitisch bedeutsamsten malignen Erkrankungen. Die Früherkennung von kolorektalen Karzinomen kann die Inzidenz und Mortalität deutlich reduzieren. Die dazu bisher verwendeten Nachweisverfahren, wie die konventionelle Koloskopie als der Goldstandard, häufig genutzte Stuhltests wie der FOBT oder molekulare Tests bzw. CT- oder MRT-gestützte bildgebende Verfahren, wie die virtuelle Koloskopie, können bislang noch nicht als zufriedenstellende, weil in der Bevölkerung akzeptierte und in ihrer Aussage zuverlässige Screeningmethoden, beurteilt werden. Beispielhaft seien an dieser Stelle einige wesentliche Motive mit dem invasiven Vorgehen, der bereits oben beschriebenen Störanfälligkeit, einem nicht zu unterschätzenden Schamgefühl oder der Nichteignung als Nachweisverfahren für Adenome genannt. Eine potentielle Alternative könnte daher die Detektion von Tumor-DNA in einem Blut-basierten Test darstellen. Die Erfassung kolorektaler Karzinome aus dem Blut hätte im Vergleich zu

den o.g. Verfahren den entscheidenden Vorteil, ein einfaches und risikoarmes Verfahren zu sein, das zudem eine hohe Akzeptanz in der Bevölkerung erreichen könnte.

Die in der Einleitung aufgeführten Daten zeigen jedoch eindrücklich, dass gerade für das Screening, d.h. für die Erkennung von Frühstadien wie Adenome oder die UICC-Stadien I und II mit guter kurativer Therapierbarkeit, nur sehr wenige Arbeiten vorhanden sind, die zudem sehr variabel in ihren Aussagen sind. Abgeleitet aus den oben beschriebenen Sachverhalten zu den bisher etablierten Verfahren der Detektion kolorektaler Karzinome im Blut ergaben sich daher die folgenden Fragestellungen, die im Rahmen dieser Arbeit beantwortet werden sollen:

1. Ist es möglich einen Blut-basierten Test zu etablieren, der bei akzeptabler Anwendbarkeit, Frühstadien der kolorektalen Karzinogenese (UICC I und II) gegenüber gesunden Individuen zu differenzieren vermag?
2. Welche Ergebnisse liefert das von *Weisenberger et al. 2006* in kolorektalen Primärtumoren beschriebene CIMP-Panel (CACNA1G, IGF-2, NEUROG-1, RUNX-3, SOCS-1) im Serum? (Weisenberger et al., 2006)  
Kann die Sensitivität/ Spezifität des Tests durch die Kombination eines Markerpanels erhöht werden?
3. Wie verlässlich ist dieser Test bei der Detektion von Adenomen im Patientenserum?

Die nachfolgenden Tabellen geben noch einmal einen zusammenfassenden Überblick über die gegenwärtig etablierten Testverfahren und deren Sensitivität und Spezifität:

*Tabelle 1.3: Sensitivität und Spezifität derzeit verwendeter und potentieller Screeningverfahren zur Detektion kolorektaler Karzinome (1)*

Test-Verfahren	Karzinome		Autor (en)
	Sensivität	Spezifität	
Konventionelle Koloskopie	95%	-----	McLoughlin et al., 2006
	100%	-----	Rex et al., 1997
FOBT*	64,3%- 81,8%	90,1% - 96,9%	Allison et al., 2007
virtuelle Koloskopie	90%	86%	Johnson et al., 2008
	100%	99,2%	White et al., 2008
	Adenome $\geq$ 1cm		Autor (en)
	Sensivität	Spezifität	
Konventionelle Koloskopie	87,5%	-----	Pickhardt et al., 2003
	94%	-----	Rex et al., 1997
	98%	-----	Rockey et al., 2005
FOBT*	10,7%	-----	Imperiale et al., 2004
	41,3%	90,6%	Allison et al., 2007
virtuelle Koloskopie	55%	96%	Cotton et al., 2004
	85%	97%	Mulhall et al., 2005
	96,7%	-----	Graser et al., 2008
*abhängig vom verwendeten Test			

*Tabelle 1.4: Sensitivität und Spezifität potentieller Screeningverfahren zur  
Detektion kolorektaler Karzinome (2)*

Testverfahren	Karzinome		Adenome $\geq$ 1cm		Autor (en)
Stuhltests					
1. Mutationen	Sens.#	Spez.^	Sens.	Spez.	
p53, K-ras, Bat-26, APC	91%	93%	82%	93%	Ahlquist D.A. et al., 2000
APC, p53, DCC, hMLH1, D9S162, D9S171, IFNA	96,7%	100%	---	---	Koshiji M. et al., 2002
APC, p53, K-ras	63,5%	96,2%	57,1%	96,2%	Tagore et al., 2003
APC, p53, K-ras	54%	---	26%	---	Syngal et al., 2006
2. Methylierung	Sens.	Spez.	Sens.	Spez.	
HIC1	42%	98%	31%	98%	Lenhard K. et al., 2005
SFRP2	77%	77%	---	---	Müller H.M. et al., 2004
$\beta$ -Globulin	70%	100%	67%	---	Leung W.K. et al., 2004
Bluttests					
1. Mutationen	Sens.	Spez.	Sens.	Spez.	
APC	100%	---	---	---	Diehl F. et al., 2005
2. Methylierung	Sens.	Spez.	Sens.	Spez.	
Septin-9	70%	90%	56%	---	Lofton-Day et al., 2007 Ebert M.P. et al., 2006
HLTF / HPP1	47% / 53%	---	---	---	Wallner et al., 2006
APC, hMLH1, HLTF	57,1%	90,2%	---	---	Leung W.K. et al., 2005
CDA, MGC20553, BANK1, BCNP1 und MS4A1	94%	77%	---	---	Han M. et al., 2008
# Sensitivität ^ Spezifität					

## **2 Materialien und Methoden**

Zur Durchführung dieser Arbeit liegt ein positives Votum der Ethikkommission vor.

### **2.1 Probenmaterial**

#### **2.1.1 Gewinnung**

Die verwendeten Serumproben stammen von Patienten aus der Maria-Theresia-Klinik beziehungsweise aus dem Universitätsklinikum Großhadern in München, wurden nach Diagnosestellung präoperativ entnommen und bis zur Weiterverarbeitung bei einer Temperatur von  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur späteren Messung der Promotor-Methylierung in den verschiedenen Genen erfolgte die Unterteilung in ein Training-Set, sowie ein Tumorstaging- und Test-Set. Die Untersuchungen wurden von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München genehmigt.

#### **2.1.2 Aufbereitung der Serumproben**

##### **2.1.2.1 DNA-Isolation**

Die DNA-Isolation aus jeweils 1 ml Patienten-Serum erfolgte mit dem „High Pure Viral Nucleic Acid Kit“ (Roche, Basel, Schweiz), ursprünglich zur Isolation viraler Nukleinsäuren entwickelt, entsprechend der Hersteller-Angabe. In einer kleineren Stichprobe hatte sich dieses Kit gegenüber dem in den meisten Publikationen verwendeten „QIAamp DNA Blood Mini-Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) aufgrund einer höheren DNA-Ausbeute aus der Einzelprobe durchgesetzt. Zur Aufbereitung wurde das Serum zunächst mit 1 ml „Working-Solution“ (hergestellt aus „Poly(A) carrier“ und „RNA Binding Buffer“ in einem Mischungsverhältnis von 1:50) und 250  $\mu\text{l}$  Proteinase K (Roche) vermischt und für 10 min bei  $72^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad inkubiert. Anschließend folgte die Zugabe des „Binding-Buffers“ und das Pipettieren von 600  $\mu\text{l}$  dieses Gemisches auf jeweils 1x Collection-Tube mit integrierter Filter-Membran. Nach 2-maliger 1-minütiger Zentrifugation bei 8000 x g Raumtemperatur wurden 500  $\mu\text{l}$  „Inhibitor Removal Buffer“ hinzugefügt und erneut zentrifugiert. Im nächsten Arbeitsschritt erfolgte die 2-malige Zugabe von 450  $\mu\text{l}$  „Wash Buffer“ mit jeweils nachfolgender Zentrifugation bei gleicher Rotation zur Entfernung von Verunreinigungen und verbliebenen Rückständen.

Zum Schluss wurde das Eluat durch Zugabe von 50 µl „Elution Buffer“ und nochmalige Zentrifugation gewonnen. Anschließend Lagerung der Proben bei -20°C bis zur Weiteraufbereitung.

### 2.1.2.2 Bisulfit-Behandlung

Die Bisulfit-Behandlung dient, wie bereits beschrieben, der Umwandlung der unmethylierten Cytosin-Basen in Uracil, während bereits methyliertes Cytosin unverändert bestehen bleibt (Hayatsu et al. 1976). Damit wird erreicht, dass methylierte Sequenzen, wie sie sich in den sogenannten CpG-Inseln befinden, sich von unmethylierten durch ihre jeweils spezifische Sequenz unterscheiden. Dieser Schritt schafft die wesentliche Voraussetzung für das Design spezifisch bindender Primer und die nachfolgende Amplifikation ausgewählter Abschnitte, wie bereits von *Frommer M. et al. 1992* beschrieben. Die Behandlung der Proben mit Bisulfit erfolgte unter Verwendung des „Wizard DNA-Clean-up System“ (Promega, Mannheim, Deutschland), welches laut Herstellerangabe auch für DNA-Mengen im Nanogramm-Bereich genutzt werden kann. Hiefür wurden 48 µl Serum-DNA und 2 µl DNA aus Lachssperma (Stratagene, Heidelberg, Deutschland) verwendet, mit 5,5µl 2M NaOH (Merck, Darmstadt, Deutschland) vermischt und 15 min bei 37°C im Heizblock inkubiert. Anschließend wurden 30 µl 10M Hydrochinon (Sigma) sowie 520µl 3M Natriumbisulfit (pH 5,1) (Sigma, München, Deutschland) zugegeben und unter Lichtschutz 15-16 Stunden bei 55°C im Heizblock belassen. Nach erfolgter Inkubation wurden 1 ml „Clean-Up Kit“ beziehungsweise 2 ml 80%iges Isopropanol (Merck) zugegeben und die Probe nach 1-minütiger Wartezeit jeweils unter Sogwirkung durch die Anionen-Austauscher-Säulen (Minicolumn) gesaugt. Nach einer kurzen Trocknungsphase wurden 50 µl 70°C warmen Wassers auf jede Säule pipettiert und die Probe bei 8000 x g Raumtemperatur 1 min zentrifugiert. Anschließend unter vorsichtigem Mischen Zugabe von 5,5µl 3M NaOH und 1 µl Glycogen (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) sowie 33 µl 10 M CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> (Sigma) und 270 µl 100 %igem Ethanol (Merck). Danach Lagerung für 2 Stunden bei -80°C. Vorletzter Arbeitsschritt war die 45-minütige Zentrifugation der Proben bei 4°C und 14000 U/min. Der dabei entstandene Überstand wurde entfernt und die nun als kleines Pellet sichtbare DNA nach Zugabe von 1 ml 70 %igem Ethanol, Zentrifugation für 15 min bei 14000 U/min und erneuter Trocknungsphase schließlich in 30 µl 1mM Tris-Puffer (pH 8,0) resuspendiert. Die Aufbewahrung der Bisulfit-behandelten Proben bis zur Messung mittels Methylierungsspezifischer PCR (MSP) bzw. anschließender quantitativer Real-time PCR erfolgte bei einer Temperatur von -80°C.

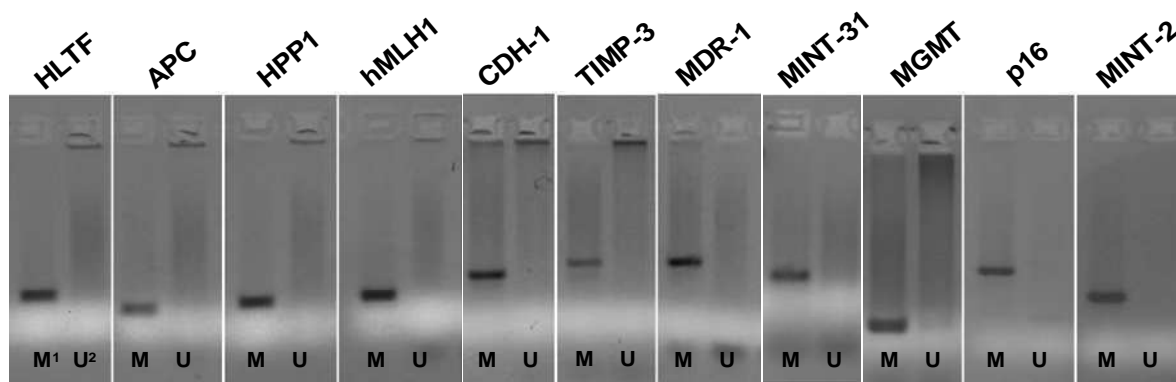


## 2.2 Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCR)

### 2.2.1 Methylierungsspezifische PCR (MSP)

#### 2.2.1.1 Methylierungsspezifische Primer und Sonden

Die methylierungsspezifischen Primer beziehungsweise Sonden, exklusive die des CIMP-Panels, wurden mit „Primer3“ bzw. „Primer-Express“ (Howard Hughes Medical Institute by Steve Rozen bzw. Applied Biosystems) erstellt und von der Firma Metabion, Martinsried, synthetisiert, wobei in der ausgewählten Promotorregion bis 1000 Basenpaare up- und downstream von einer 100%igen Methylierung ausgegangen wurde. Dabei wurde auf einen höchstmöglichen Guanin/Cytosin-Gehalt geachtet, um nachfolgend eine bessere Bindung und Elongation zu erreichen. Anschließend wurden die Primer unter Variation der PCR-Bedingungen auf standardisierter methylierter und unmethylierter DNA (Chemicon, Hofheim, Deutschland) auf die Spezifität ihrer Bindung überprüft. Eine Optimierung der PCR-Bedingungen für jedes verwendete Primerpaar wurde durch die Anpassung der Primer-/beziehungsweise Sondenkonzentration, der Annealing-Temperatur sowie der  $MgCl_2$ -Konzentration erreicht. Für die nach Austestung der Primer durchgeführte quantitative Real-time PCR wurden nur Marker weiter verwendet, die eine ausreichende Diskriminierung zwischen methylierter und unmethylierter Standard-DNA in der Gelelektrophorese zeigten. Die PCR's wurden auf dem Peltier Thermal Cycler (MJ Research-PTC-200) durchgeführt. Einen Überblick über jeweils ausgetesteten Reaktionsbedingungen und die dadurch erreichte Diskriminierung in der Agarose-Gelelektrophorese, sowie über verwendete Primersequenzen geben die *Tabellen 2.1, 2.2* und *Abbildung 2*.



<sup>1</sup> – Primer-Diskriminierung auf methylierter Standard-DNA (Chemicon; c=0,1µg/µl)

<sup>2</sup> – Primer-Diskriminierung auf unmethylierter Standard-DNA (Chemicon; c=0,1µg/µl)

Abbildung 2.1: Austestung der Primer auf methylierter und unmethylierter Standard-DNA

Tabelle 2.1: Austestung der PCR-Bedingungen für alle getesteten Biomarker

PCR-Bedingungen für alle Marker					
Serummarker	Primerkonzentration		Sondenkonzentration	Annealing-Temperatur	MgCl <sub>2</sub> -Konzentration
	Forward	Reverse			
ALU-Repeats	600nM	600nM	300nM	60°C	4mM
APC	450nM	450nM	147nM	60°C	4mM
CACNA1G	600nM	600nM	300nM	60°C	4mM
CDH-1	300nM	300nM	200nM	62°C	4mM
HLTF	450nM	450nM	182nM	60°C	4mM
hMLH-1	450nM	450nM	250nM	60°C	4mM
HPP-1	450nM	450nM	250nM	60°C	4mM
IGF-2	600nM	600nM	300nM	60°C	4mM
MDR-1	600nM	600nM	300nM	62°C	4mM
MGMT	600nM	600nM	300nM	64°C	4mM
NEUROG-1	600nM	600nM	300nM	60°C	4mM
p16	300nM	300nM	300nM	61°C	4mM
RUNX-3	600nM	600nM	300nM	61°C	3,5mM
SOCS-1	600nM	600nM	300nM	61°C	4mM
TIMP-3	300nM	300nM	300nM	62°C	4mM

*Tabelle 2.2: DNA-Sequenzen von Primern und Sonden sowie Fragmentlängen der verwendeten Methylierungsmarker*

HUGO Gen-Nomenklatur	Fragmentlänge (bp)	Sequenz Forward-Primer	Sequenz Reverse-Primer	Sequenz Sonde
ALU-C4	98	GGTTAGGTATAGTGGTTTAT ATTTGTAATTTTAGTA	ATTAACATAACTAATCTTAAA CTCCTAACCTCA	6FAM-CCTACCTTAACCTCCC- MGB
APC	97	TATTGCGGAGTGCGGGTC	TCGACGAACTCCCGACGA	6FAM- ATTACACAACACTACTTCTCTCC GCTT-TAMRA
CACNA1G	173	TTTCGGAGTTCGCGTTGTTT GGGTTT	CGAATCGCCCGAAACCCCG ACTA	6FAM- AAATAACGCCGAATCCGACAAC CGA-BHQ
CDH-1	122	AGGGTTATCGCGTTTATGCG	CCCCCGTACCGCTAATTAAC TAA	6FAM- CGTTGTTGATTGGTTGTGGTCG GTAGG-TAMRA
HLTF	95	CGGCGTTCGGAATTTGTT	AAACGCCTCGACTCCCCTAA	6FAM- AGGAGGCGTATCGAGGCGGTT CG-TAMRA
hMLH-1	87	CGTTATATATCGTTCGTAGT ATTCGTGTTT	CTATCGCCGCCTCATCGT	6FAM- CGCGAGGTCAAACGCCACTACG TAMRA
HPP-1	87	GTTATCGTCGTCGTTTTTGT TGTC	GACTTCGAAAAACACAAAA TCG	6FAM- CCGAACAACGGACTACTAAACA TCCCGG-TAMRA
IGF-2	196	CGTTTGTTCGCGTTTTGTTT ATTAGC	ACCGCCTCCTCGAACGAAAC G	6FAM- CCCTCTACCGTCGCGAACCCGA BHQ
MDR-1	150	CGGTTTAGGACGCGAAAAGA T	TCCTTCTTAACGCGTCTAAT ACCA	6FAM- AGGTTGAGGTGGGAGCGATAT GGTGGTGTG-TAMRA
MGMT	90	GCGTTTCGACGTTTCGTAGGT	AACTCCGCACTCTTCCGAAA A	6FAM- TGCGTATTGTTGCGATTTGGT GAGT-TAMRA
NEUROG-1	161	AGTCGTTAGGGCGTATTTAC GTTTTT	ATCACTCAAAAAACCGACCG AAC	6FAM- CGATAACGACCTCCCGGAACA TAA-BHQ-1
p16	184	GGTCGCGGTCGTGGTTAGT	TTCCGCCAACACCGAAA	6FAM- TTTCGTAGTCGTCGAGTGTACG CGGT-TAMRA
RUNX-3	141	GTTTTACGGTCGTTTGCGCG TT	CGACCGCTATTATACGTATT CCCGTAA	6FAM- CGCACGAACTCGCTACGTAAT CCG-BHQ-1
SOCS-1	160	TTCGCGTGTATTTTAGGTC GGTC	CGACACAACCTCTACAACGA CCG	6FAM- ACAATTCGCTAACGACTATCG CGCA-BHQ-1
TIMP-3	144	TTCGCGTGTTCACGGCG	GCCCCCTCAAACCAATAACA A	6FAM- TTTGAGGGTTGATGAGGTAAT GCGGT-TAMRA

### 2.2.1.2 Reaktionsbedingungen der MSP

Sowohl die methylierungsspezifische Standard-PCR (Peltier Thermal Cycler; MJ Research), als auch die quantitative Bestimmung der Promotor-Methylierung mittels Real-time PCR (Mastercycler realplex ep gradient S; Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wurde unter den folgenden Bedingungen durchgeführt:

1. Aktivierung der DNA-Polymerase (Hot Star Taq, Qiagen) für 900 sec bei 95°C.
2. Denaturierung, das heißt Auftrennung der Stränge der Template-DNA, und Auftrennung unspezifischer Bindungen für 30 sec bei 94°C.
3. Amplifikation: Hybridisierung der methylierungsspezifischen Primer an die einzelsträngige Template-DNA bei unterschiedlich ausgetesteten Annealing-Temperaturen von 60-64°C für 60 sec (*Tabelle 2.1*).
4. Elongation: Verlängerung des DNA-Zweitstrangs durch Anlagerung der zugegebenen Nukleotide (dNTP, Qiagen) an die bereits hybridisierten Primer bei der jeweils ausgetesteten optimalen Annealing-Temperatur (*Tabelle 2.1*) für weitere 60 sec.
5. Messung der Fluoreszenz und Vervollständigen des Elongationsschrittes bei einer Temperatur von 84°C für 20 sec
6. Abkühlen der Proben auf 4°C.

Die Schritte 2-4 wurden für insgesamt 50 Zyklen durchlaufen.

Die PCR-Reaktionen wurden mit dem Hot Star Taq Master Mix Kit (Qiagen) in Reaktionsvolumina von 20 µl durchgeführt und beinhalteten folgende Reagenzien: 10x PCR-Buffer (enthält 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>), 2 bzw. 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> (jeweils entsprechend den ausgetesteten Reaktionsbedingungen und der Gesamt- MgCl<sub>2</sub>-Konzentration von 3,5 bzw. 4 mM für jeden Marker, *Tabelle 2.1*), 250µM Desoxynukleotid-Triphosphat-Mix (dNTP), Primer- und Sondenkonzentration (gemäß Austestung der optimalen Reaktionsbedingungen in *Tabelle 2.1*), 1x Q-Solution, 0,05 U/µl Hot Star Taq-Polymerase und 2 µl Bisulfit-behandelte DNA.

## **2.2.2 Quantitative Real-time PCR**

### **2.2.2.1 Allgemeine Funktionsweise**

Das Prinzip der quantitativen Real-time PCR besteht in der Vervielfältigung von DNA-Abschnitten, die mit Hilfe von Taqman-Sonden durch Erzeugung von Fluoreszenzsignalen eine quantitative Transkriptanalyse ermöglichen. Dabei steigt mit zunehmender Menge an PCR-Produkt die vom PCR-Cycler gemessene Fluoreszenz, die mittels Standardkurve eine Quantifizierung des erhaltenen Signals ermöglicht.

In dieser Arbeit können durch die Verwendung methylierungsspezifischer Primer wiederum Rückschlüsse auf den Grad der Methylierung des betreffenden Genabschnitts gezogen werden. Zur Erzeugung der Fluoreszenz dienten sequenzspezifische fluoreszenzmarkierte Sonden, sogenannte Taqman-Sonden, an deren 5`- und 3`-Ende jeweils ein Fluoreszenzfarbstoff (Fluorochrom) gebunden ist. Die Polymerase baut während des Amplifikationsvorgangs die Taqman-Sonde vom 5`-Ende her ab, wobei deren beide Bestandteile, Fluorophor (Donor) und Quencher (Akzeptor) getrennt werden und dadurch ein Fluoreszenzsignal ausgesendet wird, da nun der Donor das Signal des Akzeptors nicht mehr unterdrückt. Bei diesem Vorgang wird Licht einer bestimmten Wellenlänge ausgesendet, die schließlich per Photomultiplier im PCR-Cycler gemessen und quantifiziert werden kann. Eine Taqman-Sonde, bestehend aus Donor und Akzeptor, wird auch als FAM-TAMRA-Sonde bezeichnet (Donor = FAM, Akzeptor = TAMRA). Für das bereits oben beschriebene CIMP-Panel und das zur Quantifizierung verwendete ALU C4-Gen wurden Sonden mit anderen Fluorochromen (black hole quencher -BHQ- bzw. minor groove binding non-fluorescent quencher -MGBNFQ) mit ähnlichem Wirkprinzip wie FAM-TAMRA-Sonden eingesetzt.

## **2.3 Quantifizierung der Ergebnisse**

### **2.3.1 Threshold-Cycle (Ct)**

Für die Ermittlung des Threshold-Cycles wird die Kinetik der PCR-Reaktion genutzt. Solange während der Reaktion ausreichend Reagenzien zur Verfügung stehen und diese nicht aufgrund der hohen Temperaturen ihre Funktion einstellen oder sich störende Metabolite anhäufen, folgt die Reaktion einem exponentiellen Verlauf. Nach Erreichen des Reaktionsmaximums flacht die Kurve ab und geht in eine lineare Funktion über. Die Zykluszahl, bei dem die Änderung des Fluoreszenzsignals maximal ist, d.h. der Reaktionsverlauf ein Optimum erreicht hat, beschreibt den Threshold-Cycle (Ct). Dieser sollte für alle Kurven im unteren Drittel des exponentiellen Bereichs liegen (Abbildung 2.2). Mit Hilfe des Threshold-Cycles und einer Marker-spezifischen Standardkurve ist es möglich, die Templatemenge quantitativ zu bestimmen.

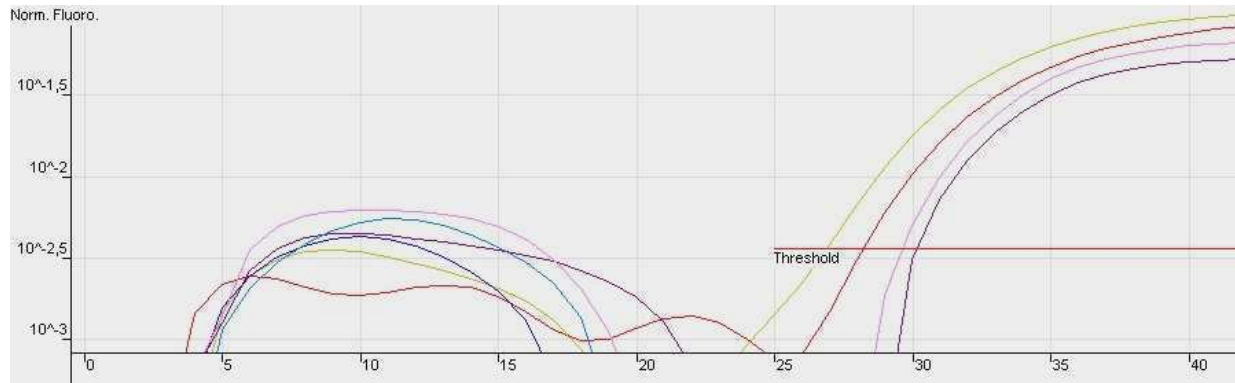


Abbildung 2.2: Ermittlung des Threshold-Cycles (Ct-Wert)

### 2.3.2 Standardkurven

Die Erstellung von Standardkurven ist erforderlich, da sich die DNA-Menge pro Amplifikationsschritt zwar theoretisch verdoppelt, jedoch große Variationen in der tatsächlichen Amplifikationsrate eines Fragments bestehen. Aus der Standardkurve kann mit Hilfe des oben beschriebenen Ct-Wertes auf die Templatemenge geschlossen werden. Die Standardkurven wurden für jeden Marker unter Verwendung der methylierungsspezifischen Primer und der methylierten Standard-DNA (Chemicon) in den Verdünnungsstufen 1:1, 1:4, 1:16, 1:64, 1:256 entsprechend einer DNA-Vervierfachung pro 2 Zyklen erstellt. Ein Beispiel für eine Standardkurve mit den dazugehörigen Ct-Werten zeigen *Abbildung 2.3* und *2.4*.

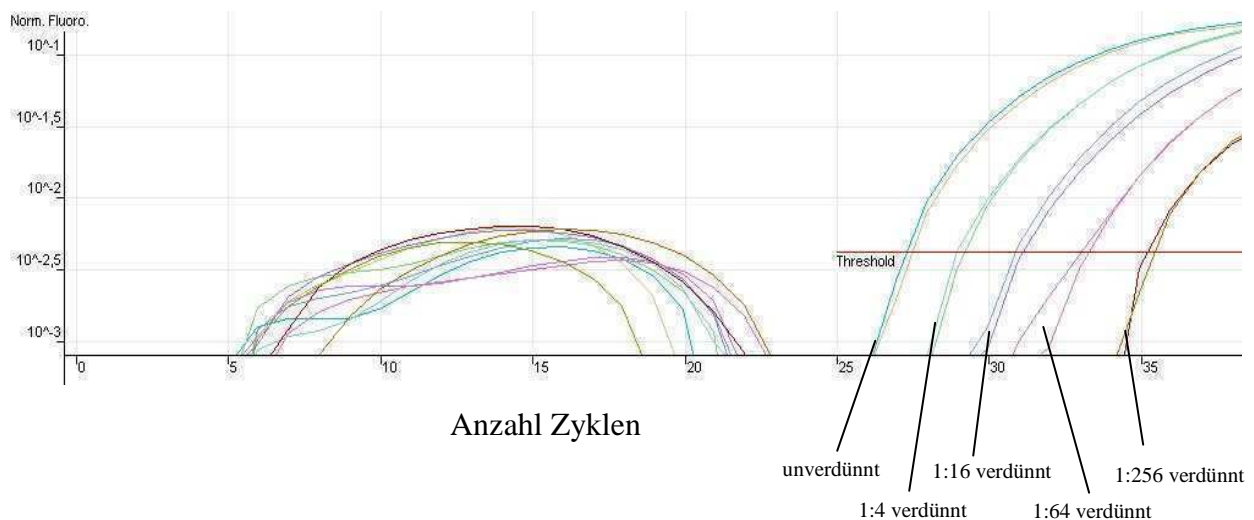


Abbildung 2.3: Erstellung der Standardkurve unter Verwendung verschiedener DNA-Verdünnungsstufen

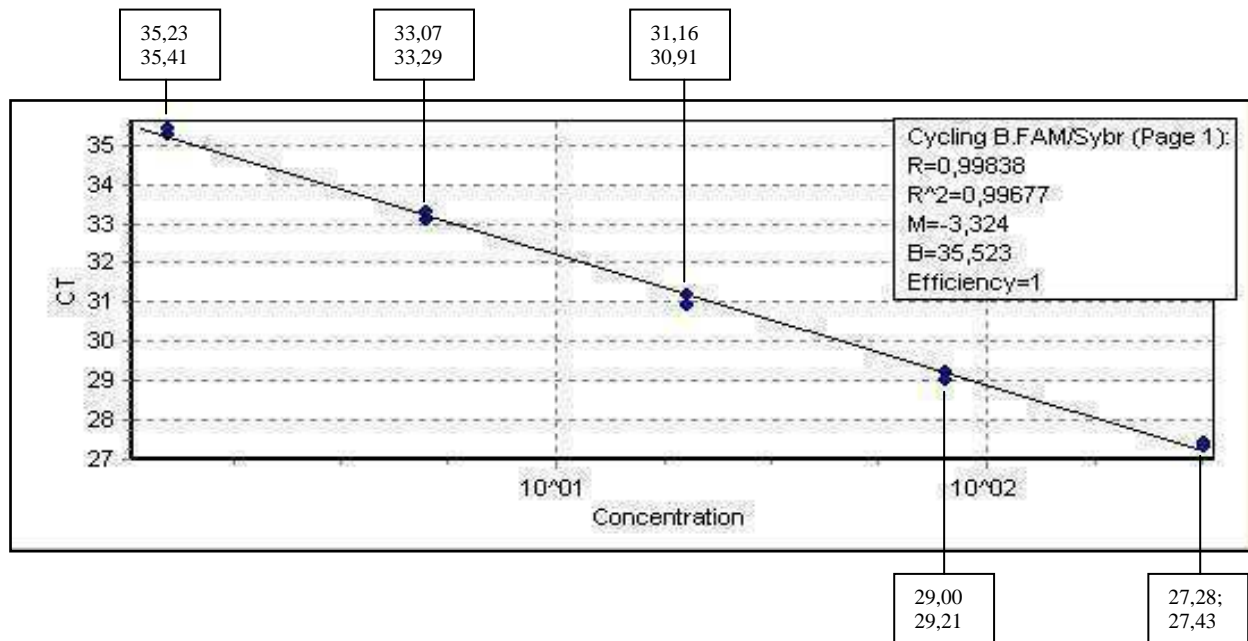


Abbildung 2.4: Berechnung der Template-Mengen mittels Standardkurve

### 2.3.3 Berechnung der Template-Menge

Die Berechnung der Templatemenge erfolgt unter Nutzung der Formel für lineare Funktionen:

$y = f(x) = mx + n$ . Das heißt, unter Einbeziehung der in Doppelbestimmung gemessenen Ct-Werte werden graphisch die Steigung  $m$  und der Schnittpunkt mit der  $y$ -Achse  $n$  bestimmt. So würde die graphisch ermittelte Funktion aus *Abbildung 2.4* z.B.  $y = f(x) = -3,324x + 35,523$  lauten und ermöglicht es, jedem beliebigen gemessenen Ct-Wert eine definierte Template-Menge zuzuordnen. Nach diesem Prinzip wurde die Templatemenge sowohl für jeden Marker im Patientenserum, als auch für jeden Marker in methylierter Standard-DNA (Chemicon) berechnet.

## 2.4 Normalisierung der ermittelten Templatemenen mittels Referenzgen

### 2.4.1 Referenzgen ALU-C4

Das menschliche Genom beinhaltet ca. 45% repetitive Elemente (Lander et al. 2001; Jordan et al. 2003). Die dabei am häufigsten vorkommende repetitive Sequenz ALU umfasst ungefähr 10% des menschlichen Genoms und ist mit über 1 Million Kopien massenhaft im haploiden Chromosomensatz vertreten (Weiner et al. 2002). Von repetitiven ALU-Sequenzen ist unter anderem bekannt, dass sie in Genen wie CDKN2A in dem Promotorbereich vorgeschalteten Regionen Hypermethylierung aufweisen (Weisenberger et al. 2004). So scheinen ALU-Sequenzen sich sowohl als Surrogatmarker für die Analyse von globalen Methylierungsprofilen, als auch als „house-keeping“-Gen und damit Referenzgen für die Normalisierung ermittelter Templatemenen zu eignen (Umetani et al., 2006b). Im Vergleich zu bisher verwendeten Kontrollgenen wie ACTB oder MYOD1 bietet ALU den Vorteil, kein „single copy-Gen“ zu sein und daher in humanen Karzinomen, in denen häufig Deletionen, Duplikationen oder Gen-Amplifikationen stattfinden, als verlässlicherer Parameter zu wirken (Weisenberger et al. 2005). Außerdem scheint ALU sehr sensitiv bei der Analyse kleiner DNA-Mengen zu sein, wie sie typischerweise im Serum zu finden sind (Ebert et al. 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde zu diesem Zweck für die repetitive ALU-Sequenz ebenfalls eine Standardkurve erstellt (siehe Punkt 2.3.2), mit deren Hilfe zum einen die Templatemenen von ALU im Patientenserum und zum anderen in methylierter Standard-DNA (Chemicon) ermittelt wurden.

### 2.4.2 Normalisierungsberechnung

Um eine möglichst hohe Fehlerreduktion bei den zwischen den einzelnen Messungen entstehenden Abweichungen zu erzielen, wurde das Fluoreszenzsignal jeder Methylierungsreaktion, unter Verwendung der folgenden Formel normalisiert:

$\text{normalisierte DNA-Menge} = \frac{\text{DNA-Menge für methyliertes „gene of interest“ im Serum}}{\text{DNA-Menge der ALU-Repeats im Serum}}$
--



Anschließend wurden für die errechneten Daten für bestimmte Grenzwerte die Zahl der positiven Fälle in Prozent bestimmt, wie auch im Ergebnisteil in *Tabelle 1* zu sehen. Die hierfür willkürlich ausgewählten Grenzwerte entsprechen 0, 0,005, 0,05 und 0,1.

## 2.5 Inter- Intra-Assay

Um die Frage zu klären, ob es möglich wäre, alle für die Arbeit erforderlichen Messungen auch in Duplikaten statt Triplikaten zu messen und trotzdem eine vertretbare Standardabweichung zu erhalten, wurde ein Inter- Intra-Assay durchgeführt. Hierzu wurden innerhalb eines Tages 3 PCR-Durchgänge, in denen jeweils 2 Serummarker (HPP1; NEUROG-1) plus das Referenzgen ALU gemessen wurden, absolviert. Es wurden 5 Seren von gesunden Kontrollpersonen und 5 weitere von Patienten in bereits metastasierten Tumorstadien zufällig ausgewählt. Einen Überblick über die erhaltenen Messergebnisse liefern die *Abbildungen 3.5* und *3.6* im Ergebnisteil. An dieser Stelle sei vorweggenommen, dass aufgrund der niedrigen Standardabweichung der Triplikate untereinander, der reproduzierbaren Methylierungsmessungen in den Patientenserum und nicht zuletzt zur optimalen Nutzung des limitierten Materials letztlich die Entscheidung zur Messung in Duplikaten fiel.

## 2.6 Patientenkollektive (Sets)

Das für die Messungen verwendete Serum wurde präoperativ bzw. im Rahmen von Routine-Blutentnahmen (gesunde Kontrollpersonen) gewonnen und mit unterschiedlichen Fragestellungen in 3 verschiedenen Patientenkollektiven (Sets) gemessen, wie im Folgenden erläutert.

### 2.6.1 Trainings-Set

Ziel dieses aus 32 gesunden Kontrollpersonen und 15 Karzinompatienten im Stadium UICC IV bestehenden Sets sollte die Vorauswahl von möglichst sensitiven Markern sein, die für eine Übernahme in Prognose- bzw. Screeningset im Gesunden keinerlei Methylierung in den Promotorregionen zeigten bzw. eine ausgeprägte Methylierung in den fortgeschrittenen Stadien aufwiesen. Das Durchschnittsalter für die gesunden Kontrollpersonen im Set betrug 59 Jahre mit einer Altersverteilung von 23 bis 80 Jahren. Das Geschlechterverhältnis teilte sich in 13 männliche und 19 weibliche Kontrollpersonen auf.

Alle Kontrollpersonen erhielten eine Koloskopie mit jeweils unauffälligem Befund und boten auch sonst keinen Hinweis auf eine andere maligne Erkrankung. Für die Karzinompatienten im Alter zwischen 31 und 80 Jahren betrug das Durchschnittsalter 64 Jahre. Davon waren 40,6% männlichen Geschlechtes. Zwischen beiden Gruppen bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen der Alters-/ bzw. Geschlechterverteilung (Geschlecht:  $P=0,7526$ , Fisher`s exact test; Alter:  $P=0,4049$ , Mann-Whitney test).

### **2.6.2 Tumorstaging-Set**

Das Tumorstaging-Set setzte sich aus 11 Patientenproben im Stadium UICC I (Durchschnittsalter 61 Jahre; Altersverteilung 45 - 70 Jahre) und 29 Serumproben im Stadium UICC II (Durchschnittsalter 58 Jahre; Altersverteilung 54 - 84 Jahre), sowie aus 37 bzw. 18 Proben aus den UICC-Stadien III (Durchschnittsalter 66 Jahre; Altersverteilung 41 - 85 Jahre) bzw. dem bereits metastasierten Stadium UICC IV (Durchschnittsalter 66 Jahre; Altersverteilung 50 – 83 Jahre) zusammen. Auch in diesem zweiten Set bestanden zwischen den einzelnen Tumorstadien keine statistischen Unterschiede im Bezug auf das durchschnittliche Alter der Patienten oder die Geschlechterverteilung (Geschlecht:  $P=0,7239$ , Chi Quadrat Test); Alter:  $P=0,3655$  (one-way ANOVA). Mit der Differenzierung zwischen den einzelnen Tumorstadien sollte eine weitere Erhöhung der Sensitivität und eine noch größere Trennschärfe auf der Suche nach frühen Markern der Karzinogenese erreicht werden. Weiterhin sollte gemäß einer weiteren Arbeitshypothese die Frage geklärt werden, ob ein linearer Zusammenhang zwischen der Zunahme der methylierten DNA-Menge, d.h. einem als positiv gewerteten Marker und den unterschiedlichen Tumorstadien mit steigender Infiltrationstiefe bzw. Metastasierung besteht.

### **2.6.3 Test-Set**

Das Test-Set sollte zum einen der Bestätigung der Ergebnisse aus dem Trainings- bzw. dem Tumorstaging-Set dienen und zum anderen die Reproduzierbarkeit der Daten an einer größeren Stichprobe mit Fokus auf die Frühstadien der Karzinogenese bzw. prämaligene Läsionen wie Polypen zeigen.

Das Test-Set beinhaltete insgesamt 182 Serumproben, davon 45 gesunde Kontrollpersonen (Durchschnittsalter 63 Jahre (von 31 der 45 Personen verfügbar); Altersverteilung 44 – 81 Jahre), 40 Adenome mit einer Größe von über 1cm (Durchschnittsalter 63 Jahre; Altersverteilung 43 – 73 Jahre) sowie 27 Proben im Stadium UICC I (Durchschnittsalter 64 Jahre; Altersverteilung 44 – 83 Jahre) und 70 Proben im UICC-Stadium II (Durchschnittsalter 68 Jahre, Altersverteilung 37 – 91 Jahre). Auch in diesem Set bestanden keine statistischen Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen im Bezug auf Alters- oder Geschlechtsverteilung (Geschlecht:  $P=0,7289$ , Fisher's exact test; Alter:  $P=0,0814$  (Mann-Whitney-test)).

## 2.6.4 Flow-Chart (Gesamtaufbau)

Zur Veranschaulichung der einzelnen Sets und der darin gemessenen Biomarker soll zum Abschluss dieses Kapitels noch einmal die folgende Abbildung dienen:

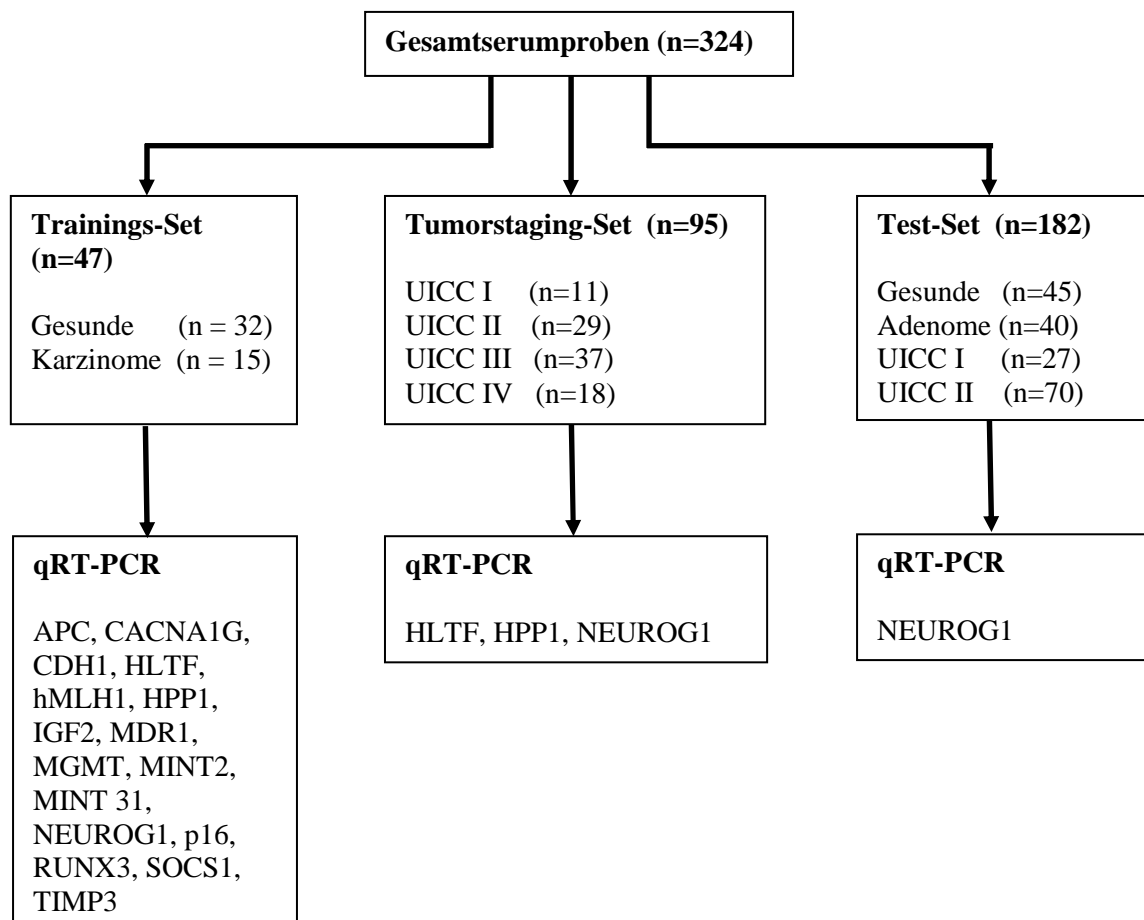


Abbildung 2.7 Flow-Chart aller enthaltenen Sets und der darin gemessenen Marker

Insgesamt wurden 324 Serumproben auf geeignete Marker zur Detektion kolorektaler Karzinome analysiert. Im Training-Set mit gesunden Kontrollpersonen und Seren von Patienten mit metastasierten Stadien (UICC IV) wurden insgesamt 16 Gene mit der qRT-PCR auf ihren Methylierungsstatus untersucht. Das Tumorstaging-Set beinhaltete 95 Karzinomseren jeden Stadiums. In ihm wurden die 3 nach definierten Auswahlkriterien aus dem Trainings-Set verbliebenen Marker HLTF, HPP1 und NEUROG-1 getestet. Um die Ergebnisse zu verifizieren, wurde anschließend im Testset an einer Stichprobe von 182 Seren gesunder Kontrollpersonen, Adenom- und Karzinompatienten der UICC-Stadien I und II der Marker NEUROG-1 nochmals analysiert.

## 2.6.5 Serum-Tumor-Korrelationsset

Dieses Set umfasste 10 Patienten mit einem Durchschnittsalter von 68 Jahren, einer Altersverteilung von 50-87 Jahren und 8 männlichen und 2 weiblichen Personen und sollte zeigen, dass zwischen dem koloskopisch erfassten Primärtumor und dem entnommenen Serum der Patienten ein signifikanter Zusammenhang bestand und dieselbe epigenetisch modifizierte Tumor-DNA auch in beiden Medien nachweisbar sein musste.

Eine Zusammenstellung aller Eigenschaften der oben beschriebenen Sets liefert *Tabelle 2.3*.

*Tabelle 2.3: Patientencharakteristika von Trainings-/ Tumorstaging-/ und Test-Set*

	Trainings-Set (n=47)				Tumorstaging-Set (n=95)				Test-Set (n=182)				
	n	m	w	Alter min-max	n	m	w	Alter min-max	n	m	w	Alter min-max	
Gesunde	32	13	19	59 23-80					45	21	24	63*	44-81
Adenome <sup>1</sup>									40	28	12	63	43-73
UICC I					11	4	7	61 45-70	27	13	14	64	44-83
UICC II					29	12	17	68 54-84	70	27	43	68	37-91
UICC III					37	16	21	66 41-85					
UICC IV	15	5	10	64 31-80	18	10	8	66 50-83					

\* Daten von 31 Patienten verfügbar  
<sup>1</sup> Größe der Adenome > 1cm  
n Anzahl männlicher und weiblicher Testpersonen  
m Anzahl männlicher Testpersonen  
w Anzahl weiblicher Testpersonen

## 2.7 Statistische Analyse

Zur Ermittlung der Geschlechterverteilung zwischen den drei Einzelsets wurden der Pearson's Chi Quadrat-Test, und der exakte Fisher-Test, sowie der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test bzw. die einfache univariate Varianz-Analyse (ANOVA) zur Prüfung der Altersverteilung herangezogen. Auch zur Korrelation der erhobenen Daten mit klinisch-pathologischen Eigenschaften dienten der Pearson's Chi Quadrat bzw. der exakte Fisher-Test. Alle diese statistischen Analysen wurden unter Verwendung der Prism 4-Software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt. Um die Konfidenzintervalle für die Sensitivität eines einzelnen Gens zu bestimmen, wurde Algorithmus von A. Crispin (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von A. Crispin, Universität München) genutzt.

Die ROC-Analyse war erforderlich, um den Treshhold-Cycle für den Marker NEUROG-1 (Punkt 2.3.1) zu definieren. Diese statistische Analyse wurde mit der SPSS-Software Version 16.0 (SPSS, Inc. Chicago, IL, USA) erstellt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Methodische Entwicklung

##### 3.1.1 Inter-Intra-Assay

Wie bereits im Abschnitt Materialien und Methoden beschrieben, finden sich in den folgenden Abbildungen 3.1 und 3.2 die Ergebnisse des Inter- Intra-Assays, der zur Evaluierung der Standardabweichung zwischen den Einzelmessungen durchgeführt wurde und damit ein weiteres Qualitätsmerkmal dieser Untersuchung beinhalten sollte.

Inter-Intra-Assay GESUNDE																		
		1. Lauf					2. Lauf					3. Lauf					Statistik	
	Marker	Ct (1)	Ct (2)	Ct (3)	X	$\sigma_x$	Ct (1)	Ct (2)	Ct (3)	X	$\sigma_x$	Ct (1)	Ct (2)	Ct (3)	X	$\sigma_x$	VarK (x) in %	$\bar{\sigma}_n$
Ges. 1	ALU	23,47	23,8	23,59	23,62	0,17	21,38	21,69	21,67	21,58	0,17	18,83	18,99	18,99	18,94	0,09	0,67	0,05
	HPP1	0	0	0	n.d.	n.d.	0	0	0	n.d.	n.d.	0	48,12	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	NEUROG1	42,07	42,07	43,4	42,51	0,77	0	47,64	49,41	n.d.	n.d.	0	0	44,83	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ges. 2	ALU	27,77	27,98	27,87	27,87	0,11	25,84	25,84	26,02	25,9	0,1	23,4	23,41	23,71	23,51	0,18	0,5	0,04
	HPP1	0	0	0	n.d.	n.d.	0	0	0	n.d.	n.d.	0	0	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	NEUROG1	43,52	43,77	40,24	42,51	1,97	40,55	48,44	0	n.d.	n.d.	45,67	47,53	45,13	46,11	1,26	n.d.	n.d.
Ges. 3	ALU	23,42	22,96	23,83	23,4	0,44	21,52	21,3	22,02	21,61	0,37	19,4	19,37	19,27	19,35	0,07	1,36	0,1
	HPP1	0	0	0	n.d.	n.d.	0	0	0	n.d.	n.d.	0	0	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	NEUROG1	42,58	48,89	41,53	44,33	3,98	47,78	46,21	0	n.d.	n.d.	41,77	40,84	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ges. 4	ALU	24,85	25,02	25,22	25,03	0,19	22,68	22,63	22,76	22,69	0,07	20,56	20,49	20,65	20,57	0,08	0,48	0,04
	HPP1	0	0	0	n.d.	n.d.	0	0	0	n.d.	n.d.	0	0	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	NEUROG1	42,6	46,1	43,18	43,96	1,88	42,83	44,25	49,09	45,39	3,28	0	48,21	47,88	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ges. 5	ALU	23,68	23,78	23,83	23,76	0,08	21,79	21,73	21,9	21,81	0,09	19,37	19,53	19,5	19,47	0,09	0,38	0,03
	HPP1	0	0	0	n.d.	n.d.	0	0	0	n.d.	n.d.	47,88	0	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	NEUROG1	37,98	38,4	37,98	38,12	0,24	38,38	39,69	38,73	38,93	0,68	39,65	37,99	37,94	38,53	0,97	1,64	0,21

Ges. – Gesunde Kontrollpersonen  
Ct – Treshold-Cycle  
 $\sigma_x$  – Standardabweichung  
VarK – Variationskoeffizient ( $\kappa$ )  
X - Mittelwert  
 $\bar{\sigma}_n$  - Varianz

Abbildung 3.1: Inter-Intra-Assay an gesunden Kontrollpersonen

Inter-Intra-Assay M-STADIEN																		
		1. Lauf					2. Lauf					3. Lauf					Statistik	
	Marker	Ct (1)	Ct (2)	Ct (3)	X	$\sigma_x$	Ct (1)	Ct (2)	Ct (3)	X	$\sigma_x$	Ct (1)	Ct (2)	Ct (3)	X	$\sigma_x$	VarK (x)	$\delta_n$
Pat. 1	ALU	25,72	25,16	24,99	25,29	0,38	23,07	23,06	22,30	22,81	0,44	20,77	20,18	19,90	20,28	0,44	1,85	0,14
	HPP1	36,37	37,77	37,59	37,24	0,76	37,25	37,56	37,50	37,44	0,16	39,17	39,46	38,42	39,02	0,54	1,29	0,16
	NEUROG1	43,53	35,6	34,81	37,98	4,82	36,41	34,69	37,62	36,24	1,47	36,59	35,92	36,08	36,20	0,35	6,02	0,74
Pat. 2	ALU	22,18	22,02	22,92	22,37	0,48	20,25	20,23	20,11	20,20	0,08	17,63	17,97	17,90	17,83	0,18	1,22	0,08
	HPP1	35,02	34,47	34,94	34,81	0,30	34,62	34,19	34,42	34,41	0,22	36,02	35,43	35,34	35,60	0,37	0,84	0,10
	NEUROG1	36,65	36,11	37,31	36,69	0,60	36,21	39,21	37,34	37,59	1,52	37,60	37,75	36,56	37,30	0,65	2,48	0,31
Pat. 3	ALU	22,58	22,48	22,41	22,49	0,09	20,07	20,02	20,11	20,07	0,05	17,93	17,43	17,76	17,71	0,25	0,64	0,04
	HPP1	36,46	36,91	36,84	36,74	0,24	35,62	35,56	35,71	35,63	0,08	36,85	37,06	37,33	37,08	0,24	0,51	0,06
	NEUROG1	40,56	40,66	40,43	40,55	0,12	40,91	42,69	40,51	41,37	1,16	39,09	43,43	40,88	41,13	2,18	2,81	0,38
Pat. 4	ALU	24,29	24,28	24,33	24,30	0,03	22,21	22,43	21,98	22,21	0,23	19,56	19,75	19,84	19,72	0,14	0,60	0,04
	HPP1	42,77	43,52	0	n.d.	n.d.	42,19	0	42,89	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	NEUROG1	43,27	39,81	41,05	41,38	1,75	39,51	41,21	41,95	40,89	1,25	41,87	41,83	39,82	41,17	1,17	3,38	0,46
Pat. 5	ALU	21,56	21,47	20,92	21,32	0,35	19,15	18,69	19,17	19,00	0,27	17,39	16,94	16,92	17,08	0,27	1,54	0,10
	HPP1	38,17	38,49	38,07	38,24	0,22	37,37	36,71	37,47	37,18	0,41	39,73	39,64	39,03	39,47	0,38	0,88	0,11
	NEUROG1	39,27	38,64	38,29	38,73	0,50	39,91	39,95	40,93	40,26	0,58	42,09	40,05	40,83	40,99	1,03	1,75	0,23

Pat. – Patienten mit kolorektalem Karzinom im metastasierten Stadium UICC IV  
Ct – Treshold-Cycle  
 $\sigma_x$  – Standardabweichung  
VarK – Variationskoeffizient ( $\kappa$ )  
X - Mittelwert  
 $\delta_n$  - Varianz

Abbildung 3.2: Inter-Intra-Assay in metastasierten Tumorstadien (UICC IV)

Bei der Auswertung des Assays fällt auf, dass die gemessene Methylierungsfrequenz bei den Serumproben im bereits metastasierten Stadium (Abb.: 3.2) sehr viel höher ist als bei den Kontrollseren (Abb.: 3.1). Weiterhin bleibt die Standardabweichung bei nahezu allen Triplikaten sehr niedrig und erreicht als Maximum 0,76. Einzige Ausnahme ist das Gen NEUROG-1, welches nur selten Standardabweichungen  $<1$  aufweist. Durch die sehr kleine Menge an DNA, die vom Tumor ins Blut freigesetzt wird, kann mit den verfügbaren Meßmethoden trotz exakter Austestung der Reaktionsbedingungen wahrscheinlich derzeit keine genauere Analyse erzielt werden. Ein Vergleich mit einer ähnlichen Fragestellung eines solchen Assays war jedoch aufgrund der verfügbaren Datenlage nicht möglich. Auffällig ist der Vergleich der 3 PCR-Durchgänge („Lauf 1, 2, 3“) pro Serumprobe („Ges. 1“ bzw. „Pat.1“) untereinander. Hierbei lässt sich eine relativ große Abweichung der Mittelwerte der Fluoreszenzsignale der Triplikate erkennen.

Eine mögliche Erklärung hierfür wäre die leichte Veränderung der Reaktionsbedingungen während des Testtages: das Auftauen der Proben, die zwar stets auf Eis gelagert wurden aber doch nicht zwischen den Läufen wieder eingefroren wurden oder auch, trotz großer Sorgfalt, kleinere Ungenauigkeiten beim Pipettieren der Ansätze. Der Standardfehler, als Maß der Streuung der Stichprobenmittelwerte, lag exklusive NEUROG-1 bei unter 0,2.

Der Variationskoeffizient, auch als Maß für die relative Standardabweichung bekannt, besaß ein Maximum von 6%. Aufgrund der niedrigen Standardabweichung der Triplikate untereinander, der bis auf eine Ausnahme („Pat. 4“/ „HPP1“) reproduzierbaren Methylierungsmessungen in den Patientenproben („M-Stadien“) und nicht zuletzt zur optimalen Nutzung des limitierten Materials (aus 1ml für die DNA-Isolation eingesetzten Serums erhielt man 30µl Bisulfit-behandelte DNA, von der je 2µl pro PCR eingesetzt wurden) fiel letztlich, wie bereits erwähnt, die Entscheidung zur Messung in Duplikaten.

### **3.2 Trainings-Set**

Um größtmögliche Sensitivität und Trennschärfe der Ergebnisse zu erzielen, wurden 16 Methylierungsmarker in unterschiedlichen Patientenkollektiven mit steigenden Anforderungen an den einzelnen Marker gemessen: das Trainings-Set, Tumorstaging-Set und das Test-Set (Punkt 2.6.4).

Im Trainings-Set, bestehend aus 32 gesunden Kontrollpersonen und 15 Karzinomseren im metastasierten Stadium, sollte untersucht werden, ob die einzelnen Marker schon im Serum gesunder Patienten eine Methylierung aufwiesen und wie stark diese Methylierung war. Ziel war es, Marker zu identifizieren, die eine gute Diskriminierung zwischen Gesunden und kolorektalen Karzinomen erlauben. Wir gingen dabei davon aus, dass ein Marker, der bereits im Gesunden eine starke Methylierung aufwies, keine gute Diskriminierung zwischen gesunden Kontrollen und den Frühstadien UICC I und II gewährleisten konnte. Die Seren aus den bereits metastasierten Stadien wurden integriert, um die Marker herauszufinden, die in fortgeschrittenen Stadien eine hohe Methylierungsrate aufwiesen. Im Vergleich zu Markern mit geringer Methylierung in UICC IV sollten diese Marker eine höhere Methylierung in UICC I und II aufweisen. In diesem ersten Set wurden alle 16 Ausgangsmarker, inklusive der fünf Marker des CIMP-Panels, die in der Literatur bereits als methyliert in kolorektalen Karzinomen beschrieben wurden, eingeschlossen (APC, CACNA1G, CDH-1, IGF-2, HLTF, hMLH-1, HPP1, MDR-1, MGMT, MINT-2, MINT-31, NEUROG1, p16, RUNX-3, SOCS-1 und TIMP-3).



Die Ergebnisse der Promotor-Methylierungsmessungen dieses ersten Sets sind in *Tabelle 3.1* dargestellt. Dabei wurde jedem Marker die zugehörige Template-Menge (= Anzahl DNA-Moleküle), die zuvor mit einer Standardkurve ermittelt wurde, zugeordnet. An einer definierten Stelle der PCR-Reaktion wurde dafür die Amplifikationsrate für jedes Gen per Fluoreszenzsignal gemessen und anschließend mit Hilfe der Standardkurve die dementsprechende DNA-Menge ermittelt. Zur Vereinfachung sind an dieser Stelle alle auf diese Weise ermittelten Daten mit P (= positiver Wert) gezeigt. Die normalisierten Originaldaten der PCR befinden sich im Anhang unter *Tabelle 4.1*.

Tabelle 3.1: Ergebnisse der Serummarker-Messung im Trainings-Set (Serum von 32 gesunden Kontrollpersonen (G) und von 15 Patienten mit kolorektalen Karzinomen im UICC-Stadium IV (K))

Nr.	Status	Referenz-Gen													
		APC	CACNA1G	CDH1	IGF-2	HLTF	hMLH1	HPP1	MDR-1	MGMT	NEUROG1	p16	RUNX-3	SOCS-1	TIMP-3
1	G	P	n.d.	---	n.d.	---	---	---	---	---	n.d.	---	n.d.	n.d.	---
2	G	---	n.d.	---	n.d.	---	---	---	---	---	n.d.	---	n.d.	n.d.	---
3	G	---	n.d.	---	n.d.	---	---	P	---	---	n.d.	---	n.d.	n.d.	---
4	G	P	n.d.	---	n.d.	---	---	---	---	---	n.d.	---	n.d.	n.d.	P
5	G	---	n.d.	---	n.d.	---	---	---	---	---	n.d.	---	n.d.	n.d.	---
6	G	---	n.d.	---	n.d.	---	---	---	---	---	n.d.	---	n.d.	n.d.	---
7	G	---	n.d.	---	n.d.	---	---	---	---	---	n.d.	---	n.d.	n.d.	---
8	G	---	n.d.	---	n.d.	---	---	---	---	---	n.d.	---	n.d.	n.d.	---
9	G	P	n.d.	---	n.d.	---	P	---	---	---	n.d.	---	n.d.	n.d.	---
10	G	---	n.d.	---	n.d.	---	---	P	---	---	n.d.	---	n.d.	n.d.	---
11	G	P	n.d.	---	n.d.	---	---	P	---	---	n.d.	---	n.d.	n.d.	---
12	G	---	n.d.	P	n.d.	---	P	---	---	---	n.d.	---	n.d.	n.d.	P
13	G	---	n.d.	---	n.d.	---	---	---	---	---	n.d.	---	n.d.	n.d.	---
14	G	P	n.d.	---	n.d.	---	---	---	---	---	n.d.	---	n.d.	n.d.	---
15	G	---	n.d.	---	n.d.	---	---	---	---	---	n.d.	---	n.d.	n.d.	---
16	G	---	n.d.	---	n.d.	P	---	---	---	---	n.d.	---	n.d.	n.d.	---
17	G	---	n.d.	---	n.d.	---	---	---	---	---	n.d.	---	n.d.	n.d.	---
18	G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	P	---	---	---	---
19	G	---	---	---	P	---	P	---	---	---	P	---	---	P	---
20	G	---	---	---	---	---	P	---	---	---	P	---	---	---	---
21	G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	P	---	---	---	---
22	G	P	---	---	P	P	P	---	P	---	---	---	---	---	---
23	G	---	---	---	P	---	P	---	---	---	P	---	---	P	---
24	G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	P	---	P	---	---
25	G	---	---	---	P	---	---	---	---	---	P	---	---	---	---
26	G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
27	G	---	---	---	P	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
28	G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	P	---	---	---	---
29	G	---	P	---	P	---	---	---	---	---	P	---	---	---	---
30	G	---	P	---	P	---	---	---	---	---	P	---	P	---	---
31	G	---	P	---	P	---	---	---	---	---	P	---	---	---	---
32	G	---	---	---	P	---	---	---	---	---	P	---	---	---	---
33	K	---	---	---	---	---	---	---	---	---	P	---	---	---	---
34	K	---	---	---	---	P	P	P	---	P	P	---	---	---	---
35	K	P	P	---	P	p	---	P	---	---	P	---	P	---	---
36	K	---	---	---	---	---	---	---	---	---	P	---	---	---	---
37	K	---	---	---	---	P	---	---	---	P	P	---	---	---	---
38	K	---	---	---	P	P	P	P	P	P	P	---	---	P	P
39	K	P	---	---	P	---	---	---	---	---	P	---	---	---	---
40	K	P	P	---	P	---	---	---	---	---	P	---	P	---	---
41	K	P	---	---	---	P	---	P	---	P	P	---	---	P	---
42	K	---	---	---	P	P	P	P	---	---	P	---	---	---	---
43	K	P	---	---	P	P	---	P	---	---	P	---	P	---	---
44	K	---	---	---	P	P	P	P	---	---	P	---	P	P	P
45	K	P	---	---	---	P	---	P	---	P	P	---	---	---	---
46	K	P	P	---	P	P	---	P	---	---	P	---	P	P	P
47	K	P	---	---	---	---	P	P	---	---	P	---	P	P	---

n.d. – nicht gemessen  
G – Gesunde Kontrollpersonen  
K – Karzinom-Seren im Stadium UICC IV  
P – anhand PCR-Reaktion ermittelte positive Messwerte, denen mit der Standardkurve eine definierte DNA-Menge zugeordnet werden konnte

Im nächsten Schritt wurden die in Tabelle 4.1 (Anhang) aufgeführten, mit der jeweiligen Standardkurve ermittelten DNA-Mengen für jeden Marker und jedes Serum auf das Referenzgen ALU normalisiert.

Dabei wurde der Quotient zwischen der Menge der DNA-Moleküle des Markers und der DNA-Menge des zugehörigen Referenzgens (ALU) für jede Serumprobe bestimmt.

Die Ergebnisse sind Tabelle 3.2 zu entnehmen.

Tabelle 3.2: Normalisierung der DNA-Molekül-Mengen mittels Referenz-Gen ALU

Referenz-Gen															
Nr	Status	APC	CACNA1G	CDH-1	IGF-2	HLTF	hMLH1	HPP1	MDR-1	MGMT	NEUROG1	p16	RUNX-3	SOCS-1	TIMP-3
1	G	B	n.d.	0	n.d.	0	0	0	0	0	n.d.	0	n.d.	n.d.	0
2	G	0	n.d.	0	n.d.	0	0	0	0	0	n.d.	0	n.d.	n.d.	0
3	G	0	n.d.	0	n.d.	0	0	A	0	0	n.d.	0	n.d.	n.d.	0
4	G	0	n.d.	0	n.d.	0	0	0	0	0	n.d.	0	n.d.	n.d.	B
5	G	0	n.d.	0	n.d.	0	0	0	0	0	n.d.	0	n.d.	n.d.	0
6	G	0	n.d.	0	n.d.	0	0	0	0	0	n.d.	0	n.d.	n.d.	0
7	G	0	n.d.	0	n.d.	0	0	0	0	0	n.d.	0	n.d.	n.d.	0
8	G	0	n.d.	0	n.d.	0	0	0	0	0	n.d.	0	n.d.	n.d.	0
9	G	A	n.d.	0	n.d.	0	A	0	0	0	n.d.	0	n.d.	n.d.	0
10	G	0	n.d.	0	n.d.	0	0	B	0	0	n.d.	0	n.d.	n.d.	0
11	G	C	n.d.	0	n.d.	0	0	A	0	0	n.d.	0	n.d.	n.d.	0
12	G	0	n.d.	0	n.d.	0	0	0	0	0	n.d.	0	n.d.	n.d.	0
13	G	0	n.d.	0	n.d.	0	0	0	0	0	n.d.	0	n.d.	n.d.	0
14	G	A	n.d.	0	n.d.	0	0	0	0	0	n.d.	0	n.d.	n.d.	0
15	G	0	n.d.	0	n.d.	0	0	0	0	0	n.d.	0	n.d.	n.d.	0
16	G	0	n.d.	0	n.d.	A	0	0	0	0	n.d.	0	n.d.	n.d.	0
17	G	0	n.d.	0	n.d.	0	0	0	0	0	n.d.	0	n.d.	n.d.	0
18	G	0	0	0	0	0	0	0	0	0	A	0	0	0	0
19	G	0	0	0	A	0	A	0	0	0	B	0	0	B	0
20	G	0	0	0	0	0	B	0	0	0	A	0	0	0	0
21	G	0	0	0	0	0	0	0	0	0	B	0	0	0	0
22	G	0	0	0	0	0	A	0	0	0	0	0	0	0	0
23	G	0	0	0	A	0	A	0	0	0	0	0	0	A	0
24	G	0	0	0	0	0	0	0	0	0	A	0	B	0	0
25	G	0	0	0	B	0	0	0	0	0	A	0	0	0	0
26	G	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	G	0	0	0	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28	G	0	0	0	0	0	0	0	0	0	A	0	0	0	0
29	G	0	B	0	B	0	0	0	0	0	B	0	0	0	0
30	G	0	B	0	B	0	0	0	0	0	A	0	B	0	0
31	G	0	A	0	B	0	0	0	0	0	A	0	0	0	0
32	G	0	0	0	B	0	0	0	0	0	D	0	0	0	0
33	K	0	0	0	0	0	0	0	0	0	D	0	0	0	0
34	K	0	0	0	0	B	C	D	0	B	D	0	0	0	0
35	K	0	C	0	D	D	0	D	0	0	D	0	A	0	0
36	K	0	0	0	0	0	0	0	0	0	D	0	0	0	0
37	K	0	0	0	0	B	0	0	0	A	D	0	0	0	0
38	K	0	0	0	B	B	B	B	A	A	D	0	0	B	B
39	K	B	0	0	B	0	0	0	0	0	D	0	0	0	0
40	K	0	B	0	B	0	0	0	0	0	D	0	A	0	0
41	K	0	0	0	0	A	0	B	0	A	D	0	0	0	0
42	K	0	0	0	A	A	B	B	0	0	C	0	0	0	0
43	K	C	0	0	A	B	0	D	0	0	D	0	B	0	0
44	K	0	0	0	B	D	B	D	0	0	D	0	B	B	A
45	K	D	0	0	0	C	0	B	0	B	D	0	0	0	0
46	K	C	B	0	B	A	0	B	0	0	B	0	A	A	0
47	K	0	0	0	0	0	A	A	0	0	D	0	A	0	0

G – Gesunde  
K – Karzinome  
Die in der Tabelle enthaltenen Einzeldaten wurden aus dem Quotienten der mittels Standardkurve errechneten DNA-Menge des Einzel-Markers und der DNA-Menge des Referenz-Gens ALU bestimmt.  
A – Grenzwert > 0  
B – Grenzwert > 0,005  
C – Grenzwert > 0,05  
D – Grenzwert > 0,1

Zur besseren Übersicht wurden die Originaldaten der Normalisierungsberechnung durch die Buchstaben A bis D ersetzt, die jeweils einem bestimmten Grenzwert entsprechen. Die Originaldaten der Normalisierungsberechnung befinden sich im Anhang unter Tabelle 4.2. Anschließend wurde für die vier, willkürlich festgelegten Grenzwerte ( $>0$ ;  $>0,005$ ;  $>0,05$ ;  $>0,1$ ) die Sensitivität der einzelnen Marker in absoluten Zahlen und in Prozentwerten ermittelt. Für die nachfolgenden Sets (Tumorstaging-Set und Test-Set) wurde ebenfalls die Methode zur Normalisierung, wie unter Punkt 3.2 beschrieben (normalisierte DNA-Menge = Quotient aus Menge der DNA-Moleküle des Markers und der DNA-Menge des zugehörigen Referenzgens ALU für jede Serumprobe) angewandt.

Tabelle 3.3: Auswertung Trainings-Set unter Einbeziehung definierter Grenzwerte

			APC	CACNAG1	CDH1	IGF2	hMLH1	HLTF	HPP1/TPEF	MDR1	MGMT	NEUROG1	p16	RUNX3	SOCS1	TIMP3
$>0$	Gesunde	n	6	3	1	9	6	2	3	1	0	12	0	2	2	2
		%	18,8	20,0	3,1	60,0	18,8	6,3	9,4	3,1	0,0	80,0	0,0	13,3	13,3	6,3
	Metastasen	n	8	3	0	8	5	10	10	1	5	15	0	6	5	3
		%	53,3	20,0	0,0	53,3	33,3	66,7	66,7	6,7	33,3	100,0	0,0	40,0	33,3	20,0
$>0,005$	Gesunde	n	2	2	0	6	1	0	1	0	0	4	0	2	1	1
		%	6,3	13,3	0,0	40,0	3,1	0,0	3,1	0,0	0,0	26,7	0,0	13,3	6,7	3,1
	Metastasen	n	4	3	0	6	4	7	9	0	2	15	0	2	3	2
		%	26,7	20,0	0,0	40,0	26,7	46,7	60,0	0,0	13,3	100,0	0,0	13,3	20,0	13,3
$>0,05$	Gesunde	n	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
		%	3,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,7	0,0	0,0	0,0	0,0
	Metastasen	n	3	1	0	1	1	3	4	0	0	14	0	0	0	0
		%	20,0	6,7	0,0	6,7	6,7	20,0	26,7	0,0	0,0	93,3	0,0	0,0	0,0	0,0
$>0,1$	Gesunde	n	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
		%	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,7	0,0	0,0	0,0	0,0
	Metastasen	n	1	0	0	1	0	2	4	0	0	13	0	0	0	0
		%	6,7	0,0	0,0	6,7	0,0	13,3	26,7	0,0	0,0	86,7	0,0	0,0	0,0	0,0

Für die vier willkürlich festgelegten Grenzwerte  $>0$ ,  $>0,005$ ,  $>0,05$ ,  $>0,1$  wurden für jeden im Trainings-Set enthaltenen Marker die Sensitivitäten in absoluten Zahlen und in Prozentwerten ermittelt. Für APC waren beispielsweise 6 gesunde Seren für einen Grenzwert  $>0$  positiv, entsprechend einem Prozentsatz von 18,8%.

n – Anzahl positive Fälle

n.d. – nicht gemessen

grau unterlegt: Marker mit Sensitivität  $> 50\%$  und Falsch-Positiv-Rate  $< 10\%$

Als vielversprechende Marker mit hohem Potential in der Früherkennung kolorektaler Tumoren wurden Marker mit:

1. einer Detektionsrate von mindestens **50%** für Karzinome und
2. einer Falsch-Positiv-Rate von  **$< 10\%$**

zur weiteren Evaluation in das nächste Set (Tumorstagingset) aufgenommen.

Dementsprechend wurden alle Marker, die bei einem definierten Schwellenwert (0; 0,005, 0,05 oder 0,1) mehr als 50 % der 15 Karzinomseren erfassten und dabei weniger als 10% der Proben als falsch positiv erkannten, für die weiteren Messungen verwendet. Diese Kriterien erfüllten nur drei, der initial 16 untersuchten Marker: HLTF/TPEF, HPP1 und NEUROG1 (in *Tabelle 3.3* grau unterlegt). Bei einem *Cut-Off* von  $> 0$  konnte für HLTF in 6,3% der gesunden Kontrollpersonen und in 66,7% der Karzinomseren Promotor-Methylierung nachgewiesen werden. Für HPP1/TPEF betrug die Anzahl der Methylierung ebenfalls ohne Schwellenwert in den gesunden Seren 9,4% und 66,7% für die Karzinomproben. Diese Ergebnisse entsprechen der maximal erzielten Sensitivität für diese Marker. Die dazu komplementär gemessenen Spezifitäten lagen entsprechend bei 93,7% für HLTF und 90,6% für HPP1/TPEF. Bei einem *Cut-Off* von  $> 0,05$  waren für NEUROG1 6,7% (entsprechend einer Spezifität von 93,3%) der gesunden Kontrollseren und 93,3% der Karzinomseren methyliert, was dem besten Detektionsergebnis entsprach (*Tabelle 3.3*).

Die folgende Auflistung zeigt noch einmal die errechneten Prozentwerte aller für die Publikation relevanten Marker mit den entsprechenden 95%-Konfidenzintervallen (Andreas Herbst mit Excel Sheets P1, Version 12.0 (A. Crispin, Biometrie des Klinikums der Universität München); *Tabelle 3.4*).

*Tabelle 3.4: Identifikation geeigneter diagnostischer Serummarker im Trainings-Set*

Grenz- wert	$> 0$		$> 0,005$		$> 0,05$	
	Status Gesunde	Karzinome	Status Gesunde	Karzinome	Status Gesunde	Karzinome
Anzahl Proben	n = 32	n = 15	n = 32	n = 15	n = 32	n = 15
CACNA1G*	20,0 (4,3-48,1)	20,0 (4,3- 48,1)	13,3 (1,7-40,5)	20,0 (4,3-48,1)	0,0 (0,0-21,8)	6,7 (2,0-31,9)
CDH1	3,1 (0,1-14,2)	0,0 (0,0-21,8)	0,0 (0,0-9,5)	0,0 (0,0-21,8)	0,0 (0,0-9,5)	0,0 (0,0-21,8)
HLTF	9,4 (2,0-25,0)	66,7 (38,4-88,2)	3,1 (0,1-14,2)	60,0 (32,3-83,7)	0,0 (0,0-9,5)	26,7 (7,8-55,1)
HPP1	6,3 (0,7-18,2)	66,7 (38,4-88,2)	0,0 (0,0-9,5)	46,7 (21,3-73,4)	0,0 (0,0-9,5)	20,0 (4,3-48,1)
IGF2*	60,0 (32,3-83,7)	53,3 (26,6-78,7)	40,0 (16,3-67,7)	40,0 (16,3-67,7)	0,0 (0,0-21,8)	6,7 (2,0-31,9)
MDR1	3,1 (0,1-14,2)	6,7 (2,0-31,9)	0,0 (0,0-9,5)	0,0 (0,0-21,8)	0,0 (0,0-9,5)	0,0 (0,0-21,8)
NEUROG1*	80,0 (51,9-95,7)	100,0 (78,2-100,0)	26,7 (7,8-55,1)	100,0 (78,2-100,0)	6,7 (2,0-31,9)	93,3 (68,1-99,8)
RUNX3*	13,3 (1,7-40,5)	40,0 (16,3-67,7)	13,3 (1,7-40,5)	13,3 (1,7-40,5)	0,0 (0,0-21,8)	0,0 (0,0-21,8)
SOCS1*	13,3 (1,7-40,5)	33,3 (11,8-61,6)	6,7 (2,0-31,9)	20,0 4,3-48,1)	0,0 (0,0-21,8)	0,0 (0,0-21,8)
TIMP3	6,3 (0,7-18,2)	20,0 (4,3-48,1)	3,1 (0,1-14,2)	13,3 (1,7-40,5)	0,0 (0,0-9,5)	0,0 (0,0-21,8)

\* Daten von 15 / 32 gesunden Kontrollpersonen verfügbar  
in Klammern sind die jeweiligen 95%-Konfidenzintervalle angegeben

### 3.3 Tumorstaging-Set

Mit dem Tumorstaging-Set, bestehend aus 11 bzw. 29 Patienten in den frühen UICC-Stadien I und II, 37 Seren im UICC-Stadiums III und 18 Patienten im fortgeschrittenen UICC-Stadium IV, sollten folgende Fragestellungen untersucht werden:

Ob und wie gut die getesteten Marker, die aus dem Trainingset verblieben waren, zwischen Früh- und Spätstadien zu diskriminieren vermögen, ob sie in der Lage sind, Tumore in allen Stadien zu erfassen und ob es aufgrund dieser Erkenntnisse möglich wäre, Marker mit dem Ziel der Früherkennung kolorektaler Karzinome ausfindig zu machen. Schließlich sollte ein Screeningtest v. a. asymptomatische und frühe, gut therapierbare Karzinome erfassen.

Die im Tumorstaging-Set gemessenen Marker waren die zuvor im Training-Set identifizierten Marker: HLTF, HPP1/TPEF und NEUROG1. Methylierung im Promotor von HLTF wurde nur in insgesamt 10 der eingeschlossenen 95 Patientenseren (entsprechend einer Sensitivität von 10,5 %) gefunden, HPP1-Methylierung in 19 getesteten Fällen (entsprechend einer Sensitivität von 20%). Für beide Marker konnte eine Zunahme der Sensitivität mit Fortschreiten des Tumorstadiums beobachtet werden, Abbildung 3.3A und 3.3B).

Im Vergleich dazu wurde Promotormethylierung von NEUROG1 in 63 von 95 Karzinomseren gefunden (entsprechend einer Sensitivität von 66,3%), die mehr oder weniger gleichmäßig auf die einzelnen Tumorstadien verteilt war: UICC-Stadium I: 72,7%, UICC-Stadium II: 55,2%, UICC-Stadium III: 73% und UICC-Stadium IV: 66,7% (Abbildung 3.3C). Zwischen den einzelnen Tumorstadien wurden jedoch keine statistisch relevanten Unterschiede festgestellt (univariate Varianzanalyse ANOVA,  $P=0,769$ ). Damit konnte sich nur methyliertes NEUROG1 als potentieller Marker für die Detektion kolorektaler Karzinome in frühen Stadien qualifizieren und wurde in das dritte Set, das Test-Set, eingeschlossen.

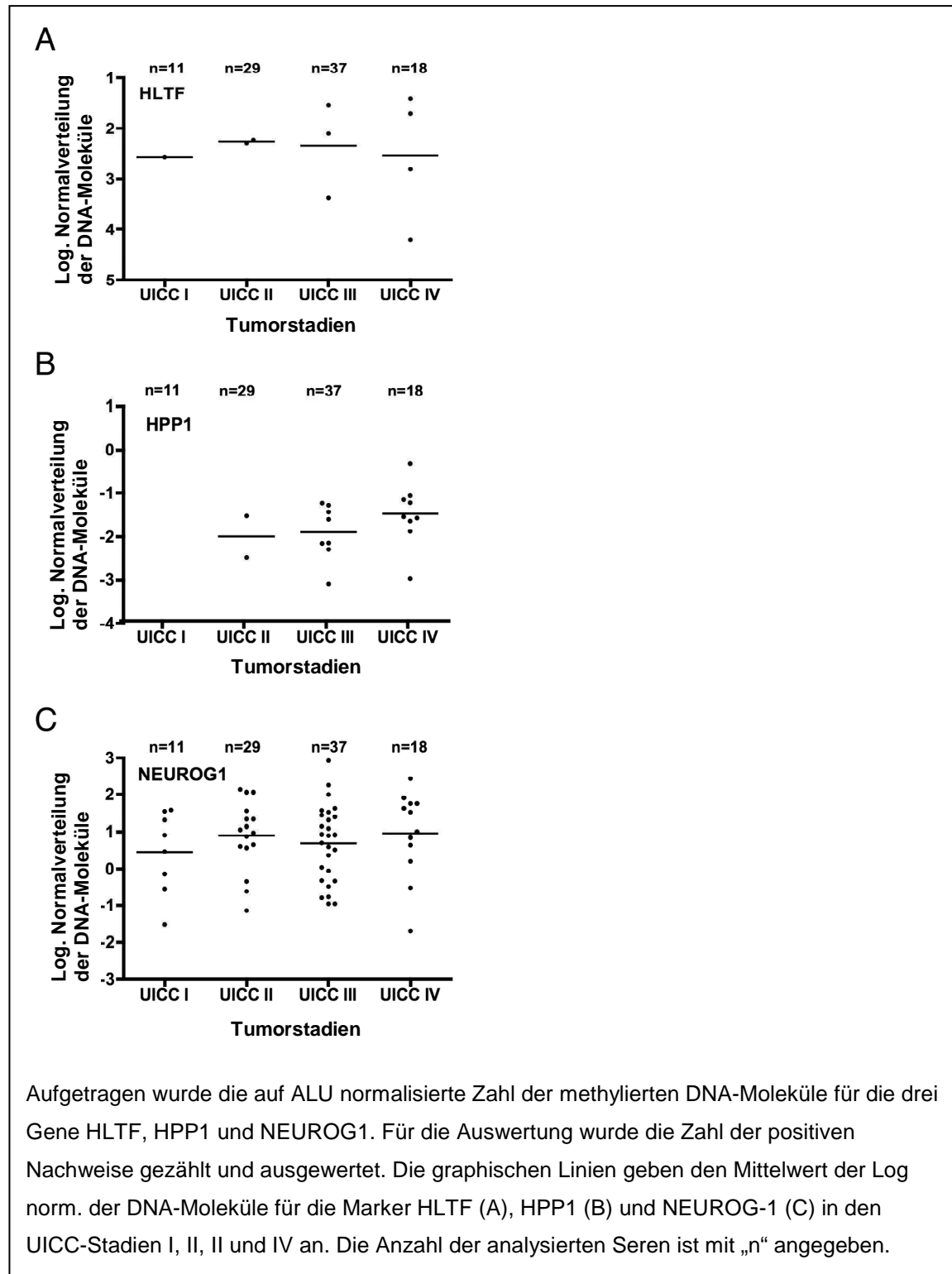


Abbildung 3.3 A,B,C Verteilungsmuster der Promotormethylierung für die Gene HLTF, HPP1 und NEUROG1 in den kolorektalen Karzinomstadien UICC I bis IV

Um zu zeigen, dass die Methylierungsergebnisse aus den gemessenen Seren auch mit den Primärtumoren übereinstimmten, wurde an einer kleinen Stichprobe von 10 Patienten (Serum-Tumor-Korrelations-Set) sowohl das Serum als auch der Primärtumor auf Promotor-Methylierung getestet. Tatsächlich konnte in 7 von 10 Patienten (entsprechend 70%) in beiden Medien Methylierung von NEUROG1 nachgewiesen werden. Das heißt, es besteht eine enge Korrelation zwischen der Methylierung von NEUROG1 im Primärtumor und dem Serum.

(Abbildung 3.4).

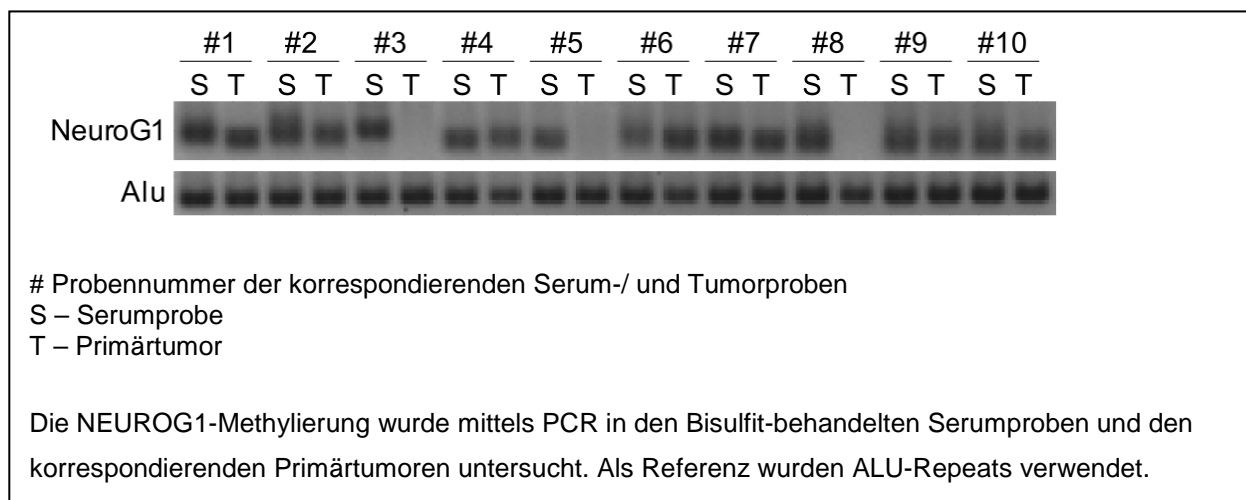


Abbildung 3.4: Ergebnisse des Serum-Tumor-Korrelations-Sets

### 3.4 Test-Set

Das Test-Set umfasste Seren gesunder Kontrollpersonen (n = 45), Seren von Patienten mit kolorektalen Adenomen (n = 40) und mit kolorektalen Karzinomen in den Stadien UICC I (n=27) und UICC II (n = 70) und wurde speziell auf die Detektion von Frühstadien und präkanzerösen Läsionen, als die mit dem besten Resultat der Erkrankung therapierbaren Läsionen, ausgerichtet.

Schwerpunkte der Untersuchung waren:

1. die Bestätigung der Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aus dem Training-Set bzw. Tumorstaging-Set an einer größeren Stichprobe,
2. die Austestung des aus den bisherigen Messungen als am sensitivsten agierenden Markers NEUROG1 in Serumproben von Adenom-Patienten.



Die Ergebnisse für den Nachweis von NEUROG1-Methylierung im Testset sind in *Tabelle 3.5* dargestellt:

*Tabelle 3.5: Auswertung und Charakteristika des Test-Sets für NEUROG1-Methylierung*

Status	Charakteristika		Anzahl Proben	Anzahl der NEUROG1 positiven Proben (Grenzwert > 0,089)	P =
<b>Gesunde</b>	Geschlecht	männlich	21	3	0,326
		weiblich	24	1	
	Alter*	< 60	12	3	0,272
		> = 60	19	1	
<b>Adenome</b>	Geschlecht	männlich	21	1	0,596
		weiblich	19	2	
	Alter	< 60	14	2	0,276
		> = 60	26	1	
<b>Karzinome</b>	Geschlecht	männlich	40	26	0,531
		weiblich	57	33	
	Alter	< 60	31	21	0,503
		> = 60	66	38	
	Lokalisation	proximal	27	13	0,163
		distal	70	46	
	Tumorstadium	UICC I	27	14	0,356
		UICC II	70	45	
	Status	Gesunde	45	4	< 0,0001
		Adenome	40	3	
		Karzinome	97	59	

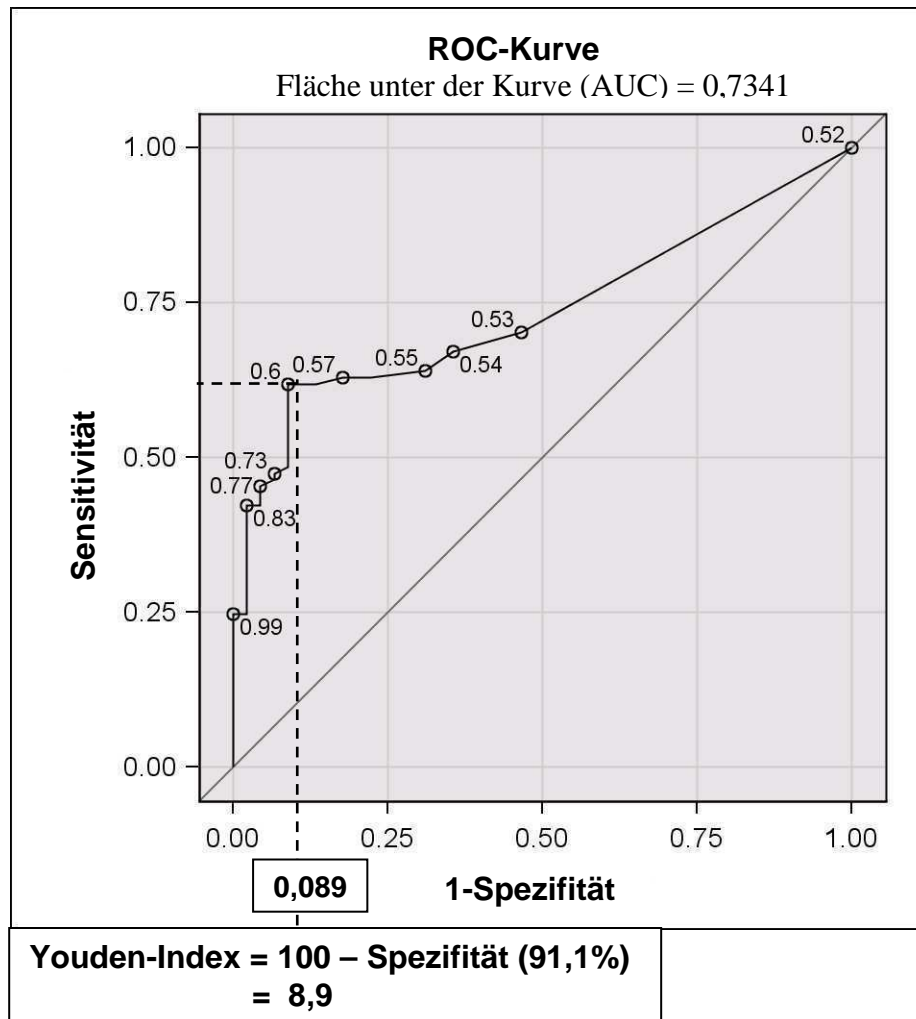
\* Daten von 31 der 45 Proben verfügbar  
P wurde mit der Software Prism berechnet

Um die Korrelation NEUROG1 positiver Serumproben mit verschiedenen Parametern im Test-Set zu überprüfen, wurde der Pearson's Chi-Quadrat-Test verwendet.

Um den optimalen Grenzwert (Cut-Off), d.h. die größtmögliche Trennschärfe zum Erreichen bestmöglicher Sensitivität und Spezifität für NEUROG1 zu bestimmen, wurde eine Receiver-Operating-Charakteristik (ROC) erstellt (SPSS Software, Version 17). Hierfür wurden den 45 gesunden Kontroll-Patienten des Testsets die 97 Karzinomseren im Stadium UICC I und II gegenübergestellt (Abbildung 3.5). Der mittels ROC-Kurve rechnerisch ermittelte Grenzwert von 0,089 (Youden-Index) wurde anschließend genutzt, um die Sensitivität von NEUROG1 für Adenome und kolorektale Karzinome der UICC-Stadien I und II sowie die korrelierende Spezifität zu erfassen.

Wie aus *Abbildung 3.5* ersichtlich, liegt dieser optimale, rechnerisch und graphisch ermittelte Grenzwert für NEUROG-1 bei 0,089 (Youden-Index = 8,9), entsprechend einer Spezifität von 91,1%.

Mit einer Spezifität von rund 91% konnte NEUROG1 also in 7,5% der Fälle Adenome, zu 51,9% Karzinome im Stadium UICC I und zu 71,4% Karzinome in den UICC-II-Stadien detektieren (*Abbildung 3.6*).



*Abbildung 3.5: Receiver-Operating-Charakteristik (ROC) zur Evaluation größtmöglicher Sensitivität und Spezifität für NEUROG1*

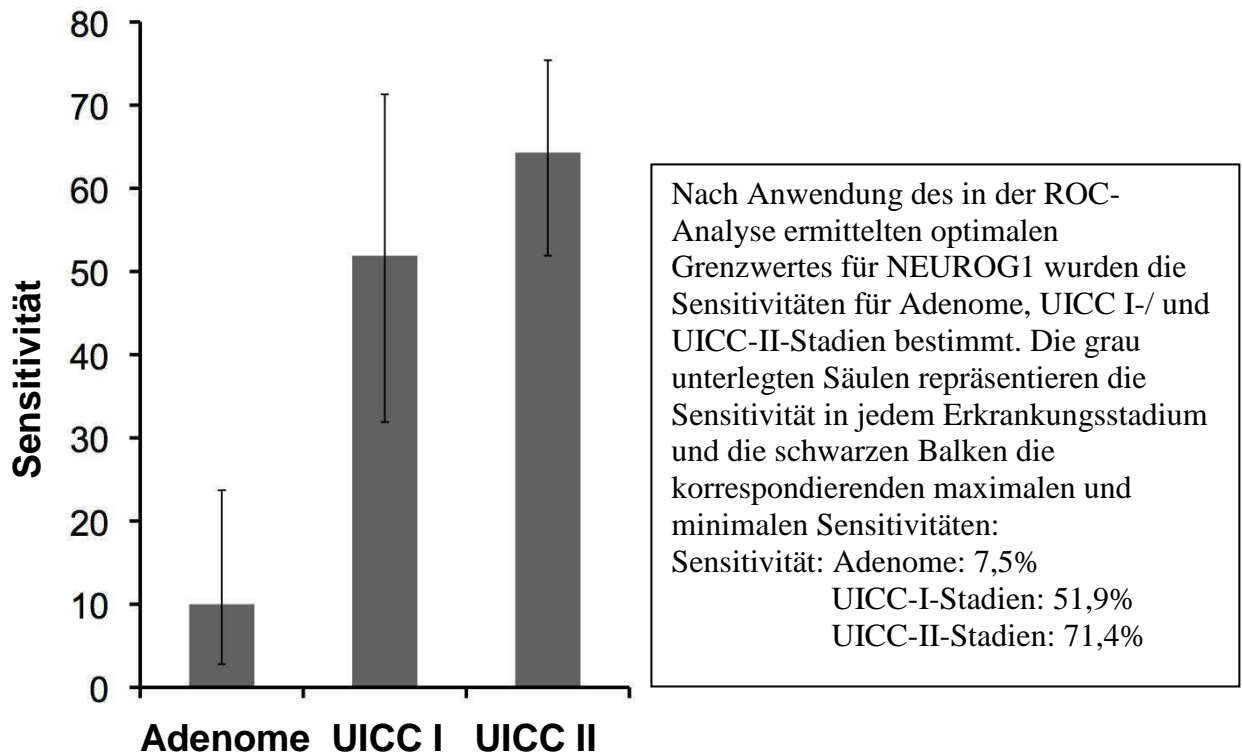


Abbildung 3.6: Sensitivität und Spezifität für NEUROG1 für Adenome, UICC-I- und UICC-II-Karzinomseren im Testset

Die statistische Analyse des Test-Sets (Tabelle 3.5) zeigt, dass die Detektion des Methylierungsmarkers NEUROG1 eindeutig mit kolorektalen Karzinomen, jedoch weder mit gesunden Kontrollseren noch mit Adenomen assoziiert ist (univariate Varianzanalyse ANOVA;  $P=0,0001$ ). Von den Gesunden waren bei einem Grenzwert von 0,089 4 von 45 Seren, entsprechend etwa 9 %, methyliert. Für Adenome entsprach die Sensitivität lediglich 7,5%. Für Karzinome allerdings konnte eine Detektionsrate von mehr als 60% nachgewiesen werden. Alle anderen getesteten Kriterien, wie Alter, Geschlecht, Tumorstadium und Tumorlokalisation ergaben keine signifikante Korrelation mit der Methylierung von NEUROG1 im Serum.

## 4 Diskussion

Kolorektale Karzinome gehören zu den am häufigsten auftretenden und mit einer hohen Mortalitätsrate verbundenen Tumorerkrankungen weltweit. Allein in Deutschland versterben jedes Jahr etwa 27.800 Menschen an dieser Erkrankung bei einer Inzidenz von über 73.000. (RKI, 2008; Zahlen für 2004). Die Früherkennung und Entfernung präkanzeröser Läsionen, wie Adenome oder kolorektale Karzinome in Frühstadien, kann nachweislich sowohl die Inzidenz als auch Mortalität kolorektaler Karzinome verringern (Brenner et al., 2010; Winawer et al., 1993; Citarda et al., 2001). Um dieses Ziel zu verwirklichen, wurden viele Anstrengungen unternommen, diese Malignome in frühen Stadien zu erkennen. Die Koloskopie stellt hierfür den Goldstandard dar und ist die Methode der Wahl im Hinblick auf Diagnose- und Therapiesicherheit (Morikawa et al., 2005; Schönfeld et al., 2005). Trotz aller bisheriger Bemühungen und wachsender Aufklärungsarbeit ist die Akzeptanz für diesen Screeningtest in der Bevölkerung weiterhin gering (Gerst, 2010). Im Jahr 2008 lag die kumulative Teilnahmerate der 55-74-jährigen Männer bei 15,5%, die der Frauen in der gleichen Altersgruppe bei 17,2%. Die geringe Akzeptanz der Vorsorgekoloskopie ist unter anderem der Angst vor einem negativen Untersuchungsbefund, der Prozedur des präinterventionellen Abführens, sowie der Erwartung einer als unangenehm empfundenen bzw. mit Schmerzen verbundenen Untersuchung geschuldet (Hart et al., 1995; Inadomi et al., 2008). Um dem Anteil an Personen, die ein erhöhtes Risiko besitzen, an kolorektalen Karzinomen zu erkranken, dennoch ein alternatives Verfahren anzubieten und damit zumindest einen weiteren Teil der Erkrankungen zu identifizieren, wird seit Jahren an der Verbesserung der Sensitivität anderer Verfahren gearbeitet. So wurde u.a. an der Weiterentwicklung des FOBT in Form des FITs, sowie an Stuhltests zum Nachweis von Tumor-DNA oder der Verbesserung der Nachweismöglichkeit mittels virtueller Koloskopie geforscht. Ein weiteres mögliches und noch sehr junges Alternativverfahren besteht in der Detektion von spezifischen Zellbestandteilen aus dem Kolon und Rektum oder Tumor-DNA in Bluttests. So wurden nach den Vorreitern Carcinoembryonales Antigen (CEA) und des Carboanhydrat-Antigens 19-9 (Ca 19-9), die wie bereits eingangs besprochen, unspezifisch sezerniert werden und daher wenig sensitiv sind, sowie zuverlässiger erst weit fortgeschrittene Tumorstadien erfassen können, auch genetische und epigenetische Veränderungen von Tumor-DNA im Serum nachgewiesen (Hundt et al., 2007; Sidransky et al., 2002; Diehl et al., 2005, Leung et al. 2005).

Zu den in dieser Arbeit untersuchten epigenetischen Veränderungen gehörte die Methylierung von Promotorabschnitten in Genen mit Funktionen in der Tumorsuppression, Transkription, der Differenzierung, DNA-Reparatur oder der Zellzyklusregulation. Durch die Messung in den unterschiedlichen Proben-Sets wurde es möglich, einen erfolgsversprechenden Marker zur Detektion kolorektaler Frühstadien der Tumorgenese zu evaluieren. Nach den von unserer Arbeitsgruppe konzipierten Qualitätskriterien, konnten von den initial in das erste Set (Trainings-Set) eingeschlossenen 16 Markern nur drei den gestellten Anforderungen an die Methylierungsverteilung entsprechen und erreichten eine Sensitivität von  $> 50\%$  bei einer Falsch-Positiv-Rate von  $< 10\%$ . Das waren die Marker HPP1/TPEF, HLTF und NEUROG-1, die nach Messung im Trainings-Set in die nachfolgenden Sets (Tumorstaging-Set und Test-Set) übernommen wurden. Im ersten Set, dem Trainings-Set, erreichten HPP1/TPEF und HLTF ohne errechneten Schwellenwert eine maximale Sensitivität von jeweils  $66,7\%$  bei einer komplementären Spezifität von  $90,6\%$  bzw.  $93,7\%$ . NEUROG-1 erzielte bei einem Grenzwert von  $>0,05$  das beste Detektionsergebnis mit einer Sensitivität von  $93,3\%$  bei einer Spezifität von  $93,3\%$ . Bei einem Schwellenwert von  $>0,005$  wurden von NEUROG-1 sogar  $100\%$  der Karzinomseren erkannt, bei einer Spezifität von allerdings nur noch  $73,3\%$ . Das Tumorstaging-Set, in dem die verbliebenen Marker HLTF, HPP1/TPEF und NEUROG-1 gemessen wurden und das eine Aussage zum Diskriminierungsverhalten dieser Gene in unterschiedlichen Tumorstadien erlauben sollte, brachte die folgenden Messergebnisse: HLTF-Methylierung konnte in 10 der insgesamt 95 Tumorseren nachgewiesen werden und HPP1/TPEF in 19 der 95 Seren, wobei bei beiden Markern eine Zunahme der Sensitivität mit Fortschreiten des Tumorstadiums beobachtet werden konnte. Promotormethylierung von NEUROG-1 trat mit einer Sensitivität von  $66,3\%$  in 63 von 95 Seren auf. Im Unterschied zu HLTF und HPP1/TPEF konnte NEUROG-1 jedoch bereits Frühstadien wie UICC I und II mit einer Treffsicherheit von  $72,7\%$  bzw.  $55,2\%$  detektieren. HLTF oder HPP1/TPEF erfassten, wie vorangegangene Arbeiten u. a. unserer Arbeitsgruppe zeigen, v.a. Spätstadien der Tumorgenese und sind, wie die o.g. Ergebnisse zeigen, keinesfalls für die Früherkennung geeignet. Allerdings ist bei diesen Markern eine verlässliche Aussage zur Krankheitsprognose unter Berücksichtigung von Tumorgröße, Nodalstatus und Fernmetastasierung möglich (Wallner et al., 2006; Herbst et al., 2009).

Im letzten Set, dem Test-Set, wurde NEUROG-1 noch einmal in Seren der UICC-Stadien I und II, sowie in Adenom-Seren gemessen und konnte bei einer maximalen Spezifität von 91,1% (ROC-Analyse) 7,5% der Adenom-Seren, 51,9% der UICC-I und 71,4% der UICC-II-Stadien erfassen. Nach Korrelation der Tumorgröße, -lokalisation, Alter oder Geschlecht der Patienten und der NEUROG-1-Methylierung ergab sich keine Signifikanz

Im Vergleich zu anderen, in der aktuellen Literatur publizierten Bluttests, kann NEUROG-1 ähnlich gute bzw. bessere Detektionsergebnisse v.a. für kolorektale Frühstadien, wie UICC I und II, vorweisen. So konnten 2007 bzw. 2008 in einem epigenetischen Ansatz von *Lofton-Day et al.* für die Kombination dreier neuer Biomarker, TMEFF2, NGFR und SEPT9, eine Sensitivität für kolorektale Karzinome von 70% bei einer Spezifität von etwa vergleichbaren 90% nachweisen. Allerdings war dieses Ergebnis nur unter Berücksichtigung der Tumorstadien-Kombination UICC I, II und III möglich. Für die Frühstadien UICC I und II mit einer guten Langzeitüberlebensrate wurden jedoch im Durchschnitt nur etwa 60% Sensitivität, vergleichbar mit NEUROG-1 (UICC I + II: Sensitivität: 64%), erreicht. Mit einer Sensitivität von 72,7% konnten UICC I-Stadien isoliert mit NEUROG-1 sogar zu einem höheren Prozentsatz als mit dem erwähnten Marker-Panel erfasst werden und ist damit der beste derzeit evaluierte Marker im Serum. Unsere Ergebnisse, sowie die der Arbeitsgruppe um *Lofton-Day* zeigen, dass es sich beim Einsatz von Methylierungsmarkern im Blut um einen neuen ernstzunehmenden Screening-Ansatz handelt, der unter Umständen nach entsprechender Weiterentwicklung auch konkurrenzfähig gegenüber bisher etablierten Verfahren, wie dem FOBT, sein könnte.

Die aktuell als am besten einzustufenden Biomarker auf dem Gebiet der Detektion kolorektaler Vorstufen der Karzinogenese, wie Adenome, sind das bereits oben erwähnte SEPT9 in Kombination mit einem zweiten Marker, ALX-4, für den die Arbeitsgruppe um *Ebert* bzw. *Lofton-Day et al.*, 2008 mit einer maximalen Sensitivität von 56% Adenome jeder Größe nachweisen konnte. Im Vergleich dazu konnten durch NEUROG-1 lediglich 7,5% der eingeschlossenen Adenom-Seren erkannt werden. In einer Folgestudie dieser Arbeitsgruppe 2010 erfasste SEPT9 allein 73% der kolorektalen Karzinome aller Tumorstadien (45% waren UICC III bzw. IV\_Stadien) und ist damit insgesamt schlechter einzustufen als NEUROG-1 (71,4 % für UICC II-Stadien). Die Kombination aus ALX-4 und SEPT9 konnte in 37% der Fälle Adenome und nur in 60% der Fälle kolorektale Karzinome jeden Stadiums im Plasma nachweisen.

Die Detektionsergebnisse des Carcinoembryonalen Antigens (CEA) im Blut variieren sehr stark und wurden mit Sensitivitäten zwischen 43% und 69% stadienunabhängig für alle Tumore angegeben (Bombardieri et al., 1985; Carpelan-Holmstrom et al., 2002). Weiterhin ist dieser Marker erst in fortgeschrittenen Stadien zuverlässig nachweisbar (Dukes A: 0-20%, Dukes B: 20-40%) und damit für das primäre Screening ungeeignet (Araud et al., 1980; Safi et al. 1988; Lau-Werner et al. 2003; Herszényi et al. 2008). Unbestritten ist jedoch seine Bedeutung als prognostischer Parameter v.a. in der Tumornachsorge durch die positive Korrelation mit der rezidivfreien Überlebenszeit (Wanebo et al., 1978; Louhimo et al. 2002; Lau-Werner et al. 2003).

Molekulare Stuhltests zum Nachweis kolorektaler Karzinome, sowie Vorstufen der Karzinogenese sind inzwischen ebenfalls immer häufiger Gegenstand der Forschung und untersuchten in zahlreichen Studien Tumor-DNA im Stuhl auf genetische und epigenetische Veränderungen.

Im Bereich der Mutationen erzielte ein Marker-Panel von *Ahlquist et al., 2000* (K-ras, p53, APC und Bat-26) mit 82% die höchste Sensitivität für Adenome bei einer maximalen Spezifität von 93% und erreichte damit das beste bisher publizierte Ergebnis. Für Karzinome wurden bei *Koshii et al., 2002* mit einem Markerpanel, bestehend aus APC, p53, DCC, hMLH1, D9S162, D9S171, und IFNA mit einer Sensitivität von 96,7% bei 100% Spezifität die besten Detektionraten bisher beschrieben. Allerdings erfolgte auch hier keine separate, stadienabhängige Auswertung der Ergebnisse, sodass die Übertragbarkeit auf kolorektale Frühstadien nicht gegeben ist. Gegenüber der Analyse fäkaler DNA-Marker hat die Untersuchung auf methylierte DNA im Serum den entscheidenden Vorteil, dass das dafür erforderliche Basismedium Blut komplikationslos im Routineverfahren entnommen werden kann. Weiterhin ist dieser Screeningtest weniger kostenintensiv im Vergleich zur Analyse fäkaler DNA bzw. zu endoskopischen Prozeduren (ca. 47.000US-\$ bzw. ca. 10.000US-\$ pro Lebensjahr; Imperiale et al., 2004; Woolf et al., 2004; Sonnenberg et al., 2000) und wir erwarten für dieses Verfahren eine höhere Akzeptanz in der Bevölkerung, da es im allgemeinen als weniger problematisch angesehen werden dürfte, eine Blutprobe als eine Stuhlprobe zu diagnostischen Zwecken, d.h. zum Screening kolorektaler Karzinome in möglichst frühen Stadien, zu erhalten. Abgesehen davon, ist die Aufbereitung der Stuhlproben sehr aufwändig, die zum Entnahmezeitpunkt vorherrschende Darmflora kann die Qualität der Analyse beeinflussen und es ist wurde zudem beschrieben, dass auch andere Tumorentitäten, die sich proximal des Kolons befinden, detektiert werden können (Hundt et al. 2007; Osborn et al., 2005).

Bei den epigenetischen Veränderungen in molekularen Stuhltests erreichte SFRP2 mit einer maximalen Sensitivität für Karzinome von 90% (Spezifität 77%) in einer Arbeit von *Müller et al., 2004* das beste Detektionsergebnis. Für fortgeschrittene Adenome variieren die Nachweisraten zwischen 57% und 82% (Tagore et al., 2003; Dong et al., 2001 ; Ahlquist et al., 2000). Trotz dieser guten Ergebnisse werden molekulare Stuhltests bisher nicht zum Screening empfohlen (DGVS, ACS, USMSTF). Die Gründe dafür sind vielfältig und liegen v.a. in bisher fehlenden Studienergebnissen für asymptomatische Personen, den Kosten und dem hohen Aufbereitungsaufwand (DGVS Leitlinie kolorektales Karzinom, 2008).

Im Vergleich zum klassischen FOBT, der mit sehr variablen und insgesamt mäßigen Sensitivitäten zwischen 24 % und 71% für kolorektale Karzinome und geringen Nachweisraten für Adenome (Allison et al.,1996; Liebermann et al.,1995; DGVS Leitlinie kolorektales Karzinom 2008) ist ein Bluttest, wie NEUROG-1, zumindest bei der Detektion der Karzinome dem FOBT in Sensitivität und Spezifität deutlich überlegen. Allerdings konnte für den FOBT bereits eine durchschnittliche Senkung der karzinombedingten Mortalität von 23% gezeigt werden (Jorgensen et al., 2002), sodass dieses Testverfahren auch weiterhin zum Screening, v.a. für Nichtteilnehmer an der Koloskopie von der DGVS empfohlen wird; nicht zuletzt auch wegen der einfachen Anwendbarkeit für den Patienten. Für die postoperative Nachsorge ist der FOBT jedoch nicht geeignet (DGVS).

Bei allen bisher erörterten Nachweisverfahren (Bluttests, molekulare Stuhltests, FOBT) müsste sich an ein positives Testergebnis die komplette endoskopische Untersuchung des Darms anschließen.

Die Koloskopie selbst weist mit einer Sensitivität von bis zu 95% für kolorektale Karzinome und der höchsten Erkennungsrate für Adenome ein in der Früherkennung erstklassiges Verfahren auf und hat damit die größte Bedeutung in der Primärprävention (DGVS, 2008). Die Koloskopie ermöglicht es, bereits kolorektale Vorstufen mit hoher Treffsicherheit und hoher Spezifität (94%-100%) zu erfassen und damit die Entwicklung von Karzinomen zu verhindern (Rex et al., 1997). Dazu ist in diesem Maße kein anderes Verfahren in der Lage, weshalb die Koloskopie an einer exponierten Position im Hinblick auf das Screening steht. Limitationen der vorliegenden Arbeit, insbesondere der erarbeiteten Messergebnisse und deren Aussagekraft ergeben sich u.a. durch materielle und interventionell auftretende Schwierigkeiten. In besonderem Maße sichtbar wurde dies bei dem Versuch der Detektion von Adenomen in den Patientenserien, die mit einer Sensitivität von 7,5% äußerst gering ausfiel.



Wahrscheinlich ist die Detektion im Serum mit den dazu aktuell vorhandenen Aufbereitungs- und Nachweismethoden einfach noch nicht zufriedenstellend möglich und bedarf der weiteren klinischen Forschung. Auch die Lagerung der Serumproben bei  $-80^{\circ}\text{C}$  und das nachfolgende Auftauen, das bis zur eigentlichen Messung mitunter mehrmals geschieht, könnte durch partielle Zerstörung der DNA zu Verfälschungen der Ergebnisse beitragen, wie bereits u.a. an Spermien- und Blastozysten-DNA gezeigt (Hu et al., 2008; Kader et al., 2009). Mögliche Ursachen für die geringen methylierten DNA-Mengen, die in den getesteten Adenomseren zu finden waren, könnten zum einen die generell verminderten Methylierungsraten in karzinomatösen Vorstufen, sowie weiterhin die geringe aus Adenomen in die Blutbahn freigesetzte DNA-Menge sein. Adenome besitzen vermutlich eine schlechtere Blutversorgung gegenüber den Karzinomen, d.h. absterbende Zellen werden eventuell nicht in die Zirkulation abgegeben. Diese These stützt u.a. eine Arbeit von *Danese et al., 2010*, in der erhöhte Mengen frei zirkulierender DNA sowohl im Serum von Patienten mit Polypen als auch, und zwar mehr als doppelt so viel, mit kolorektalen Karzinomen gemessen wurde. Weitere Arbeiten zu diesem Thema existieren von *Caldwell et al., 2006* und *Li et al., 2009*, die zeigen konnten, dass eine Methylierung von Genen (sFRP1; RGMA) bereits in primären Adenomen nachweisbar und gegenüber kolorektalen Karzinomen deutlich vermindert ist.

Die Detektion von Methylierung im Serum von Adenompatienten wurde 2008 von *Grützmann et al.* am Marker Septin-9 untersucht. Auch in dieser Studie konnte jedoch nur eine Sensitivität für Adenome einer Größe  $> 1$  cm von etwa 20% erreicht werden; ein Ergebnis, das die o.g. eventuell zugrunde liegenden Thesen unterlegt.

Als einen weiteren Punkt, der die Ergebnisqualität dieser Arbeit beeinflusst haben könnte, wäre die bereits oben kurz angesprochene Aufreinigung der DNA in verschiedenen Verarbeitungsschritten und die anschließende Messung per PCR (Aufbewahrung bei  $-80^{\circ}\text{C}$ , DNA-Isolation, Bisulfit-Behandlung, Erhitzung in der PCR bis zu  $94^{\circ}\text{C}$  mit Denaturierung der Polymerase) zu nennen (Jakubke et al., 1982; Mülhardt et al., 2006).

Zur Qualitätssicherung wurden hier zum einen die PCR-Bedingungen für jeden Marker separat ausgetestet und mittels Agarose-Gel optisch überprüft (Konzentrationen von Primer und Sonde,  $\text{MgCl}_2$ -Konzentration, Annealing-Temperatur). Vor allem von der eingesetzten  $\text{MgCl}_2$ -Konzentration ist ein erheblicher Einfluss auf die Aktivität der Polymerase, die Annealing-Temperatur, die während des Amplifikationsprozesses entstehenden Spaltprodukte und damit auf die Sensitivität der PCR bekannt (Dieffenbach et al., 1995; Khosravinia et al., 2007).

Zum anderen wurde ein Inter-Intra-Assay eingeführt, der die Standardabweichung zwischen den Einzelmessungen erfassen und damit eine reliable Quantifizierung ermöglichen sollte. Anhand des Assays wird deutlich, dass die Standardabweichung gerade bei NEUROG-1 häufig  $> 1$  ist und an dieser Stelle ebenfalls deutliches Fehlerpotential enthalten ist. Ähnlich fehlerbehaftet dürfte die Konstanz der Reaktionsbedingungen während der 3 Messreihen des Testtages sein, die sich an der relativ großen Abweichung der Mittelwerte der Fluoreszenzsignale zeigt, und die trotz größter Sorgfalt nicht gänzlich verhindert werden konnte.

Auch die Tatsache, dass pro Patient nur eine einzige Blutprobe zur Methylierungsanalyse auf Karzinome bzw. kolorektale Vorstufen verwendet wurde, birgt eine potentielle Fehlerquelle. Angenommen, die Freisetzung von Tumor-DNA ist als ein inkonstanter Prozess und der Primärtumor als ein heterogenes Gewebe zu betrachten, so unterliegt der Nachweis in dieser einzelnen Serumprobe großen Schwankungen und folglich einer hohen Falsch-Negativ-Rate. Durch das invasive und infiltrierende Wachstum mit regressiven Veränderungen, wie Verkalkungen oder Nekrosen, kann sicherlich nicht in jedem Anteil des Tumors genetisch identisches Zellmaterial vorausgesetzt werden. Bereits in der Vergangenheit wurde dieser Aspekt von *Wharton et al., 1999* untersucht und auf Basis der gewonnenen Erkenntnisse zur Analyse ein Mix mehrerer Blutproben unterschiedlicher Entnahmezeitpunkte empfohlen, um die Sensitivität zu erhöhen. In der genannten Arbeit gelang durch die Kombination dreier Blutproben ein Anstieg von 34% bzw. 48% für CK20 bzw. CEA auf insgesamt 74% (CK20+CEA) gegenüber der Einzelmessung eines der beiden Marker.

Seit langem bekannt ist ebenfalls der negative Einfluss von EDTA-, Citrat- bzw. Heparin-Zusätze auf die Qualität der PCR (Beutler et al., 1990; Holodniy et al., 1991; Ding et al., 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde den Patienten präoperativ routinemäßig EDTA-Blut entnommen. Vorstellbar ist aus unserer Sicht eine mögliche Verfälschung der Messergebnisse durch die erfolgte Ungerinnbarmachung des Plasmas durch Natriumcitrat-/ oder EDTA-Zusätze vor der weiteren Verarbeitung und Kryokonservierung. So könnte EDTA als Chelatbildner durch Komplexbildung mit Ionen wie Magnesium oder Eisen Einfluss auf die Aufbereitung der Serumproben mittels Bisulfitbehandlung, an der eine Reihe von Ionen-Austauschprozessen beteiligt sind, haben oder auch die anschließende PCR-Reaktion durch Beeinflussung der Enzymaktivität stören (Pschyrembel, 260. Auflage; Khosravinia et al., 2007). Auch eine beschleunigte Fragmentierung der DNA durch diese Substanzen wäre denkbar.

Trotzdem verwendeten wir als unser Basismedium Serum, da die Analyse der Genmethylierung in Plasmaproben im Vergleich zu Serumproben stellenweise eine verminderte Sensitivität für die darin analysierten Gene offenbarte, (Lofton-Day et al., 2008). Weiterhin wurde von *Umetani et al., 2006a* gezeigt, dass sich in Serumproben im Vergleich zum Plasma rund sechsmal mehr frei zirkulierende DNA befindet.

An dieser Stelle muss außerdem die Anzahl der untersuchten Proben in den einzelnen Sets kritisch betrachtet werden. Die gewonnenen Ergebnisse aus den eher niedrigen Fallzahlen gestatten erst bei erneuter Messung in einem größeren Patientenkollektiv eine reale Übertragbarkeit auf Patienten mit kolorektalen Karzinomen und damit einen Einsatz von NEUROG-1 in der täglichen Routine. Verbesserte DNA-Aufreinigungskits, die die ohnehin geringen im Blut enthaltenen Mengen an Tumor-DNA noch mehr quantifizieren, wären dafür genauso erforderlich, wie die Fortsetzung der Suche nach einem geeigneten Grenzwert, der eine optimale Trennschärfe zwischen gesunden Individuen und Kandidaten mit kolorektalen Vorstufen bzw. Karzinomen in Frühstadien (UICC I und II) erlaubt. Eventuell ließe sich auch durch Kombination mit anderen Methylierungsmarkern, im Sinne eines Markerpanels, die Sensitivität und Spezifität noch steigern. Als mögliche Kandidaten seien hier ALX-4 und Septin-9 genannt.

Uns gelang es in der vorliegenden Arbeit nicht, mit Hilfe des bereits von in der Literatur beschriebenen CIMP-Panels, bestehend aus den Genen CACNA1G, IGF-2, NEUROG-1, RUNX-3 und SOCS-1 die Sensitivität zu erhöhen (Weisenberger et al. 2006), da NEUROG-1 ohne den mittels ROC-Kurve errechneten Grenzwert bereits zu 100% sensitiv Karzinome anzeigte (Ergebnisse Trainings-Set). Bei Anwendung des Grenzwertes von 0,089 konnte eine Sensitivität für den Einzelmarker NEUROG-1 von 93,3 % bei einer Falsch-Positiv-Rate von 6,7% ermittelt werden. Eine weitere Zunahme der Sensitivität konnte durch Kombination des CIMP-Panels an dieser Stelle ebenfalls nicht erreicht werden.

Weitere Untersuchungen sollten auch mit NEUROG-1 und einem Mix an Patientenproben verschiedener Entnahmezeitpunkte erfolgen, die eine weitere Sensitivitätssteigerung durch Erhöhung der „Trefferquote“ von Tumor-DNA im Serum in Aussicht stellen könnten.

Mit NEUROG-1 konnten wir einen Serummarker identifizieren, der v.a. zwischen gesunden Individuen und Patienten in Frühstadien der kolorektalen Karzinogenese zu diskriminieren vermag und mit einer Sensitivität von 51,9% (UICC I) bzw. 71,4% (UICC II) und 93,3 bis 100% (UICC IV) einer der besten aktuell evaluierten Serummarker auf diesem Gebiet ist.

Gesunde Personen und Patienten mit präkanzerösen Läsionen, wie Adenomen, wiesen nur geringe Mengen methylierter NEUROG1-DNA in ihren Seren auf, weshalb NEUROG-1 nicht zur Detektion von Adenomen im Serum herangezogen werden kann. Bereits beim Übergang zum frühen Karzinom konnte jedoch ein deutlicher Anstieg dieser methylierten DNA verzeichnet werden. Diese Veränderung im Methylierungsstatus von NEUROG1 könnte künftig dazu genutzt werden, Patienten mit asymptomatischen karzinomatösen Läsionen zu identifizieren, die ansonsten, v. a. bei Personen mit gegenüber einer Vorsorgekoloskopie ablehnenden Haltung, unentdeckt bleiben würden. Natürlich wäre bei positivem Befund, d.h. dem Nachweis methylierter NEUROG-1-DNA, wie bei allen anderen alternativen Nachweismethoden, trotzdem die logische Konsequenz die Durchführung einer kompletten Koloskopie zur Befundsicherung.

Die Bedeutung von NEUROG-1 als diagnostischer Biomarker wird auch durch die Beobachtung weiter untermauert, dass die Promotormethylierung im Serum gut mit der Methylierung in den Primärtumoren korrelierte. So konnte in sieben von zehn Seren mit positivem Methylierungsstatus von NEUROG1 auch Methylierung im korrespondierenden Primärtumor gefunden werden. Eine denkbare Erklärung für das Unvermögen, in methylierten Serumproben NEUROG1-Methylierung genauso wie im Primärtumor nachweisen zu können, könnte wiederum die Heterogenität des Tumorgewebes sein. Insgesamt lassen die in dieser Arbeit veröffentlichten Ergebnisse den Schluss zu, dass, unter Berücksichtigung und Korrektur der o.g. Limitationen des Markers, mit dem Nachweis von NEUROG1-Methylierung im Serum die Detektion kolorektaler Karzinome vereinfacht und prospektiv eine gezielte Therapie von karzinomatösen Frühstadien ermöglicht wird. Und man könnte denjenigen Menschen in Zukunft einen gut zu tolerierenden Screeningtest anbieten, die sich trotz des geringen interventionellen Risikos einer endoskopischer Untersuchung primär keiner Koloskopie unterziehen würden. Und das werden nach aktuellen Hochrechnungen des Zentralinstitutes für die kassenärztliche Versorgung in der Bundesrepublik Deutschland (ZI) in Zukunft immer noch ca. 70% sein. Abschließend sind zukünftig sicher viele weiterführende Untersuchungen erforderlich, um auch präkanzeröse Läsionen zuverlässig im Blut detektieren zu können. Vielleicht ist ein spezifischer und sensitiver Nachweis dieser Läsionen darüber hinaus aufgrund der geringen freigesetzten DNA-Mengen ins Blut bzw. dem zu erwartenden niedrigeren Anteil an epigenetischen Veränderungen, wie der Promotor-Methylierung, in diesem Material auch generell nicht möglich.

Für die Erfassung karzinomatöser Frühstadien kolorektaler Karzinome, den UICC-Stadien I und II, ist mit dieser Arbeit ungeachtet dessen ein weiterer Schritt zur Verbesserung der Nachweisbarkeit dieser Tumorentität im Blut gelungen.

## 5 Zusammenfassung

Kolorektale Karzinome gehören zu den am häufigsten auftretenden Malignomen in der westlichen Welt. Jährlich versterben etwa 12,4% der an Darmkrebs erkrankten Frauen und 14,3% der an Darmkrebs erkrankten Männer in Deutschland hieran. Trotzdem ist der Anteil der Menschen, die sich einer Koloskopie, dem sensitivsten Nachweisverfahren für Kolonkarzinome und Kolonadenome, unterziehen niedrig. Der Haemocultttest ist wenig sensitiv. Aus diesen Gründen ist der Nachweis von Malignomen und prämaligen Läsionen des Kolons und Rektums aus Serum oder Plasma erstrebenswert. Neben dem klassischen Tumormarker CEA, der nur mit geringer Sensitivität für Adenome und frühe Karzinome überwiegend fortgeschrittene kolorektale Karzinome nachweisen kann, stellt der Nachweis frei zirkulierender, methylierter DNA einen vielversprechenden neuen Marker zum Nachweis von Tumor-spezifischer DNA im Blut von Tumorpatienten dar.

Mit der vorliegenden Arbeit sollten Marker identifiziert werden, die speziell zum Nachweis prämaligener und früher maligner karzinomatöser Läsionen in Kolon und Rektum im Blut geeignet sind. Hierzu wurden 16 potentielle DNA-Methylierungsmarker in einem Trainings-Set aus Proben koloskopierter Gesunder und manifester kolorektaler Karzinome untersucht. Von diesen 16 Kandidatengen wiesen nach Messung im Trainings-Set nur drei Marker eine Detektionsrate von mindestens 50% für Karzinome bei einer Falsch-Positiv-Rate von  $< 10\%$  auf. Das waren: HLTF, HPP1/TPEF und NEUROG-1. Bei der anschließenden Messung mit angepassten Schwellenwerten im Tumorstaging-Set, das Proben von Tumoren der Stadien I-IV enthielt, konnte nur NEUROG-1 eine hohe Sensitivität für die Frühstadien UICC I bzw. UICC II erreichen. Für die anschließende Messung im Test-Set, bestehend aus Serumproben von Adenomen  $> 1$  cm und Karzinom-Frühstadien (UICC I und II), wurde daher nur der Marker NEUROG-1 verwendet. In diesem Probenkollektiv erreichte NEUROG-1 eine Sensitivität von knapp 52% für UICC I-Stadien und 71% für UICC II-Stadien bei einer Spezifität von 91%. Allerdings gelang es nur 7,5% der Adenome im Serum zu detektieren. NEUROG-1 ist somit ein neuer und vielversprechender Serum-Marker zur Diagnose und potentiell auch Früherkennung karzinomatöser Frühstadien des Kolons. Für den Nachweis von Adenomen eignet sich NEUROG-1 aufgrund geringer Detektionsraten auch im Vergleich zu anderen Markern und Tests nicht. Für Personen, die keine Koloskopie zur Vorsorge wünschen, könnte der Nachweis von frei zirkulierender, methylierter DNA eine sinnvolle Alternative zum Haemocultttest darstellen.

## 6 Anhang

*Tabelle 4.1: Ergebnisse der Serummarker-Messung im Trainings-Set (Seren von 32 gesunden Kontrollpersonen (G) und von 15 Patienten mit kolorektalen Karzinomen im UICC-Stadium IV (K))*

Referenz-Gen																
Nr.	Status	APC	CACNA1G	CDH-1	IGF-2	HLTF	hMLH1	HPP1	MDR-1	MGMT	NEUROG1	p16	RUNX-3	SOCS-1	TIMP-3	ALU
1	G	1,03	n.d.	---	n.d.	---	---	---	---	---	n.d.	---	n.d.	n.d.	---	131,94
2	G	---	n.d.	---	n.d.	---	---	---	---	---	n.d.	---	n.d.	n.d.	---	3262,22
3	G	---	n.d.	---	n.d.	---	---	1,16	---	---	n.d.	---	n.d.	n.d.	---	424,1
4	G	0,69	n.d.	---	n.d.	---	---	---	---	---	n.d.	---	n.d.	n.d.	15,4	1642,03
5	G	---	n.d.	---	n.d.	---	---	---	---	---	n.d.	---	n.d.	n.d.	---	555,26
6	G	---	n.d.	---	n.d.	---	---	---	---	---	n.d.	---	n.d.	n.d.	---	964,1
7	G	---	n.d.	---	n.d.	---	---	---	---	---	n.d.	---	n.d.	n.d.	---	643,55
8	G	---	n.d.	---	n.d.	---	---	---	---	---	n.d.	---	n.d.	n.d.	---	153,9
9	G	2	n.d.	---	n.d.	---	7,5	---	---	---	n.d.	---	n.d.	n.d.	---	3829,75
10	G	---	n.d.	---	n.d.	---	---	3,71	---	---	n.d.	---	n.d.	n.d.	---	544,68
11	G	64,3	n.d.	---	n.d.	---	---	2,74	---	---	n.d.	---	n.d.	n.d.	---	921,75
12	G	---	n.d.	0,89	n.d.	---	0,09	---	---	---	n.d.	---	n.d.	n.d.	0,4	17185,5
13	G	---	n.d.	---	n.d.	---	---	---	---	---	n.d.	---	n.d.	n.d.	---	424,1
14	G	1,65	n.d.	---	n.d.	---	---	---	---	---	n.d.	---	n.d.	n.d.	---	765,27
15	G	---	n.d.	---	n.d.	---	---	---	---	---	n.d.	---	n.d.	n.d.	---	176,1
16	G	---	n.d.	---	n.d.	14,5	---	---	---	---	n.d.	---	n.d.	n.d.	---	3535,97
17	G	---	n.d.	---	n.d.	---	---	---	---	---	n.d.	---	n.d.	n.d.	---	5,04
18	G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0,12	---	---	---	---	118,3
19	G	---	---	---	0,66	---	0,19	---	---	---	3,6	---	---	3,79	---	301,86
20	G	---	---	---	---	---	3,63	---	---	---	0,53	---	---	---	---	202,8
21	G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	4,5	---	---	---	---	288,6
22	G	0,01	---	---	1,06	1,1	2,07	---	0,864	---	---	---	---	---	---	2761,02
23	G	---	---	---	1,22	---	4,05	---	---	---	0,45	---	---	1,14	---	1540
24	G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0,12	---	0,37	---	---	31,96
25	G	---	---	---	1,93	---	---	---	---	---	0,24	---	---	---	---	50,72
26	G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	11,98
27	G	---	---	---	2,64	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	202,8
28	G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0,15	---	---	---	---	58,79
29	G	---	7,8	---	1,45	---	---	---	---	---	2,22	---	---	---	---	239,6
30	G	---	2,92	---	0,86	---	---	---	---	---	0,75	---	1,27	---	---	151,94
31	G	---	0,81	---	6,19	---	---	---	---	---	0,22	---	---	---	---	298
32	G	---	---	---	0,94	---	---	---	---	---	4,24	---	---	---	---	31,76
33	K	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1158	---	---	---	---	39,75
34	K	---	---	---	---	1,52	16,41	145	---	3,14	5545,1	---	---	---	---	268,93
35	K	0,68	91,86	---	170	187	---	326	---	---	725,62	---	6,72	---	---	1481,83
36	K	---	---	---	---	---	---	---	---	---	981,48	---	---	---	---	84,75
37	K	---	---	---	---	2,13	---	---	---	0,22	670,44	---	---	---	---	119,83
38	K	---	---	---	4,5	10,9	17,74	13,4	0,51	0,54	405,27	---	---	4,15	3,44	530,9
39	K	0,93	---	---	1,01	---	---	---	---	---	791,02	---	---	---	---	69,5
40	K	0,37	29,91	---	4,11	---	---	---	---	---	5094	---	2,54	---	---	741,11
41	K	1,13	---	---	---	11,7	---	90,6	---	8,01	1235,43	---	---	0,02	---	2925,14
42	K	---	---	---	0,91	0,13	1,8	2,9	---	---	14,67	---	---	---	---	255,5
43	K	17,9	---	---	0,69	9,33	---	40	---	---	54,11	---	2,23	---	---	283,1
44	K	---	---	---	1,12	18,2	2,86	37,3	---	---	468	---	3,99	2,94	0,67	122,95
45	K	21,9	---	---	---	9,81	---	8,7	---	1,35	506,48	---	---	---	---	176,1
46	K	48,5	25,36	---	12,9	1,97	---	7,93	---	---	32,1	---	2,51	4,53	0,008	826,51
47	K	0,3	---	---	---	---	2,01	2,3	---	---	1047,1	---	1,05	0,02	---	1001,93

n.d. – nicht gemessen  
G – Gesunde Kontrollpersonen  
K – Karzinom-Seren im Stadium UICC IV

Tabelle 4.2: Normalisierung der DNA-Molekül-Mengen mittels Referenz-Gen ALU

Referenz-Gen															
Nr	Status	APC	CACNA1G	CDH-1	IGF-2	HLTF	hMLH1	HPP1	MDR-1	MGMT	NEUROG1	p16	RUNX-3	SOCS-1	TIMP-3
1	G	0,008	n.d.	0,000	n.d.	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	n.d.	0,000	n.d.	n.d.	0,000
2	G	0,000	n.d.	0,000	n.d.	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	n.d.	0,000	n.d.	n.d.	0,000
3	G	0,000	n.d.	0,000	n.d.	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	n.d.	0,000	n.d.	n.d.	0,000
4	G	0,000	n.d.	0,000	n.d.	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	n.d.	0,000	n.d.	n.d.	0,009
5	G	0,000	n.d.	0,000	n.d.	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	n.d.	0,000	n.d.	n.d.	0,000
6	G	0,000	n.d.	0,000	n.d.	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	n.d.	0,000	n.d.	n.d.	0,000
7	G	0,000	n.d.	0,000	n.d.	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	n.d.	0,000	n.d.	n.d.	0,000
8	G	0,000	n.d.	0,000	n.d.	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	n.d.	0,000	n.d.	n.d.	0,000
9	G	0,001	n.d.	0,000	n.d.	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	n.d.	0,000	n.d.	n.d.	0,000
10	G	0,000	n.d.	0,000	n.d.	0,000	0,000	0,007	0,000	0,000	n.d.	0,000	n.d.	n.d.	0,000
11	G	0,070	n.d.	0,000	n.d.	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	n.d.	0,000	n.d.	n.d.	0,000
12	G	0,000	n.d.	0,000	n.d.	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	n.d.	0,000	n.d.	n.d.	0,000
13	G	0,000	n.d.	0,000	n.d.	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	n.d.	0,000	n.d.	n.d.	0,000
14	G	0,002	n.d.	0,000	n.d.	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	n.d.	0,000	n.d.	n.d.	0,000
15	G	0,000	n.d.	0,000	n.d.	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	n.d.	0,000	n.d.	n.d.	0,000
16	G	0,000	n.d.	0,000	n.d.	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	n.d.	0,000	n.d.	n.d.	0,000
17	G	0,000	n.d.	0,000	n.d.	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	n.d.	0,000	n.d.	n.d.	0,000
18	G	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000
19	G	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,012	0,000	0,000	0,013	0,000
20	G	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,018	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000
21	G	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,016	0,000	0,000	0,000	0,000
22	G	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
23	G	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000
24	G	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,012	0,000	0,000
25	G	0,000	0,000	0,000	0,038	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000
26	G	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
27	G	0,000	0,000	0,000	0,013	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
28	G	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000
29	G	0,000	0,033	0,000	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000
30	G	0,000	0,019	0,000	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,005	0,000	0,008	0,000	0,000
31	G	0,000	0,003	0,000	0,021	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000
32	G	0,000	0,000	0,000	0,030	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,134	0,000	0,000	0,000	0,000
33	K	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	29,132	0,000	0,000	0,000	0,000
34	K	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006	0,061	0,541	0,000	0,012	20,619	0,000	0,000	0,000	0,000
35	K	0,000	0,062	0,000	0,115	0,126	0,000	0,220	0,000	0,000	0,490	0,000	0,005	0,000	0,000
36	K	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	11,581	0,000	0,000	0,000	0,000
37	K	0,000	0,000	0,000	0,000	0,018	0,000	0,000	0,000	0,002	5,595	0,000	0,000	0,000	0,000
38	K	0,000	0,000	0,000	0,008	0,021	0,033	0,025	0,001	0,001	0,763	0,000	0,000	0,008	0,006
39	K	0,013	0,000	0,000	0,015	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	11,382	0,000	0,000	0,000	0,000
40	K	0,000	0,040	0,000	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	6,873	0,000	0,003	0,000	0,000
41	K	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,031	0,000	0,003	0,422	0,000	0,000	0,000	0,000
42	K	0,000	0,000	0,000	0,004	0,001	0,007	0,011	0,000	0,000	0,057	0,000	0,000	0,000	0,000
43	K	0,063	0,000	0,000	0,002	0,033	0,000	0,141	0,000	0,000	0,191	0,000	0,008	0,000	0,000
44	K	0,000	0,000	0,000	0,009	0,148	0,023	0,303	0,000	0,000	3,806	0,000	0,032	0,024	0,005
45	K	0,124	0,000	0,000	0,000	0,056	0,000	0,049	0,000	0,008	2,876	0,000	0,000	0,000	0,000
46	K	0,059	0,031	0,000	0,016	0,002	0,000	0,010	0,000	0,000	0,040	0,000	0,003	0,005	0,000
47	K	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	0,000	0,000	1,045	0,000	0,001	0,000	0,000

G – Gesunde Kontrollpersonen  
K – Karzinom-Seren im Stadium UICC IV  
Die in der Tabelle enthaltenen Einzeldaten wurden aus dem Quotienten der mittels Standardkurve errechneten DNA-Menge des Einzel-Markers und der DNA-Menge des Referenz-Gens ALU bestimmt.



## 7 Quellenverzeichnis

Jemal A. et al. Cancer Statistics 2004. *CA Cancer J Clin* 2004; 54; 8-29.

Krebs in Deutschland-Häufigkeiten und Trends. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch Institut. 6. Ausgabe, Saarbrücken 2008.  
<http://www.rki.de/krebs>

Hisamuddin I. et al. Genetics of Colorectal Cancer. *MedGenMed*. 2004; 6.

Fearon E.R., Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61; 759-767.

Middledorp A. et al. High frequency of copy-neutral LOH in MUTYH-associated polyposis carcinomas. *J Pathol* 2008; 216; 25-31.

Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, Walter de Gruyter-Verlag 2004; 260. Auflage.

Knudson A.G. Antioncogenes and human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90; 10914-10921.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez> (Geninformationen)

Vogelstein B. et al. Allelotype of colorectal carcinomas. *Science* 1989; 244; 207-211.

Fearon E.R. et al. Molecular genetics of colorectal cancer. *Ann NY Acad Sci* 1995; 768; 101-110.

Esteller M. et al. DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. *Hum Mol Genet* 2001; 10; 3001-3007.

Lander E.S. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409; 860-921.

Kim H.C. et al. CpG island methylation as an early event during adenoma progression in carcinogenesis of sporadic colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20; 1920-1926.

Bird A. et al. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002; 16; 6-21.

Russo V.E.A. et al. Epigenetic mechanisms of gene regulation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* 1996.

Rhee I. et al. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature* 2002; 416; 552-556.

Rashid A. et al. CpG Island Methylation in Gastroenterologic Neoplasia: A Maturing Field. *Gastroenterology* 2004; 127; 1578-1588.

Ehrlich M. Amounts and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues or cells. *Nucleic Acids Res.* 1982; 10; 2709-2721.

Boyes J., Bird A. Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: Evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein. *EMBO J* 1992;11; 327-333.

Herman J.G. et al. Gene Silencing in Cancer in Association with Promotor Hypermethylation. *N Engl J Med* 2003; 349; 2042-2054.

Kondo Y., Issa J.P. Epigenetic changes in colorectal cancer. *Cancer Met Rev* 2004; 23; 29-39.

Nuovo G.J. et al. In situ detection of the hypermethylation-induced inactivation of the p16 gene as an early event in oncogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96; 12754-12759.

<http://www.kbv.de> – Kassenärztliche Bundesvereinigung

McLoughlin R.M., O'Morain C.A.: Colorectal cancer screening. *World J Gastroenterol.* 2006; 12; 6747-6750.

Robinson M.H. et al. The risks of screening: data from the Nottingham randomised controlled trial of faecal occult blood screening for colorectal cancer. *Gut* 1999; 45; 588-592.

Winawer S.J. et al. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med* 1993; 329; 1977-1981.

Citarda F. et al. Efficacy in standard clinical practice of colonoscopic polypectomy in reducing colorectal cancer incidence. *Gut* 2001; 48; 812-815.

Allison J.E. et al. A comparison of fecal occult-blood tests for colorectal-cancer screening. *N Engl J Med.* 1996; 334; 155-159.

Simon J.B. et al. Occult blood screening for colorectal carcinoma: a critical review. *Gastroenterology* 1985; 88; 820-837.

Hardcastle J.D. et al. Randomised controlled trial of faecal-occult-blood screening for colorectal cancer. *Lancet* 1996; 348; 1472-1477.

Kronborg O. et al. Randomised study of screening for colorectal cancer with fecal-occult-blood test. *Lancet* 1996; 348; 1467-1471.

Wilson J.M.G. et al. Principles and Practise of Screening for Disease. Geneva Switzerland. World Health Organization 1968.

Caligiore P. et al. Peroxidase levels in food: relevance to colorectal cancer screening. *Am J Clin Nutr* 1982; 35; 1487-1489.

Allison J.E. et al. Screening for colorectal neoplasms with new fecal occult blood tests: update on performance characteristics. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99; 1462-1470.

- Eigenbrodt E. et al. Quantification of tumor type M2 pyruvate kinase (Tu M2-PK) in human carcinomas. *Anticancer Res.* 1997; 17; 3153-3156.
- Ewald N. et al. Pyruvate kinase M2 (tumor M2-PK) as a screening tool for colorectal cancer. A review of current published data. *Z Gastroenterol* 2005; 43; 1313-1317.
- Hardt P.D. et al. Faecal tumour M2 pyruvate kinase: a new sensitive screening tool for colorectal cancer. *Br J Cancer* 2004; 91; 980-984.
- Haug U. et al. Sensitivity and specificity of faecal tumour M2 pyruvate kinase for detection of colorectal adenomas in a large screening study. *Br J Cancer* 2008; 99; 133-135.
- Shastri Y.M. et al. Comparison of an established simple office-based immunological FOBT with fecal tumor pyruvate kinase type M2 (M2-PK) for colorectal cancer screening: prospective multicenter study. *Am J Gastroenterol* 2008; 103; 1496-1504.
- Tonus C. et al. Colorectal cancer screening by non-invasive metabolic biomarker fecal tumor M2-PK. *World J Gastroenterol* 2006; 12; 7007-7011.
- Lenhard K. et al. Analysis of promoter methylation in stool: a novel method for the detection of colorectal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2005; 3; 142-149.
- Levin B. et al. Screening and Surveillance for the Early Detection of Colorectal Cancer and Adenomatous Polyps, 2008: A Joint Guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *CA Cancer J Clin* 2008; 58; 130-160.
- Cotton P.B. et al. Computed tomographic colonography (virtual colonoscopy): a multicentre comparison with standard colonoscopy for detection of colorectal neoplasia. *JAMA* 2004; 291; 1713-1719.
- Rockey D.C. et al. Colon imaging: computed tomographic colonography. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3; 37-41.
- Pickhardt P.J. et al. Computed tomographic virtual colonoscopy to screen for colorectal neoplasia in asymptomatic adults. *N Engl J Med* 2003; 349; 2191-2200.
- Halligan S. et al. CT colonography in the detection of colorectal polyps and cancer: systematic review, meta-analysis, and proposed minimum data set for study level reporting. *Radiology* 2005; 237; 893-904.
- Farrar W.D. et al. Colorectal cancers found after a complete colonoscopy. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4; 1259-1264.
- Graser A. et al. Comparison of CT Colonography, Colonoscopy, Sigmoidoscopy, and Fecal Occult Blood Tests for the Detection of Advanced Adenoma in an Average Risk Population. *Gut* 2008.
- White T.J. et al. Virtual Colonoscopy versus Conventional colonoscopy in patients at high risk of colorectal cancer- a prospective trial of 150 patients. *Colorectal Dis.* 2008.

Deutsche Gesellschaft für Verdauungs-/ und Stoffwechselerkrankungen (DGVS), S3-Leitlinie zum kolorektalen Karzinom 2004 / 2008.

Kerker J. et al. MR-colonography in hospitalized patients: feasibility and sensitivity. *Z Gastroenterol.* 2008; 46; 339-343.

Kim D.H. et al. CT colonography versus colonoscopy for the detection of advanced neoplasia. *N Engl J Med.* 2007; 357; 1403-1412.

Ahlquist D.A. et al. Colorectal cancer screening by detection of altered human DNA in stool: feasibility of a multitarget assay panel. *Gastroenterology* 2000; 119; 1219-1227.

Tagore K.S. et al. Sensitivity and specificity of a stool DNA multitarget assay panel for the detection of advanced colorectal neoplasia. *Clin Colorectal Cancer* 2003; 3; 47-53.

Syngal S. et al. Detection of stool DNA mutations before and after treatment of colorectal neoplasia. *Cancer* 2006; 106; 277-283.

Müller H.M. et al. Methylation changes in faecal DNA: a marker for colorectal cancer screening? *Lancet* 2004; 363; 1283-1285.

Lenhard K. et al. Analysis of promoter methylation in stool: a novel method for the detection of colorectal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2005; 3; 142-149.

Osborn N.K. et al. Stool Screening for colorectal cancer: molecular approaches. *Gastroenterology* 2005; 128; 192-206.

Chun F.K. et al. Circulating tumour-associated plasma DNA represents an independent and informative predictor of prostate cancer. *BJU Int.* 2006; 98; 544-548.

Chang H.W. et al. Assessment of plasma DNA levels, allelic imbalance, and CA 125 as diagnostic tests for cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2002; 94; 1697-1703.

Gautschi O. et al. Circulating deoxyribonucleic Acid as prognostic marker in non-small-cell lung cancer patients undergoing chemotherapy. *J Clin Oncol.* 2004; 22; 4157-4164.

Wu T.L. et al. Cell-free DNA: measurement in various carcinomas and establishment of normal reference range. *Clin Chim Acta* 2002; 321; 77-87.

Diehl F. et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *PNAS* 2005; 102; 16368-16373.

Umetani N. et al. Increased integrity of free circulating DNA in sera of patients with colorectal or periampullary cancer: direct quantitative PCR for ALU repeats. *Clin Chem.* 2006; 52; 1062-1069.

Sidransky D. et al. Emerging molecular markers of cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2; 210-219.

Goessl C. et al. Diagnostic potential of circulating nucleic acids for oncology. *Expert Rev Mol Diagn.* 2002; 3; 431-442.

Müller H.M. et al. Methylated DNA as a possible screening marker for neoplastic disease in several body fluids. *Expert Mol Rev Diagn.* 2003; 3; 443-458.

Burchill S.A. et al. Molecular detection of low-level disease in patients with cancer. *J Pathol* 2000; 190; 6-14.

Leung W.K. et al. Quantitative Detection of Promotor Hypermethylation in Multiple Genes in the Serum of Patients with Colorectal Cancer. *Am J Gastroenterol* 2005; 100; 2274-2279.

Ebert M.P. et al. Aristaless-like homeobox-4 gene methylation is a potential marker for colorectal adenocarcinomas. *Gastroenterology* 2006; 131; 1418-1430.

Wallner M. et al. Methylation of Serum DNA Is an Independent Prognostic Marker in Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12; 7347-7352.

Han M. et al. Novel blood-based, five-gene biomarker set for the detection of colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14; 455-460.

Weisenberger D.J. et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet* 2006; 38; 787-793.

Toyota M. et al. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96; 8681-8686.

Rashid A. et al. CpG island methylation in colorectal adenomas. *Am J Pathol* 2001; 159; 1129-1135.

Rijnsoever van M. et al. Characterisation of colorectal cancers showing hypermethylation at multiple CpG islands. *Gut* 2002; 51; 797-802.

Ogino S. et al. Evaluation of Markers for CpG Island Methylator Phenotype (CIMP) in Colorectal Cancer by a Large Population-Based Sample. *J Mol Diagn* 2007; 9; 305-314.

Visintin I. et al. Diagnostic markers for early detection of ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2008; 14; 1065-1072.

Marini A. et al. Epigenetic inactivation of tumor suppressor genes in serum of patients with cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol.* 2006; 126; 422-431.

Tan SH. et al. Detection of promotor hypermethylation in serum samples of cancer patients by methylation-specific polymerase chain reaction for tumour suppressor genes including RUNX3. *Oncol Rep.* 2007; 18; 1225-1230.

Johnson D.C. et al. Accuracy of CT colonography for detection of large adenomas and cancers. *N Engl J Med.* 2008; 359; 1285-1287.

Eads C.A. et al. Fields of Abberant CpG Island Hypermethylation in Barrett`s Esophagus and Associated Adenocarcinoma. *Cancer Res* 2000; 60; 5021-5026.

Ogino S. et al. Precision and Performance Characteristics of Bisulfite Conversion and Real-Time PCR (MethyLight) for Quantitative DNA Methylation Analysis. *JMD* 2006; 8; 209-217.

Jemal A. et al. Cancer Statistics 2008. *CA Cancer J Clin* 2004; 58; 71-96.

Selby J.V. et al. A case-control study of screening sigmoidoscopy and mortality from colorectal cancer. *N Engl J Med* 1992; 326; 653 – 657.

Kahi et al. Screening, surveillance, and primary prevention for colorectal cancer: a review of the recent literature. *Gastroenterology* 2008; 135; 380 – 399.

Toyota M., Issa J.P. Epigenetic changes in solid and hematopoietic tumors. *Semin Oncol* 2005; 32; 521 – 530.

Lofton-Day C. et al. DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening. *Clin Chem* 2008; 54; 414 – 423.

Jordan I.K. et al. Origin of a substantial fraction of human regulatory sequences from transposable elements. *Trends Genet.* 2003; 19:68-72.

Weiner A.M. et al. SINEs und LINEs: the art of biting the hand that feeds you. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2002; 14: 343-350.

Weisenberger D.J. et al. Role of the DNA methyltransferase variant DNMT3b3 in DNA methylation. *Mol. Cancer Res.* 2004; 2: 62-72.

Weisenberger D.J. et al. Analysis of repetitive element DNA methylation by MethyLight. *Nucleic Acids Res.* 2005; 33: 6823-6836.

Ebert M. et al. Hypermethylation of the TPEF/HPP1 Gene in Primary and Metastatic Colorectal Cancers. *Neoplasia* 2005;7:771-778.

Eads C.A. et al. Epigenetic patterns in the progression of esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res* 2001; 61; 3410-3418.

Esteller M. et al. Abnormalities of the APC/beta-catenin pathway in endometrial cancer. *Oncogene* 2002; 21: 7981-7990.

Thorstensen L. et al. The WNT signaling pathway and its role in human solid tumors. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology* 2003.

Esteller M. et al. Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. *CancerRes.* 2000; 60:4366-4371.

Esteller M. et al. A CpG island hypermethylation profile of primary colorectal carcinomas and colon cancer cell lines. *Mol. Cancer* 2004; 3.

Hisamuddin I.M. et al. Genetics of Colorectal Cancer. *MedGenMed*. 2004; 6.

Pecina-Slaus N. Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. *Cancer Cell International* 2003; 3.

Vleminckx K. et al. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* 1991; 66:107-119.

Rietmacher D. et al. Targeted mutation in the mouse E-cadherin gene results in defective preimplantation development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 855-859.

Berx G. et al. Mutations of the human E-cadherin (CDH1) gene. *Hum Mutat* 1998; 12: 226-237.

Guilford P. et al. E-cadherin downregulation in cancer: fuel on the fire? *Mol Med Today* 1999; 5:172-177.

Tycko B. et al. Epigenetic gene silencing in cancer. *J Clin Invest* 2000; 105: 401-407.

Tan SH. et al. Detection of promoter hypermethylation in serum samples of cancer patients by methylation-specific polymerase chain reaction for tumour suppressor genes including RUNX3. *Oncol Rep*. 2007; 18; 1225-1230.

Conacci-Sorrell M. et al. The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *J Clin Invest* 2002; 109: 987-991.

Moinova H.R. et al. HMTF gene silencing in human colon cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; 99; 4562-4567.

Duval A. et al. Gender difference for mismatch repair deficiency in human colorectal cancer. *Gastroenterol* 2001; 121; 1026-1027.

Cejka P. et al. Methylation-induced G2/M arrest requires a full complement of the mismatch repair protein hMLH1. *The EMBO J*. 2003; 22; 2245-2254.

Young J. et al. HPP1: A transmembrane protein-encoding gene commonly methylated in colorectal polyps and cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; 98: 265-270.

Ebert M et al. Hypermethylation of the TPEF/HPP1 Gene in Primary and Metastatic Colorectal Cancers. *Neoplasia* 2005; 7: 771-778.

Sato F et al. Aberrant Methylation of the HPP1 Gene in Ulcerative Colitis-associated Colorectal Carcinoma. *Cancer Res* 2002; 62; 6820-6822.

Sonoyama K et al. Upregulation of activin A gene by butyrate in human colon cancer cell lines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 284; 989-995.

Kingsley DM et al. The TGF- $\beta$  superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 1994; 8; 133-146.

- El-Osta A. et al. Precipitous Release of Methyl-CpG Binding Protein 2 and Histone Deacetylase 1 from the Methylated Human Multidrug Resistance Gene (MDR1) on Activation. *Mol. Cell. Biol.* 2002; 22; 1844-1857.
- Morschhäuser J. et al. The transcription factor Mrr1p controls expression of the MDR1 efflux pump and mediates multidrug resistance in *Candida albicans*. *PLOS Pathog.* 2007; 3; 1603-1616.
- Shannon B.A. et al. Methylation of the hMLH1, p16 and MDR1 genes in colorectal carcinoma: associations with clinicopathological features. *Cancer Lett.* 2001; 167; 91-97.
- Rijnsoever van M. et al. Characterisation of colorectal cancers showing hypermethylation at multiple CpG islands. *Gut* 2002; 51; 797-802.
- Ahuja N. et al. Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer. *Cancer Res* 1998; 58; 5489-5494.
- Toyota M. et al. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96; 8681-8686.
- Esteller M. et al. Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O<sup>6</sup>-methylguanine DNA methyltransferase in human cancer. *Oncogene* 2004; 23; 1-6.
- Pegg A.E. et al. Depletion of mammalian O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity by O<sup>6</sup>-benzylguanine provides a means to evaluate the role of this protein in protection against carcinogenic and therapeutic alkylating agents. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87; 5368-5372.
- Pegg A.E. et al. Human variants of O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA-alkyltransferase. *DNA Repair (Amst)* 2007; 6; 1071-1078.
- Qi J. et al. Hypermethylation of CpG island in O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA-methyltransferase gene was associated with K-ras G to A mutation in colorectal tumor. *World J Gastroenterol* 2005; 11; 2022-2025.
- Esteller M. et al. A Gene Hypermethylation Profile of Human Cancer. *Cancer Res* 2001; 61; 3225-3229.
- Kanai Y. et al. DNA Methyltransferase Expression And DNA Methylation of CpG Islands And Peri-Centromeric Satellite Regions In Human Colorectal And Stomach Cancers. *Int J Cancer* 2001; 91; 205-212.
- Park S. et al. Frequent CpG Island Methylation in Serrated Adenomas of the Colorectum. *Am J Pathol* 2003; 162; 815-822.
- Merlo A. et al. CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nature Med.* 1995; 1; 686-692.
- Hsiao PC. et al. Promoter methylation of p16 and EDNRB gene in leukemia patients in Taiwan. *Chin J Physiol.* 2008; 51; 27-31.



- Zhang C. et al. CpG island methylator phenotype association with upregulated telomerase activity in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2008 ; 123; 998-1004.
- Zou HZ. et al. Detection of Abberant p16 Methylation in the Serum of Colorectal Cancer Patients. *Clin Cancer Res* 2002. 8; 188-191.
- Zeng ZS et al. Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-3 Is a Basement Membrane-Associated Protein that Is Significantly Decreased in Human Colorectal Cancer. *Dis Colon Rectum* 2001 : 44; 1290-1296.
- Leeman MF et al. New insights into the roles of matrix metalloproteinases in colorectal cancer development and progression. *J Pathol* 2003; 201; 528-34.
- Brueckl WM wt al. Alterations in the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) are found frequently in human colorectal tumours displaying either microsatellite stability (MSS) or instability (MSI). *Cancer Letters* 2005; 223; 137-142.
- Murphy G et al. An inhibitor of collagenase from human amniotic fluid : purification, characterization and action on metalloproteinases. *Biochem J* 1981; 195; 167-70.
- Stetler-Stevenson WG et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2): a new member of the metalloproteinase inhibitor family. *J Biol Chem* 1989; 264; 17374-8.
- Greene J et al. Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *J Biol Chem* 1996; 271; 30375-80.
- Apte SS et al. Cloning of the cDNA encoding human tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-3) and mapping of the TIMP-3 gene to chromosome 22. *Genomics* 1994; 19; 86-90.
- Wick M et al. Structure of the human TIMP-3 gene and its cell cycle-regulated promotor. *Biochem J* 1995; 311; 549-54.
- Powe DG et al. TIMP-3 mRNA expression is regionally increased in moderately and poorly differentiated colorectal adenocarcinomas. *Br J Cancer* 1997; 75; 1678-83.
- Anand-Apte B et al. Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinases-3. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38; 817-23.
- Deng X et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 induces apoptosis in prostate cancer cells and confers increased sensitivity to paclitaxel. *Eur J Cancer* 2006.
- Bachman K.E. et al. Methylation-associated Silencing of the Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-3 Gene Suggests a Suppressor Role in Kidney, Brain, and Other Human Cancers. *Cancer Res* 1999; 59; 798-802.
- Stanganelli C. et al. DNA methylation analysis of tumor suppressor genes in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Ann Hematol.* 2009.

- Ogino S. et al. CpG island methylator phenotype (CIMP) of colorectal cancer is best characterised by quantitative DNA methylation analysis and prospective cohort studies. *Gut* 2006; 55: 1000-1006.
- Xu S.B. et al. DNA methylation regulates constitutive expression of Stat6 regulatory genes SOCS-1 and SHP-1 in colon cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009; 135: 1791 – 1798.
- Yadav A. et al. Increased expression of suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1): A mechanism for dysregulated T helper-1 responses in HIV-1 disease. *Virology* 2009; 385: 126 – 133.
- Johan M.F. et al. Aberrant methylation of the negative regulators RASSF1A, SHP-1 and SOCS-1 in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 2005; 129: 60 – 65.
- Toyota M. et al. Inactivation of CACNA1G, a T-type calcium channel gene, by aberrant methylation of its 5' CpG island in human tumors. *Cancer Res* 1999; 59: 4535 – 4541.
- Ernst W.L. et al. Genetic enhancement of thalamocortical network activity by elevating alpha 1g-mediated low-voltage-activated calcium current induces pure absence epilepsy. *J. Neurosci.* 2009; 29: 1615 – 1625.
- Wang Y. et al. Association of insulin-like growth factor 2 with the insulin-linked polymorphic region in cultured fetal thymus cells. *Biochemistry* 2009; 48: 8189 – 8194.
- Nosho K. et al. A prospective cohort study shows unique epigenetic, genetic, and prognostic features of synchronous colorectal cancers. *Gastroenterology* 2009; 137 1609 – 1620.
- Fu V.X. et al. Aging and cancer-related loss of insulin-like growth factor 2 imprinting in the mouse and human prostate. *Cancer Res.* 2008; 15: 6797 – 6802.
- Hwang J. et al. Correlation between preoperative serum levels of five biomarkers and relationships between these biomarkers and cancer stage in epithelial ovarian cancer. *J Gynecol Oncol.* 2009; 20: 169 – 175.
- Kim W.Y. et al. Elevated epithelial insulin-like growth factor expression is a risk factor for lung cancer development. *Cancer Res.* 2009; 69: 7439 – 7448.
- Kaaks R. et al. Insulin-like growth factor-II methylation status in lymphocyte DNA and colon cancer risk in the Northern Sweden Health and Disease cohort. *Cancer Res.* 2009; 69, 5400 – 5405.
- Li Q.L. et al. Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell* 2002; 109: 113 – 124.
- Ahlqist T. et al. Gene methylation profiles of normal mucosa, and benign and malignant colorectal tumors identify early onset markers. *Mol Cancer.* 2008; 7:94.

- Ho B.C. et al. Basic helix-loop-helix transcription factor NEUROG1 and schizophrenia: effects on illness susceptibility, MRI brain morphometry and cognitive abilities. *Schizophr Res.* 2008; 106: 192 – 199.
- Kim B.H. et al. CpG island hypermethylation and repetitive DNA hypomethylation in premalignant lesion of extrahepatic cholangiocarcinoma. *Virchows Arch.* 2009.
- Cohen Y. et al. Hypermethylation of CpG island loci of multiple tumor suppressor genes in retinoblastoma. *Exp Eye Res.* 2008; 86: 201-206.
- Merhavi E. et al. Promoter methylation status of multiple genes in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007. 48: 4403-4406.
- Nosho K. et al. Comprehensive biostatistical analysis of CpG island methylator phenotype in colorectal cancer using a large population-based sample. *PloS one.* 2008; 3.
- Cho N.Y. et al. Hypermethylation of CpG island loci and hypomethylation of LINE-1 and Alu repeats in prostate adenocarcinoma and their relationship to clinicopathological features. *J Pathol.* 2007; 211; 269-277.
- Herbst A. et al. Methylation of helicase-like transcription factor in serum of patients with colorectal cancer is an independent predictor of disease recurrence. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2009; 21: 565-569.
- Morikawa T. et al. A comparison of the immunochemical fecal occult blood test and total colonoscopy in the asymptomatic population. *Gastroenterology* 2005; 129: 422 – 428.
- Schoenfeld P. et al. Colonoscopic screening of average-risk women for colorectal neoplasia. *N Engl J Med.* 2005; 352: 2061–2068.
- Caldwell J. M. et al. The Wnt antagonist sFRP1 is downregulated in premalignant large bowel adenomas. *Br J Cancer* 2006; 94: 922–927.
- Li V. S. et al. Frequent inactivation of axon guidance molecule RGMA in human colon cancer through genetic and epigenetic mechanisms. *Gastroenterology* 2009; 137: 176–187.
- Hu J. H. et al. Effects of different extenders on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing-thawing. *Cryobiology* 2008; 57: 257–262.
- Kader A. et al. Evaluation of post-thaw DNA integrity of mouse blastocysts after ultrarapid and slow freezing. *Fertil Steril.* 2009; 91: 2087-2094.
- Grützmann R. et al. Sensitive detection of colorectal cancer in peripheral blood by septin 9 DNA methylation assay. *PloS One* 2008; 3: e3759.
- Anglim P. P. et al. Identification of a panel of sensitive and specific DNA methylatiomarkers for squamous cell lung cancer. *Mol Cancer* 2008; 62: 1476 -1498.
- Kapasa M. et al. Identification of phylogenetically conserved enhancer elements implicated in pancreas development in the WISP1 and CTGF orthologs. *Genomics* 2008; 92: 301-308.

- Hundt S. et al. Blood markers for Early Detection of Colorectal Cancer: A Systematic Review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16: 1935-1953.
- Stintzing S. et al. The Treatment of Colorectal Carcinoma With Monoclonal Antibodies - The Importance of KRAS Mutation Analysis and EGFR Status. *Dtsch Arztebl Int* 2009; 106: 202-206.
- Leonard G.D. et al. Neoadjuvant chemotherapy before liver resection for patients with unresectable liver metastases from colorectal carcinoma. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2038-2048.
- Neumann U. et al. Chirurgische und interventionelle Therapiemöglichkeiten bei Fernmetastasen kolorektaler Karzinome. *Chir Gastroenterol* 2005; 21: 157-162.
- Hayatsu H. et al. Reaction of cytidine with semicarbazide in the presence of bisulfite. A rapid modification specific for single-stranded polynucleotide. *Biochemistry* 1976; 15: 2677-2682.
- Guittet L. et al. Comparison of a guaiac based and an immunochemical faecal occult blood test in screening for colorectal cancer in a general average risk population. *Gut* 2007; 56: 210-214.
- Brenner H. et al. Comparative evaluation of immunochemical fecal occult blood tests for colorectal adenoma detection. *Ann Intern Med.* 2009; 150: 162-169.
- Brenner H. et al. Zwischenbilanz der Früherkennungskoloskopie nach acht Jahren: Eine Hochrechnung und erste Ergebnisse. *Dtsch Arztebl Int* 2010; 107: 753-9.
- Baxter N. et al. Association of Colonoscopy and Death From Colorectal Cancer. *Ann Intern Med.* 2009; 150: 1-8.
- American Cancer Society/US Multisociety Task Force on Colorectal Cancer/American College of Radiology (ACS/USMSTF/ACR). Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: a joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *CA Cancer J Clin* 2008; 58: 130-60.
- Imperiale T.F. et al. Fecal DNA versus Fecal Occult Blood for Colorectal-Cancer Screening in an Average-Risk Population. *N Engl J Med* 2004; 351: 2704-14.
- Mulhall P.B. et al. Meta-analysis: computed tomographic colonography. *Ann Intern Med.* 2005; 142: 635-50.
- Gerst T. Darmkrebsprävention: Großes Engagement allerorten. *Dtsch Arztebl* 2010; 107: 424-425.
- Hart A.R. et al. Colorectal cancer screening in asymptomatic populations. *Gut* 1995; 36: 590-598.
- Inadomi J.M. et al. Taishotoyama Symposium Barriers to colorectal cancer screening: economics, capacity and adherence. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008; 23:198-204.

Sonnenberg A. et al. Cost-effectiveness of colonoscopy in screening for colorectal cancer. *Ann Intern Med.* 2000; 133: 573-84.

Imperiale T.F. et al. Fecal DNA versus fecal occult blood for colorectal-cancer screening in an average-risk population. *N Engl J Med* 2004; 351: 2704–2714.

Woolf S.H. et al. A smarter strategy? – Reflections on fecal DNA screening for colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 2755–2758.

Tänzer M. et al. Performance of epigenetic markers SEPT9 and ALX4 in plasma for detection of colorectal precancerous lesions. *PLoS One.* 2010; 5: e9061

Bombardieri E. et al. Tissue polypeptide antigen and carcinoembryonic antigen in colon tumors: Serum levels and immunohistochemical localization. *Cancer Detect Prev* 1985; 8: 219-226.

Carpelan-Holmstrom M. et al. CEA, CA 19-9 and CA 72-4 improve the diagnostic accuracy in gastrointestinal cancers. *Anticancer Res* 2002; 22: 2311-2316.

Arnaud J.P. et al. Carcinoembryonic antigen (CEA) in diagnosis and prognosis of colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 1980; 23: 141-144.

Lau-Werner U. et al. Tumormarker beim kolorektalen Karzinom. *J Lab Med* 2003; 27: 20-25.

Wanebo H.J. et al. Preoperative carcinoembryonic antigen level as a prognostic indicator in colorectal cancer. *N Engl J Med* 1978; 299: 448-451.

Schmiegel W. et al. S3-Leitlinie „Kolorektales Karzinom“ Ergebnisse evidenzbasierter Konsensuskonferenzen am 6./7. Februar 2004 und am 8./9. Juni 2007. *Z Gastroenterol* 2008; 46: 1–73 (gültig bis 2012).

Dong S.M. et al. Detecting colorectal cancer in stool with the use of multiple genetic targets. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 858–865.

Lieberman D.A. Cost-effectiveness model for colon cancer screening. *Gastroenterology* 1995; 109: 1781-90.

Jorgensen O.D. et al. A randomised study of screening for colorectal cancer using faecal occult blood testing: results after 13 years and seven biennial screening rounds. *Gut* 2002; 50: 29–32.

Rex D. K. et al. Colonoscopic miss rates of adenomas determined by back-to-back colonoscopies. *Gastroenterology* 1997; 112 (1): 24–28.

Jakubke H.D. et al. *Aminosäuren, Peptide, Proteine*, Verlag Chemie Weinheim 1982: 403-404.

Wharton R. Q. et al. Increased detection of circulating tumor cells in the blood of colorectal carcinoma patients using two reverse transcription-PCR assays and multiple blood samples. *Clin Cancer Res.* 1999 ; 5: 4158-4163.

Holodniy M. et al. Inhibition of human immunodeficiency virus gene amplification by heparin. *J Clin Microbiol.* 1991; 29: 676-9.

Ding M. et al. An optimized sensitive method for quantitation of DNA/RNA viruses in heparinized and cryopreserved plasma. *J Virol Methods.* 2011. [Epub ahead of print]

Beutler E. et al. Interference of heparin with the polymerase chain reaction. *Biotech.* 1990; 9: 166.

Khosravinia H. et al. Influence of EDTA and magnesium on DNA extraction from blood samples and specificity of polymerase chain reaction. *African Journal of Biotechnology* 2007; 6 :184-187.

Dieffenbach C.W. et al. PCR Primer: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* 1995.

Umetani N. et al. Higher amount of free circulating DNA in serum than in plasma is not mainly caused by contaminated extraneous DNA during separation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006a; 1075: 299-307.

Umetani N. et al. Increased integrity of free circulating DNA in sera of patients with colorectal or periampullary cancer: direct quantitative PCR for ALU repeats. *Clin Chem.* 2006b; 52: 1062-9.

Wittekind et al. *TNM Klassifikation maligner Tumoren.* 7. Auflage, 2010.

Safi F. et al. The clinical relevance of tumor marker CEA, CA 19-9 in regional chemotherapy for hepatic metastases of colorectal carcinoma. *Int J Biol Markers* 1988; 3: 101-106.

Louhimo J. et al. Serum HCG beta, CA 72-4 and CEA are independent prognostic factors in colorectal cancer. *Int J Cancer* 2002; 101: 545-548.

Herszényi L. et al. Tumor marker utility and prognostic relevance of cathepsin B, cathepsin L, urokinase-type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor type-1, CEA and CA 19-9 in colorectal cancer. *BMC Cancer.* 2008; 8: 194.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

MYH...	mutiertes YH-Gen an DNA-Reparatur-Mechanismen, speziell am Basen-Austausch beteiligtes Gen
O <sub>2</sub> ...	Sauerstoff
CH <sub>3</sub> ...	Methylrest
GOÄ ...	Gebührenordnung für Ärzte
p53 ...	Tumorsupressorgen mit einem Molekulargewicht von 53 kDa
D9S162 ...	Mikrosatelliten-Marker auf Chromosom 9p13, zeigt den Verlust der Heterozygotie (LOH) an
D9S171 ...	Mikrosatelliten-Marker auf Chromosom 9p13, zeigt den Verlust der Heterozygotie (LOH) an
IFNA ...	Interferon Alpha
CDA ...	Cytidin-Deaminase
MGC20553 ...	multifunktionelles Protein mit Wirkung auf die mechanischen Membraneigenschaften und auf die Ausprägung von Erythrozyten
BANK1...	Gerüstprotein von B-Zell-Lymphozyten mit ankyrin repeats 1, welches an der Mobilisation intrazellulärer Kalziumspeicher beteiligt ist
BCNP1...	B-cell novel protein number 1
MS4A1...	membrane-spanning 4-domains; Oberflächen-Antigen Nr. 1 auf B-Zell-Lymphozyten
SFRP2 ...	Secreted frizzled-related protein 2, löslicher Modulator des Wnt-Signalweges
HIC1...	hypermethylated in cancer; Tumorsuppressorgen-Kandidat
o. g. ...	oben genannte (r)
v. a. ...	vor allem
bzw. ...	beziehungsweise
TMEFF2 ...	transmembrane protein with EGFLike and two follistatin-like domains 2
NGFR ...	nerve growth factor receptor (TNFR superfamily, member 16)
SEPT9 ...	Septin 9
z.T. ...	zum Teil

RGMA ...	repulsive guidance molecule for retinal axons, Funktion in der embryonalen Neuralrohrentwicklung
z.B....	zum Beispiel
EDTA ...	Ethylendiamintetraacetat
LEF ...	lymphoid enhancer-binding factor 1
TCF4 ...	T-cell specific transcription factor 4
ALX-4 ...	Aristaless-like homeobox-4
CYCD1 ...	Cyclin D1
CDKN2A ...	Cyclin dependent kinase inhibitor 2A, Tumorsuppressorprotein
bp ...	Basenpaare
nM ...	Nanomol
mM ...	Millimol
MgCl <sub>2</sub> ...	Magnesiumchlorid
AUC...	Area under the curve
DGVS...	Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten



## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms nach TNM-Klassifikation

Tabelle 1.2: Nachweis kolorektaler Karzinome in genetischen und epigenetischen Stuhltests

Tabelle 1.3: Sensitivität und Spezifität derzeit verwendeter und potentieller Screeningverfahren zur Detektion kolorektaler Karzinome (1)

Tabelle 1.4: Sensitivität und Spezifität potentieller Screeningverfahren zur Detektion kolorektaler Karzinome (2)

Tabelle 2.1: Austestung der PCR-Bedingungen für alle getesteten Biomarker

Tabelle 2.2: DNA-Sequenzen von Primern und Sonden sowie Fragmentlängen der verwendeten Methylierungsmarker

Tabelle 2.3: Patientencharakteristika von Trainings-/ Tumorstaging-/ und Test-Set

Tabelle 2.4: Aktuelle Methylierungsraten in primären kolorektalen Karzinomen unter Einbeziehung der Serumanalyse

Tabelle 3.1: Ergebnisse der Serummarker-Messung im Trainings-Set

Tabelle 3.2: Normalisierung der DNA-Molekül-Mengen mittels Referenz-Gen ALU

Tabelle 3.3: Auswertung Trainings-Set unter Einbeziehung definierter Grenzwerte

Tabelle 3.4: Identifikation geeigneter diagnostischer Serummarker im Trainings-Set

Tabelle 3.5: Auswertung und Charakteristika des Test-Sets für NEUROG-1-Methylierung

Tabelle 4.1: Ergebnisse der Serummarker-Messung im Trainings-Set  
(normalisierte Originaldaten der PCR)

## 10 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1.1: Prozentualer Anteil kolorektaler und anderer Karzinome im Bezug auf alle neu aufgetretenen Malignomfälle 2008
- Abbildung 1.2: Genese des kolorektalen Karzinoms
- Abbildung 1.3: Kolorektale Karzinogenese nach dem Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz
- Abbildung 1.4: Hypothese der Karzinomentstehung nach B. Vogelstein („Adenom-Karzinom-Sequenz“)
- Abbildung 1.5: Umwandlung von Cytosin über 5-Methyl-Cytosin zu Thymin und dessen Auswirkungen auf die Transkription
- Abbildung 1.6: Kumulative Beteiligung der Bevölkerung an Früherkennungs-Koloskopien
- Abbildung 1.7: Durch Früherkennungs-Koloskopien erfasste Diagnosen im Jahr 2008
- Abbildung 2.1: Austestung der Primer auf methylierter und unmethylierter Standard-DNA
- Abbildung 2.2: Ermittlung des Treshold-Cycles (Ct-Wert)
- Abbildung 2.3: Erstellung der Standardkurve unter Verwendung verschiedener DNA-Verdünnungsstufen
- Abbildung 2.4: Berechnung der Template-Mengen mittels Standardkurve
- Abbildung 2.5: Inter-/ Intra-Assay an gesunden Kontrollpersonen
- Abbildung 2.6: Inter-/ Intra-Assay an metastasierten Tumorstadien (UICC IV)
- Abbildung 2.7: Flow-Chart aller enthaltenen Sets und der darin gemessenen Marker

Abbildung 3.1: Inter-Intra-Assay an gesunden Kontrollpersonen

Abbildung 3.2: Inter-Intra-Assay in metastasierten Tumorstadien (UICC IV)

Abbildungen 3.3 A,B,C:

Verteilungsmuster der Promotormethylierung für die Gene HLTF,  
HPP1 und NEUROG1 in den kolorektalen Karzinomstadien  
UICC I bis IV

Abbildung 3.4: Ergebnisse des Serum- Tumor-Korrelations-Sets

Abbildung 3.5: Receiver-Operating-Charakteristik (ROC) zur Evaluation größtmöglicher  
Sensitivität und Spezifität für NEUROG-1

Abbildung 3.6: Sensitivität und Spezifität für NEUROG-1 für Adenome,  
UICC-I- und UICC-II-Karzinomseren im Test-Set