

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

# **Die Methylierung von Serum-DNA ist ein unabhängiger prognostischer Marker des kolorektalen Karzinoms**

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

vorgelegt von

**Maike Wallner**

aus  
Frankfurt am Main  
2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

1. Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. F. Kolligs
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. B. F. Becker
1. Mitberichterstatter:	Prof. Dr. G. W. Bornkamm
2. Mitberichterstatter:	Prof. Dr. St. Endres
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. A. Herbst
Dekan:	Prof. Dr. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	31.01.2008

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	3
Danksagung .....	5
1 Einleitung.....	6
1.1 Das kolorektale Karzinom .....	6
1.1.1 Deskriptive Epidemiologie .....	6
1.1.2 Ätiologische Epidemiologie .....	6
1.1.3 Stadieneinteilung und Prognose.....	7
1.1.4 Hereditäre Kolonkarzinome.....	9
1.2 Molekulare Marker .....	10
1.2.1 Epigenetik/DNA-Methylierung .....	10
1.2.2 Detektion von Tumormarkern in Körperflüssigkeiten.....	13
1.3 Ziele der Arbeit.....	15
2 Methoden und Material.....	16
2.1 Patienten und Serumproben.....	16
2.2 Isolation genomischer DNA aus Serum.....	17
2.3 Isolation genomischer DNA aus peripheren Leukozyten.....	17
2.4 Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von DNA.....	18
2.5 Ethanol-Präzipitation .....	18
2.6 Methylierung von DNA mit SSS1 (CpG-Methylase).....	18
2.7 Agarose-Gelelektrophorese .....	19
2.8 Bisulfitbehandlung der genomischen DNA .....	19
2.9 Konventionelle Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	20
2.10 Echtzeit quantitative Polymerase-Kettenreaktion (QPCR).....	21
2.11 Methylierungsspezifische Polymerase-Kettenreaktion (MSP).....	22
2.12 Bestimmung der CEA Werte .....	23
2.13 Statistik .....	23
2.14 Oligonukleotide .....	23
2.15 Spezielle Lösungen .....	26

2.16	Lösungen und Puffer.....	26
2.17	Patientenmaterial .....	27
3	Ergebnisse.....	28
3.1	Nachweis von Methylierung.....	28
3.1.1	Etablierung der Detektion.....	28
3.1.2	Optimierung der PCR Bedingungen.....	30
3.2	Gen-Evaluierungsset.....	31
3.2.1	Identifizierung der geeigneten Gene in einem Gen-Evaluierungsset .....	31
3.2.2	Korrelation der Methylierung mit klinisch-pathologischen Daten.....	33
3.3	Testset .....	36
3.3.1	Korrelation der Methylierung mit klinisch-pathologischen Daten.....	36
3.3.2	Analyse der prognostischen Signifikanz von DNA-Methylierung.....	37
3.3.2.1	Rezidiv .....	37
3.3.2.2	Versterben.....	40
4	Diskussion.....	45
5	Zusammenfassung .....	51
6	Anhang.....	53
7	Schrifttum .....	64
8	Abkürzungen.....	74
9	Lebenslauf.....	77

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Kolligs für die hervorragende Betreuung dieser Doktorarbeit und die Vertretung vor der Fakultät bedanken. Mit seiner ständigen Unterstützung, seinem großem Engagement und seinem umfassenden Wissen stand er mir immer zur Seite und ermöglichte mir dadurch diese Arbeit.

Herrn Professor Dr. Göke danke ich für die Vermittlung dieser Dissertation und die Motivation sie durchzuführen.

Bei Herrn Dr. Herbst bedanke ich mich für die kontinuierliche Beratung, Diskussion und Anregungen während der Erstellung der Arbeit.

Herrn Dr. Crispin danke ich für die große Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Frau Andrea Behrens und dem ganzen Labor PD Dr. Kolligs möchte ich für die Unterstützung, Hilfestellungen und die sehr gute Zusammenarbeit danken.

Herrn Professor Dr. Lamerz danke ich für die Überlassung der Proben aus seinem Archiv und die Anregungen zur statistischen Auswertung.

Außerdem danke ich allen Mitarbeitern der Medizinischen Klinik II und der Chirurgischen Klinik Großhadern, die unermüdlich die Blutproben gesammelt haben.

Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern der Maria-Theresia-Klinik und Frau Dr. Lau-Werner für die Bereit- und Verfügungsstellung der Patientendaten.

Ganz besonderer Dank geht an die Patienten, die ihre Proben und Daten zur Auswertung zur Verfügung gestellt haben.

Zum Schluss möchte ich die Gelegenheit nutzen, meinem Ehemann, meiner Tochter, meinem Sohn und meinen Eltern für Ihre Unterstützung zu danken.

# 1 Einleitung

## 1.1 Das kolorektale Karzinom

### 1.1.1 Deskriptive Epidemiologie

Das kolorektale Karzinom ist die vierthäufigste Neoplasie weltweit. Im Jahr 2000 erkrankten 943.000 Menschen an einem kolorektalen Karzinom und ca. 510.000 starben daran (Becker, 2003). Jährlich erkranken an dieser Krebsart ca. 72.000 Menschen in Deutschland und ungefähr 30.000 sterben daran. Damit ist das Kolonkarzinom, beide Geschlechter gemeinsam betrachtet, die häufigste Krebserkrankung in Deutschland und die zweithäufigste Krebstodesursache. Das Mammakarzinom folgt mit ca. 55.000 Erkrankungen pro Jahr und das Bronchialkarzinom mit etwa 44.000 Erkrankungen pro Jahr (GEKID and RKI, 2006). Nach Geschlechtern getrennt betrachtet, ist das Kolonkarzinom mit 17,6% aller Neoplasien die zweithäufigste Karzinomerkrankung nach dem Mammakarzinom. Männer erkranken am häufigsten an Bronchial- und Prostatakrebs, das Kolonkarzinom liegt auf Platz drei (16,3%) (Schalhorn et al., 2006). Die Lebenszeitwahrscheinlichkeit an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken liegt bei 6% (Sandler, 1997). Im Mittel erkranken Männer mit 69 Jahren und Frauen mit 75 Jahren (GEKID and RKI, 2006). Weltweit steigt die Inzidenz des kolorektalen Karzinoms beider Geschlechter. In Deutschland steigt die Inzidenz seit den achtziger Jahren bei Männern, bei Frauen stagniert sie hingegen. Das Risiko an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken erhöht sich ab dem 40. Lebensjahr langsam und steigt im 5. Lebensjahrzehnt sprunghaft. Die Mortalitätsrate für Frauen liegt bei 21 pro 100.000 und für Männer bei 32 pro 100.000 Einwohnern (Schalhorn et al., 2006). Es kann ein Sinken der weiblichen Mortalitätsrate seit 20 Jahren, bei der männlichen seit 10 Jahren beobachtet werden (Becker, 2003).

### 1.1.2 Ätiologische Epidemiologie

Neben der individuellen Disposition an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken spielt die Exposition eine große Rolle. Studien zufolge passt sich das Risiko für eine kolorektale Erkrankung dem Risiko der unmittelbaren Umgebung an. Bei Japanern, welche nach Hawaii auswanderten, stieg die Inzidenz um das Vierfache im Vergleich zu Japanern im Ursprungsland (Becker, 2003). Ernährung spielt eine erhebliche Rolle in der Genese des Kolonkarzinoms. Verzehr von Gemüse und Bewegung gilt inzwischen als gesichert protektiv. Dagegen erhöht der Genuss von „rotem“ Fleisch, fetthaltige Nahrung (World Cancer Research Fund, 1997; Sandhu et al., 2001), Rauchen und Übergewicht (Bergström et al., 2001) wahrscheinlich das Risiko. Ob die Einnahme von

Aspirin protektiv wirkt, ist noch nicht durch Studien belegt. Nebenwirkungen übersteigen zurzeit den Effekt (Schalhorn et al., 2006).

Die genetische Voraussetzung gehört zu den gesicherten Risikofaktoren. Hereditäre Kolonkarzinome wie z.B. familiäre adenomatöse polyposis coli (FAP) und hereditäre nicht-polypöse kolorektale Karzinome (HNPCC), haben einen Anteil von etwa 5% an den Kolonkarzinomen. Ist ein Verwandter ersten Grades an einem kolorektalen Karzinom erkrankt, steigt das Risiko selbst zu erkranken um das zwei bis dreifache, bei mehreren Familienmitgliedern sogar um das sechsfache (Becker, 2003). Familiär gehäufte Tumore nehmen ein Viertel aller Kolonkarzinome ein. Sporadisch auftretender Darmkrebs macht den größten Teil der Kolonkarzinome aus (75%). Patienten mit der chronisch entzündliche Darmerkrankung Colitis ulcerosa haben ein höheres Risiko, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken. Die Überlebensrate der Patienten mit diagnostiziertem Kolonkarzinom hängt stark von dem Zeitpunkt der Diagnose ab. Die 5-Jahres-Überlebensrate des adenomatösen Vorstadiums beträgt >99%. Im UICC-Stadium I 95%, UICC II 80-95%, UICC III N1 70-75%, N2 45% und UICC IV 2-25%. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate beträgt 56% (GEKID and RKI, 2006).

### 1.1.3 Stadieneinteilung und Prognose

Das Rektosigmoid ist am häufigsten von Tumoren betroffen (55%, davon Rektum 40%). Das proximale Kolonkarzinom folgt mit einem Anteil von 22% (Zökum 13%, Kolon ascendens 9%), das Kolon transversum mit 11% und das Kolon descendens mit 6%. Die Inzidenz rechtsseitiger Karzinome nimmt seit Jahren zu, dabei sinkt die der rektosigmoidalen Tumore. Mehrfachkarzinome betreffen 2-3% der Patienten. Kolonkarzinome metastasieren lympho- und hämatogen. Über das Pfortadersystem bilden sich Fernmetastasen in der Leber (70-80%). Metastasen werden auch in der Lunge (10-35%), Skelett, Nebennieren, Gehirn und Peritoneum (17-32%) diagnostiziert. Eine schlechtere Prognose gilt für eine lymphatische und venöse Infiltration der Gefäße, eine perineurale Tumordinfiltration und eine Dedifferenzierung des Tumors. Dagegen ist eine lymphoide Metastasierung (Inzidenz 8-73%) prognostisch günstig.

In der Klinik werden die TNM- und die UICC-Klassifikation verwendet. Eine genaue Stadieneinteilung ist wichtig, da die Therapie- und Prognoseabschätzung Stadien-abhängig ist. Die Bezeichnung cTNM beruht auf der Diagnostik von Endoskopie, Ultraschall und CT. Die pTNM Klassifikation bezeichnet die pathologische Diagnostik. Nach einer neoadjuvanten Therapie wird ein y zugefügt.

*Tabelle 1.1: Stadieneinteilung kolorektaler Karzinome nach Thiemes Innere Medizin, Thieme 1999, Stuttgart*

UICC	TNM	Dukes	5-Jahres-Überlebensrate
Stadium 0	Tis N0 M0		>99%
Stadium I	T1-2 N0 M0	Dukes A	95%
Stadium II	T3-4 N0 M0	Dukes B	80-95%
Stadium III	Tx N1 M0	Dukes C	70-75%
	Tx N2 M0		45%
Stadium IV	Tx Nx M1		2-25%

*Tabelle 1.2: Einteilung TNM nach Thiemes Innere Medizin, Thieme 1999, Stuttgart; Schalhorn et al., 2006*

T	Primärtumor
Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T1	Submucosa
T2	Muscularis propria
T3	Subserosa, nichtperitonealisiertes, -perikolisches, -perirektales Gewebe
T4	viszerales Peritoneum/andere Organe und Strukturen
N	Regionäre Lymphknoten
Nx	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N1	≤ 3 Lymphknoten
N2	≥ 3 Lymphknoten
N3	Lymphknoten an Gefäßstämmen
M	Fernmetastasen
Mx	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Die Differenzierung eines Tumors wird mit dem histopathologischen Grading eingeteilt (Schalhorn et al., 2006).

*Tabelle 1.3: Einteilung Grading und Residualtumor (Quelle: Schalhorn et al., 2006)*

G	Grading
Gx	Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden
G1	Gut differenziert
G2	Mäßig differenziert
G3	Schlecht differenziert
G4	Undifferenziert
R	Residualtumor
Rx	Vorhandensein eines Residualtumors kann nicht beurteilt werden
R0	Kein Residualtumor
R1	Mikroskopischer Residualtumor
R2	Makroskopischer Residualtumor



Das TNM-System ist derzeit der Goldstandard für die Einteilung des kolorektalen Karzinoms und eignet sich hervorragend zur Prognose von Extremstadien im Vergleich zwischen Stadium I und Stadium IV Tumoren. Allerdings ist die prognostische Aussage bei den intermediären Gruppen weniger informativ (Duffy et al., 2003). CEA ist bis zum jetzigen Zeitpunkt der einzige Tumormarker mit prognostischer Signifikanz, der zur Ergänzung des etablierten TNM-Systems vorgeschlagen worden ist. Präoperative CEA-Werte im Serum geben eine unabhängige prognostische Information (Duffy, 2001). Das carcinoembryonale Antigen (CEA) ist ein Glykoprotein und gehört zur Familie der Immunglobuline. CEA spielt eine Rolle in zahlreichen biochemischen Prozessen, wie Zelladhäsion, Immunität und Apoptose. Der Tumormarker kann erst in fortgeschrittenen gastrointestinalen Tumoren nachgewiesen werden, vor allem im kolorektalen Karzinom. Die *American Joint Committee on Cancer Prognostic Factors Consensus Conference* empfiehlt, den CEA-Wert folgendermaßen dem TNM-Stadium System zuzufügen. Ein Tumor, der mit erhöhtem CEA Level ( $\geq 5$  ng/ml) assoziiert ist, soll von Tumoren ohne erhöhtes CEA ( $< 5$  ng/ml) unterschieden werden. Das TNM-System soll in allen Stadien I-IV mit CX/C0/C1 ergänzt werden. CX bedeutet: CEA kann nicht gemessen werden, C0: CEA ist nicht erhöht ( $< 5$  ng/ml), C1: CEA ist erhöht ( $\geq 5$  ng/ml) (Compton et al., 2000).

Bis heute wurden schon viele Tumormarker zur Prognose untersucht. Der zurzeit vielversprechendste Marker ist der Heterozygotieverlust des Chromosomarmes 18q (18q LOH). Studien zeigten, dass der Marker detaillierte Prognoseaussagen ermöglicht. Patienten des Stadiums II mit 18q LOH hatten die gleiche schlechte Prognose wie im Stadium III. Patienten mit Stadium II ohne 18q LOH hatten die gleiche gute Prognose wie im Stadium I (Jen et al., 1994). DCC (deleted in colon carcinoma) zeigte sich als starker, positiver Prädiktor für das Überleben bei kolorektalen Karzinomen des Stadiums II und III (Shibata et al., 1996). Ein ebenfalls geeigneter prognostischer Marker könnte die Thymidylat-Synthase sein. Eine Überexpression der Thymidylat-Synthase zeigte eine schlechtere Prognose und eine Resistenz gegen Chemotherapie an (Johnston et al., 1994). Die Mutation von K-ras war, besonders bei Patienten mit Stadium II, mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Ahn et al., 1998). Patienten mit HNPCC oder sporadischem kolorektalen Karzinom hatten eine bessere Überlebenschance, wenn ebenfalls eine Mikrosatelliteninstabilität nachgewiesen wurde (Watson et al., 1998).

Bis Prognosemarker in der Klinik Anwendung finden können, müssen allerdings große prospektive Studien durchgeführt werden (Compton et al., 2000).

#### **1.1.4 Hereditäre Kolonkarzinome**

Zu den genetisch determinierten Kolonkarzinomen gehören FAP (familiäre adenomatöse polyposis coli) und HNPCC (hereditäre nicht-polypöse kolorektale Karzinom) (Holinski-Feder et al., 2006). Patienten mit FAP leiden ab einem Alter von 15-25 Jahren unter hundert oder mehr Polypen im gesamten Kolon. Ein Kolonkarzinom

manifestiert sich bis zum 40. Lebensjahr bei fast 100% der Betroffenen. Die Häufigkeit in der Bevölkerung beträgt 1:8.000. Ca. 80% der Erkrankten mit der autosomal dominant vererbten Form haben eine Keimbahnmutation des APC-Gens. Bei der autosomal rezessiven FAP haben die Patienten zu 50-60% eine Mutation des MYH Gens. HNPCC (auch Lynch-Syndrom) wird mit Hilfe der Amsterdam-Kriterien und der Bethesda-Kriterien klinisch diagnostiziert. Molekular-genetisch findet man bei Betroffenen eine Keimbahnmutation der DNA-Reparaturgene (z.B. hMLH1, MSH2, MSH6, PMS2). Patienten mit diagnostiziertem HNPCC haben ein erhöhtes Risiko vor dem 45. Lebensjahr an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken. Die Häufigkeit des HNPCC-Syndroms liegt, abhängig von der Klassifikation, zwischen 1,5-3% und 5-8%.

## 1.2 Molekulare Marker

Ein Charakteristikum des kolorektalen Karzinoms ist seine Entstehung über adenomatöse Vorstadien. Die Entwicklung vom frühen Adenom bis zum kolorektalen Karzinom nimmt in der Regel 10 bis 15 Jahre in Anspruch (Kinzler and Vogelstein, 1996). Fearon und Vogelstein haben ein Modell entwickelt, welches beschreibt, dass es bei der schrittweisen Progression von Adenomen zu invasiven Karzinomen, zur Akkumulation genetischer Mutationen und chromosomalen Imbalancen kommt. Die Entwicklung des kolorektalen Karzinoms folgt in etwa 80% der Fälle dem Weg der chromosomalen Instabilität (CIN oder Tumorsuppressor-Phänotyp) (Fearon and Vogelstein, 1990). Die Reihenfolge und die Anzahl der Mutationen variiert. Es ist davon auszugehen, dass das *adenomatous polyposis coli* Gen (APC) ganz früh durch Mutation inaktiviert wird, deshalb wird es auch als *gatekeeper* bezeichnet (Kinzler and Vogelstein, 1996). In der Folge kommt es häufig zur Mutation und Aktivierung des Onkogens K-ras, zum Expressionsverlust des auf Chromosom 18q21 gelegenen Tumorsuppressorgenkandidaten DCC (*deleted in colorectal cancer*) und zur Inaktivierung des Tumorsuppressorgens p53. Dabei wird die schrittweise Akkumulation der Mutationen in einen kausalen Zusammenhang mit der Progression der Tumore gebracht. Die verbleibenden Fälle kolorektaler Karzinome folgen überwiegend dem Mikrosatelliteninstabilitätsweg (MSI), der auf der Inaktivierung von DNA-Reparaturgenen (*mismatch repair genes*), z.B. hMLH1, hMSH2 beruht. Unter Mikrosatelliten versteht man kurze, repetitive DNA Sequenzen, die über das gesamte Genom verteilt sind. Liegt eine Instabilität vor, wird durch Replikationsfehler die Basensequenz der Mikrosatelliten verändert (Brueckl et al., 2000). Ausgelöst wird MSI im sporadischen Karzinom durch Hypermethylierung des Promoters des hMLH1 Gens (Herman and Baylin, 2003; Imperiale et al., 2004).

### 1.2.1 Epigenetik/DNA-Methylierung

Werden Mechanismen, wie z.B. die zelluläre Antwort auf autokrine und parakrine Wachstumsfaktoren, Zellzykluskontrolle, Seneszenz, Motilität und Invasion durch eine Folge von molekularen Veränderungen gestört, kann es zur malignen Transformation

der Zelle kommen. Genetische Veränderungen wurden bei erblichen Karzinomen als primäre Ursache für deren molekulare Karzinogenese gefunden. Genetische Veränderungen, das heißt Mutationen der Gene durch z.B. Deletion oder Punktmutation, sind allerdings nicht alleine ursächlich für die Entstehung erblicher Karzinome. Neuere Studien wiesen in diesem Zusammenhang epigenetische Veränderungen ebenso als Ursache der neoplastischen Transformation nach (Shen and Issa, 2002). Unter epigenetischen Veränderungen versteht man eine veränderte Genexpression ohne assoziierte genetische Veränderung in der primären DNA-Sequenz. Hierbei handelt es sich vor allem um DNA-Methylierung von CpG-Inseln von Genen und Chromatinmodifikationen wie Histonacetylierung und -methylierung. Dieses *gene silencing* auf Chromatinebene ist für eukaryotische Organismen wichtig bei der Regulation von biologischen Schlüsselprozessen wie Differenzierung und Imprinting (Jones and Baylin, 2007). Dabei ist der epigenetische Zustand grundsätzlich reversibel (Jaenisch and Bird, 2003). Andererseits sind epigenetische Veränderungen auch über die Zellteilung hinweg auf Tochterzellen vererbbar und können dadurch während der Entwicklung eines Karzinoms eine ähnliche Rolle spielen und ebenso selektiven Prozessen unterliegen wie das bei Genmutationen der Fall ist (Jones and Baylin, 2007). Epigenetische Veränderungen können außerdem mit genetischen Veränderungen „kollaborieren“ um die Expression von Genprodukten in Karzinomzellen zu unterdrücken, z.B. in dem ein Allel eines Gens mutiert und das andere Allel durch Promotermethylierung ausgeschaltet wird. Insgesamt sind somit neben genetischen auch epigenetische Veränderungen essenziell für den Erhalt der Gewebshomöostase als auch die Initiation und Progression von Tumoren (Baylin and Ohm, 2006).

Die DNA-Methylierung wird durch die Übertragung von Methylgruppen durch Enzyme auf Nukleobasen an bestimmten Stellen innerhalb der DNA hervorgerufen. Die DNA-Methylierung findet beim Menschen nur an Cytosinen statt, die Teil eines CpG-Dinukleotids sind. Beim Prozess der DNA-Methylierung fungiert S-adenosyl-methionin als Methyl donor und hängt mit Hilfe eines Katalysators aus der Familie der DNA-Methyltransferasen (DNMTs) eine Methylgruppe (CH<sub>3</sub>) an den Cytosin-Ring. Das Hauptenzym DNMT1 ist verantwortlich für die post-replikative Wiederherstellung von teilweise methylierten Bereichen zur vollen Methylierung. Dieser Vorgang wird *maintenance* Methylierung genannt. DNMT3a und DNMT3b scheinen für die Methylierung neuer Bereiche verantwortlich zu sein, die sogenannte *de novo* Methylierung (Herman and Baylin, 2003; Shen and Issa, 2002; Laird, 2003). Promotoren bestehen zu 50-60% aus gewöhnlich unmethylierten CpG-Inseln (Bereiche mit vielen CpG-Dinukleotiden). Physiologisch wird die Methylierung bei der Inaktivierung eines weiblichen X-Chromosoms, bei der Regulierung der genetischen Prägung und bei der Inhibierung der Expression wiederholender Sequenzen beobachtet (Toyota and Issa, 2000). Aberrante Veränderungen der Cytosin-Methylierung finden sich in verschiedenen Neoplasien, dem fragilen X-Syndrom und in gealterten Zellen. Die Inaktivierung von Tumorsuppressorgen durch Methylierung stellt einen wichtigen Schritt in der Tumorgenese dar (Toyota et al., 1999a). Damit ist die DNA-

Methylierung neben der chromosomalen Instabilität (CIN) und der Mikrosatelliteninstabilität (MSI) ein weiterer Karzinogenesemechanismus mit hoher Relevanz für die Entstehung von kolorektalen Karzinomen (Lee et al., 2004; Kondo and Issa, 2004).

Kolorektale Tumore, die eine hohe Frequenz methylierter Gene aufweisen, werden als *CpG island methylator phenotype* (CIMP)-Tumoren bezeichnet. CIMP scheint ein frühes Ereignis in der Tumorgenese zu sein. CIMP+ kolorektale Karzinome kommen häufiger bei Frauen vor, zeigen eine schlechtere Differenzierung und sind häufiger in proximalen und fortgeschrittenen Karzinomen zu finden (Van Rijnsoever et al., 2002). Außerdem sind sie mit einer schlechteren Prognose assoziiert und ermöglichen eine unabhängige prädiktive Aussage zum Überlebensvorteil bei einer adjuvanten Chemotherapie (Ward et al., 2003; Van Rijnsoever et al., 2003).

Neben der regionalen Hypermethylierung bestimmter Gene wird auch eine globale Hypomethylierung in hyperplastischen Polypen, Adenomen und im kolorektalen Karzinom gefunden (Matsuzaki et al., 2005). Die Hypomethylierung ist, im Zusammenhang mit der Tumorgenese des kolorektalen Karzinoms, schon sehr früh beschrieben worden (Shen and Issa, 2002, Matsuzaki et al., 2005). Der genaue Mechanismus der Hypomethylierung ist noch nicht bekannt. Durch Hypomethylierung kann es zur Aktivierung von Protoonkogenen kommen und es scheint einen Zusammenhang mit der Entstehung von chromosomaler Instabilität zu bestehen (Matsuzaki et al., 2005). Die DNA-Hypomethylierung induziert eine signifikante Reorganisation von Heterochromatin. Eine mögliche Erklärung dieser Reorganisation ist, dass durch globale Hypomethylierung die molekulare Anordnung von Heterochromatin und die Chromatinkonformation beeinflusst werden und mit Hilfe der Destabilisation LOH gefördert wird. Eine weitere Theorie ist, dass die Hypomethylierung durch DNMT3b-Mutation eine karyotypische Instabilität bewirken könnte, wie für das ICF-Syndrom (immunodeficiency, centromeric instability) beschrieben (Kondo and Issa, 2004). Beobachtet werden in Tumoren einerseits eine karzinomgebundene, globale DNA-Hypomethylierung, die einer Reduzierung von Satelliten-DNA-Methylierung zugeordnet werden kann, andererseits einzelne hypomethylierte kopierte Sequenzen. Der Zusammenhang zwischen Hypermethylierung und Hypomethylierung ist bis heute nicht geklärt. Wurden Hypomethylierung und Hypermethylierung untersucht, wurde beides in denselben Tumoren gefunden. Außerdem scheint Hypermethylierung auch eine Reaktion auf Hypomethylierung zu sein. Eine DNA-Sequenz kann innerhalb derselben Region gleichzeitig einer karzinom-assoziierten Demethylierung und einer *de novo*-Methylierung unterliegen (Ehrlich et al., 2006).

Eine Regulationsmöglichkeit der Nukleosome, ein Komplex aus DNA und Histon-Proteinen, ist die Acetylierung und die Methylierung im Bereich des N-terminalen Endes der Histone. (Kondo and Issa, 2004; Bird and Wolffe, 1999). Dieser Bereich ist während der Transkription der Gene acetyliert, bei hypermethylierten inaktiven Genen

jedoch deacetyliert. Die Methylierung der Histone kann sowohl Inaktivierung, als auch Aktivierung der Gene bewirken. DNA-Methylierung und Histonmodifikation interagieren in manchen Tumorsuppressorgenen miteinander. Gemeinsam können die Mechanismen Geninaktivierung erreichen und erhalten. Diese Verbindung wird vermittelt durch DNA-Bindungsproteine wie z.B. MeCP2 und MBD1. Diese Proteine, lokalisiert in methylierten Promotoren, erneuern Proteinkomplexe, welche Histondeacetylase und Histonmethylase enthalten (Kondo und Issa, 2004; Bird and Wolffe, 1999).

Eine Hypermethylierung von CpG-Inseln bei Lungenkrebs und Lymphomen wurde erstmals 1986 im Calcitonin Gen auf Chromosom 11p entdeckt. Eine Hypermethylierung im Promoter des Retinoblastom Gens wurde beim Retinoblastom 1989 entdeckt (Herman, 1999). Seitdem wurde bei zahlreichen weiteren Tumorsuppressorgenen eine Inaktivierung durch Methylierung beschrieben, hierzu zählen hMLH1 im Kolon, CDH1 im Magen, VHL in der Niere, BRCA1 in der Mamma und p16<sup>INK4A</sup> in Kolon, Lunge und Mamma (Toyota and Issa, 2005). Speziell im kolorektalen Karzinom führt z.B. die durch Methylierung erreichte Inaktivierung des zyklinabhängigen Kinaseinhibitors p16<sup>INK4A</sup> zur Inhibierung der Zellzyklusregulation und bietet den betroffenen Zellen vermutlich einen Wachstumsvorteil (Herman et al., 1995). Andere Tumorsuppressorgene wie ARF sind ebenso ein Ziel der Inaktivierung durch DNA-Methylierung (Robertson and Jones, 1998). Das Genprodukt p14<sup>ARF</sup> aktiviert p53 durch Interaktionen mit MDM2, dadurch beeinflusst der Verlust von p14<sup>ARF</sup> negativ die Funktion von p53 (Sherr, 2001). In einer Studie wurde nachgewiesen, dass im kolorektalen Karzinom die Methylierung des Gens ARF mit einer Mikrosatelliteninstabilität und dem Fehlen einer p53-Mutation assoziiert ist. Dies erklärt wahrscheinlich den Mangel an p53-Mutationen bei gleichzeitiger Mikrosatelliteninstabilität im kolorektalen Karzinom (Shen et al., 2003). Inaktivierung durch Methylierung wurde ebenso bei den DNA-Reparaturgenen wie hMLH1 (Kane et al., 1997) und MGMT (Costello et al., 1994) gefunden. Das Gen APC, welches bei der FAP (familiäre adenomatöse polyposis coli) mutiert ist, ist ebenfalls Ziel der DNA-Methylierung (Esteller et al., 2000a). Auch Gene wie HPP1/TPEF (Young et al., 2001; Liang et al., 2000), HLTF (Moinova et al., 2002) und andere sind Ziel der Promotermethylierung beim kolorektalen Karzinom. Mögliche Onkogene wie COX2 (Toyota et al., 2000) und hTERT (Devereux et al., 1999) werden außerdem durch aberrante DNA-Methylierung beeinflusst. Das Übergewicht der Methylierung der Tumorsuppressorgene bei der Neoplasie resultiert wahrscheinlich aus der Positivselektion der Methylierung der Tumorsuppressorgene und der Negativselektion der Methylierung der Onkogene (Kondo and Issa, 2004).

### 1.2.2 Detektion von Tumormarkern in Körperflüssigkeiten

Freie DNA kann z.B. aus Serum/Plasma, Stuhl, Urin und Speichel/Sputum isoliert werden (Sidransky, 2002). Die veränderte DNA sämtlicher gastrointestinaler Tumore wird mit dem Stuhl ausgeschieden (Ahlquist et al., 2000) und damit steht die Stuhl-

DNA für genetische Tests zur Verfügung. Imperiale et al. führten eine große Studie mit über 2.500 Patienten durch und verglichen den Hämoccult-Test (FOBT), den einzig nicht-invasiven Test der Klinik, mit einem fäkalen DNA-Test. Der Test detektierte im Stuhl Mutationen von APC, p53, Kras und BAT26. Invasive Karzinome wurden mit Hilfe des FOBTs bis zu 12,9% detektiert und mit dem fäkalen DNA-Test 51,6% (Imperiale et al., 2004).

Neuerdings lassen sich auch epigenetische Marker wie die aberrante DNA-Methylierung nicht nur im Tumorgewebe selbst, sondern auch in freier DNA von Körperflüssigkeiten nachweisen (Johnson and Lo, 2002). Im Stuhl von Patienten mit kolorektalem Karzinom ließen sich bereits Methylierungen von z.B. HPP1, p16<sup>INK4A</sup>, HIC1, MLH1, SFRP und APC nachweisen (Belshaw et al., 2004; Müller et al., 2004; Lenhard et al. 2005). Petko et al. detektierte Methylierungen der Gene DCKN2A, MGMT, und MLH1 im Stuhl von Patienten mit diagnostizierten sporadischen Polypen des Kolons (Petko et al., 2005). Im Sputum von Patienten mit Lungenkrebs konnte das Karzinom bei Rauchern bis zu drei Jahre im Voraus diagnostiziert werden (Herman and Baylin, 2003). Im Serum von Patienten mit kolorektalen Karzinomen konnte eine Methylierung von p16, APC und hMLH1 (Grady et al., 2001, Ito et al., 2002) detektiert werden. Leung et al. untersuchten quantitativ die Hypermethylierung der Gene APC, hMLH1 und HLTF. Sie fanden bei Patienten mit UICC-Stadium III/IV eine höhere Konzentration methylierter DNA und bei Patienten mit fortgeschrittenen Karzinomen eine höhere Methylierungsfrequenz (Leung et al., 2005).

Die Vorteile der Messung der DNA-Methylierung sind z.B. die Stabilität der DNA-Moleküle über Jahre, die Bestimmung eines absoluten Referenzbereichs, das qualitative und quantitative Differieren und die Universalität der Methylierung bestimmter Marker. (Laird, 2003). Eine DNA-Methylierung zeigt vielversprechende Ansätze für die Therapieauswahl und die Diagnostik von Karzinomen. Die Methylierung ist ein frühes Ereignis der Karzinogenese. Dadurch ist eine frühzeitige Erkennung von Tumoren möglich und folgend auch eine höhere Überlebenschancen. Bei einigen Tumoren mit schlechteren Prognosen, späten Symptomen und hohen Mortalitätsraten wie Pulmo-, Ovar- und Pankreaskarzinom ist der Zeitpunkt der Diagnose extrem entscheidend für das Überleben der Patienten (Laird, 2003).

Studien an vielen Karzinomen (z.B. Ösophaguskarzinom, Blasenkrebs, Kopf/Hals Tumor, Ovarialkarzinom, Zervixkarzinom, Bronchialkarzinom, Akute Lymphatische Leukämie) zeigten, dass Patienten mit Hypermethylierungen der Tumorsuppressorgene eine schlechtere Prognose haben. Zum Beispiel konnte im frühen Stadium des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms die Methylierung von DAPK, p16<sup>INK4A</sup>, MGMT, IGFBP3 mit einer negativen prognostischen Signifikanz gefunden werden (Issa, 2003). Müller et al. wiesen im Serum von Patienten mit Mammakarzinom Methylierungen der Gene ESR1, APC, HSD17B4, HIC1 und RASSF1A nach. Waren die Gene RASSF1A und/oder APC schon präoperativ methyliert, zeigte sich eine schlechtere Prognose für die Patientinnen (Müller et al., 2003). Fiegl et al. stellten fest, dass Mammakarzinom-

patientinnen nach einem Jahr Behandlung mit Tamoxifen mit einer Methylierung des RASSF1A Gens im Serum ein höheres Risiko hatten an einem Rezidiv zu erkranken oder zu versterben. Somit könnte die Methylierung der Tumorsuppressorgene im Serum sogar zur Testung des Therapieansprechens verwendet werden (Fiegl et al., 2005). Im Serum von Patientinnen mit Zervixkarzinom wurden 83% der Gene CALCA, hTERT, MYOD1, PGR und TMP3 methyliert gefunden. Eine positive Methylierung des Gens MYOD1 ging mit einer schlechteren Prognose einher (Widschwendter et al., 2004).

Es wird postuliert, dass mit einem Panel von Markern der DNA-Methylierung die Möglichkeit gegeben ist, in Zukunft ein Werkzeug zur Risikoabwägung, zur frühzeitigen Detektion, zur molekularen Diagnostik von resezierten Patientenproben, zu Chemotherapieempfehlungen und zum Monitoring des Rezidiv zu haben (Laird, 2003). Damit ein Tumormarker allerdings für das Screening, zur Diagnostik, dem Monitoren der Therapie und der Detektion eines Rezidivs geeignet ist, muss er tumorspezifisch sein, quantitativ die Tumorgöße beschreiben und in so einer großen Menge ausgeschüttet werden, dass kleinste Tumore detektierbar sind. Damit der Marker in der Klinik angewandt werden kann, muss er hoch sensitiv und hoch spezifisch sein. Außerdem muss eine Standardisierung der Probensammlung, der DNA-Isolation, der DNA-Modifikation, der Untersuchung, der Testwiederholbarkeit (Intraassay und Interassay Variabilität), der Sensitivität und Spezifität und der Effizienz bei Vergleich mit schon etablierten Tumormarkern erfolgen (Widschwendter and Menon, 2006).

### 1.3 Ziele der Arbeit

Das kolorektale Karzinom ist eines der häufigsten Malignome weltweit. Methylierte DNA, mit Ursprung des kolorektalen Karzinoms, lässt sich nicht nur im Tumor selbst, sondern ebenfalls im Serum und Stuhl der Patienten detektieren. Tumormarker, die sich in Körperflüssigkeiten nachweisen lassen und eine Aussage zum Screening, Stadium, Therapieansprechen und Prognose erlauben, könnten die Diagnostik erheblich vereinfachen. Da erst wenige Daten zur prognostischen Relevanz methylierter DNA im Serum vorliegen, wurde das prognostische Potential der DNA-Hypermethylierung im prätherapeutischen Serum von Patienten mit kolorektalem Karzinom untersucht.

Es werden folgende Themen bearbeitet:

1. Zur Identifikation geeigneter epigenetischer Marker werden zwölf Gene im Serum von Patienten mit kolorektalem Karzinom untersucht.
2. Die Ergebnisse werden statistisch quantitativ und qualitativ mit den etablierten Prognosefaktoren Tumorstadium, Nodalstatus, Metastasenstatus, UICC-System, histologischem Grading und CEA korreliert.
3. Die vielversprechendsten Gene werden auf ihre prognostische Relevanz für Gesamtüberleben und Rezidivrisiko hin untersucht.

## 2 Methoden und Material

### 2.1 Patienten und Serumproben

Das Gen-Evaluierungsset besteht aus 38 Patienten mit neu diagnostiziertem sporadischem kolorektalem Karzinom, 24 waren mit M<sub>0</sub> (Alter: 34-87 Jahre, Median: 67 Jahre) und 14 mit M<sub>1</sub> (Alter: 33-72 Jahre, Median: 62 Jahre) klassifiziert. Ebenfalls wurden 20 Patienten (Alter: 23-81 Jahre, Median: 58 Jahre) mit normalem kolorektalen Befund und keinem bekannten Malignom eingeschlossen. Es gab weder einen statistischen Unterschied zwischen dem mittleren Alter der Kontrollen und den M<sub>0</sub> Patienten ( $P = 0,282$ ), noch zwischen den M<sub>0</sub> und M<sub>1</sub> Patienten ( $P = 0,263$ ) und auch nicht zwischen den M<sub>1</sub> und den Kontrollpatienten ( $P = 0,261$ ).

Das Testset schließt 104 Patienten mit diagnostiziertem kolorektalem Karzinom in den Jahren 1991 bis 1997 ein. Die Patienten wurden im Universitätsklinikum Großhadern, München und der Maria-Teresia Klinik, München operiert (Alter: 33-92 Jahre, Median: 68 Jahre). Es gab keine statistische Differenz zwischen dem mittleren Alter des Gen-Evaluierungssets und dem Testset ( $P = 0,097$ ). Für 77 Patienten stand der klinische Verlauf der 5 folgenden Jahre zur Verfügung. Die statistischen Berechnungen zu den klinisch-pathologischen Daten des Gen-Evaluierungssets und des Testsets im Vergleich sind in Tabelle 2.1 aufgeführt. Bei jedem Patienten wurde Blut mit einem EDTA-Röhrchen vor der Therapie abgenommen. Das Blut wurde anschließend für 10 Minuten zentrifugiert (3300 U/min; *Zentrifuge: Hettich, Rotanda/S, Rotor: 5084*) und der Überstand abpipettiert. Dieser wurde bei  $-80^{\circ}\text{C}$  in Cryoröhrchen bis zur weiteren Bearbeitung eingefroren.

Tabelle 2.1: Klinik/Pathologie des Gen-Evaluierungssets und Testsets

Klinik/Pathologie	Gen-Evaluierungsset (N=38) %	Testset (N=104) %	P*
Geschlecht			0.117
Männlich	68	56	
Weiblich	32	44	
Tumorgröße <sup>^</sup>			0.631
T1	5	8	
T2	5	12	
T3	69	68	
T4	21	12	
Lymphknoten Status <sup>^</sup>			0,912
N0	40	52	
N1	60	48	



Klinik/Pathologie	Gen-Evaluierungsset (N=38) %	Testset (N=104) %	P*
Fernmetastasen <sup>^</sup>			0,675
M0	63	83	
M1	37	17	
Lokalisation <sup>+^</sup>			0,739
Rechts <sup>~</sup>	38	24	
Links <sup>#</sup>	62	76	
Kolon	63	58	0,108
Rektum	38	42	
Grading			0,504
G1	3	3	
G2	44	52	
G3 <sup>§</sup>	53	45	
UICC Stadium			0,196
I (T1-T2,N0)	10	14	
II (T3-T4,N0)	21	33	
III (T1-4,N1)	32	36	
IV (T1-4,N0-1,M1)	37	17	
*P- Werte zum Vergleich der Patienten wurden mit dem $\chi^2$ -Test berechnet.			
<sup>+</sup> Für einen Patienten im Gen-Evaluierungsset war die Tumorlokalisierung unbekannt.			
<sup>^</sup> Für einen Patienten im Testset war die Tumorlokalisierung und die Information zum TNM-Stadium nicht verfügbar.			
<sup>~</sup> Rechtes Kolon beinhaltet das Zökum bis zum Kolon transversum.			
<sup>#</sup> Linkes Kolon beinhaltet das Kolon descendens bis zum Rektum.			
<sup>§</sup> G3 beinhaltet alle Fälle, die mit G3 und G2-3 klassifiziert wurden.			

## 2.2 Isolation genomischer DNA aus Serum

Mit dem QIAmp®DNA BLOOD Mini Kit (Qiagen, Hilden) wurde reine genomische DNA eluiert. Die Qiagen Protease (20 µl) wurde zu 1000 µl Serum gegeben, mit 1000 µl AL Puffer aufgefüllt und kurz gevortext. Es folgte eine Inkubation von 10 Minuten bei 56°C. Nach einer kurzen Zentrifugation wurden 2000 µl Ethanol zugefügt und die Proben auf die Säulen pipettiert. Durch diesen Schritt wird die DNA auf einer Silica-Gel Membran gebunden. Mit Zugabe von jeweils 500 µl AW1 und AW2 Puffer und einer nach jedem Schritt durchgeführten Zentrifugation wird die DNA gewaschen und in 200 µl AE Puffer eluiert. Die DNA kann bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert werden.

## 2.3 Isolation genomischer DNA aus peripheren Leukozyten

EDTA-Blut (9 ml) wurde mit eiskühlem Ery-Lysepuffer (41 ml) versetzt. Anschließend erfolgte unter mehrmaligem Mischen eine 15-minütige Inkubation auf Eis, bis eine vollständige Lyse eintrat. Folgend wurden die Proben 10 Minuten zentrifugiert (1000 U/min, 4°C; Zentrifuge: Eppendorf 5417R, Rotor: FA45-30-11), der Überstand verworfen und das Pellet in Ery-Lysepuffer (30 ml) resuspendiert. Nach einer weiteren Inkubation auf Eis (15 Minuten) erfolgte nochmals eine Zentrifugation (2000 U/min, 4°C; Eppendorf 5417R) und anschließend eine Aufnahme des Pellets in 5 ml SE-Puffer. Im Folgenden wurde 25 µl Proteinase (10 mg/ml) und 250 µl SDS (20%)

zugegeben und die Mischung der Reagenzien über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag konnten die Proteine mit NaCl (2 ml einer 5 M-Lösung) gefällt und die Proben gevortext und zentrifugiert werden (2500 U/min, RT, 10 min; *Eppendorf 5417R*). Der klare Überstand wurde vorsichtig über eine sterile Gaze in ein neues Gefäß gegossen (Gaze eventuell auswringen) und anschließend durch Zugabe des doppelten Volumens (70 ml) (absolut Ethanol, -20°C) gefällt. Die DNA musste nochmals 20 min (14000 U/min, 4°C; *Eppendorf 5417R*) zentrifugiert und mit Ethanol (70%) gewaschen werden. Zum Schluss wurde nochmals zentrifugiert (10 min bei 14000U/min, 4°C; *Eppendorf 5417R*), die Flüssigkeit pipettiert, das Pellet getrocknet und in 200 µl TE Puffer resuspendiert. Die photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte bei 260 nm durch Messung der optischen Dichte.

## 2.4 Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA in einer wässrigen Lösung wird durch die Messung der Absorption bestimmt. Die durch eine Lösung absorbierte Lichtmenge wird mit einem Spektralphotometer gemessen. Die Nukleinsäuren weisen bei der Wellenlänge von 260 nm ein Absorptionsmaximum auf. Eine  $OD_{260}$  von 1 entspricht 50 µg/µl doppelsträngiger und 40 µg/µl einzelsträngiger DNA

Konzentration der doppelsträngigen DNA (µg/ml) =  $OD_{260} \times 50 \times \text{Verdünnung}$

Konzentration der einzelsträngigen DNA (µg/ml) =  $OD_{260} \times 40 \times \text{Verdünnung}$

Ein weiteres Absorptionsmaximum bei 280 nm weist auf die Anwesenheit von Proteinen hin. Durch den Quotienten der Absorptionskoeffizienten von 260 nm und 280 nm kann eine Aussage über die Reinheit der DNA-Isolation getroffen werden. Liegt der Quotient zwischen 1,8 und 1,9 ist DNA praktisch rein. Sind die Werte niedriger, kann von einer Verunreinigung mit Proteinen ausgegangen werden, sind die Werte höher, deutet dies auf eine Anwesenheit von RNA oder eine Denaturierung der DNA hin.

## 2.5 Ethanol-Präzipitation

Mit Hilfe der Ethanol-Präzipitation wurde die Serum-DNA konzentriert. Es wurde zu 200 µl Serum-DNA, 1 µl Glycogen, 133 µl 10 M Ammoniumacetat und 3 Volumina (1000µl) absolutes Ethanol gegeben. Die Proben wurden bei -80°C 2 Stunden gefällt, die ausgefallene DNA für 45 Minuten zentrifugiert (14000 U/min, 4°C; *Eppendorf 5417R*) und mit 70% Ethanol gewaschen. Danach wurden nochmals die Proben für 15 Minuten zentrifugiert, das Pellet getrocknet und in 30 µl 1mM TrisHCl bei pH 8,0 gelöst. Die Lagerung der DNA ist bei -20°C möglich.

## 2.6 Methylierung von DNA mit SSS1 (CpG-Methylase)

Zur Etablierung der quantitativen Messung von methylierter DNA, wurde Leukozyten- und Serum-DNA eines gesunden Probanden mit CpG-Methylase behandelt. Die CpG-

Methylase bewirkt eine Umwandlung der genomischen DNA in methylierte DNA. Für einen Reaktionsansatz von 20  $\mu\text{l}$  wurde 1  $\mu\text{g}$  DNA mit 1  $\mu\text{l}$  (4000U/ml) SSSI versetzt. Dazugegeben wurden 2  $\mu\text{l}$  1x NEB2-Puffer und 1  $\mu\text{l}$  160  $\mu\text{M}$  S-adenosylmethionin und die entsprechende Menge  $\text{H}_2\text{O}$ . Der Reaktionsansatz wurde bei 37°C 1 Stunde inkubiert und die DNA bei -20 °C eingefroren.

## 2.7 Agarose-Gelelektrophorese

In der Gelelektrophorese können doppelsträngige sowie einzelsträngige Nukleinsäurefragmente in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. Die Größe der in der Arbeit untersuchten PCR-Produkte lag zwischen 50 und 150 Basenpaaren. Zur Darstellung dieser DNA-Fragmentgrößen kam ein 3%iges Agarose-Gel zum Einsatz. Die DNA wurde zur Detektion mit Ethidiumbromid angefärbt.

## 2.8 Bisulfitbehandlung der genomischen DNA

Um methylierte CpG-Dinukleotide zu detektieren muss die DNA mit Natriumbisulfit behandelt werden. Natriumbisulfit kann an eine Doppelbindung des unmethylierten Cytosins binden und eine hydrolytische Desaminierung der Cytosin-Bisulfit Derivate zu Uracil-Bisulfit Derivaten bewirken. Zum Schluss wird die Sulfonatgruppe mit einer alkalischen Behandlung entfernt und Uracil entsteht (Clark et al., 1994). Bei diesem Vorgang wird das methylierte Cytosin der CpG-Dinukleotide (5-Methyl-Cytosin) nicht umgewandelt (Frommer et al., 1992). Durch die anschließende PCR zur Detektion wird das Uracil durch Thymin ersetzt.

ACG CCA GCT CGA CTT GCG (*unbehandelte, unmethylierte DNA*)



AUG UUA GUT UGA UTT GUG (*behandelte, unmethylierte DNA*)

Bild 2.1: Bisulfitbehandlung einer unmethylierten DNA

AC<sub>m</sub>G CCA GCT C<sub>m</sub>GA CTT GC<sub>m</sub>G (*unbehandelte, methylierte DNA*)



AC<sub>m</sub>G UUA GUT C<sub>m</sub>GA UTT GC<sub>m</sub>G (*behandelte, methylierte DNA*)

Bild 2.2: Bisulfitbehandlung einer methylierten DNA

Ein 50  $\mu\text{l}$  Ansatz bestehend aus 1  $\mu\text{g}$  genomischer DNA, 2  $\mu\text{l}$  (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) Lachssperma DNA, die als Trägersubstanz fungiert, und der entsprechenden Menge Aqua bidest wurde alkalisch mit 5,5  $\mu\text{l}$  einer 2 M NaOH-Lösung denaturiert und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Um die Desaminierung der DNA zu erreichen wurden 30  $\mu\text{l}$  einer 10 M Hydrochinon-Lösung und 520  $\mu\text{l}$  einer 3 M Natriumbisulfit-Lösung mit pH 5,1 zugegeben und dann 16 Stunden bei 55°C inkubiert. Hydrochinon und Natriumbisulfit müssen direkt vor der Verwendung frisch angesetzt werden. Die umgewandelte DNA

wurde mit Hilfe des *Wizard DNA Clean-Up Systems (Promega, Mannheim)* laut Handbuch aufgereinigt, entsalzt und in 50  $\mu\text{l}$  70°C warmen Aqua bidest eluiert. Mit 5,5  $\mu\text{l}$  einer 3 M NaOH-Lösung und einer Inkubation von fünf Minuten bei Raumtemperatur wurde eine vollständige Denaturierung erreicht. Um eine Neutralisierung zu erreichen, müssen 33  $\mu\text{l}$  einer 10 M  $\text{NH}_4\text{Ac}$ -Lösung zugegeben, eine Ethanolpräzipitation mit 1  $\mu\text{l}$  Glycogen und 270  $\mu\text{l}$  Ethanol durchgeführt werden und zum Schluss die Proben für 2 Stunden bei -80°C gefällt werden. Direkt danach wurde die DNA bei 4°C und 14000 U/min (*Eppendorf 5417R*) 45 Minuten zentrifugiert. Nach dem Waschen mit 1 ml Ethanol (70%) wurde erneut 15 Minuten zentrifugiert, das Pellet getrocknet und in 30  $\mu\text{l}$  1mM TrisHCl mit pH 8,0 resuspendiert. Nach dem Aufteilen der Proben in 3 x 10  $\mu\text{l}$  wird die DNA bei -80°C gelagert. Die DNA liegt jetzt einzelsträngig vor und ist sehr instabil. Die beiden Stränge der ehemaligen Doppelhelix sind nicht mehr komplementär zueinander. Bei diesem Verfahren degradieren 84 – 96% der DNA (Grunau et al., 2001). Um die bisulfitbehandelte DNA nicht weiter zu denaturieren, sollte vermehrtes Einfrieren, Pipettieren und Vortexen vermieden werden.

## 2.9 Konventionelle Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um Unterschiede der Reaktionsansätze zu verhindern wurde zuerst ein Mastermix mit 20  $\mu\text{l}$  pro Ansatz angefertigt. Dieser Mastermix enthält die für die PCR notwendigen Reagenzien, die DNA ausgenommen (siehe Tabelle 2.2). Das Wasser zur Negativkontrolle und die DNA wurden erst nach dem Aliquotieren des Mastermixes direkt in die Reaktionsgefäße gegeben. Zur Aktivierung der Hot Star Taq (*Qiagen, Hilden*) wurde im ersten Schritt des PCR-Zyklus eine Temperatur von 95°C für 15 Minuten gewählt, gefolgt von der Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 94°C für 30s. Während des Inkubationsschrittes bei 60°C für 2 Minuten findet das Annealen der Primer und die Elongation der PCR-Produkte statt. Es wurden 40 Zyklen für die Vervielfältigung der DNA gewählt. Am Ende der gesamten Zyklen fand eine Abkühlung bei 25°C für 1 Minute statt. Bei 4°C können die Proben gelagert werden. Die Kontrolle erfolgt über eine Agarose-Gelelektrophorese.

Tabelle 2.2: Konzentration der Reagenzien für die konventionelle PCR (20  $\mu\text{l}$  Ansatz)

Reagenz	Konzentration Ausgangsmenge	Menge pro Ansatz	Konzentration Reaktion
Polymerase-Puffer (15 mM $\text{MgCl}_2$ )	10 x	2 $\mu\text{l}$	1 x
$\text{MgCl}_2$ -Lösung	25 mM	2 $\mu\text{l}$	2,5 mM
Q-Solution	5 x	4 $\mu\text{l}$	1x
DNTP	10 mM	0,5 $\mu\text{l}$	0,25 mM
Sense Primer	10 $\mu\text{M}$	2 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{M}$
Antisense Primer	10 $\mu\text{M}$	2 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{M}$
$\text{H}_2\text{O}$	-	5,3 $\mu\text{l}$	-
Hot Star Taq	5 U/ $\mu\text{l}$	0,2 $\mu\text{l}$	1 U (0,05 U/ $\mu\text{l}$ )
DNA	-	2 $\mu\text{l}$	-

Tabelle 2.3: Protokoll der konventionellen PCR

Schritt	Anzahl Zyklen	Temperatur	Dauer in Sekunden	Funktion
Denaturierung	1	95°C	900	Aktivierung der Hot Star Taq, Denaturierung
Amplifikation	40	94°C	30	Denaturierung
		60°C	60	Hybridisierung der Primer
		60°C	60	Elongation
Abkühlen	1	25°C	60	Abkühlen der Proben
Aufbewahren	1	4°C	bis zur weiteren Bearbeitung	

## 2.10 Echtzeit quantitative Polymerase-Kettenreaktion (QPCR)

Die Echtzeit quantitative PCR wird zur Messung der Menge (Anzahl) von DNA-Molekülen in einer Probe eingesetzt. Durch Zugabe eines interkalierenden Farbstoffes zur PCR-Reaktionslösung kann die Menge an neu synthetisierter DNA (PCR-Produkten) gemessen werden. Bei dem Prinzip des TaqMan®-Ansatzes wird ein Oligonukleotid verwendet, das einem Abschnitt der zu amplifizierenden DNA-Sequenz entspricht. Die 5'-Position ist mit einem Fluoreszenz-Reporter-Farbstoff (6FAM=5,6 Carboxy-fluoreszein) gekennzeichnet. An das 3'-Ende der Sequenz ist ein „Quenching-Molekül“ (TAMRA = Tetramethyl-Ce-Carboxyrhodamin) angehängt. Das Emissionsspektrum des Reporters überlappt mit dem Anregungsspektrum des Quenchers. Da die Sequenz der Oligonukleotide relativ kurz ist, kommt es zum Energietransfer zwischen den Molekülen. Durch diesen endogenen Energietransfer wird ein Elektron des Reporters durch Lichtanregung einer bestimmten Wellenlänge auf ein höheres Energieniveau gehoben, fällt aber direkt wieder auf ein niedrigeres Energieniveau und überträgt dabei die Fluoreszenzenergie auf den Quencher. So wird der Quencher in einen energetisch höheren Zustand versetzt und die Energiedifferenz wird als Wärmestrahlung an die Umgebung abgegeben. So lange dieser Energietransfer stattfindet, ist keine Fluoreszenz sichtbar. Während der Annealing-Phase der PCR-Reaktion hybridisiert die Sonde gleichzeitig mit den Primern auf die DNA-Zielsequenz. Die Sequenz der Sonde wird so gewählt, dass sie genau zwischen den beiden Primer-Sequenzen liegt. Verlängert die Taq-DNA-Polymerase die Primersequenz, trifft sie auf die Sonde und baut sie mit Hilfe ihrer enzymatischen Exonukleaseaktivität ab. Der Reporter wird vom Quencher getrennt. Es findet kein Energietransfer mehr statt und somit kann die Reporterfluoreszenz gemessen werden (Eads et al., 1999).

Der Ansatz des Mastermixes für die PCR-Reaktion ist unter Kapitel 2.9 beschrieben worden. Die quantitative PCR benötigt zusätzlich noch die spezifische TaqMan®-Sonde (250nM) (siehe Tabelle 2.4). Bei jedem PCR-Zyklus wurde während der Elongation noch ein Schritt hinzugefügt, um die Fluoreszenz zu messen (20 Sekunden bei 84°C). In der exponentiellen Phase erfolgt eine Verdopplung der PCR-Produktmenge. Deshalb kann in dieser Phase die DNA-Konzentration einer Probe durch Vergleich mit einer

Referenz oder einer Standardkurve aus der Zykluszahl abgeleitet werden. Durch die Erstellung einer Standardkurve und der Normierung der Werte auf das Referenzgen  $\beta$ -Aktin (ACTB) konnte für jedes untersuchte Gen der DNA-Gehalt quantifiziert werden.

*Prozent der vollständig methylierten Moleküle (PMR) eines bestimmten Bereichs = Gen/ACTB (Probe)//Gen/ACTB (Standard) \*100.*

Die Untersuchungen wurden mit dem Echtzeit QPCR-Gerät *Rotor-Gene RG 3000* (Corbett Research, Sydney, Australia) durchgeführt.

Tabelle 2.4: Konzentration der Reagenzien für die quantitative PCR (20  $\mu$ l Ansatz)

Reagenz	Konzentration Ausgangsmenge	Menge pro Ansatz	Konzentration Reaktion
Polymerase-Puffer (15 mM MgCl <sub>2</sub> )	10 x	2 $\mu$ l	1 x
MgCl <sub>2</sub> -Lösung	25mM	2 $\mu$ l	1,25 mM
Q-Solution	5 x	4 $\mu$ l	1x
DNTP	10 mM	0,5 $\mu$ l	0,25 mM
Primer Forward	900 nM	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l HIC for + 20 $\mu$ l H <sub>2</sub> O
Primer Reverse	900 nM	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l HIC rev + 20 $\mu$ l H <sub>2</sub> O
H <sub>2</sub> O	-	3,3 $\mu$ l	-
Probe	250 nM (1:40)	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l Probe + 78 $\mu$ l H <sub>2</sub> O
Hot Star Taq	5 U/ $\mu$ l	0,2 $\mu$ l	1 U (0,05 U/ $\mu$ l)
DNA	-	2 $\mu$ l	-

Tabelle 2.5: Protokoll der quantitativen PCR

Schritt	Anzahl Zyklen	Temperatur	Dauer in Sekunden	Funktion
Denaturierung	1	95°C	900	Aktivierung der Hot Star Taq, Denaturierung
		94°C	30	Denaturierung
Amplifikation	40	60°C	60	Hybridisierung der Primer
		60°C	60	Elongation
Fluoreszenz	1	84°C	20	Messung
Abkühlen	1	25°C	60	Abkühlen der Proben

## 2.11 Methylierungsspezifische Polymerase-Kettenreaktion (MSP)

Die methylierungsspezifische PCR (MSP), entwickelt von Herman et al., besteht aus zwei Schritten (Herman et al., 1996). Zuerst wurde die unter Kapitel 2.8 beschriebene Bisulfitbehandlung durchgeführt und anschließend entweder eine konventionelle (MSP) oder eine Echtzeit QPCR mit SybrGreen oder spezifischen TaqMan-Sonden (MethyLight) durchgeführt. Die Sequenzen der Primer und Sonden müssen komplementär an die behandelte und umgewandelte DNA binden. Um methylierte DNA-Bereiche zu detektieren, müssen in der Sequenz der Primer CpG-Dinukleotide enthalten sein. Im Promoterbereich der Gene liegen die meisten CpG Dinukleotide,

daher wird der Promoter als bevorzugter Bereich zur Auswahl der Primer gewählt. In der Sequenz des Sense-Primers müssen die Cytosin-Basen, die nicht im Bereich eines CpG-Dinukleotid liegen, durch Thymin-Basen ersetzt werden. In der Anti-Sense-Primer-Sequenz werden alle Guanin-Basen durch Adenin-Basen ersetzt, wieder mit Ausnahme der CpG-Dinukleotide. Liegt eine Methylierung der CpG-Dinukleotide vor, werden diese Cytosin-Basen vor der Umwandlung durch Natriumbisulfit geschützt und der Primer kann an die einzelsträngige DNA binden. Falls kein Signal sichtbar wird, liegt die DNA unmethyliert vor.

## 2.12 Bestimmung der CEA Werte

Das Carcinoembryonale Antigen (CEA) wurde mit einem Mikropartikel Immuno-enzymometrischem Ansatz quantifiziert (*AxSYM, AbbottLaboratories, Chicago, IL*).

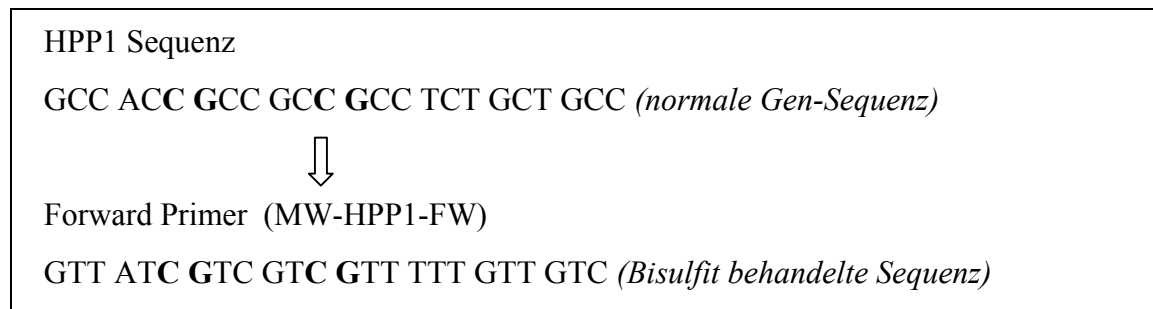
## 2.13 Statistik

Es wurde eine Deskription anhand skalenadäquater Maßzahlen vorgenommen. Die Interferenzanalysen wurden mit Hilfe folgender Verfahren durchgeführt: Bei der quantitativen Berechnung wurde zur Korrelation metrischer Werte der Test nach Spearman-Rho verwandt. Um Gruppenvergleiche metrischer Zielgrößen zu verwerthen, kam der Mann-Whitney-Test zur Anwendung. Der Kruskal-Wallis-Test wurde bei gleichwertigen metrischen Zielgrößen verwendet. Zur qualitativen Berechnung kam der Pearson's  $\chi^2$ -Test zur Exploration von Assoziationen zwischen klinisch-pathologischen Eigenschaften zum Einsatz. Das Überleben und die Rezidive der Patienten wurden vom Tag der Diagnose des Primärtumors bis zum Eintreten des Ereignisses beobachtet oder endeten mit einer Zeitspanne von 5 Jahren. Der Kaplan-Meier-Test wurde zur Auswertung der Überlebensanalysen angewandt. Die univariate Analyse des Überlebens wurde entsprechend der klinisch-pathologischen Daten und des Genmethylierungsstatus mit dem zweiseitigen Log-Rank-Test berechnet. Mit Hilfe der Cox-Regression wurde der prognostische Effekt der methylierten Gene und die Kontrolle der klassischen Risikofaktoren Tumorgröße, Lymphknotenstatus, Fernmetastasen und Alter bei der Diagnose geschätzt. Bei den multiplen Regressionen geht es um die Kontrolle von konfundierenden Variablen, d.h. die adäquate Berücksichtigung von Scheinkorrelationen durch Störgrößeneffekte. Bei multivariaten Analysen werden mehrere Variable simultan betrachtet. Bei allen Aussagen wurden  $P$ -Werte  $< 0,05$  als signifikant betrachtet. Alle Tests sind explorative Tests. Zur Auswertung wurde die SPSS-Software, Versionen 12.0, 13.0 und 14.0 (*SPSS Inc., Chicago, IL, USA*), verwendet.

## 2.14 Oligonukleotide

Zuerst wurden die Gensequenzen mit Hilfe des UCSC Genome Browsers gesucht und dann die zu amplifizierenden DNA-Sequenz mit Hilfe des Programms *Clonemanager5* (*Scientific & Educational Software*) spezifiziert. Nach Umwandlung des bestimmten

DNA-Abschnitts in die mit Bisulfit behandelte Sequenz, konnten mit dem Programm *Primer Express (Applied Biosystems 1.5a, 2001)* die Primer und die Sonden gestaltet werden.



*Bild 2.3: Umwandlung der ursprünglichen Gen-Sequenz in die Bisulfit behandelte Sequenz*

Die Primer und Sonden aufgelistet in der Tabelle 2.6 wurden von den Firmen *MWG Biotech (Ebersberg)* und *Metabion (Martinsried)* bezogen.



Tabelle 2.6: Sequenzen der Primer und Sonden

Gen	Chromosom	Genbank Nr.	Lokalisation nach Genbank Nr.	Lokalisation relativ zum Transkriptionsstart	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	Referenz	Sonden (5'-3')	Referenz
ACTB	7p22.1	Y00474	391 bis 522	-189 bis -58	TGG TGA TGG AGG AGG TTT AGT AAG T	AAC CAA TAA AAC CTA CTC CTC CCT TAA	Eads et al., 1999	6FAM - ACC ACC ACC CAA CAC ACA ATA ACA AAC ACA - TAMRA	Eads et al., 1999
APC	5q22	U02509	702 bis 799	-127 bis -29	TAT TGC GGA GTG CGG GTC	TCG ACG AAC TCC CGA CGA	Kang et al., 2002	6FAM - ATT ACA CAA CTA CTT CTC TCT CCG CTT - TAMRA	
HIC1	17p13.3	AJ40468 8	1929 bis 2110	-1308 bis -3911	GAA GTC GTG AAG TCG TTT GCG TAG	CTA CCA ACG ACC CCC GAA CGA		6FAM - CAA AAT CTC GAA CGC CCC CCG AA - TAMRA	
HLTF	3q24	Z46606	1076 bis 1171	-118 bis -23	CGGCGTTCGGAATTG TT	AAACGCCTCGACTCCC CTAA		6FAM - AGG AGG CGT ATC GAG GCG GTT CG - TAMRA	
hMLH1	3p22.3	U07418	131 bis 218	-671 bis -593	CGT TAT ATA TCG TTC GTA GTA TTC GTG TTT	CTA TCG CCG CCT CAT CGT	Geddert et al., 2004	6FAM - CGC GAC GTC AAA CGC CAC TAC G - TAMRA	Geddert et al., 2004
HPP1	2q32.3	AF24222 2	245 bis 332	-36 bis +49	GTT ATC GTC GTC GTT TTT GTT GTC	GAC TTC CGA AAA ACA CAA AAT CG	Geddert et al., 2004	6FAM - CCG AAC AAC GGA CTA CTA AAC ATC CCG CG - TAMRA	Geddert et al., 2004
p16	9p21.3	NM_000 077	362 bis 524	+149 bis +311	GGT TAT GAT GAT GGG TAG CGT TC	ACA ACA CCA CCA ACG TAT CCA A		6FAM - TAC GGC GCG GAG TTT AAT TGC GTC - TAMRA	
RASS F1A	3p21.2	AF13267 5	81 bis 176	+83 bis -178	GTG TTA ACG CGT TGC GTA TC	AAC CCC GCG AAC TAA AAA CGA	Kang et al., 2002	6FAM - ACC AAC TAC CGT ATA AAA TTA CAC GCG ATA - TAMRA	
SFRP1	8p12- p11.1	NM_003 012	1011 bis 1136	-299 bis -174	TGT AGT TTT CGG AGT TAG TGT CGC GC	CCT ACG ATC GAA AAC GAC GCG AAC G	Suzuki et al., 2004	6FAM - TTC GTC GTT TCG CGT TTT TTT GTT CG - TAMRA	
SFRP2	4q31.3	NM_003 013	620 bis 746	-621 bis -495	AAA ATA AGT TCG GGT TTC GGC GGT AC	CAA TAA ACG AAC AAA ACG CGA ACT ACG	Suzuki et al., 2004	6FAM - CGT TTT CGT TAG TAT TTG GTC GCG AGG TCG - TAMRA	
SFRP4	7p14.1	NM_003 014	811 bis 922	-190 bis -77	GGG TGA TGT TAT CGT TTT TGT ATC GAC	CCT CCC CTA ACG TAA ACT CGA AAC G	Suzuki et al., 2004	6FAM - CCT CGA CCG CCC CAC CCC CA - TAMRA	
SFRP5	10q24.3	NM_003 016	855 bis 990	-146 bis -190	AAG ATT TGG CGT TGG CG GGA CGT TC	ACT CCA ACC CGA ACC TCG CCG TAC G	Suzuki et al., 2004	6FAM - CCC TCA ACC CCT CCC GCA CCC TA - TAMRA	
WT1	11p13	X74840	1730 bis 1805	+379 bis -454	TTC GGG CGG TAT TTG GG	CCC GCG ACT CCT CCG		6FAM - AGT AAA TGG GTT TCG ACG TGC GGG AT - TAMRA	

## 2.15 Spezielle Lösungen

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma *Sigma (Missouri, USA)* bezogen.

Tabelle 2.7: *Spezielle Lösungen*

Lösung	Firma
Agarose (3%)	Peqlab
Ethanol (70%, absolut)	Merck
Glycogen	Invitrogen
Lachssperma-DNA	Invitrogen
DNTP Mix (10 mM)	Peqlab
DNase-, RNase freies H <sub>2</sub> O	Invitrogen
1kb Plus DNA Marker	Invitrogen
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Merck
Falcon-Röhrchen (50 ml, 10 ml)	Becton-Dickinson
Cryoröhrchen (3,6 ml)	Nunc
Verbandmull (Gaze)	Rauscher
CpGenome <sup>TM</sup> Universal Methylated DNA	Chemicon
CpG Methylase (M.SSSI)	NewEngland BioLabs
NEB2 Puffer	NewEngland BioLabs
S-adenosylmethionin (SAM)	NewEngland BioLabs
Hot Star Taq Kit	Qiagen
Wizard DNA-Clean-up System	Promega
Qiamp <sup>®</sup> DNABlood MiniKit	Qiagen

## 2.16 Lösungen und Puffer

Bromphenolblau-Ladepuffer:	0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol 30% Glycerin gelöst in Aqua bidest
Ery-Lysepuffer:	150 mM NH <sub>4</sub> Cl 10 mM KHCO <sub>3</sub> 2,5 mM EDTA

SE-Puffer:	pH 7,8 0,75 M NaCl 25 mM EDTA
TAE-Puffer:	pH 8 40 mM Trisma Base 2 mM Na <sub>2</sub> EDTA x 2 H <sub>2</sub> O
TE-Puffer:	10 mM Trisma Base 1 mM EDTA pH 7,4

### 2.17 Patientenmaterial

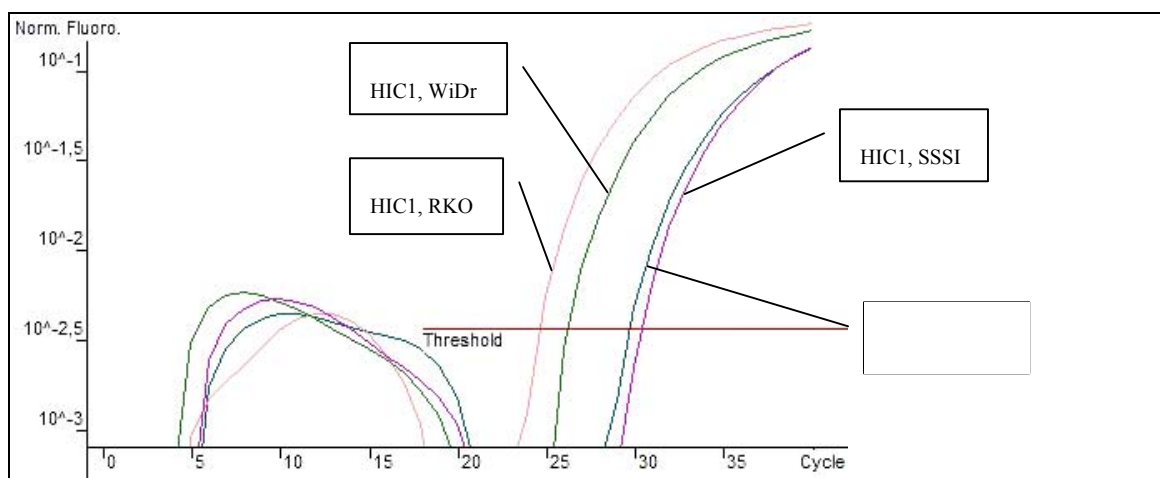
Die Patienten wurden vor der Blutentnahme über die Verwendung der Proben und den Hintergrund der Arbeit mündlich und schriftlich aufgeklärt. Mit der Unterschrift des Patienten wurde das Einverständnis dokumentiert. Es liegt für alle Patienten ein genauer Befund des Kolons vor. Ein Patient wurde als gesund bezeichnet, wenn bei der Koloskopie kein auffälliger Befund festgestellt wurde. Patienten mit kolorektalen Karzinomen wurden nur eingeschlossen, wenn noch keine Behandlung des Tumors stattgefunden hatte. Die Ethikkommission der LMU München genehmigte diese Untersuchungen mit dem Titel „Aufbau einer Probandenbank für die molekulare Diagnostik und das Screening gastrointestinaler Tumoren“ (Projektnummer 081/02).

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Nachweis von Methylierung

#### 3.1.1 Etablierung der Detektion

Die quantitative Analyse der DNA-Hypermethylierung wurde an kolorektalen Zelllinien und Serum-DNA etabliert. Stellvertretend für alle anderen Gene soll hier die Etablierung des HIC1 Gens dargestellt werden. Um zu überprüfen, ob die Methylierung des HIC1 Gens auch im Serum detektiert werden kann, wurde die DNA aus dem Serum eines gesunden Probanden extrahiert und mit SSSI behandelt. SSSI ist eine CpG-Methylase, durch die DNA praktisch vollständig methyliert wird. Die methylierte Serum-DNA und die kolorektalen Zelllinien wurden anschließend mit Natriumbisulfit behandelt. Natriumbisulfit bewirkt eine Umwandlung von nicht methyliertem Cytosin in Uracil. Bild 3.1 stellt die Methylierung des HIC1 Gens in den kolorektalen Zelllinien WiDr, RKO und LOVO sowie in der methylierten Serum-DNA dar. Die ebenfalls untersuchte unmethylierte, nur mit Bisulfit behandelten Serum-DNA eines gesunden Probanden sowie die Leerkontrolle blieben negativ.



*Bild 3.1: Etablierung des HIC1 Gens an den Zelllinien LOVO, RKO, WiDr und methylierter Serum-DNA. Das Serum einer gesunden Kontrolle wurde mit SSSI fast vollständig methyliert. Die Zelllinien und die methylierte Serum-DNA wurden mit Bisulfit vor der Analyse umgewandelt. Alle Zelllinien sowie die SSSI behandelte Serum-DNA waren methyliert. Die unmethylierte Serum-DNA und H<sub>2</sub>O blieben negativ.*

Zur Kontrolle der Bisulfitbehandlung und Quantifizierung der DNA wurde jede Serum-DNA der Patienten mit ACTB getestet. ACTB ist ein ubiquitär vorkommendes Gen und kann in jeder DNA nachgewiesen werden. Das Fehlen dieses Gens gilt somit als Nachweis für fehlende DNA. Bild 3.2 zeigt eine Analyse von ACTB und der Methylierung des Gens HIC1.

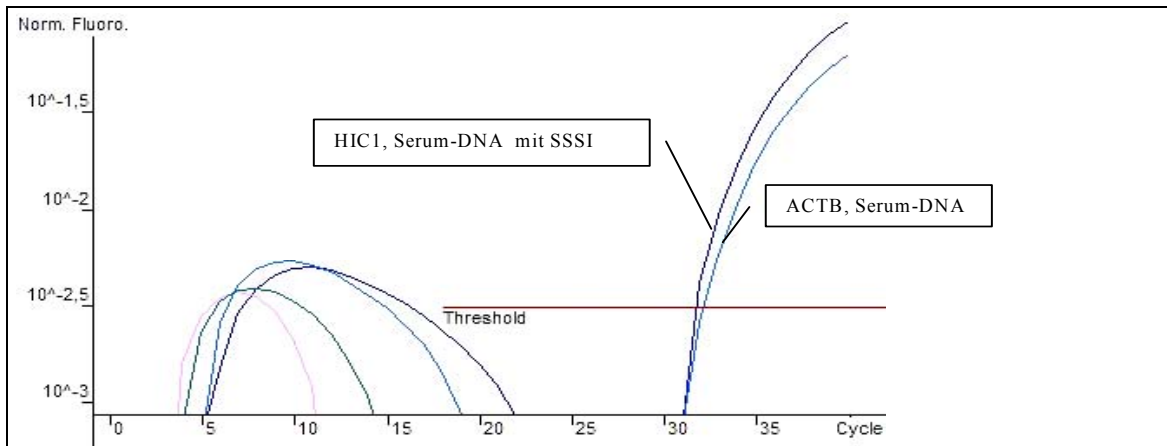


Bild 3.2: Es wurde die mit SSSI und mit Bisulfit behandelte Serum-DNA und die nur mit Bisulfit behandelte Serum-DNA auf eine HIC1 Methylierung getestet. Nur die SSSI behandelte Serum-DNA zeigte eine Methylierung des Gens HIC1. Die ACTB-Analyse der Serum-DNA kontrollierte die Existenz von DNA im Serum. Die unmethylierte Serum-DNA zeigte keine Methylierung. Ebenso blieb H<sub>2</sub>O negativ.

Der Nachweis der Methylierung von zwölf Genen wurde in der konventionellen und quantitativen PCR etabliert. Bild 3.3 zeigt Beispiele der Gene hMLH1, HLTF und ACTB. Getestet wurde, ob eine Methylierung der Gene in der Serum-DNA zu detektieren ist. Als methylierte Kontrolle diente die mit SSSI und dann mit Bisulfit behandelte Serum-DNA. Die mit Bisulfit behandelte Serum-DNA eines gesunden Probanden wurde zur Kontrolle von unmethylierter DNA verwendet. Das Gen ACTB war in methylierter wie in unmethylierter DNA vorhanden.

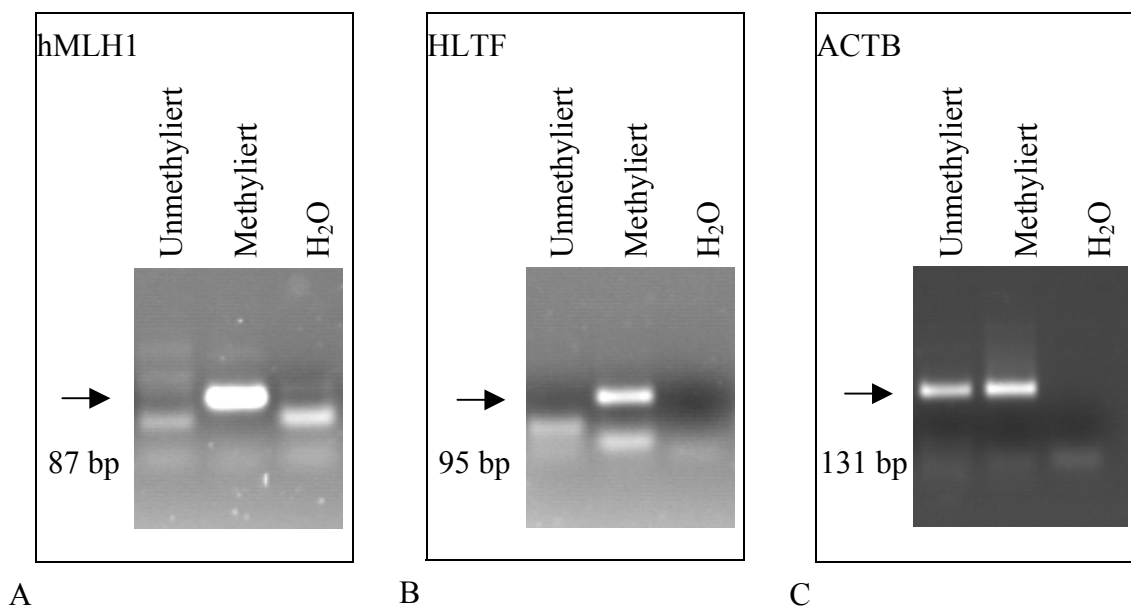


Bild 3.3: Agarosegele zur Etablierung der Gene A=hMLH1, B=HLTF und C=ACTB in der PCR. Als unmethylierte Kontrolle diente die nur mit Bisulfit behandelte Serum-DNA. Die methylierte Serum-DNA-Kontrolle wurde mit SSSI und Bisulfit behandelt.

### 3.1.2 Optimierung der PCR Bedingungen

Zur Etablierung der Rotor-Gene-Läufe wurde der Ansatz der konventionellen PCR mit dem Zusatz der spezifischen Sonde (250 nM) übernommen. Anschließend musste die optimale Konzentration von Sonden und Primern ermittelt werden. Nur dadurch kann auch die geringste Menge DNA im Serum detektiert werden. Getestet wurden die Sondenkonzentrationen 50 nM, 100 nM und 250 nM, die Primerkonzentrationen 300 nM und 900 nM und die Magnesiumchloridkonzentrationen 0 mM, 1,25 mM und 2,5 mM. Die Sondenkonzentration 250 nM, die Primerkonzentration 900 nM und die Magnesiumchloridkonzentration 1,25 mM lieferten das deutlichste Ergebnis.

Standardkurven (HIC1 siehe Bild 3.4) sind notwendig, um die Daten der Rotor-Gene-Läufe quantitativ zu berechnen. Für die Standardkurve wurde eine gekaufte, universal methylierte DNA (*CpGenome<sup>TM</sup> universal methylierte, Chemicon*) eingesetzt (200 ng). Die Verdünnungen wurden mit der Anzahl von Molekülen gleichgesetzt und anschließend die Werte logarithmiert und in der Standardkurve gegen die CT-Werte aufgetragen. Die Ergebnisse entsprachen der Anzahl der Moleküle im Serum des Patienten. Je größer der Tumor ist, desto mehr DNA gibt er ab. Aus diesem Grund ist die Konzentration der DNA im Serum der Patienten unterschiedlich. Mit Hilfe des ACTB Gens konnte der Gehalt an DNA im Patientenserum normiert werden. Der mittlere DNA-Gehalt der Seren aus den Jahren 1991-1994 betrug  $39,5 \pm 115,8$  und die Proben aus den Jahren 1995-1997 enthielten  $45,8 \pm 79,8$  ( $P= 0,396$ ) DNA-Moleküle. Dies bewies, dass trotz langer Lagerung der Seren die DNA stabil bleibt.

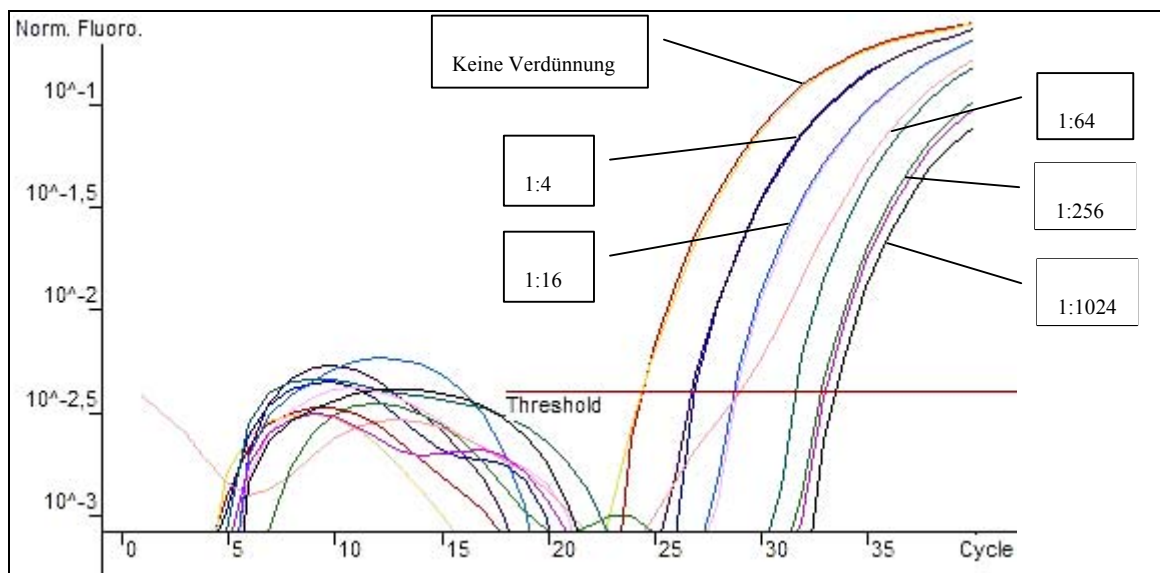


Bild 3.4: HIC1 Standardkurve mit Doppelbestimmung. Die Standardkurve wurde mit der CpGenome DNA erstellt.

Der Methylierungsstatus der Promotoren der 12 Gene wurde in den Patienten-DNAs untersucht. Bei jeder Testung lief eine Positivkontrolle mit, so kann davon ausgegangen werden, dass der Prozess korrekt lief. Das Bild 3.5 zeigt eine Untersuchung der Patientenserum auf das Gen HIC1. Die DNA des Patienten mit der Nummer 39 ist in

diesem Bereich des Gens methyliert. Zur Querkontrolle wurde ein Agarosegel (Bild 3.6) angefertigt. Auch hier ist das gleiche Ergebnis zu sehen.

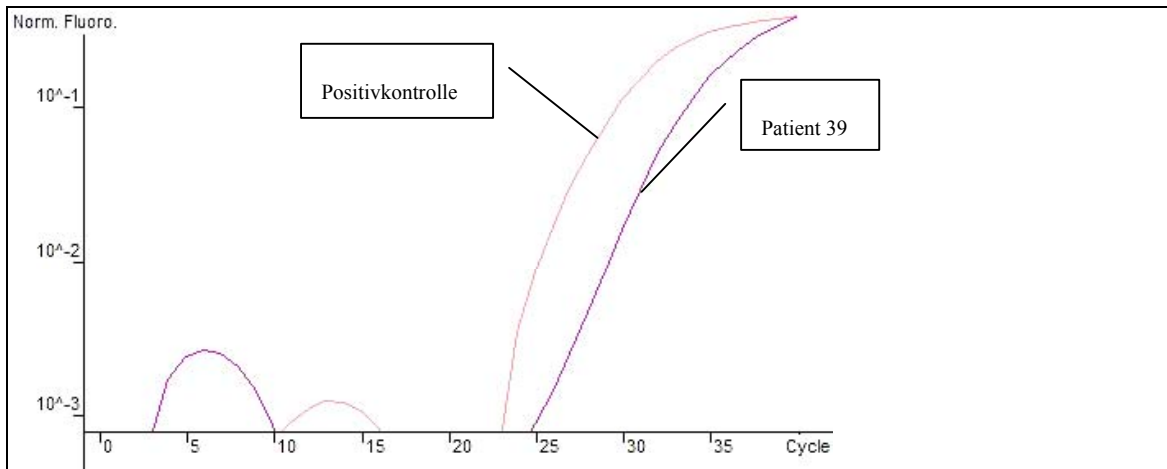


Bild 3.5: Analyse der Patientenserien 39-42 des Testsets auf das Gen *HIC1*. Patient 39 hatte eine Methylierung des Gens *HIC1*. Die DNA der Patienten 40-42 waren in dem getesteten Bereich des *HIC1* Gens nicht methyliert. Die Negativkontrolle mit  $H_2O$  blieb negativ.

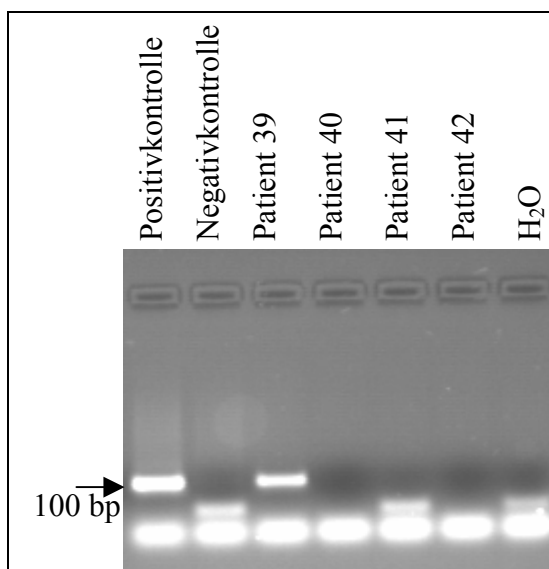


Bild 3.6: Agarosegel der Analyse der Patientenserien 39-42. Patient 39 hatte eine Methylierung des Gens *HIC1*. Patienten 40-42 waren in dem getesteten Bereich des *HIC1* Gens nicht methyliert. Die Negativkontrolle mit  $H_2O$  blieb immer negativ.

## 3.2 Gen-Evaluierungsset

### 3.2.1 Identifizierung der geeigneten Gene in einem Gen-Evaluierungsset

Es wurden zwölf Gene, die mit einer CpG-Insel Hypermethylierung im primären kolorektalen Karzinom zu unterschiedlichen Frequenzen von 10 bis 80%, aber selten in normalen Kolon beschrieben worden sind, analysiert. Die Untersuchungen wurden mit Serum von 24 Patienten mit lokalem kolorektalem Karzinom (*International Union*

against Cancer (UICC) I-III), 14 Patienten mit metastasiertem Karzinom (UICC IV) und 20 gesunden Kontrollen durchgeführt. Einen Überblick zur Frequenz der Genmethylierung in den untersuchten Seren stellt Tabelle 3.1 dar. Zur weiteren Analyse wurden Gene gewählt, die bei den gesunden Kontrollen zu  $\geq 90\%$  unmethyliert waren, in mindestens 30% der Seren der Patienten mit metastasierten kolorektalen Karzinomen methyliert waren und höher frequentiert methyliert in Serum von Patienten mit metastasierten Karzinom als in Seren von Patienten mit lokalem Tumor. Nur drei Gene entsprachen diesen Kriterien: HLTF, HPP1 und hMLH1.

Tabelle 3.1: Frequenz der methylierten Gene des Gen-Evaluierungsset

Gene	Gesunde (n=20)	Lokaler Tumor (n=24)	Metastasierter Tumor (n=14)
APC	20	21	43
HIC1	10	4	14
HLTF	0	17	50
hMLH1	0	4	43
HPP1	0	13	36
p16	60	25	64
RASSF1A	10	4	0
SFRP1	10	17	0
SFRP2	0	4	7
SFRP4	5	13	0
SFRP5	5	4	14
WT1	15	4	0

Anmerkung: Werte sind in % Positiven ausgedrückt.

Der Prozentsatz der vollständig methylierten Moleküle (PMR) für diese drei Gene wurde folgendermaßen berechnet:

$$PMR = \text{Gen}/\text{ACTB (Probe)} // \text{Gen}/\text{ACTB (Standard)} * 100$$

Ein Gen galt als methyliert bei  $PMR > 0$ . Die Verteilung des PMR für die Seren der 141 Patienten des Gen-Evaluierungssets und des Testsets beschreibt die Tabelle 3.2. Der beste Grenzwert berechnet mit der Receiver-Operating-Characteristic-Kurve (ROC), lag für HLTF und HPP1 bei 0,5 und für hMLH1 bei 2,0. Die folgenden Analysen wurden quantitativ mit den berechneten Grenzwerten und qualitativ bestimmt. Da die Ergebnisse durch die niedrigen Grenzwerte nicht essentiell variierten, konzentriert sich die folgende Darstellung auf die qualitative Auswertung.

Tabelle 3.2: Verteilung der PMR Werte im Serum von 141 Patienten mit kolorektalem Karzinom

PMR	HLTF			HPP1			hMLH1		
	I+II	III	IV	I+II	III	IV	I+II	III	IV
0	50	41	16	58	45	17	42	32	19
0-5	3	2	4	3	2	6	11	13	7
5-25	2	5	2	0	2	4	1	3	1
>25	6	1	9	0	0	4	7	1	4



### 3.2.2 Korrelation der Serummethylierung mit klinisch-pathologischen Daten

Die Methylierung der zwölf Gene wurde in den 58 prätherapeutischen Seren des Gen-Evaluationssets analysiert und mit den klinisch-pathologischen Daten korreliert (Tabelle 3.3-Tabelle 3.6). Es konnte kein Zusammenhang des Methylierungsstatus der Gene mit dem Alter, Geschlecht, Tumortiefe, Lymphknotenstatus, Tumorlokalisation und histologischem Grading gezeigt werden. Die Methylierung der Gene HLTF, hMLH1 und p16 korrelierten mit dem Fernmetastasenstatus ( $P = 0,036$ ,  $P = 0,006$ ,  $P = 0,020$ ). Signifikant korrelierte nur die Methylierung des Gens hMLH1 mit dem Tumorstadium ( $P = 0,017$ ).

Tabelle 3.3: Klinik/Pathologie des Gen-Evaluierungssets mit den Genen HLTF, HPP1, hMLH1

Klinik/ Pathologie	Anzahl der Patienten	HLTF			HPP1			hMLH1		
		% Pos	$P^*$ Qual	$P$ Quant	% Pos	$P$ Qual	$P$ Quant	% Pos	$P$ Qual	$P$ Quant
Tumorgröße			0,150	0,215		0,453	0,605		0,462	0,567
T1 + T2 + T3	30	0			23			17		
T4	8	88			13			25		
Lymphknoten- status			0,550	0,674		0,302	0,264		0,419	0,588
N0	15	0			13			13		
N1	23	17			26			22		
Fern- metastasen			0,036	0,015		0,102	0,071		0,006	0,002
M0	24	0			13			4		
M1	14	29			36			43		
Lokalisation <sup>+</sup>			0,316	0,350		0,102	0,074		0,161	0,196
Rechts <sup>~</sup>	14	0			7			7		
Links <sup>#</sup>	23	13			30			26		
Kolon	23	0			43			17		
Rektum	14	50			29			21		
Grading			0,080	0,285		0,344	0,122		0,416	0,239
G1	1	0			0			0		
G2	15	7			13			7		
G3 <sup>§</sup>	18	11			33			22		
UICC-Stadium			0,173	0,036		0,249	0,084		0,017	0,029
I	4	0			25			25		
II	8	13			0			0		
III	12	8			17			0		
IV	14	14			36			43		

Tabelle 3.4: Klinik/Pathologie des Gen-Evaluierungssets mit den Genen APC, HIC1, p16

Klinik/ Pathologie	Anzahl der Patienten	APC			HIC1			p16		
		% Pos	P* Qual	P Quant	% Pos	P Qual	P Quant	% Pos	P Qual	P Quant
Tumorgröße			0,578	0,895		0,106	0,054		0,085	0,125
T1 + T2 + T3	30	30			3			47		
T4	8	25			25			13		
Lymphknoten- status			0,198	0,123		0,660	0,778		0,346	0,595
N0	15	40			7			47		
N1	23	22			9			35		
Fern- metastasen			0,142	0,143		0,302	0,249		0,020	0,003
M0	24	21			4			25		
M1	14	43			14			64		
Lokalisation <sup>+</sup>			0,316	0,293		0,684	0,871		0,546	0,904
Rechts <sup>~</sup>	14	21			7			43		
Links <sup>#</sup>	23	35			9			39		
Kolon	23	22			4			39		
Rektum	14	43			14			43		
Grading			0,739	0,508		0,860	0,565		0,725	0,513
G1	1	0			0			0		
G2	15	27			7			40		
G3 <sup>§</sup>	18	33			11			39		
UICC-Stadium			0,194	0,611		0,495	0,428		0,086	0,033
I	4	50			0			25		
II	8	25			13			38		
III	12	8			0			17		
IV	14	43			14			64		

Tabelle 3.5: Klinik/Pathologie des Gen-Evaluierungssets mit den Genen RASSF1A, WT1, SFRP1

Klinik/ Pathologie	Anzahl der Patienten	RASSF1A			WT1			SFRP1		
		% Pos	P* Qual	P Quant	% Pos	P Qual	P Quant	% Pos	P Qual	P Quant
Tumorgröße			0,789	0,612		0,211	0,051		0,629	0,818
T1 + T2 + T3	30	27			23			10		
T4	8	0			13			13		
Lymphknoten- status			0,395	0,220		0,605	0,427		0,480	0,491
N0	15	7			0			7		
N1	23	0			4			13		
Fern- metastasen			0,632	0,453		0,632	0,453		0,144	0,113
M0	24	4			4			17		
M1	14	0			0			0		

Klinik/ Pathologie	Anzahl der Patienten	RASSF1A			WT1			SFRP1		
		% Pos	<i>P</i> * Qual	<i>P</i> Quant	% Pos.	<i>P</i> Qual	<i>P</i> Quant	% Pos.	<i>P</i> Qual	<i>P</i> Quant
Lokalisation <sup>+</sup>			0,378	0,204		0,156	0,443		0,491	0,690
Rechts <sup>~</sup>	14	7			0			14		
Links <sup>#</sup>	23	0			4			9		
Kolon	23	4			4			13		
Rektum	14	0			0			7		
Grading			0,521	0,330		0,622	0,925		0,916	0,953
G1	1	0			0			0		
G2	15	7			0			13		
G3 <sup>§</sup>	18	0			6			11		
UICC-Stadium			0,278	0,299		0,527	0,126		0,185	0,518
I	4	0			0			0		
II	8	13			0			13		
III	12	0			8			25		
IV	14	0			0			0		

Tabelle 3.6: Klinik/Pathologie des Gen-Evaluierungssets mit den Genen SFRP2, SFRP4, SFR5

Klinik/ Pathologie	Anzahl der Patienten	SFRP2			SFRP4			SFRP5		
		% Pos	<i>P</i> * Qual	<i>P</i> Quant	% Pos.	<i>P</i> Qual	<i>P</i> Quant	% Pos.	<i>P</i> Qual	<i>P</i> Quant
Tumorgröße			0,381	0,294		0,106	0,054		0,519	0,599
T1 + T2 + T3	30	3			3			7		
T4	8	13			25			13		
Lymphknoten- status			0,640	0,791		0,210	0,153		0,340	0,298
N0	15	7			0			13		
N1	23	4			13			4		
Fern- metastasen			0,607	0,730		0,240	0,178		0,302	0,307
M0	24	4			13			4		
M1	14	7			0			14		
Lokalisation <sup>+</sup>			0,380	0,269		0,380	0,269		0,684	0,871
Rechts <sup>~</sup>	14	0			0			7		
Links <sup>#</sup>	23	9			9			9		
Kolon	23	4			9			9		
Rektum	14	7			0			7		
Grading			0,389	0,185		0,389	0,185		0,389	0,185
G1	1	0			0			0		
G2	15	0			0			0		
G3 <sup>§</sup>	18	11			11			11		
UICC-Stadium			0,803	0,473		0,070	0,868		0,250	0,761
I	4	0			0			25		
II	8	0			0			0		
III	12	8			25			0		
IV	14	7			0			14		

\*P-Werte wurden mit dem  $\chi^2$ -Test berechnet.

<sup>+</sup>Für einen Patienten war die Tumorlokalisierung unbekannt.

<sup>~</sup>Rechtes Kolon beinhaltet das Zökum bis zum Kolon transversum.

<sup>#</sup>Linkes Kolon beinhaltet das Kolon descendens bis zum Rektum.

<sup>§</sup>G3 beinhaltet alle Fälle, die mit G3 und G2-3 klassifiziert wurden.

% Pos = % Positive, Quant = Quantitative Ergebnisse, Qual = Qualitative Ergebnisse.

### 3.3 Testset

#### 3.3.1 Korrelation der Serummethylierung mit klinisch-pathologischen Daten

Der Methylierungsstatus von HPP1, HLTF und hMLH1 wurde in den Seren von 104 Patienten des Testsets vor der Therapie analysiert und auf einen Zusammenhang mit den klinisch-pathologischen Daten hin untersucht (siehe Tabelle 3.7). Hierbei wurde keine signifikante Korrelation zwischen diesen Genen und Alter, Geschlecht und histologischem Grading gefunden. Die Methylierung von HPP1, HLTF und hMLH1 korrelierten signifikant mit der Tumorgroße ( $P = 0,03$ ,  $P = 0,021$ , und  $P = 0,047$ ). Nur die Methylierung des Gens HPP1 korrelierte mit dem Lymphknotenstatus ( $P = 0,026$ ). Die Methylierung von HLTF und HPP1 wurde signifikant häufiger im Serum von Patienten mit Fernmetastasen gefunden als in Patienten ohne ( $P = 0,009$  und  $P < 0,001$  versus  $P = 0,181$  für hMLH1). Die Methylierung von HLTF und HPP1 wurde häufiger bei Patienten entdeckt, die ein höheres Tumorstadium haben, als bei Patienten mit niedrigeren Tumorstadien ( $P = 0,042$  und  $P < 0,001$ ).

Die *American Joint Committee on Cancer Prognostic Factors Consensus Conference* empfiehlt das CEA zum etablierten TNM-System hinzuzufügen (Compton et al., 2000). Zur CEA-Analyse standen 77 Patientenserumproben des Testsets zur Verfügung. Es wurde der empfohlene Grenzwert von  $\geq 5$  ng/ml verwendet. Ein positiver CEA-Wert korrelierte signifikant mit dem Methylierungsstatus von HPP1 ( $P = 0,001$ ) und von HPP1 und/oder HLTF ( $P = 0,001$ ). Der Methylierungsstatus von HLTF ( $P = 0,056$ ) und hMLH1 ( $P = 0,571$ ) korrelierte nicht signifikant mit CEA.

Tabelle 3.7: Klinik/Pathologie des Testsets mit den Genen HLTF, HPP1, hMLH1

Klinik/ Pathologie	Anzahl der Patienten	HLTF			HPP1			hMLH1		
		% Pos	$P^*$ Qual	$P$ Quant	% Pos	$P$ Qual	$P$ Quant	% Pos	$P$ Qual	$P$ Quant
Tumorgroße <sup>^</sup>			0,03	0,033		0,021	0,201		0,047	0,051
T1 + T2 + T3	90	28			11			20		
T4	13	46			23			46		
Lymphknoten- status			0,514	0,968		0,026	0,022		0,494	0,602
N0	54	20			6			24		
N1	49	22			20			22		

Klinik/ Pathologie	Anzahl der Patienten	HLTF			HPP1			hMLH1		
		% Pos	<i>P</i> * Qual	<i>P</i> Quant	% Pos	<i>P</i> Qual	<i>P</i> Quant	% Pos	<i>P</i> Qual	<i>P</i> Quant
Fern- metastasen			0,009	0,006		<0,001	<0,001		0,181	0,209
M0	86	16			5			26		
M1	17	47			53			12		
Lokalisation <sup>^</sup>			0,049	0,050		0,156	0,185		0,100	0,094
Rechts <sup>~</sup>	25	2			4			12		
Links <sup>#</sup>	78	20			14			27		
Kolon	60	15			7			22		
Rektum	43	30			19			26		
Grading			0,872	0,926		0,796	0,793		0,316	0,204
G1	3	33			0			0		
G2	53	21			13			19		
G3 <sup>§</sup>	45	22			13			29		
UICC-Stadium			0,042	0,138		<0,001	<0,001		0,648	0,361
I	15	20			7			27		
II	34	15			3			24		
III	37	16			5			27		
IV	17	47			53			12		

*\*P-Werte wurden mit dem  $\chi^2$ -Test berechnet.*  
<sup>^</sup>Für einen Patienten war die Tumorlokalisierung und die Information zum TNM-Stadium nicht verfügbar.  
<sup>~</sup>Rechtes Kolon beinhaltet das Zökum bis zum Kolon transversum.  
<sup>#</sup>Linkes Kolon beinhaltet das Kolon descendens bis zum Rektum.  
<sup>§</sup>G3 beinhaltet alle Fälle, die mit G3 und G2-3 klassifiziert wurden.  
% Pos = % Positive, Quant = Quantitative Ergebnisse, Qual = Qualitative Ergebnisse.

### 3.3.2 Analyse der prognostischen Signifikanz von DNA-Methylierung im Serum

Der Zusammenhang der klinisch-pathologischen Daten und dem prätherapeutischen Methylierungsstatus der Gene HLTF, HPP1 und hMLH1 wurde mit dem bekannten klinischen Verlauf von 77 Patienten des Testsets analysiert.

#### 3.3.2.1 Rezidiv

##### *Univariate Analyse*

In die univariate Analyse zum Rezidiv wurden 62 kurativ behandelte Patienten der Tumorstadien UICC I+II+III eingeschlossen. Die statistische Auswertung zur Wahrscheinlichkeit, an einem Rezidiv zu erkranken (siehe Tabelle 3.8), ergab eine prognostische Signifikanz für die Tumorgröße (T) mit einem relativen Risiko (RR) von 1,3 (95% KI 1,0 – 1,7;  $P = 0,044$ ). Je größer der Tumor bei der Diagnose war, desto eher bekamen die Patienten ein Rezidiv. Waren die Lymphknoten (N) befallen, erhöhte sich ebenfalls das relative Risiko ein Rezidiv zu erleiden um 3,6 (95% KI 1,4 – 9,3;  $P = 0,008$ ). Die Tumorlokalisierung (Kolon versus Rektum) und das histologische Grading (G) hatten mit einem RR von 1,7 (95% KI 1,1 – 2,7;  $P = 0,025$ ) und einem RR von 2,8 (95% KI 1,2 – 6,6;  $P = 0,02$ ) auch einen Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs.

Bei einem höheren UICC-Stadium stieg signifikant das relative Risiko eines Rezidivs: UICC-Stadium I versus II mit dem RR von 0,2 (95% KI 0,3 – 1,0;  $P = 0,005$ ), UICC II versus III mit dem RR von 8,0 (95% KI 1,8 – 34,7;  $P = 0,005$ ) und UICC I+II versus III mit dem RR von 1,9 (95% KI 1,2 – 3,1;  $P = 0,008$ ).

Patienten mit einer Methylierung des Gens HLTF erkrankten mit einer höheren Wahrscheinlichkeit an einem Rezidiv. Das relative Risiko betrug 3,4 (95% KI 1,4 – 8,5;  $P = 0,009$ ). Ebenso erlitten die Patienten mit der Methylierung des Gens HPP1 mit einem RR von 7,1 (95% KI 1,6 – 31,5;  $P = 0,010$ ) und die Patienten mit der Methylierung beider Gene HLTF und/oder HPP1, mit dem RR von 3,4 (95% KI 1,4 – 8,5;  $P = 0,009$ ) eher ein Rezidiv als Patienten ohne Methylierung dieser Gene. Dies wird auch mit Hilfe der Kaplan-Meier Kurve (Bild 3.7) deutlich. Patienten ohne Methylierung der Gene (gestrichelte Linie), bekamen signifikant später ein Rezidiv als Patienten mit einer Methylierung der Gene (volle Linie). Da die Methylierung des Gens HPP1 ausschließlich mit der Methylierung des Gens HLTF einherging, sind die Ergebnisse von HLTF und die Ergebnisse der Kombination von HLTF und/oder HPP1 identisch. Nicht signifikant waren die Berechnungen zur Tumorlokalisation (rechtes versus linkes Kolon) ( $P = 0,274$ ) und der Methylierung des Gens hMLH1 ( $P = 0,172$ ).

Tabelle 3.8: Ergebnisse der univariaten Analyse zum Rezidiv

Klinik/Pathologie	Anzahl der Patienten mit Rezidiv/Gesamtanzahl	Relatives Risiko eines Rezidivs (95% KI)*	$P^*$
Tumorgröße <sup>^</sup>			0,044
T1 + T2 + T3	16/54		
T4	5/8	1,3 (1,0 – 1,7)	
Lymphknotenstatus			0,008
N0	6/33		
N1	15/29	3,6 (1,4 – 9,3)	
Lokalisation <sup>^</sup>			
Rechts <sup>~</sup>	3/14		
Links <sup>#</sup>	18/48	2 (0,6 – 6,7)	0,274
Kolon	7/33		
Rektum	14/29	1,7 (1,1 – 2,7)	0,025
Grading			0,020
G1	0/1		
G2	8/33		
G3 <sup>§</sup>	13/26	2,8 (1,2 – 6,6)	
UICC Stadium			0,005
I	4/10		
II	2/23	0,3 (0,2 – 1,0)	
III	15/29	8,0 (1,8 – 34,7)	
I+II vs III	6/33 vs 15/29	1,9 (1,2 – 3,1)	0,008
HLTF Methylierung			0,009
Unmethyliert	14/52		
Methyliert	7/10	3,4 (1,4 – 8,5)	
HPP1 Methylierung			0,010
Unmethyliert	19/60		
Methyliert	2/2	7,1 (1,6 – 31,5)	

Klinik/Pathologie	Anzahl der Patienten mit Rezidiv/Gesamtanzahl	Relatives Risiko eines Rezidivs (95% KI)*	P*
HPP1+/-HLTF Methylierung			0,009
Unmethyliert	14/52		
Methyliert	7/10	3,4 (1,4 – 8,5)	
hMLH1 Methylierung			0,172
Unmethyliert	14/47		
Methyliert	7/15	1,9 (0,8 – 4,7)	

\*95% KI und P-Werte wurden mit der Cox-Regression berechnet.  
^Für einen Patienten war die Tumorlokalisation und die Information zum TNM-Stadium nicht verfügbar.  
~Rechtes Kolon beinhaltet das Zökum bis zum Kolon transversum,  
#Linkes Kolon beinhaltet das Kolon descendens bis zum Rektum.  
§G3 beinhaltet alle Fälle, die mit G3 und G2-3 klassifiziert wurden.

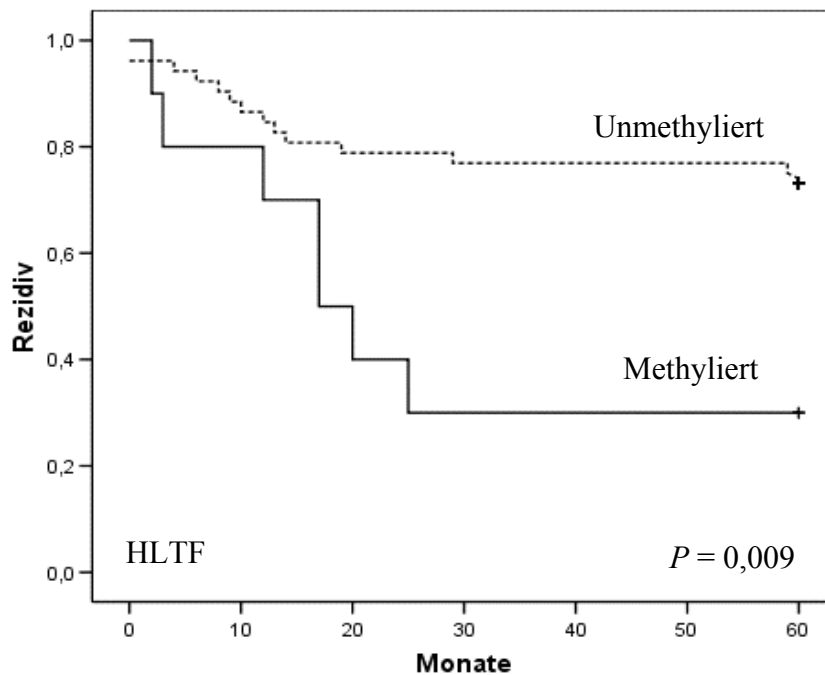


Bild 3.7: Kaplan-Meier Analyse zum Rezidiv HLTF. Gestrichelte Linie = Patienten mit unmethyliertem Gen, volle Linie = Patienten mit methyliertem Gen.

### Multivariate Analyse

In der multivariaten Analyse wurden Tumorgröße, Lymphknotenstaus, Alter und Methylierung von HPP1 und/oder HLTF untersucht (siehe Tabelle 3.9). In der Cox-

Regressionsanalyse der unabhängigen Variablen zeigte der Lymphknotenstatus mit einem relativen Risiko von 3,4 (95% KI 1,3 – 8,9;  $P = 0,014$ ) und die Serum-Methylierung von HPP1 und/oder HLTF mit einem RR von 2,8 (95% KI 1,1 – 7,1;  $P = 0,032$ ) eine unabhängige prognostische Information.

Für Tumorgröße (T1 + T2) vs. (T3 + T4) ( $P = 0,288$ ) und Alter ( $P = 0,842$ ) wurden keine Signifikanzen auf dem  $\alpha$ -Level von 0,5 gefunden.

Tabelle 3.9 Multivariate Analyse zum Risiko eines Rezidivs

Klinik/Pathologie	Relatives Risiko eines Rezidivs (95% Konfidenzintervall)	$P$
Tumorgröße (T1 + T2) vs. (T3 + T4)	0,8 (0,5 – 1,3)	0,288
Lymphknotenmetastasen Ja vs. Nein	3,4 (1,3 – 8,9)	0,014
Alter	1,0 (1,0 – 1,0)	0,842
HPP1 +/- HLTF vs. Unmethyliert	2,8 (1,1 – 7,1)	0,032

### 3.3.2.2 Versterben

#### *Univariate Analyse*

Die Berechnung der univariaten Analyse zum Versterben der Patienten brachte folgende prognostischen Aussagen (siehe Tabelle 3.10): Je größer der Tumor (T) des Patienten bei der Diagnose, desto schlechter war seine Prognose mit einem RR von 1,3 (95% KI 1,1 – 1,6;  $P = 0,025$ ). Waren Fernmetastasen (M) vorhanden, starben die Patienten ebenfalls signifikant früher mit einem RR von 2,5 (95% KI 1,1 – 5,6;  $P = 0,034$ ). Auch das UICC-Stadium hatte einen signifikanten Einfluss auf das Versterben der Patienten. Im Vergleich der Patienten mit unterschiedlichen UICC-Stadien hatten die Patienten mit höheren Stadien bei der Diagnose eine signifikant kürzere Überlebenszeit: UICC-Stadium I versus II mit einem RR von 0,7 (95% KI 0,2 – 2,9;  $P = 0,025$ ), UICC II versus III mit einem RR von 2,1 (95% KI 0,7 – 6,0;  $P = 0,025$ ) und UICC III versus IV mit einem RR von 1,9 (95% KI 0,8 – 4,5;  $P = 0,025$ ).

Patienten mit einer Methylierung des Gens HLTF verstarben mit einem RR von 3,0 (95% KI 1,4 – 6,4;  $P = 0,008$ ) früher an dem kolorektalen Karzinom. Patienten mit der Methylierung des Gens HPP1 und Patienten mit der Methylierung beider Gene HLTF und/oder HPP1 lebten ebenfalls signifikant kürzer mit einem RR von 5,1 (95 % KI 2,2 – 11,6;  $P = 0,001$ ) und mit einem RR von 4,2 (95% KI 2,0 – 9,0;  $P < 0,001$ ). Die Kaplan-Meier Kurven (Bild 3.8) zeigen graphisch, dass Patienten ohne Methylierung der Gene (gestrichelte Linie) signifikant länger überlebten als Patienten mit einer Methylierung der Gene (volle Linie). Eine Subanalyse zeigte, dass Patienten mit UICC-Stadium II und einer Serum-Methylierung von HPP1 und/oder HLTF mit einem RR von 11,8 (95% KI 1,9 – 74,7;  $P = 0,04$ ) ebenso eine signifikante schlechtere Prognose hatten. Nicht signifikant waren die Berechnungen zu Lymphknotenstatus ( $P = 0,065$ ),

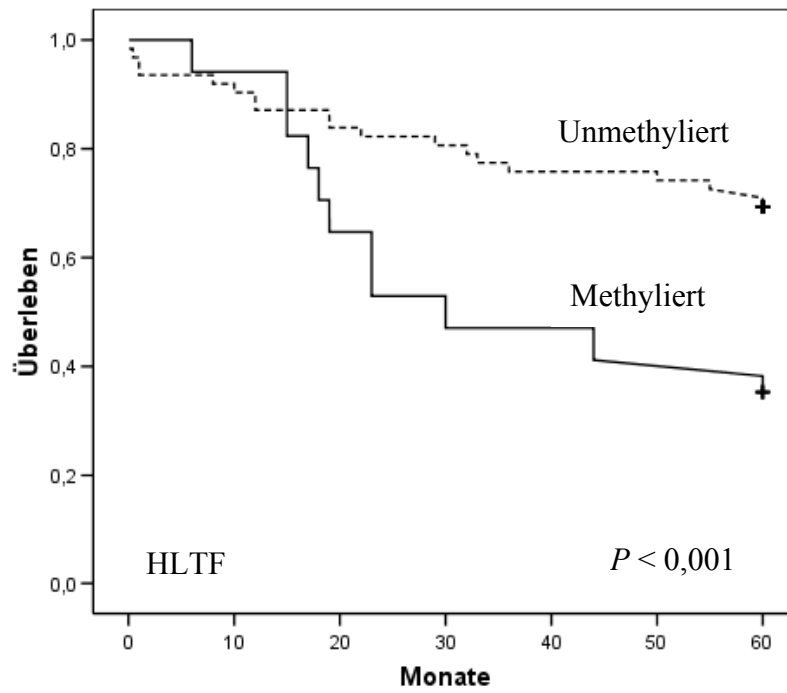


Tumorlokalisierung (Rechts/Links:  $P = 0,873$ ; Kolon/Rektum:  $P = 0,198$ ), histologischem Grading ( $P = 0,363$ ) und der Methylierung des Gens hMLH1 ( $P = 0,425$ ).

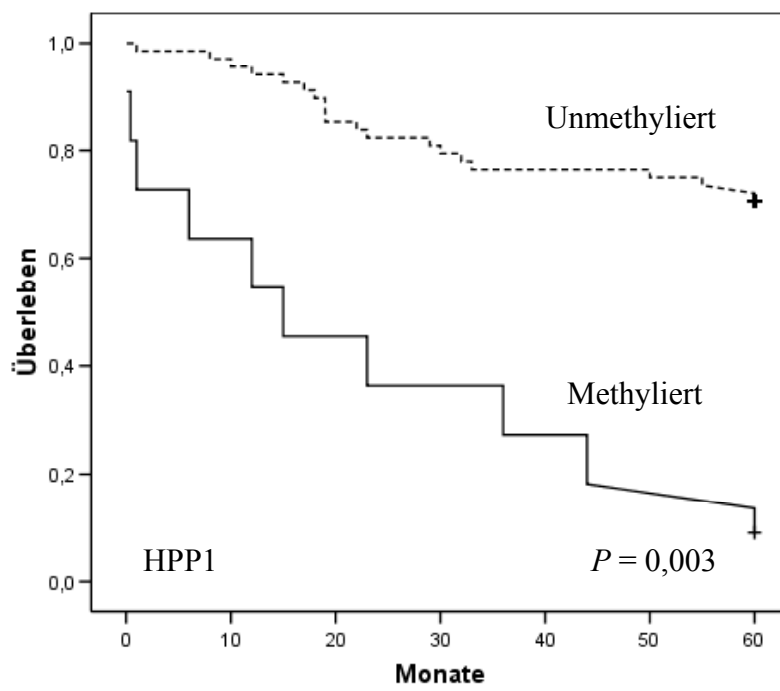
Tabelle 3.10 Ergebnisse der univariaten Analyse zum Versterben

Klinik/Pathologie	Anzahl der Patienten die Verstarben/Gesamtanzahl	Relatives Risiko zu Versterben (95% KI)	$P^*$
Tumorgroße <sup>^</sup>			0,025
T1 + T2 + T3	21/66		
T4	7/10	1.3 (1.1 – 1.6)	
Lymphknotenstatus			0,065
N0	10/39		
N1	18/37	1.4 (1.0 – 3.8)	
Fernmetastasen			0,034
M0	19/61		
M1	9/15	2.5 (1.1 – 5.6)	
Lokalisation <sup>^</sup>			
Rechts <sup>~</sup>	6/17		
Links <sup>#</sup>	22/60	1.1 (0.4 – 2.7)	0,873
Kolon	12/40		
Rektum	16/37	1.3 (0.9 – 1.9)	0,198
Grading			0,363
G1	0/1		
G2	13/38		
G3 <sup>§</sup>	14/35	1.2 (0.6 – 2.6)	
UICC Stadium			0,025
I	3/10		
II	5/24	0.7 (0.2 – 2.9)	
III	11/27	2.1 (0.7 – 6.0)	
IV	9/15	1.9 (0.8 – 4.5)	
HLTF			0,008
Methylierung			
unmethyliert	17/60		
methyliert	11/17	3,0 (1,4 – 6,4)	
HPP1			0,001
Methylierung			
unmethyliert	20/68		
methyliert	8/9	5,1 (2,2 – 11,6)	
HPP1+/-HLTF			<0,001
Methylierung			
unmethyliert	14/57		
methyliert	14/20	4,2 (2,0 – 9,0)	
hMLH1			0,425
Methylierung			
unmethyliert	20/59		
methyliert	8/18	1,4 (0,6 – 3,1)	
*95% KI und P-Werte wurden mit der Cox-Regression berechnet.			
<sup>^</sup> Für einen Patienten war die Tumorlokalisierung und die Information zum TNM-Stadium nicht verfügbar.			
<sup>~</sup> Rechtes Kolon beinhaltet das Zökum bis zum Kolon transversum,			
<sup>#</sup> Linkes Kolon beinhaltet das Kolon descendens bis zum Rektum.			
<sup>§</sup> G3 beinhaltet alle Fälle, die mit G3 und G2-3 klassifiziert wurden.			

A



B



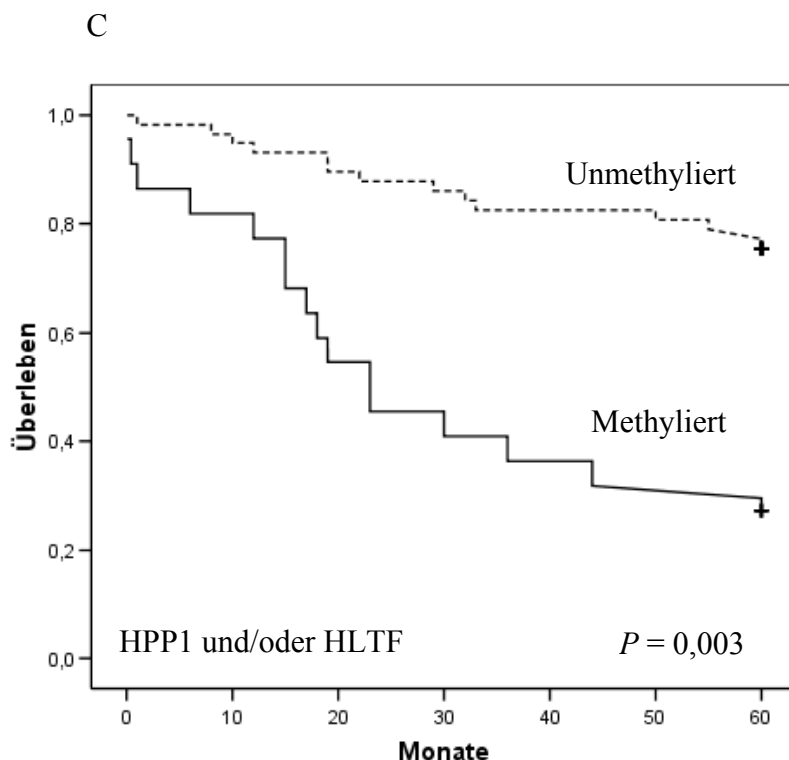


Bild 3.8: Kaplan-Meier Analyse zum Versterben: A=HLTF, B=HPP1, C=HPP1 und/oder HLTF. Gestrichelte Linie = Patienten mit unmethyliertem Gen, volle Linie = Patienten mit methyliertem Gen.

### Multivariate Analyse

In der Cox-Regressionsanalyse zum Versterben (siehe Tabelle 3.11) wurden die Variablen Tumorgröße, Lymphknotenstatus, Fernmetastasenstatus, Alter und Serum-Methylierung von HPP1 und/oder HLTF eingesetzt und auf Unabhängigkeit überprüft.

Die Serum-Methylierung von HPP1 und/oder HLTF zeigte auch hier eine unabhängige prognostische Information mit einem relativen Risiko von 3,4 (95% KI 1,4 – 8,1;  $P = 0,007$ ). Die Ergebnisse beweisen, dass die Methylierung der Gene HPP1 und/oder HLTF, unabhängig von den klassischen Stadiumparametern, ein prognostischer Faktor ist. Patienten mit einer Methylierung von HPP1 und/oder HLTF verstarben signifikant früher als Patienten ohne Methylierung dieser Gene. Das TNM-Stadium und das Alter konnten in der multivariaten Analyse als Störfaktoren ausgeschlossen werden.

Für Tumorgröße (T1 + T2) vs. (T3 + T4) ( $P = 0,735$ ), Lymphknotenstatus ( $P = 0,620$ ), Fernmetastasenstatus ( $P = 0,735$ ) und Alter ( $P = 0,382$ ) wurden keine Signifikanzen gefunden.

Tabelle 3.11 Multivariate Analyse zum Versterben

Klinik/Pathologie	Relatives Risiko zu Versterben (95% Konfidenzintervall)	P
Tumorgröße (T1 + T2) vs. (T3 + T4)	0,9 (0,5 – 1,6)	0,735
Lymphknotenmetastasen Ja vs. Nein	1,9 (0,9 – 4,3)	0,620
Fernmetastasen Ja vs. Nein	1,3 (1,0 – 1,1)	0,735
Alter	1,0 (1,0 – 1,1)	0,382
HPP1 +/- HLTF vs. Unmethyliert	3,4 (1,4 – 8,1)	0,007

## 4 Diskussion

Aberrante Hypermethylierung von CpG Inseln ist ein Kennzeichen von Karzinomen. Der prognostische Wert wurde im primären kolorektalen Karzinom erforscht. Da erst wenige Daten zur Analyse methylierter DNA im Serum veröffentlicht sind, wurde diese Studie durchgeführt, welche die Identifizierung von Methylierungsmarkern mit prognostischer Information im Serum ermöglicht. Da es am Anfang der Studie noch keine Standard-Markerpanel-Empfehlung gab, fiel die Wahl auf Marker aus der Literatur, welche von wichtiger Bedeutung in der Initiation und Progression des kolorektalen Karzinoms zu sein scheinen. Diese Marker sind im kolorektalen Karzinom als mit unterschiedlichen Frequenzen und nur selten im normalen Gewebe des Kolons methyliert beschrieben worden.

Der genaue Mechanismus, durch den Tumor-DNA in den Blutkreislauf gelangt, ist noch nicht aufgeklärt (Widschwendter and Menon, 2006). Während bei Apoptose die zelluläre DNA enzymatisch in Fragmente von 185 bis 200 Basenpaare gespalten wird, bleibt bei pathologischem Zelltod, z.B. Nekrose, ein hoher Grad an DNA-Integrität erhalten. Es wird vermutet, dass stark proliferierende Tumore DNA in den Interzellularraum ausschütten, die dann via Lymphe in das Blutssystem gelangt (Widschwendter and Menon, 2006). Unterstützt wird diese Theorie durch die Beobachtung, dass bei einer Chemotherapie nach einem initialen Anstieg der freien DNA wiederum ein Abfall folgt und dass freie DNA eine prognostische Signifikanz für das Ansprechen auf die Chemotherapie hat (Kamat et al., 2006).

Eine Methylierung des Tumorsuppressorgens APC, des DNA Reparaturgens hMLH1 und des Zellzyklusregulators p16<sup>INK4A</sup> wurde in 10 bis 30 % der Fälle gefunden (Esteller et al., 2000b; Esteller et al., 2001; Herman et al., 1998; Kane et al., 1997; Robertson and Jones, 1998; Veigl et al., 1998). Die Mutation des *adenomatous polyposis coli* Gens (APC) findet häufig am Anfang der kolorektalen Tumorgenese statt (Lüchtenborg et al., 2004). Das Gen wird deswegen auch als *gatekeeper* Gen bezeichnet. APC ist durch genetische und epigenetische Mechanismen im sporadischen kolorektalen Karzinom in bis zu 80% aller Fälle inaktiviert. APC liegt auf Chromosom 5q21 und besteht aus 21 Exons. Studien haben eine Methylierung des Gens im kolorektalen Karzinom zwischen 8 und 21% nachgewiesen (Xu et al., 2004, Ebert et al., 2005). Das *human mut-L homolog 1 Gen* (hMLH1) liegt auf Chromosom 3p22.3. hMLH1 verliert durch Mutation (HNPCC) oder Hypermethylierung des Promoters (sporadische Mikrosatelliteninstabilität) seine Funktion und Expression. Das Fehlen der Expression des hMLH1 Proteins führt zu Mikrosatelliteninstabilität (Geddert et al., 2004). Eine Hypermethylierung von hMLH1 im kolorektalen Karzinom wurde bei 5-33% der Proben gefunden (Toyota et al., 1999b; Lind et al., 2004; Grady et al., 2001). Die Inaktivierung des Gens p16<sup>INK4a</sup> auf Chromosom 9p21.3 findet durch Mutation (Deletion, Punktmutation) oder

Hypermethylierung des Promoters am Anfang der Tumorgenese statt. Das Gen ist ein wichtiger Tumorsuppressor und Inhibitor des Zellzyklus und wirkt damit antiproliferativ auf die Zelle. Eine Hypermethylierung des p16<sup>INK4a</sup> Gens wurde in 20-50% der Adenome und Karzinome gefunden (Dai et al., 2000; Toyota et al., 1999b; Lind et al., 2004).

Für HIC1, HLTF, HPP1/TPEF, RASSF1A (*RAS association domain family protein*) und WT1 wurde die Methylierung in 50 bis 80% der kolorektalen Karzinome gezeigt (Ahuja et al., 1998; Chen et al., 2003; Hiltunen et al., 1997; Liang et al., 2000; Maekawa et al., 2001; Miotto et al., 2004; Moinova et al., 2002; Wales et al. 1995; Young et al., 2001). Das Gen *hypermethylated in cancer 1* (HIC1) ist ein Tumorsuppressorgen, lokalisiert auf Chromosom 17p13.3. HIC1 kodiert für einen ubiquitären, in allen Gewebetypen exprimierten Transkriptionsfaktor (Wales et al., 1995) und ist im Tumor epigenetisch inaktiviert aber nicht mutiert (Chen et al., 2004). Das Tumorsuppressorgen p53 reguliert direkt die Expression von HIC1 (Pinte et al., 2004). Die Angaben zur Hypermethylierung der Promoterregion des HIC1 im kolorektalen Tumorgewebe variieren zwischen 40 und 100% (Maekawa et al., 2001; Ahuja et al., 1997). Das Gen für den *helicase-like transcription factor* (HLTF) gehört zur SWI/SNF Familie. Die SWI/SNF-verwandten Proteine regulieren die chromosomale Stabilität, die exakte Chromosomentrennung, die Rekombination und die transkriptionale Aktivierung und Repression. Eine Methylierung der Promoterregion ist assoziiert mit dem Verlust der Genexpression im kolorektalen Karzinom. Eine Methylierung des HLTF Gens wurde im primären kolorektalen Tumorgewebe in 33% (Hibi et al., 2003), 48% (Brandes et al., 2005) und 43% (Moinova et al., 2002) der Fälle detektiert. HPP1 (*hyperplastic polyposis 1/ transmembrane protein containing epidermal growth factor and follistatin domains*) ist auf Chromosom 2q32.3 lokalisiert und spielt eine Rolle bei der Zellproliferation, -differenzierung und -adhäsion (Geddert et al., 2004). Die Hypermethylierung von HPP1 wurde in kolorektalen Adenomen, hyperplastischen Polypen und kolorektalen Karzinomen gefunden. Die Methylierung von HPP1 in sämtlichen Vorstadien des kolorektalen Karzinoms zeigt, dass HPP1-Methylierung kein frühes, initiiierendes Ereignis in der kolorektalen Tumorgenese sein kann. Vermutlich trägt die Transkriptionssuppression des Gens zur Entwicklung hyperplastischer Polypen bei (Shibata et al., 2002). Es wurde eine Methylierung von HPP1 im kolorektalen Karzinom in 77% (Ebert et al., 2005) und 50% (Sato et al., 2002) der Fälle beschrieben. Das Tumorsuppressorgen RASSF1A (*Ras association domain family protein*), lokalisiert auf Chromosom 3p21.3, gehört zur Familie der Ras-Gene. RASSF1 bindet Ras und moduliert den apoptotischen Effekt des Onkogens Ras (Vos et al., 2000). Eine Hypermethylierung von RASSF1A konnte in 16% der kolorektalen Karzinome und in 2% der Adenome detektiert werden (Lee et al., 2004). Das Wilms Tumorsuppressorgen, ursprünglich assoziiert mit dem Wilms Tumor bei Kindern, liegt auf Chromosom 11p13. WT1 Proteine führen als Transkriptionsfaktoren zur Expression von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren und sind außerdem wichtig für die mesenchymal-epitheliale Transition. Xu et al. zeigten eine Hypermethylierung des WT1 Gens im kolorektalen Karzinom in 58% der Fälle (Xu et al., 2004).

Die Methylierung der Gene *soluble frizzled related proteins* (SFRPs) führt zur Transkriptionssuppression in 30 bis 90% der kolorektalen Karzinome (Suzuki et al., 2002; Suzuki et al., 2004). Die SFRPs besitzen eine Domäne, die dem Wnt-Rezeptor ähnlich ist. Veränderungen im Wnt-Signalweg sind ein frühes Ereignis in 90% der kolorektalen Karzinome. SFRPs können die Bindung von Wnt-Faktoren an ihren Rezeptor inhibieren und damit die Aktivierung des Wnt-Signalwegs blockieren. Die Methylierung der SFRPs ist unterschiedlich im kolorektalen Gewebe: SFRP1 95%, SFRP2 90%, SFRP4 29%, SFRP5 60% (Suzuki et al., 2002, 2004).

Von den 12 Genen wurden HPP1, HLTF und hMLH1 als geeignete Methylierungsmarker zur weiteren Diagnostik im Serum von Patienten mit kolorektalen Karzinomen identifiziert. Diese Marker waren in gesunden Kontrollen nicht und in metastasierten Tumoren häufiger methyliert als in lokalen. Es konnten Methylierungsmarker im Serum identifiziert werden, die mit den klinisch-pathologischen Daten und der Prognose korrelierten. Im Gen-Evaluierungsset korrelierte die Methylierung der Marker HLTF, hMLH1 und p16 mit dem Fernmetastasenstatus und hMLH1 mit dem Tumorstadium.

Im Testset war die Methylierung von HLTF oder HPP1 signifikant mit der Tumorgroße, dem Fernmetastasenstatus und dem Tumorstadium assoziiert. Die HPP1 Methylierung war häufiger in Patienten mit positivem Lymphknotenbefund. Die hMLH1 Methylierung korrelierte nur mit der Tumorgroße. Waren HLTF oder HPP1 oder die Kombination von HLTF und/oder HPP1 im Serum methyliert, stieg das relative Risiko für den Patienten, ein Rezidiv zu erleiden, und war ebenso mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Die multivariate Analyse hat gezeigt, dass die Serum-Analyse von HPP1 und/oder HLTF ein unabhängiger prognostischer Faktor ist, unabhängig von den klassischen Stadiumsparametern wie Tumorgroße, Lymphknotenstatus, Fernmetastasenstatus und Alter.

Der derzeitige Goldstandard, die Prognose der Patienten mit kolorektalem Karzinom festzulegen, ist, den Fortschritt des Malignoms zum Zeitpunkt der Diagnose mit Hilfe des TNM-Systems einzuordnen (Duffy et al., 2003). Während das TNM-System hoch prädikativ für die Prognose von Extremstadien ist, z. B. die Prognose der Stadium I versus der Stadium IV Tumore, ist die Aussage bei intermediären Gruppen weniger informativ.

Tumormarker haben das Potential, diese Lücke im TNM-System zu schließen und detailliertere Informationen zur Prognose der Patienten mit kolorektalem Karzinom zu liefern. Gewebe des kolorektalen Karzinoms oder Körperflüssigkeiten, z.B. Serum, Stuhl, Urin und Sputum, können direkt auf Tumormarker hin untersucht werden.

Als Gewebetumormarker gelten Marker wie z.B. der Heterozygotieverlust des Chromosomarmes 18q (18q LOH), der Prognoseaussagen in den intermediären Gruppen ermöglicht (Jen et al., 1994). Ebenso erwies sich die DCC-Expression (*deleted in colon carcinoma*) als starker positiver Prädiktor für das Überleben bei Stadium II und III Patienten (Shibata et al., 1996). Eine Überexpression der Thymidylat-Synthase zeigte eine schlechtere Prognose und korrelierte mit der Resistenz gegen Chemotherapie (Johnston et al., 1994). Die Mutation von K-ras war, besonders bei Patienten mit Stadium

II, mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Ahnen et al., 1998). Patienten mit HNPCC oder sporadischem kolorektalen Karzinom mit einer Mikrosatelliteninstabilität überlebten dagegen signifikant länger (Watson et al., 1998). Es gibt vielversprechende Ansätze zur Differenzierung der Prognose im Bereich der Gewebetumormarker, die sich aber noch im experimentellen Stadium befinden. Da in den vorliegenden Studien zu viele unterschiedliche Untersuchungsmethoden angewandt worden sind, ist die Vergleichbarkeit oft schwierig. Die Tumormarker müssten in Zukunft in randomisierten klinischen Studien geprüft werden, bevor sie in der Klinik zum Einsatz kommen können. Außerdem müssten bei jeder Untersuchung identische Methoden und Reagenzien zum Einsatz kommen (Compton et al., 2000).

Spezifische zelluläre Proteine und Kohlenhydrate aus Körperflüssigkeiten sind schon vielfach analysiert und mit der Prognose verglichen worden, aber durch begrenzte Anzahl und Typen ist es schwierig, diese Marker auf individuelle Faktoren hin zu untersuchen. Biochemische Marker, die auf die Tumorzelle zurückzuführen sind und die möglicherweise prognostische Aussagen zulassen, sind z.B. CA19-9, *Class I human leukocyte antigen (HLA) molecules*, *Urokinase-type plasminogen activator*, E-cadherin, Phospholipase C, *Epidermal growth factor receptor* etc. Es gibt allerdings noch keine Studie, die fundierte und weiterführende Aussagen zur Prognose des kolorektalen Karzinoms zulässt (Compton et al., 2000).

Methylierung der DNA kann im Tumor selbst und in sämtlichen Körperflüssigkeiten gefunden werden. Es gibt einige Studien, in denen der DNA-Methylierungsstatus der Patienten untersucht und die Ergebnisse mit der Prognose korreliert worden sind. Eine Methylierung des p16<sup>INK4A</sup> Gens etwa wurde im Zusammenhang mit dem kürzeren Überleben in zwei Studien gefunden (Maeda et al., 2003; Liang et al., 1999). Allerdings konnte eine dritte Studie das Ergebnis nicht bestätigen (Esteller et al., 2000b). Eine Hypermethylierung der Gene CDKN2A, ID4 oder MYOD1 korrelierte signifikant mit einer kürzeren Überlebenszeit (Maeda et al., 2003; Umetani et al., 2004; Hiranuma et al., 2004; Liang et al., 1999). Kolorektale Tumore, die eine hohe Frequenz methylierter Gene aufweisen, werden mit dem Begriff *CpG island methylator phenotype* (CIMP) charakterisiert. Definierte CIMP<sup>+</sup>-Markerpanel korrelierten mit einer schlechten Prognose in einer (Hawkins et al., 2002), aber nicht in einer anderen Studie (Van Rijnsoever et al., 2002). Darüber hinaus wurde der DNA-Methylierungsstatus als Prädiktor einer adjuvanten Chemotherapie untersucht. Patienten mit CIMP<sup>+</sup>-Karzinomen profitieren signifikant mehr von einer adjuvanten Chemotherapie (Ward et al., 2003; Van Rijnsoever et al., 2003). Die Detektion von methylierter DNA im Serum wurde ebenfalls genutzt, um die Effizienz der adjuvanten Therapie bei Patientinnen mit Mammakarzinom zu untersuchen (Fiegl et al., 2005). Der Grund der kontroversen Ergebnisse liegt meist an der Auswahl unterschiedlicher Markerpanels und an den verschiedenen Methoden zur Analyse der DNA-Methylierung.

CEA, ein Glykoprotein, welches aus dem Serum gewonnen wird, ist bis zum jetzigen Zeitpunkt der einzige Tumormarker mit prognostischer Signifikanz, der zur Ergänzung



des etablierten TNM-Systems von der *American Joint Committee on Cancer Prognostic Factors Consensus Conference* vorgeschlagen worden ist (Compton et al., 2000). Präoperative CEA-Werte im Serum geben eine unabhängige prognostische Information (Duffy, 2001).

Es wäre sehr hilfreich, weitere Marker zu finden, die verlässlich Risikopatienten identifizieren können. Ein wichtiger Aspekt der Tumormarker wäre die Identifikation von kurativ resezierten Patienten mit hohem Risiko für ein Rezidiv. Diese Patienten könnten von einer adjuvanten Chemotherapie profitieren. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein positiver CEA-Wert signifikant mit der Methylierung von HPP1 und der Kombination von HPP1 und/oder HLTF im Serum korrelierte. In einer Subanalyse der Stadium II Patienten dieser Studie wurde eine Methylierung von HPP1 und/oder HLTF gefunden, die signifikant mit einer schlechteren Prognose korrelierte. Obwohl die Aussagekraft der vorliegenden Daten durch die kleine Anzahl von Patienten in dieser Subgruppe der Stadium II Patienten begrenzt ist, ist es ein zusätzlicher Hinweis, welches Potential die Serum-DNA-Methylierung als prognostischer Marker im kolorektalen Karzinom bietet. Es konnte erfolgreich nachgewiesen werden, dass die Methylierung der Gene HLTF, HPP1 und hMLH1 mit den klinisch-pathologischen Daten zusammenhängen. Es konnte der Nachweis geführt werden, dass die Gene HLTF, HPP1 und hMLH1 signifikant mit den etablierten Prognosefaktoren korrelierten. Diese Studie zeigt darüber hinaus, dass die Detektion der methylierungsspezifischen Gene HPP1, HLTF und die Kombination von HPP1 und/oder HLTF im Serum von Patienten mit kolorektalem Karzinom mit einer höheren Wahrscheinlichkeit ein Rezidiv zu erleiden assoziiert, und mit einer höheren Mortalität verbunden ist. Erst konnten drei interessante Marker identifiziert werden, aber nur HPP1 und HLTF zeigten prognostische Signifikanz. Diese Studie zeigt, dass ein einzelner Methylierungsmarker nicht die gleichen wertvolle Informationen liefert wie eine bestimmte Anzahl von Tumormarkern. Die Kombination von HPP1 und HLTF war ausschlaggebend für die überragenden, aussagekräftigen und vielversprechenden Ergebnisse.

Eine andere, kürzlich veröffentlichte Studie, die ebenfalls DNA-Methylierung im Serum von Patienten mit kolorektalem Karzinom analysierte, untersuchte die Marker HLTF, hMLH1 und APC (Leung et al., 2005). Diese Studie konnte die Serum-DNA-Methylierung nicht als prognostisch unabhängigen Faktor demonstrieren. Dies liegt möglicherweise an den drei gewählten Markern und an der relativ kleinen Anzahl von Fällen, welche aus 49 Patienten mit kolorektalem Karzinom und 41 Gesunden als Kontrolle bestand. In der vorliegenden Studie wurden 12 Marker in 58 Patientenproben in einem Gen-Evaluierungsset getestet. Danach wurden in einem Testset weitere 104 Proben von Patienten mit kolorektalem Karzinom auf die Methylierung der Marker HLTF, HPP1 und hMLH1 und auf prognostische Signifikanz hin untersucht.

Um ideal für Screening, Diagnose, Monitoring des Therapieansprechens und Detektion eines Rezidivs bei der Nachbeobachtung zu sein, muss ein tumorspezifischer Marker in einer so hohen Konzentration ausgeschüttet werden, dass bereits kleinste Tumore

detektiert werden können und die Größe des Tumors durch die ausgeschüttete Menge angezeigt wird. Um in der Klinik angewandt werden zu können, muss die Sensitivität und die Spezifität des Tumormarkers hoch sein (Widschwendter and Menon, 2006). Die meisten Verfahren, welche in dieser Studie angewandt worden sind, sind in der Forschung etabliert, aber zum Messen des DNA-Methylierungsstatus nicht standardisiert. Der Prozess der DNA-Gewinnung bis zur endgültigen Auswertung ist relativ lang und umfangreich. Es müssen sehr viele Schritte durchgeführt werden, wodurch es zu Verlusten der DNA (falsch-negativ) oder Kontaminationen (falsch-positiv) kommen kann. Außerdem wird mit einer sehr geringen Menge Serum-DNA gearbeitet, so dass es bei nicht ausreichender Menge zu falsch-negativen Ergebnissen kommen kann. Dieser niedrigen DNA-Konzentration muss mit hocheffizienten Untersuchungsmethoden, z.B. der MethyLight Technologie, entgegengewirkt werden. Durch Positiv- und Negativkontrollen wurde versucht, so viele Fehler wie möglich zu detektieren. Die Bestimmung der Intraassay- und Interassay-Variabilität sowie Mehrfachbestimmungen, falls genug DNA vorhanden ist, wären zur zusätzlichen Überprüfung sinnvoll. Eine Standardisierung und eine Verkürzung des Prozesses, vor allem für die sehr aufwendige und langwierige Bisulfitbehandlung, sind notwendig, um eine Etablierung in der Klinik zu ermöglichen. Kürzlich wurde ein Panel von 5 Markern vorgeschlagen, um CIMP mit hoher Sensitivität und Spezifität zu identifizieren (Weisenberger et al., 2006). Mit Hilfe solcher Markerpanels wäre der Anfang für eine Teilstandardisierung und Vergleichsmöglichkeiten für zukünftige Studien gegeben. Um diese Serum-Marker in der Klinik zu etablieren, muss als nächstes eine prospektive Studie durchgeführt werden. Diese Studie sollte idealerweise an eine Therapiestudie angelehnt sein. Nur so kann die tatsächliche Leistungsfähigkeit eines Markers erfasst werden. Solch eine Studie ist in der Arbeitsgruppe in Vorbereitung.

Nach bestem Wissen ist dies die erste Studie, welche zeigt, dass Serum-DNA-Methylierung ein unabhängiger prognostischer Marker bei Patienten mit kolorektalem Karzinom ist. Die Arbeit zeigt, dass die Bestimmung von DNA-Methylierung im Serum das Potential eines unabhängigen prätherapeutischen Prädiktors für ein Rezidiv und für das Überleben hat. Mit Hilfe dieses Markers könnte zukünftig die prognostische Aussage sensitiver und spezifischer werden. Methylierungsmarker haben das Potential, zur Individualisierung der Therapie entscheidend beizutragen.

## 5 Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom ist einer der häufigsten Tumore in Deutschland. Jährlich sterben ca. 30.000 Menschen an dieser Erkrankung. Zurzeit wird in der Klinik das TNM-System zur Einteilung des kolorektalen Karzinoms verwendet. Dieses System hat allerdings Defizite in der Prognoseaussage. Es eignet sich gut zur Einteilung der Prognose von Extremstadien. Die prognostische Aussage des TNM-Systems in den intermediären Gruppen ist jedoch weniger informativ. Der Serummarker CEA ergänzt das TNM-System und bietet eine zusätzliche Aussage zur Prognose. Bis heute ist das CEA der einzige Marker, welcher in der Klinik empfohlen wird.

Einige Studien zur DNA-Methylierung zeigen neue Erkenntnisse, die in Zukunft eine Verbesserung in der Therapieauswahl und der Diagnostik von Karzinomen ermöglichen könnten. Da das Ereignis der Methylierung in der Entwicklung des Karzinoms zu einem frühen Zeitpunkt stattfindet, ist damit die Erkennung von Tumoren bereits in den ersten Stadien möglich. Dies wiederum wirkt sich positiv auf die Überlebenschancen der Patienten aus. Weiterhin ermöglichen einige epigenetische Marker eine Prognoseaussage.

Diese Arbeit befasste sich mit der Identifikation geeigneter Prognosemarker im Serum von Patienten mit kolorektalem Karzinom. Es sind bisher erst wenige Daten zur Analyse methylierter DNA im Serum veröffentlicht worden.

Zuerst wurden zwölf unterschiedlich häufig methylierte Marker in einem Gen-Evaluierungsset analysiert. Die Gene HPP1, HLTF und hMLH1 zeigten die besten Ergebnisse, da diese Marker in gesunden Kontrollen nicht und in metastasierten Tumoren häufiger methyliert waren als in lokalen Tumorstadien. Der Methylierungsstatus der Gene wurde mit den klinisch-pathologischen Daten der Patienten korreliert. Es konnten signifikante Zusammenhänge zwischen der Methylierung der Gene HPP1, HLTF und hMLH1 gefunden werden. HLTF, HPP1 und hMLH1 wurden in einem Testset weitergehend untersucht. Hier fanden sich signifikante Korrelationen zwischen den klinisch-pathologischen Daten und der Methylierung der drei Gene. CEA korrelierte signifikant mit HPP1 und der Kombination von HLTF und/oder HPP1. Patienten, welche eine Methylierung der Gene HLTF, HPP1 und die Kombination von HLTF und/oder HPP1 hatten, bekamen signifikant häufiger ein Rezidiv und hatten eine signifikant kürzere Überlebenschance. In der multivariaten Analyse zeigte sich außerdem für die Kombination der Gene HLTF und/oder HPP1 eine unabhängige prognostische Information zum Rezidiv und zum Überleben. In einer Subanalyse von Stadium II Patienten wurde eine Methylierung von HPP1 und/oder HLTF gefunden, die signifikant mit einer schlechteren Prognose korrelierte.

Es wurden die Gene HLTF und HPP1 als geeignete epigenetische Prognosemarker im Serum von Patienten mit kolorektalem Karzinom identifiziert. Die Marker korrelierten

mit den etablierten Prognosefaktoren Tumorstadium, Lymphknotenstatus, Fernmetastasenstatus, UICC-Stadium und CEA. Es ließ sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Methylierungsstatus der Gene im Serum von Patienten mit kolorektalen Karzinom und der Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines Rezidivs und einer höheren Mortalität nachweisen. Die DNA-Methylierung im Serum zeigte sich in der Studie als unabhängiger Prognosefaktor für ein Rezidiv und das Überleben. Dies ist die erste Studie, die zeigt, dass Serummethylierung ein unabhängiger prognostischer Marker ist. Die Ergebnisse dieser Studie sind Ausgangspunkt für weitere prospektive Studien.

## 6 Anhang

Tabelle 6.1: Patientendaten des Gen-Evaluierungssets mit PMR Werten:  $A=0-5$ ,  $B=5-25$ ,  $C>25$

Nr.	Alter	m/w	TNM	Lokal. <sup>+</sup> &	G <sup>S</sup>	APC	HIC1	HLTF	hMLH1	HPP1	p16	RASSF1A	SFRP1	SFRP2	SFRP4	SFRP5	WT1
1	60	m	pT3,pN2,M0	l.K. <sup>#</sup>	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	57	m	pT3,pN2,M1	R <sup>~</sup>	3	0	B	C	A	B	0	0	0	0	0	0	0
3	67	m	pT3,pN2,M1	R	3	0	0	B	0	0	B	0	0	0	0	0	0
4	64	m	pT4,pN2,M1	r.K. <sup>~</sup>	3	0	A	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	61	w	pT3,pN2,M1	r.K.	3	0	0	0	0	0	C	0	0	0	0	0	0
6	71	m	pT4,pN2,M1	R	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	64	m	pT1,pN0c,M0	r.K.	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	78	w	pT3,pN1,pM0	R	3	0	0	0	0	0	B	0	0	0	0	0	0
9	87	m	pT3,pN0,M0	R	2	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	59	w	pT4,N0,pMx	R	2	0	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	72	w	pT3,pN2,pM0	r.K.	2	0	0	0	0	0	0	0	B	0	0	0	0
12	78	m	pT3,pN1,pM0	R	2	0	0	0	0	0	0	0	C	0	0	0	0
13	62	w	pT4,N2,Mx	l.K.	3	0	0	B	0	B	0	0	B	A	A	0	A

Nr.	Alter	m/w	TNM	Lokal. <sup>+</sup> &	G <sup>s</sup>	APC	HIC1	HLTF	hMLH1	HPP1	p16	RASSF1A	SFRP1	SFRP2	SFRP4	SFRP5	WT1
14	60	m	pT3,pN0,pM0	R	2	0	0	0	0	0	A	0	0	0	0	0	0
15	72	m	Gesund			A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	60	w	Gesund			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	63	w	Gesund			0	C	0	0	0	B	0	0	0	0	0	0
18	55	w	Gesund			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	55	w	pT3,pN2,pMx	n.b.	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	C	0	0
20	58	m	pT3,pN0,M0	R	2	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	76	m	pT3,N2,M0	r.K.	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	54	m	pT3,pN1,cM0	l.K.	3	0	0	0	0	A	0	0	0	0	0	0	0
23	72	m	pT3,pN1,M1	l.K.	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	60	w	Gesund			C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	71	m	pT3,pN1,cM0	r.K.	3	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	76	w	pT3,pN1,M0	r.K.	3	0	0	0	0	0	A	0	0	0	0	0	0
27	69	m	pT3,pN1,pM1	R	3	A	0	0	0	B	B	0	0	0	0	0	0
28	67	m	pT3,pN1,M1	l.K.	3	0	0	0	A	0	C	0	0	0	0	0	0
29	81	m	Gesund			0	0	0	0	0	C	0	0	0	0	0	0

Nr.	Alter	m/w	TNM	Lokal. <sup>+</sup> &	G <sup>s</sup>	APC	HIC1	HLTF	hMLH1	HPP1	p16	RASSF1A	SFRP1	SFRP2	SFRP4	SFRP5	WT1
30	69	m	pT3,pN0,pM0	r.K.	3	0	0	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0
31	56	w	pT4,pN2,pM1	R	3	B	0	0	C	0	0	0	0	0	0	0	0
32	37	m	Gesund			0	0	0	0	0	A	0	0	0	0	0	A
33	28	w	Gesund			0	A	0	0	0	A	0	0	0	0	0	0
34	23	m	Gesund			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35	74	w	Gesund			0	0	0	0	0	A	0	0	0	0	0	A
36	78	m	pT2,pN0,M0	l.K.	1	0	0	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37	70	m	Gesund			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
38	62	W	pT3,pN1,pM1	l.K.	2	A	0	C	C	B	B	0	0	0	0	0	0
39	61	M	pT3,pN0,pM1	R	3	C	0	A	0	A	C	0	0	A	0	0	0
40	80	W	Gesund			0	0	0	0	0	C	A	0	0	0	0	0
41	82	w	pT3,pN0,pM0	r.K.	2	0	0	0	0	0	A	A	A	0	0	0	0
42	53	w	pT3,pN0,pM1	r.K.	2	0	0	0	0	0	B	0	0	0	0	0	0
43	36	m	Gesund			0	0	0	0	0	B	A	0	0	0	0	0
44	68	m	Gesund			0	0	0	0	0	0	0	A	0	0	0	0
45	80	m	pT3,pN0,pM0	r.K.	2	0	0	0	0	0	A	0	0	0	0	0	0
46	67	m	pT4,pN1,M0	l.K.	3	0	0	B	0	0	0	0	0	0	A	0	0

Nr.	Alter	m/w	TNM	Lokal. <sup>+</sup> &	G <sup>§</sup>	APC	HIC1	HLTF	hMLH1	HPP1	p16	RASSF1A	SFRP1	SFRP2	SFRP4	SFRP5	WT1
47	78	w	Gesund			C	0	0	0	0	B	0	B	0	0	A	0
48	34	m	Gesund			0	0	0	0	0	A	0	0	0	0	0	A
49	38	m	Gesund			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	63	w	Gesund			0	0	0	0	0	C	0	0	0	0	0	0
51	63	w	Gesund			0	0	0	0	0	A	0	0	0	0	0	0
52	76	m	Gesund			0	0	0	0	0	C	0	0	0	B	0	0
53	56	m	pT1,pN0,Mx	l.K.	3	C	0	0	C	0	C	0	0	0	0	C	0
54	34	m	pT2,pN0,M0	r.K.	2	A	0	0	0	A	0	0	0	0	0	0	0
55	66	m	pT4,pN1,pMo	r.K.	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
56	73	m	pT3,pNo,pM0	R	2	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
57	33	m	pT4,pNo,M1	r.K.	2	B	0	C	C	0	C	0	0	0	0	B	0
58	69	w	pT3,pN2,M1	R	3	B	0	C	C	B	C	0	0	0	0	B	0

<sup>+</sup>Für einen Patienten war die Tumorlokalisation unbekannt.  
<sup>&</sup>Lok. = Lokalisation im Kolon  
<sup>r.K.</sup> = Rechtes Kolon beinhaltet das Zökum bis zum Kolon transversum.  
<sup>l.K.</sup> = Linkes Kolon beinhaltet das Kolon descendens bis zum Rektum.  
<sup>R</sup> = Rektum  
<sup>§</sup>G3 beinhaltet alle Fälle, die mit G3 und G2-3 klassifiziert wurden.  
n.b. = nicht bekannt



Tabelle 6.2: Patientendaten des Testsets mit PMR Werten: A=0-5, B=5-25, C&gt;25

Nr.	Alter	m/w	TNM <sup>^</sup>	Lokal. <sup>&amp;^</sup>	G <sup>§</sup>	Rezidiv	Zeit	Tod	Zeit	HLTF	HPPI	hMLHI
59	57	m	pT3,pN0,pMx	l.K. <sup>#</sup>	3	nein	60	nein	60	0	0	0
60	77	w	pT3,pN1,pM1	l.K.	2	nein	60	ja	0	0	A	A
61	83	m	pT3,pN0,pM1	r.K. <sup>~</sup>	2	nein	60	ja	15	A	0	A
62	50	m	pT3,pN1,pM0	l.K.	2	nein	60	nein	60	0	0	A
63	79	m	pT3,pN1,pM0	R <sup>~</sup>	3	nein	60	nein	60	0	0	0
64	56	m	pT3,pN0,pM0	l.K.	3	nein	60	nein	60	0	0	A
65	73	m	pT3,pN1,pM1	R	2	ja	1	ja	36	0	A	A
66	62	m	pT3,pN1,pMx	R	2	nein	60	nein	60	C	0	B
67	66	m	pT4,pN1,pM0	R	3	ja	2	ja	15	B	A	A
68	53	m	pT3,pN0,pM0	R	2	nein	60	nein	60	0	0	0
69	50	w	pT2,pN1,pM1	R	2	ja	20	nein	60	0	0	0
70	73	m	pT3,pN0,pM1	l.K.	3	nein	60	nein	60	0	0	0
71	60	m	pT4,pN3,pMx	l.K.	3	nein	60	nein	60	0	0	A
72	67	w	pT3,pN0,pMx	r.K.	2	nein	60	nein	60	0	0	A
73	51	w	pT3,pN3,pMx	r.K.	3	ja	8	nein	60	0	0	A

Nr.	Alter	m/w	TNM^	Lokal. <sup>e&amp;^</sup>	G <sup>s</sup>	Rezidiv	Zeit	Tod	Zeit	HLTF	HPP1	hMLH1
74	66	m	pT3,pN2,pM0	l.K.	3	nein	60	nein	60	0	0	A
75	72	w	pT3,pN0,pMx	r.K.	3	nein	60	nein	60	0	0	0
76	68	w	pT3,pN0,pMx	R	3	nein	60	nein	60	0	0	0
77	70	m	pT3,pN2,pM1	R	3	nein	60	ja	12	0	A	0
78	70	w	pT1,pN1,pM0	l.K.	2	nein	60	nein	60	0	0	0
79	66	w	pT3, pN0, pM1	R	3	nein	60	nein	60	A	A	A
80	52	m	pT3,pN0,pMx	l.K.	2	nein	60	nein	60	0	0	0
81	66	m	pT2,pN2,pM0	R	2	nein	60	nein	60	0	0	0
82	71	m	pT4,pN3,pM1	l.K.	2	n.b.	60	ja	60	C	C	0
83	69	m	pT3,pN0,pMx	r.K.	2	nein	60	nein	60	0	0	0
84	78	m	pT3,pN0,M0	r.K.	2	nein	60	ja	55	A	0	A
85	51	m	pT3,pN2,pM0,	l.K.	2	nein	60	nein	60	0	0	0
86	68	m	pT3,pN0,pMx	r.K.	n.b.	nein	60	ja	1	0	0	0
87	68	w	pT3,pN3,M0	r.K.	3	ja	14	ja	32	0	0	0
88	54	m	pT3,pN0,pMx	r.K.	3	nein	60	nein	60	0	0	0
89	61	w	pT2,pN0,pMx	l.K.	2	nein	60	nein	60	0	0	0
90	55	m	pT3,pN0,pMx	r.K.	2	nein	60	nein	60	0	0	0

Nr.	Alter	m/w	TNM <sup>^</sup>	Lokal. <sup>ε&amp;^</sup>	G <sup>§</sup>	Rezidiv	Zeit	Tod	Zeit	HLTF	HPP1	hMLH1
91	69	w	pT3,pN0,pMx	l.K.	3	nein	60	nein	60	0	0	C
92	50	w	pT3,pN0,pM1	R	3	ja	1	ja	23	C	C	B
93	71	m	pT2,pN0,pM0	r.K.	2	nein	60	nein	60	0	0	0
94	69	w	pT2,pN0,pMx	R	2	ja	19	ja	33	0	0	0
95	63	m	pT3,N1,pMx	l.K.	3	nein	60	nein	60	0	0	0
96	62	m	pT3,pN3,pM1	R	3	nein	60	nein	60	C	B	0
97	67	w	pT4,pN2,pM1	R	2	nein	60	ja	6	C	C	0
98	53	w	pT1,pN0,pM0	R	n.b.	nein	60	nein	60	0	0	C
99	50	m	pT4,pN0,pMx	l.K.	2	ja	20	ja	18	A	0	B
100	51	w	pT4,pN1,pM0	R	2	nein	60	nein	60	A	0	A
101	60	m	pT3,pN2,pMx	R	3	ja	13	ja	19	0	0	A
102	79	w	pT3,pN0,pMx	r.K.	2	nein	60	nein	60	0	0	0
103	74	w	pT3,pN3,pMx	R	3	ja	3	ja	30	B	0	A
104	65	m	pT3,pN0,pMx	l.K.	2	n.b.	60	n.b.	60	0	0	0
105	70	w	pT3,pN3,Mx	R	3	ja	0	ja	19	0	0	0
106	72	w	pT1,pN0,pMx	l.K.	1	n.b.	60	n.b.	60	C	0	0
107	75	w	pT2,pN0,pMx	l.K.	2	n.b.	60	n.b.	60	0	0	0

Nr.	Alter	m/w	TNM^	Lokal. <sup>ε&amp;^</sup>	G <sup>δ</sup>	Rezidiv	Zeit	Tod	Zeit	HLTF	HPP1	hMLH1
108	86	w	pT3,pN0,pMx	l.K.	2	ja	12	ja	19	C	0	C
109	68	w	pT3,pN3,pMx	r.K.	3	n.b.	60	n.b.	60	0	0	0
110	33	w	pT3,pN2,Mx	R	2	ja	60	ja	60	0	0	0
111	67	m	pT3,pN0,Mx	R	2	nein	60	nein	60	0	0	0
112	89	m	pT4,pN3,pMx	l.K.	3	nein	60	ja	22	0	0	0
113	70	m	pT1,pN0,pMx	R	2	n.b.	60	n.b.	0	0	A	A
114	76	m	pT3,pN3,pM1	n.b.	3	n.b.	60	n.b.	1	0	C	0
115	49	w	pT3,pN1,pMx	R	3	ja	10	nein	60	0	0	B
116	58	w	pT4,pN2,pMx	l.K.	3	ja	6	ja	60	0	0	B
117	60	w	pT4,pN3,pMx	R	2	n.b.	60	n.b.	60	0	0	C
118	82	m	pT3,pN1,pMx	R	2	nein	60	nein	60	0	0	0
119	81	m	pT3,pN0,pMx	R	2	nein	60	nein	60	0	0	0
120	57	m	pT3,pN0,pMx	l.K.	2	n.b.	60	n.b.	60	0	A	0
121	75	m	pT3,pN1,pMx	r.K.	3	n.b.	60	n.b.	60	0	0	0
122	50	m	pT3,pN3,pMx	l.K.	3	ja	25	nein	60	B	0	0
123	80	w	pT4,pN2,pM1	R	3	n.b.	60	n.b.	60	C	0	0
124	57	w	pT3,pN3,pM2	r.K.	3	ja	60	ja	44	B	B	0

Nr.	Alter	m/w	TNM^	Lokal. <sup>e&amp;^</sup>	G <sup>s</sup>	Rezidiv	Zeit	Tod	Zeit	HLTF	HPP1	hMLH1
125	81	w	pT3,pN0,pMx	l.K.	2	n.b.	60	n.b.	60	0	0	0
126	62	m	pT2,pN0,pMx	R	3	nein	60	nein	60	0	0	0
127	71	m	pT2,pN0,pMx	R	3	ja	17	ja	23	C	0	0
128	57	w	pT3,pN0,pMx	l.K.	3	n.b.	60	n.b.	60	C	0	C
129	71	m	n.b.	r.K.	n.b.	nein	60	nein	60	0	0	0
130	77	m	pT3,pN0,pMx	R	2	n.b.	60	ja	17	C	0	C
131	82	m	pT3,pN0,pMx	r.K.	2	n.b.	60	n.b.	60	0	0	A
132	53	m	pT2,pN0,pMx	R	3	n.b.	60	n.b.	60	0	0	0
133	65	m	pT2,pN0,pMx	R	2	ja	12	ja	12	0	0	0
134	69	m	pT1,pN1,pMx	R	2	ja	17	n.b.	60	B	B	A
135	84	m	pT1,pN0,pMx	l.K.	2	n.b.	60	n.b.	60	C	0	C
136	80	m	pT3,pN0,pMx	R	2	nein	60	nein	60	B	A	A
137	64	w	pT1,pN0,pMx	R	3	nein	60	nein	60	0	0	A
138	70	m	pT3,pN1,pMx	l.K.	2	nein	60	n.b.	60	0	0	0
139	64	w	pT3,pN0,pMx	l.K.	2	nein	60	nein	60	0	0	0
140	52	w	pT3,pN1,pMx	R	3	nein	60	nein	60	0	0	0
141	72	w	pT3,pN1,pMx	r.K.	3	n.b.	60	n.b.	60	0	0	0

Nr.	Alter	m/w	TNM^	Lokal. <sup>e&amp;^</sup>	G <sup>s</sup>	Rezidiv	Zeit	Tod	Zeit	HLTF	HPP1	hMLH1
142	92	m	pT3,pN0,pMx	l.K.	2	n.b.	60	n.b.	60	0	0	0
143	81	m	pT3,pN0,pMx	r.K.	2	n.b.	60	n.b.	60	0	0	0
144	51	w	pT4,pN1,pMx	R	3	ja	0	ja	8	0	0	0
145	76	m	pT3,pN0,pM0	r.K.	1	n.b.	60	n.b.	60	0	0	0
146	74	m	pT4,pN1,pMx	R	3	ja	59	nein	60	0	0	0
147	71	m	pT3,pN0,pMx	r.K.	2	n.b.	60	n.b.	60	0	0	0
148	72	w	pT3,pN0,pMx	r.K.	2	nein	60	nein	60	0	0	A
149	45	w	pT3,pN1,pMx	R	2	n.b.	60	n.b.	60	0	0	0
150	61	m	pT1,pN0,pMx	l.K.	1	nein	60	nein	60	0	0	0
151	89	w	pT3,pN1,pMx	l.K.	3	n.b.	60	n.b.	60	0	0	0
152	68	w	pT2,pN0,pMx	R	2	ja	4	nein	60	0	0	0
153	63	m	pT3,pN0,pMx	r.K.	2	nein	60	nein	60	0	0	0
154	56	m	pT3,pN2,pMx	l.K.	2	n.b.	60	n.b.	60	0	0	0
155	58	m	pT3,pN0,pMx	l.K.	3	nein	60	nein	60	0	0	A
156	60	m	pT3,pN0,pMx	l.K.	2	nein	60	nein	60	0	0	0
157	75	w	pT3,pN1,pMx	l.K.	3	n.b.	60	n.b.	60	0	0	A
158	53	w	pT3,pN2,pM1	R	3	ja	9	ja	10	0	0	0

Nr.	Alter	m/w	TNM <sup>^</sup>	Lokal. <sup>&amp;^</sup>	G <sup>§</sup>	Rezidiv	Zeit	Tod	Zeit	HLTF	HPP1	hMLH1
159	69	w	pT3,pN1,pMx	R	2	nein	60	nein	60	0	0	A
160	82	w	pT2,pN1,pMx	r.K.	2	ja	29	ja	29	0	0	A
161	73	w	pT3,pN1,pMx	R	3	ja	9	ja	50	0	0	0
162	72	w	pT4,pN0,pMx	r.K.	3	n.b.	60	n.b.	60	0	0	A

<sup>^</sup>Für einen Patienten war die Tumorlokalisierung und die Information zum TNM-Stadium nicht verfügbar

<sup>&</sup>Lok. = Lokalisation des Tumors im Kolon

<sup>~</sup>r.K. = Rechtes Kolon beinhaltet das Zökum bis zum Kolon transversum.

<sup>#</sup>l.K. = Linkes Kolon beinhaltet das Kolon descendens bis zum Rektum.

<sup>~</sup>R = Rektum

<sup>§</sup>G3 beinhaltet alle Fälle, die mit G3 und G2-3 klassifiziert wurden.

n.b. = nicht bekannt

## 7 Schrifttum

Ahlquist DA and Shuber AP. Stool screening for colorectal cancer: Evolution from occult blood to molecular markers. *Clin Chim Acta* 2002;315:157-68.

Ahlquist DA, Skoletsky JE, Boynton KA, Harrington JJ, Mahoney DW, Pierceall WE, Thibodeau SN, Shuber AP. Colorectal cancer screening by detection of altered human DNA in stool feasibility of a multitarget assay panel. *Gastroenterology* 2000;119(5):1219-27.

Ahnen DJ, Feigl P, Quan DC, Fenoglio-Preiser CM, Lovato LC et al. Kras Mutation and p53 overexpression predict the clinical behavior of colorectal cancer: a southwest oncology group study. *Cancer Res* 1998;58:1149-58.

Ahuja N, Li Q, Mohan AL, Baylin SB, Issa JP. Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer. *Cancer Res* 1998;58:5489-94.

Ahuja N, Mohan AL, Li Q, Stolker JM, Herman JG, Hamilton SR, et al. Association between GpG island methylation and microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1997;57:3370-4

Baylin SB, Hoppener JW, de Bustros A, Steenbergh PH, Lips CJ, Nelkin BD. DNA methylation patterns of the calcitonin gene in human lung cancers and lymphomas. *Cancer Res* 1986;46:2917-22.

Baylin SB and Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nature Reviews Cancer* 2006;6:107-116.

Becker N. Epidemiologie kolorektaler Tumoren. *Radiologe* 2003;43:98-104.

Belshaw NJ, Elliott GO, Williams EA, *et al.* Use of DNA from human stools to detect aberrant CpG island methylation of genes implicated in colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:1495-501.

Bergström A, Pisani P, Tenet V, Wolk A, Adami H-O. Overweight as an avoidable cause of cancer in Europe. *Int J Cancer* 2001;92:421-30.

Bird AP and Wolffe AP. Methylation-Induced Repression-Belts, Braces, and Chromatin. *Cell* 1999;99:451-4.

Brandes JC, van Engeland M, Wouters KA, Weijnenberg MP, Herman JG. CHFR promoter hypermethylation in colon cancer correlates with the microsatellite instability phenotype. *Carcinogenesis* 2005;26(6):1152-6.

Brenner H, Arndt V, Stürmer T, Stegmaier C, Ziegler H, Dhorn G. Long-lasting reduction of risk of colorectal cancer following screening endoscopy. *Br J Cancer* 2001;85:972-6.



- Brueckl WM, Jung A, Wein A, Brabletz T, Guenther K, Nusko G, Hahn EG. Microsatellite instability in colorectal adenomas: relevance and clinical importance. *Int J Colorectal Dis* 2000;15(4):189-96.
- Chen W, Cooper TK, Zahnow CA, Overholtzer M, Zhao Z, Ladanyi M, Karp JE, Gokgoz N, Wunder JS, Andrulis IL, Levine AJ, Mankowski JL, Baylin SB. Epigenetic and genetic loss of Hic1 function accentuates the role of p53 in tumorigenesis. *Cancer Cell* 2004;6.
- Chen WY, Zeng X, Carter MG, *et al.* Heterozygous disruption of Hic1 predisposes mice to a gender-dependent spectrum of malignant tumors. *Nat Genet* 2003;33:197-202.
- Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Research* 1994;22(15):2990-7.
- Compton C, Fenoglio-Preiser CM, Pettigrew N, Fielding LT. American Joint Committee on Cancer Prognostic Factors Consensus Conference: Colorectal Working Group. *Cancer* 2000;88:1739-57.
- Costello JF, Fruhwald MC, Smiraglia DJ, *et al.* Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet* 2000;24:132-8.
- Costello JF, Futscher BW, Tano K, Graunke DM, Pieper RO. Graded methylation in the promoter and body of the o6-methylguanine dna methyltransferase (mgmt) gene correlates with mgmt expression in human glioma cells. *J Biol Chem* 1994;269:17228-37.
- Dai CY, Furth EE, Mick R, Koh J, Takayama T, Niitsu Y, Enders GH. p16<sup>INK4A</sup> Expression begins early in human colon neoplasia and correlates inversely with markers of cell proliferation. *Gastroenterology* 2000;119:929-42.
- Devereux TR, Horikawa I, Anna CH, Annab LA, Afshari CA, Barrett JC. DNA methylation analysis of the promoter region of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene. *Cancer Res* 1999;59:6087-90.
- Duffy MJ, van Dalen A, Haglund C *et al.* Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer: European Group on Tumor markers (EGTM) guidelines. *Eur J Cancer* 2003;39:718-27.
- Duffy MJ. Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful? *Clin Chem* 2001;47:624-30.
- Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Blake C, Shibata D, Danenberg PV, Laird PW. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Research* 2000;28(8).
- Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Danenberg PV, Laird PW. CpG Island Hypermethylation in Human Colorectal Tumors Is Not Associated with DNA Methyltransferase Overexpression. *Cancer Res.* 1999;15(59):2302-6.

Eads CA, Reginald VL, Wickramasinghe K, Long TL, Kurumboor SK, Bernstein L, Peters JH, DeMeester SR, Skinner KA, Laird PW. Epigenetic Patterns in the Progression of Esophageal Adenocarcinoma. *Cancer Res* 2001;61:3410-8.

Ebert MP, Mooney SH, Tonnes-Priddy L, Lograsso J, Hoffmann J. Hypermethylation of the TPEF/HPP1 Gene in Primary and Metastatic Colorectal Cancers. *Neoplasia* 2005;7(8):771-8.

Ehrlich M, Woods CB, Yu MC, Dubeau L, Yang F, *et al.* Quantitative analysis of associations between DNA hypermethylation, hypomethylation, and DNMT RNA levels in ovarian tumors. *Oncogene* 2006;25(18):2636-45.

Esteller M, Fraga MF, Guo M, *et al.* DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. *Hum Mol Genet* 2001;10:3001-7.

Esteller M, Sparks A, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, Capella G, Peinado MA, Gonzalez S, Tarafa G, Sidransky D, Meltzer SJ, Baylin SB, Herman JG. Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. *Cancer Res* 2000a;60:4366-71.

Esteller M, Tortola S, Toyota M, *et al.* Hypermethylation-associated inactivation of p14(ARF) is independent of p16(INK4a) methylation and p53 mutational status. *Cancer Res* 2000b;60:129-33.

Fearon ER and Vogelstein B. A genetic model for colorectal carcinogenesis. *Cell* 1990; 61:759-67.

Fiegl H, Millinger S, Mueller-Holzner E, *et al.* Circulating tumor-specific DNA: a marker for monitoring efficacy of adjuvant therapy in cancer patients. *Cancer Res* 2005;65:1141-5.

Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molly PL, Paul CL. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89(5):1827-31.

Geddert H, Kiel S, Iskender E, Florl AR, Krieg T, Vossen S, Gabbert HE, Sarbia M. Correlation of hMLH1 and HPP1 hypermethylation in gastric but not in esophageal and cardiac adenocarcinoma. *Int. J. Cancer* 2004 Feb;110:208-11.

Grady WM, Rajput A, Lutterbaugh JD, Markowitz SD. Detection of aberrantly methylated hMLH1 promoter DNA in the serum of patients with microsatellite unstable colon cancer. *Cancer Res* 2001;61:900-2.

Grimm C, Spörle R, Schmid TE, Adler ID, Adamski J, Schughart K, Graw. Isolation an embryonic expression of the novel mouse gene HIC1, the homologue of HIC1, a candidate gene for the Miller-Dieker syndrome. *Human Molecular Genetics* 1999;8(4):697-710.

Grunau C, Clark SJ, Rosenthal A. Bisulfit genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Research*

2001;29(13)e65.

Hardcastle JD, Chamberlain JO, Robinson MH, Moss SM, Amar SS, Balfour TW, *et al.* Randomised controlled trial of faecal occult blood screening for colorectal cancer. *Lancet* 1996;348:1472-7.

Hawkins N, Norrie M, Cheong K, *et al.* CpG island methylation in sporadic colorectal cancers and its relationship to microsatellite instability. *Gastroenterology* 2002;122:1376-87.

Herman JG and Baylin SB. Gene Silencing in Cancer in Association with Promoter Hypermethylation. *N Engl J Med* 2003;349:2042-54.

Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Medical science* 1996;93(18):9821-6.

Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JP, Davidson NE, Sidransky D, Baylin SB. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res* 1995;55:4525-30.

Herman JG, Umar A, Polyak K, *et al.* Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:6870-5.

Herman JG. Hypermethylation of tumor suppressor genes in cancer. *Cancer Biology* 1999;9:359-367.

Hibi K, Nakayama H, Kanyama Y, Kodera Y, Iro K *et al.* Methylation pattern of HLTF gene in digestive tract cancer. *Int J. Cancer* 2003;104:433-6.

Hiltunen MO, Koistinaho J, Alhonen L, *et al.* Hypermethylation of the WT1 and calcitonin gene promoter regions at chromosome 11p in human colorectal cancer. *Br J Cancer* 1997;76:1124-30.

Hiranuma C, Kawakami K, Oyama K, Ota N, Omura K, Watanabe G. Hypermethylation of the MYOD1 gene is a novel prognostic factor in patients with colorectal cancer. *Int J Mol Med* 2004;13:413-7.

Holinski-Feder E, Vogelsang H, Gross M, Kopp R, Tympner C, Keller G. Hereditäre Tumorerkrankungen des Gastrointestinaltraktes. Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München 2006;232-52.

Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, Turnbull BA, Ross ME. Fecal DNA versus Fecal Occult Blood for Colorectal-Cancer Screening in an Average-Risk Population. *N Engl J Med* 2004;351:2704-14.

Issa JP. Methylation and prognosis: of molecular clocks and hypermethylator phenotypes. *Clin Cancer Res* 2003;9:2879-81.

Ito S, Hibi K, Nakayama H, Kodera Y, Ito K, Akiyama A, Nakao A. Detection of

- Tumor DNA in Serum of Colorectal Cancer Patients. *Jpn. J. Cancer Res* 2002;3:1266-9.
- Jaenisch R and Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature genetics supplement* 2003;33:245-52.
- Jass JR, Whitehall VLJ, Young J, Leggett BA. Emerging Concepts in Colorectal Neoplasia. *Gastroenterology* 2002;123:862-76.
- Jemal A, Tiwari RC, Murray T, *et al.* Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin* 2004;54:8-29.
- Jen J, Kim H, Piantadosi S, Liu A-F, Levitt BC *et al.* Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. *N Engl Med* 1994;331:213-21.
- Johnson PJ, Lo YMD, Plasma Nucleic Acids in the Diagnosis and Management of Malignant Disease. *Clinical Chemistry* 2002;48(8):1186-93.
- Johnston PG, Fisher ER, Rockette HE, Fisher B *et al.* The role of thymidate synthase in prognosis and outcome of adjuvant chemotherapy in patients with rectal cancer. *J Clin Oncol* 1994;12:2640-7.
- Jones PA and Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002;3:415-28.
- Jones PA and Baylin SB. The Epigenomics of Cancer. *Cell* 2007;128:638-92.
- Kamat AA, Bischoff FZ, Dang D, *et al.* Circulating cell-free DNA: a novel biomarker for response to therapy in ovarian carcinoma. *Cancer Biol Ther* 2006;5:1369-74.
- Kane MF, Loda M, Gaida GM, *et al.* Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res* 1997;57:808-11.
- Kang GH, Lee S, Shim Yh, Kim JC, Ro JY. Profile of methylated CpG sites of hMLH1 promoter in primary gastric carcinoma with microsatellite instability. *Pathology International* 2002;52:764-8.
- Kinzler KW and Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996; 87:159-70.
- Kolligs FT, Sackmann M, Göke B. Wer, wann, wie? Screening zur Vorbeugung des kolorektalen Karzinoms. *MMW-Fortschr.Med.* 2002;51-52:24-8.
- Kondo Y and Issa JP. Epigenetic changes in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004;23:29-39.
- Krebs in Deutschland, Häufigkeiten und Trends, 5. überarbeitete Ausgabe. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID) und das Robert-Koch-Institut (RKI), Saarbrücken 2006.
- Kronberg O, Fenger C, Olsen J, Jorgensen OD, Sondergaard O. Randomised study of

- screening for colorectal cancer with faecal occult blood test. *Lancet* 1996;348:1467-71.
- Laird PW. The power and the promise of DNA Methylation Markers. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:253-66.
- Laux DE, Curran EM, Welshons WV, Lubahn DB, Huang THM. Hypermethylation of the Wilms' tumor suppressor gene CpG island in human breast carcinomas. *Breast Cancer Res and Treatment* 1999;56:35-43.
- Lee S, Hwang KS, Lee HJ, Kim JS, Kang GH. Aberrant CpG island hypermethylation of multiple genes in colorectal neoplasiae. *Laboratory Investigation* 2004;84:884-93.
- Lenhard K, Bommer GT, Asutay S, *et al.* Analysis of promoter methylation in stool: a novel method for the detection of colorectal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005;3: 142-9.
- Leung WK, To KF, Man EP, *et al.* Quantitative detection of promoter hypermethylation in multiple genes in the serum of patients with colorectal cancer. *Am J Gastroenterol* 2005;100:2274-9.
- Liang G, Robertson KD, Talmadge C, Sumegi J, Jones PA. The gene for a novel transmembrane protein containing epidermal growth factor and follistatin domains is frequently hypermethylated in human tumor cells. *Cancer Res* 2000;60:4907-12.
- Liang JT, Chang KJ, Chen JC, *et al.* Hypermethylation of the p16 gene in sporadic T3N0M0 stage colorectal cancers: association with DNA replication error and shorter survival. *Oncology* 1999;57:149-56.
- Lind GE, Thorstensen L, Løvig T, Meling GI, Hamelin R, Rognum TO, Esteller M, Lothe RA. A CpG island hypermethylation profile of primary colorectal carcinomas and colon cancer cell lines. *Molecular Cancer* 2004;3:28.
- Lüchtenborg M, Weijnenberg MP, Roemen GMJM, de Bruïne AP, van den Brandt PA, Lentjes MHFM, Brink M, van Engeland, M, Goldbohm RA, Goeij de AFMP. APC mutations in sporadic colorectal carcinomas from The Netherland Cohort Study. *Carcinogenesis* 2004;25(7):1219-26.
- Maeda K, Kawakami K, Ishida Y, Ishiguro K, Omura K, Watanabe G. Hypermethylation of the CDKN2A gene in colorectal cancer is associated with shorter survival. *Oncol Rep* 2003;10:935-8.
- Maekawa M, Sugano K, Ushiana M, Fukayama N, Nomoto K, Kashiwabara H, Fujita S, Kakizoe T. Heterogeneity of DNA metyhlation status analyzed by bisulfit-PCR-SSCP and correlation with clinico-pathological characteristics in colorectal cancer. *Clin Chem Lab Med* 2001;39(2):121-8.
- Mandel JS, Bond JH, Church R, Snover DC, Bradley GM, Schuman LM, *et al.* Reducing mortality from colorectal cancer by screening for fecal occult blood. Minnesota Colon Cancer Control Study. *N Engl J Med* 1993;328:1365-71.
- Matsuzaki K, Deng G, Tanaka H, Kakar S, *et al.* The Relationship between Global

- Methylation Level, Loss of Heterozygosity, and Microsatellite Instability in Sporadic Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11(24):8564-9.
- Miotto E, Sabbioni S, Veronese A, *et al.* Frequent aberrant methylation of the CDH4 gene promoter in human colorectal and gastric cancer. *Cancer Res* 2004;64:8156-9.
- Moinova HR, Chen WD, Shen L, Smiraglia D, Olechenowicz J, Ravi L, Kasturi L, Myeroff L, Plass C, Parsons R, Minna R, Willson JKV, Green SB, Issa JP, Markowitz SD. HMTF gene silencing in human colon cancer. *PNAS* 2002;99(7):4562-7.
- Müller HM, Oberwalder M, Fiegl H, *et al.* Methylation changes in faecal DNA: a marker for colorectal cancer screening? *Lancet* 2004;363:1283-5.
- Müller HM, Widschwendter A, Fiegl H, *et al.* DNA methylation in serum of breast cancer patients: an independent prognostic marker. *Cancer Res* 2003;63:7641-5.
- Nakayama H, Hibi K, Taguchi M, *et al.* Molecular detection of p16 promoter methylation in the serum of colorectal cancer patients. *Cancer Lett* 2002;188:115-9.
- Nakayama H, Hibi K, Takase T, *et al.* Molecular detection of p16 promoter methylation in the serum of recurrent colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 2003;105:491-3.
- Ogino S, Cantor M, Kawasaki T, Brahmandam M, Kirkner GJ, Weisenberger DJ, Campan M, Laird PW, Loda M, Fuchs CS. CpG island methylator phenotype (CIMP) of colorectal cancer is best characterised by quantitative DNA methylation analysis and prospective cohort studies. *GUT* 2006;55:1000-6.
- Petko Z, Ghiassi M, Shuber A, Gorham J, Smalley W, Washington MK, Schultenover S, Gautam S, Markowitz SD, Grady WM. Aberrantly Methylated CDKN2A, MGMT and MLH1 in Colon Polyps and in Fecal DNA from Patients with Colorectal Polyps. *Clinical Research* 2005;11:1203-9.
- Pinte S, Stankovic-Valentin N, Deltour S, Rood BR, Guérardel C, Leprince D. The Tumor Suppressor Gene HIC1 (Hypermethylated in Cancer1) is a sequence-specific Transcriptional Repressor. *J Biol Chem* 2004;279;37:38313-24.
- Provenzale D. Screening and surveillance, Gastroenterology Division, Duke University Medical Center, Epidemiology, Decision Analysis, Outcome Research Group, Durham, North Carolina. *Gastrointestinal Diseases: Risk Factors and Prevention* edited by John F. Johanson, Lippincott-Raven Publisher, Philadelphia 1997;27705-7080.
- Robertson KD and Jones PA. The human ARF cell cycle regulatory gene promoter is a CpG island which can be silenced by DNA methylation and down-regulated by wild-type p53 Dynamic interrelationships between DNA replication, methylation, and repair. *Mol Cell Biol* 1998;18:6457-73.
- Rüschoff J, Roggendorf B, Brasch F, Mathiak M, Aust DE, Plaschke J, Mueller W, Poremba C, Kloor M, Keller G, Muders M, Blasenbren-Vogt, Rümmele P, Mueller A, Büttner R. Molekularpathologische Diagnostik beim erblichen Dickdarmkarzinom *Pathologie* 2004;25:178-92.

- Sandhu MS, White IR, McPherson K. Systematic review of the prospective cohort studies on meat consumption and colorectal cancer risk: a meta-analytical approach. *Cancer Epidem Biomark Prevent* 2001;10:439-46.
- Sandler RS. Colorectal Cancer. Division of Digestive Diseases and Nutrition, Department of Medicine, Center for Gastrointestinal Biology and Disease, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina. *Gastrointestinal Diseases: Risk Factors and Prevention* edited by John F. Johanson, Lippincott-Raven Publisher, Philadelphia 1997;27599-7080.
- Sato F, Shibata D, Harpaz N, Xu Y, Yin J, Mori Y *et al.* Aberrant Methylation of the HPP1 Gene in Ulcerative Colitis associated in Colorectal Carcinoma. *Cancer Res* 2002;68:20-2.
- Schalhorn A, Kolligs F, Tympner C, Gross M, Wagner A, Wichmann M, Lersch C, Zellmann K. *Manual Gastrointestinale Tumoren*. Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München 2006;117-60.
- Shen L and Issa JP. Epigenetics in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2002;118:68-73.
- Shen L, Kondo Y, Hamilton SR, Rashid A, Issa JP. p14ARF methylation in human colon cancer is associated with microsatellite instability and wild-type p53. *Gastroenterology* 2003;124(3):626-33.
- Sherr CJ. The INK4a/ARF network in tumor suppression. *Nat Rev Moll Cell Biol* 2001;2:731-7.
- Shibata D, Reale MA, Siverman P, Fearon ER *et al.* The DCC protein and prognosis in colorectal cancer. *NJ Engl J Med* 1996;335:1727-32.
- Shibata DM, Sato F, Mori Y, Perry K, Yin J, Wang S, Xu Y, Oлару A, Selaru F, Spring K, Young J, Abraham JM, Meltzer SJ. Hypermethylation of HPP1 is associated with hMLH1 Hypermethylation in Gastric Adenocarcinomas. *Cancer Res* 2002;62:5637-40.
- Sidransky D. Emerging molecular markers of cancer. *Nat Rev Cancer* 2002;2:210-9.
- Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Olson-Sand A, Anker P, About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *Clin Chim Acta* 2001;313:139-42.
- Suzuki H, Gabrielson E, Chen W, *et al.* A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer. *Nat Genet* 2002;31:141-9.
- Suzuki H, Watkins DN, Jair KW, *et al.* Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer. *Nat Genet* 2004;36:417-22.
- Takai D and Jones PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes

21 and 22. Proc Natl Acad Sci USA 2002;99:3740-5.

Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. Proc Natl Acad Sci USA 1999a;96:8681-6.

Toyota M, Ahuja N, Suzuki H, Itoh F, Ohe-Toyota M, Imai K, Baylin SB, Issa JP. Aberrant Methylation in Gastric Cancer Associated with the CpG Island Methylator Phenotype. Cancer Res 1999b;59(21):5438.

Toyota M and Issa JP. Epigenetic changes in solid and hematopoietic tumors. Semin Oncol 2005;32:521-30.

Toyota M and Issa JP. The role of DNA hypermethylation in human neoplasia. Electrophoresis 2000;(21):329-33.

Toyota M, Shen L, Ohe-Toyota M, Hamilton SR, Sinicrope FA, Issa JP. Aberrant methylation of the Cyclooxygenase 2 CpG island in colorectal tumors. Cancer Res 2000;60:4044-8.

Umetani N, Takeuchi H, Fujimoto A, Shinozaki M, Bilchik AJ, Hoon DS. Epigenetic inactivation of ID4 in colorectal carcinomas correlates with poor differentiation and unfavourable prognosis. Clin Cancer Res 2004;10:7475-83.

Ushijima, T. Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells, Nat Rev Cancer 2005;5:23-31.

Van Rijnsoever M, Eslahel H, Joseph D, McCaul K, Iacopetta B. CpG island methylator phenotype is an independent predictor of survival benefit from 5-fluorouracil in stage III colorectal cancer. Clin Cancer Res 2003;9:2898-903.

Van Rijnsoever M, Grieu F, Elsaleh H, Joseph D, Iacopetta B. Characterisation of colorectal cancers showing hypermethylation of multiple CpG islands. GUT 2002;51:797-802.

Veigl ML, Kasturi L, Olechnowicz J, *et al.* Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:8698-702.

Vos MD, Ellis CA, Bell A, Birrer MJ, Clark GJ. Ras uses the novel tumor suppressor RASSF1 as an effector to mediate apoptosis, The journal of biological chemistry 2000; 275(46):35669-72.

Wales MM, Biel MA, el Deiry W, *et al.* p53 activates expression of HIC-1, a new candidate tumour suppressor gene on 17p13.3. Nat Med 1995;1:570-7.

Ward RL, Cheong K, Ku SL, Meagher A, O'Connor T, Hawkins NF. Adverse prognostic effect of methylation in colorectal cancer is reversed by microsatellite instability. J Clin Oncol 2003;21:3729-36.

Watson P, Lin KM, Rodriguez-Bigas MA, Smyrk T, Lemon S *et al.* Colorectal carcinoma survival among hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma family



members. *Cancer* 1998;83:259-66.

Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet* 2006;38:787-93.

Whitehall VL, Wynter CV, Walsh MD, *et al.* Morphological and molecular heterogeneity within nonmicrosatellite instability-high colorectal cancer. *Cancer Res* 2002;62:6011-4.

Widschwendter M and Menon U. Circulating Methylated DNA: A New Generation of Tumor Markers. *Clin Canc Res* 2006;12(24):7205-8.

Widschwendter A, Müller HM, Fiegl H., Ivarsson L, Wiedemair A, Müller-Holzner E, Goebel G, Marth C, Widschwendter M. DNA Methylation in Serum and Tumors of Cervical Cancer Patients. *Clin Cancer Res* 2004;10:565-71.

Winawer SJ. The achievements, impact and future of the National Polyp Study. *Gastrointestinal Endoscopy* 2006;64(6):975-8.

World Cancer Research Fund (WCRF). Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research, Washington 1997.

Xu, X-L, Yu J, Zhang H-Y, Sun M-H *et al.* Methylation profile of the promoter CpG islands of 31 genes that may contribute to colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2004;10(23):3441-54.

Young J, Biden KG, Simms LA, *et al.* HPP1: a transmembrane protein-encoding gene commonly methylated in colorectal polyps and cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:265-70.

Zou HZ, Yu BM, Wang ZW, *et al.* Detection of aberrant p16 methylation in the serum of colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 2002;8:188-91.

## 8 Abkürzungen

A	Adenin
APC	adenomatous polyposis coli
Aqua bidest	Doppelt destilliertes Wasser
ARF	ADP-ribosylation factor
Bp	Basenpaar
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CEA	Carcinoembryonales Antigen
COX2	Cyklooygenase2
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat Dinatrium, Dihydrat
FAP	autosomal-dominant vererbte familiäre adenomatöse polyposis
FOBT	Fecal occult blood test
G	Guanin
HCl	Salzsäure
HIC1	hypermethylated in cancer 1
HLTF	helicase-like transcription factor
hMLH1	human mut-L homolog 1
HNPCC	hereditary nonpolyposis colorectal cancer
HPP1/ TPEF	hyperplastic polyposis 1/transmembrane protein containing epidermal growth factor and follistatin domains
hTERT	human telomerase reverse transcriptase

---

KHCO <sub>3</sub>	Kaliumhydrogencarbonat
LOH	Loss of Heterozygosity
M	Molar
MBD1	methyl CpG binding domain 1
MeCP2	methyl CpG binding protein 2
MethyLight	Methylierungs-spezifische PCR mit Taqman Sonden
mM	Millimolar
mg, µg, ng	Milli-, Mikro-, Nanogramm
min	Minuten
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MGMT	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase
mRNA	Boten-RNA
MSH2	mutS homolog 2
MSH6	mutS homolog 6
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSP	Methylierungs-spezifische PCR
MYH	mutY gene (A/G-specific adenine DNA glycosylase)
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NH <sub>4</sub> Ac	Ammoniumacetat
NH <sub>4</sub> Cl	Ammoniumchlorid
p14	Protein 14
p16 <sup>INK4a</sup>	Protein 16
p53	Protein 53
PCR	Polymerase chain reaction
PMR	percent of methylated molecules ratio (Prozentsatz der voll methylierten Moleküle)
PMS2	postmeiotic segregation increased 2

---

RASSF1A	ras association domain family protein
RNA	Ribonukleinsäure
ROC	Receiver Operating Characteristic
RR	Relatives Risiko
SFRP	soluble frizzled related protein
T	Thymin
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
U	Unit (Einheit)
UICC	Union Internationale contre le Cancer
U/min	Umdrehungen pro Minute
WT1	Wilms Tumorsuppressorgen

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Maike Julia Wallner geb. Wilbrand

Geboren am 24.02.1975 in Frankfurt am Main

Verheiratet, 2 Kinder

Staatsangehörigkeit: Deutsch

### Schulische Ausbildung

---

1981 – 1985 Grundschule, Königstein im Taunus

1985 – 1991 Taunusschule Königstein, Gymnasium, Königstein im Taunus

1991 - 1992 Chattahoochee High School, Atlanta, Georgia, USA

1992 – 1995 Immanuel-Kant-Schule, Kelkheim am Taunus

### Berufliche Ausbildung

---

1995 – 2001 Studium der Humanmedizin, Universität Mainz

1998 – 1999 Praktikum im St. John's Hospital, Kerala, Indien

2001 – 2003 Studium der Humanmedizin, LMU München

2003 – 2004 Praktisches Jahr:

-LMU München, Großhadern (Innere Medizin)

-Städtisches Krankenhaus Harlaching (Chirurgie)

-Krankenhaus Neuperlach (Gynäkologie)

### Berufliche Entwicklung

---

2004 – 2005 Assistenzärztin, Medizinische Klinik II, Klinikum Großhadern, München

seit 2005 Elternzeit