Die prognostische Relevanz von 20q13.2 beim kolorektalen Karzinom

Astrid Hacker

Pathologisches Institut
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Aus dem Pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Udo Löhrs

Die prognostische Relevanz von 20q13.2 beim kolorektalen Karzinom

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

vorgelegt von
Astrid Hacker
aus
München

im Jahr
2002

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. G. Baretton

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. vet. E. Richter
Prof. Dr. med. A. Wagner

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: Dr. med. D. E. Aust

Dekan: Prof. Dr. med. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 09.01.2003

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Gustavo Baretton für die Überlassung des interessanten Themas.

Frau Dr. Daniela Aust danke ich ganz besonders für den unermüdlichen Einsatz und ihre kontinuierlichen Bemühungen zur Steigerung der Qualität dieser Arbeit.

Frau Dr. Christine Kaltz gilt mein Dank für die gute experimentelle Einarbeitung und Anleitung, die mir ein unabhängiges Arbeiten ermöglichte.

Herrn Michael Schmidt danke ich für die zuverlässige statistische Auswertung, die geduldigen Erläuterungen und seine Bereitschaft für Hilfe.

Bei Frau Heinke Mohr, die mir eine tatkräftige Unterstützung während des experimentellen Teils der Arbeit war, möchte ich mich bedanken.

Sehr herzlich bedanke ich mich bei Herrn Helmut Grüninger, der einen sehr wesentlichen Beitrag für diese Arbeit in Hinblick auf Layout- und Office-Integration geleistet hat.

Frau Dr. Annette Lebeau verstand es, mir mit aufmunternden Gesprächen und Diskussionen nicht den Sinn für Humor abhanden kommen zu lassen.

Claudia und Wolfgang, Schorsch und Irmi, Markus, Susanne, Olaf, Ursel, Fred und viele weitere Studienkollegen und Freunde zeigten mir, daß niemand mit Problemen die ein solches Werk mit sich bringt, alleine ist. Danke.

Meinen Eltern und meinem Bruder Stefan danke ich für ihre fortwährende Unterstützung und Bestärkung, die emotionalen und kulinarischen Zuwendungen in Zeiten allzu karger Lebensführung.

INHALTSVERZEICHNIS

1 Einleitung 4

1.1 Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms 4
1.1.1 Inzidenz und Mortalität 4
1.1.2 Geschlechts- und Altersverteilung 5
1.2 Ätiologie des kolorektalen Karzinoms 6
1.2.1 Ernährung 6
1.2.1.1 Fettkonsum, Alkohol, Kaffee 6
1.2.1.2 Ballaststoffe 6
1.2.2 Berufliches Risiko 7
1.2.3 Iatrogene Faktoren 8
1.2.4 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen und kolorektales Karzinom 8
1.2.5 Genetische Faktoren 8
1.2.5.1 Hereditäres Non Polyposis kolorektales Karzinom (HNPCC) 9
1.2.5.2 Familiäre adenomatöse Polypose (FAP) 12
1.3 Formale Karzinogenese des kolorektalen Karzinoms 13
1.4 Staging und Grading 15
1.5 Metastasierungswege 18
1.6 Prognose 18
1.6.1 Klassische Prognosefaktoren 18
1.6.2 Molekulare Prognosefaktoren 19
1.6.2.1 Proteasen 19
1.6.2.2 Adhäsionsmoleküle 20
1.6.2.3 Weitere genetische Faktoren 21
1.6.2.4 20q13 21
1.7 Fragestellung 24

2 Material und Methoden 25

2.1 Material 25
2.1.1 Patientengut 25
2.1.2 Tumormaterial 25
2.1.3 Negativkontrollen 27

2.2 Methode 27
2.2.1 Aufarbeitung des Gewebes 27
2.2.2 Cytospin 28
2.2.3 FISH 29
2.2.4 Puffer und Lösungen 30
2.2.4.1 CARLSBERG-Lösung 30
2.2.4.2 Puffer I 30
2.2.4.3 Puffer II 31
2.2.4.4 RNAase A 1- Lösung 31
2.2.4.5 PBS 31
2.2.4.6 Hybridisierungs-Mix 31
2.2.4.7 0,05xSSC 31
2.2.4.8 BT-Puffer 31
2.2.4.9 BSA/BT 31
2.2.4.10 Vectashield/ DAPI 32
2.2.5 Auswertung der FISH 32
2.2.6 Statistik 33

3 Ergebnisse 34

3.1 Analyse des Kollektivs auf seine Repräsentativität 34
3.1.1 Kontingenztafeln (Chi-Quadrat-Tests) zur Beschreibung der Abhängigkeit klinischer und pathologischer Parameter 35
3.1.1.1 Alter und Tumordifferenzierung 35
3.1.1.2 Infiltrationstiefe und Tumorlokalisation 36
3.1.1.3 Tumorinfiltrationstiefe und Lymphknotenbefall 36
3.1.1.4 Lymphknotenbefall und Fernmetastasen 37
3.1.1.5 Lymphknotenbefall und Grading 37
3.1.2 Univariate Survival Analyse 38
3.1.2.1 Tumorinfiltrationstiefe und Überleben 39
3.1.2.2 Lymphknotenbefall und Überleben 41
3.1.2.3 Hämatogene Metastasen und Überleben 43
3.1.2.4 Nicht signifikante Parameter 43
3.2 FISH-Resultate 44
3.2.1 Negativkontrollen 44
3.2.2 Adenome 44
3.2.3 Karzinome 45

3.2.4 Lymphknoten-Metastase 46
3.2.5 FISH-Bilder 46
3.3 Grenzwertfestlegung 49
3.3.1 Survivalanalyse in Abhängigkeit von 20q13.2 Zugewinnen 49
3.3.1.1 Grenzwert ≥ 30% Kerne mit mehr als 2 Signalen 51
3.3.1.2 Grenzwert ≥ 40% der Zellkerne mit mehr als 2 Signalen 52
3.3.1.3 Grenzwert ≥ 50% der Kerne mit mehr als 2 Signalen 54
3.3.1.4 Grenzwert Median 1 55
3.3.1.5 Grenzwert Median 2 57
3.3.1.6 Grenzwert Median 3 58
3.3.1.7 Zusammenfassung 60
3.4 Korrelation zwischen 20q13-Zugewinn und konventionellen prognostischen Parametern 62
3.4.1 Grading und 20q13.2-Zugewinn 62
3.4.2 Alter und 20q13.2-Zugewinn 62
3.4.3 Tumortyp und 20q13.2-Zugewinn 63
3.5 Methodenvergleich CGH und FISH 64

4 Diskussion 65

4.1 Repräsentativität des Kollektivs 65
4.2 Methodenkritische Diskussion 65
4.3 Rolle des 20q13-Zugewinns in der kolorektalen Karzinogenese 67
4.4 20q13.2 als prognostischer Marker 69
4.5 Putative Onkogene auf 20q13 70

5 Zusammenfassung 71

6 Literaturverzeichnis 73

7 Abbildungsverzeichnis 83

8 Tabellenverzeichnis 84

9 Anhang 85

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms

1.1.1 Inzidenz und Mortalität

Maligne gastrointestinale Tumoren machen, wie in Abbildung 1 dargestellt, mit über 30 Prozent sowohl bei Männern, als auch bei Frauen den größten Anteil der tumorbedingten Sterbefälle der industrialisierten Welt aus. Unter den malignen gastrointestinalen Tumoren sind die kolorektalen Karzinome die häufigsten. An zweiter Stelle stehen bei den Frauen das Mammakarzinom, bei Männern das Bronchialkarzinom (Böcker *et al,* 1997).

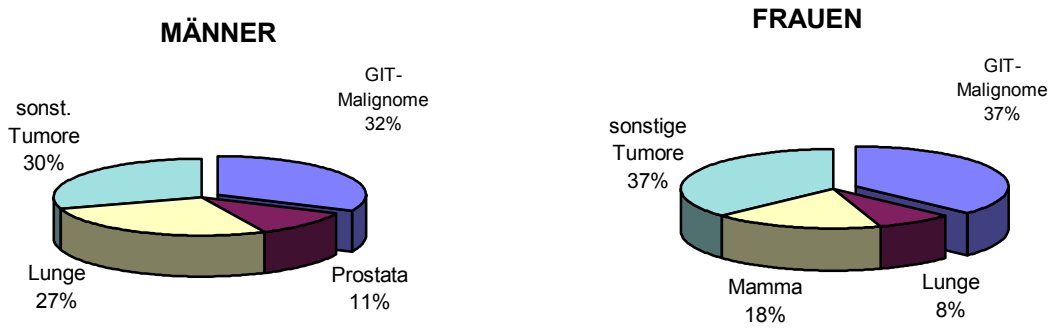


Abbildung 1: Tumorbedingte Sterbefälle nach Tumorlokalisation

Die Inzidenz (“Neuerkrankungsrate”) gibt die Häufigkeit des Neuauftretens, die Prävalenz (“Krankenstand”) die Zahl der zu einem bestimmten Zeitpunkt Erkrankten an. Zur demographischen Beschreibung dient ausserdem der Begriff der Mortalität, der die Zahl der Gestorbenen bezogen auf die Gesamtzahl der Bevölkerung nennt. Für zeitliche und regionale Vergleiche des Auftretens von malignen Neoplasien wird üblicherweise die Altersstruktur einer Bevölkerung mittels einer Altersstandardisierung berücksichtigt. Eine Gegenüberstellung von Inzidenz und Mortalität für unterschiedliche Tumoren des Gastrointestinaltraktes ist in Tabelle 1 zu sehen. Da in Deutschland die Inzidenzzahlen nur für das Saarland regelmäßig verfügbar sind, können keine bundesweiten Angaben gemacht werden. Die Daten stammen aus dem saarländischen Krebsregister und sind gemittelte Werte der Jahre 1992 und 1993. Um einen besseren Vergleich zu haben, wurden die absoluten Mortalitätsfälle auf Sterbefälle pro 100.000 Einwohner umgerechnet.

	Neuerkrankungen 1992/93 Saarland		Sterbefälle 1995 Deutschland	
Lokalisation	*männlich*	weiblich	*männlich*	weiblich
Ösophagus	8,1	1,5	7,8	2,3
Magen	23,9	22,4	19,7	17,9
Leber	6,7	4,3	7,3	4,7
Gallenwege	5,7	11,1	3,5	8,5
Pankreas	10,1	11,7	12,8	14,4
Dünndarm	0,9	0,8	0,4	0,4
Kolon	41,3	48,6	22,4	23,3
Rektum/Anus	24,2	22,9	11,0	11,2

Tabelle 1: Krebsneuerkrankungen im Gastrointestinaltrakt und Sterbefälle, differenziert nach Geschlecht und Lokalisation, Angaben bezogen auf 100000 Einwohner (Engel et al, 1997)

1.1.2 Geschlechts- und Altersverteilung

Der Altersmittelwert für das Kolonkarzinom bei Männern und Frauen liegt bei 64,7(± 12,5) Jahren. Das Geschlechterverhältnis liegt bei 1,0. Für das Rektumkarzinom ist der Altersmittelwert 63,6 (± 12,5) Jahre, wobei Männer 1,3 Mal häufiger betroffen sind als Frauen (Engel *et al*, 1997).

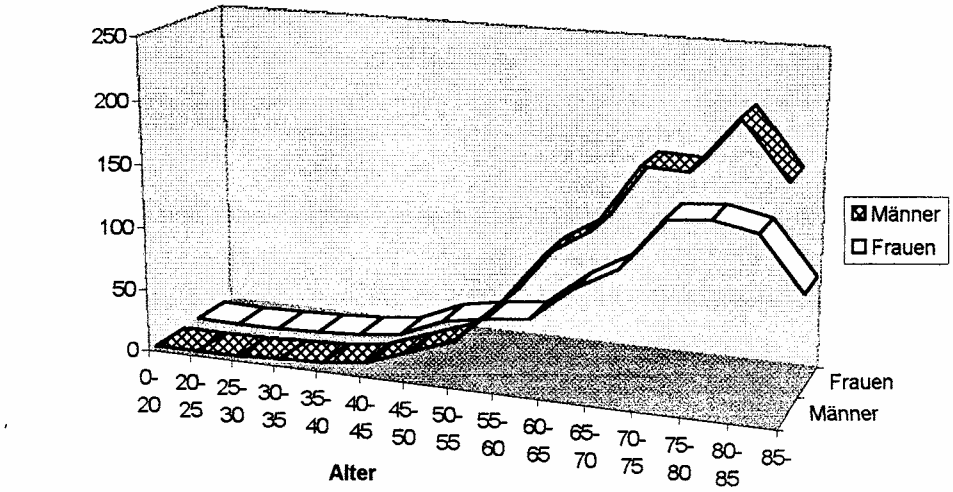


Abbildung 2: Inzidenz und Altersverteilung der kolorektalen Karzinome (Tumorzentrum München, 1997)

Die Inzidenz des kolorektalen Karzinoms nimmt mit dem Alter zu. Ab einem Lebensalter von 60 Jahren steigt die Inzidenz sprunghaft an. Die Absenkung der Kurve bei 80-85 Jahren lässt

sich durch die natürliche Absterberate erklären. Männer sind insgesamt häufiger betroffen, was sich durch das Geschlechterverhältnis bei den Rektumkarzinomen erklärt.

1.2 Ätiologie des kolorektalen Karzinoms

Bei der Entstehung eines kolorektalen Karzinoms spielen exogene wie endogene Faktoren eine Rolle (Nomura, 1990). Bei den exogenen soll besonders auf Ernährung, berufliche Exposition und iatrogene Faktoren eingegangen werden. Unter einem endogenem Faktor versteht man vor allem die genetische Disposition, die nachfolgend erläutert wird. Zunächst aber zu den exogenen Faktoren.

1.2.1 Ernährung

1.2.1.1 Fettkonsum, Alkohol, Kaffee

In den letzten Jahren stand die Ernährung bei der Suche nach Risikofaktoren für das kolorektale Karzinom im Vordergrund. Es konnte eine signifikante Korrelation zwischen pro Kopf Verzehr an Fett und der Darmkrebsmortalität in einer Population beobachtet werden. Weltweit tritt diese Erkrankung gehäuft bei Menschen auf, die in gehobenen sozioökonomischen Schichten leben. In Industrieländern mit hoher Kolonkarzinominzidenz (40 / 100000) nimmt die Bevölkerung im Durchschnitt 40-45% ihres täglichen Kalorienbedarfs in Form von Fett zu sich (Wynder *et al,* 1986). Erhöhte Energieaufnahme und Übergewicht, beides Faktoren, die in engem Zusammenhang mit hohem Fettkonsum stehen, sind ebenfalls mit einem erhöhten Risiko assoziiert (Miller *et al,* 1989).

Ebenfalls diskutiert wird der erhöhte Alkoholkonsum für das gehäufte Auftreten der Rektum-, nicht jedoch der Kolonkarzinome. Die potentielle Assoziation zwischen Kaffeekonsum und kolorektalem Karzinom wird kontrovers diskutiert (Seitz und Simanowsky*,* 1989).

Auch ein Zusammenhang zwischen Darm- und Brustkrebsmorbidität konnte aufgezeigt werden. Vermutlich liegen aber hier die gemeinsamen ätiologischen Faktoren, vor allem der erhöhte Fettgehalt der Nahrung, zugrunde (Lowenfels und Anderson, 1987).

1.2.1.2 Ballaststoffe

“Ballaststoffen”, sogenannten “nicht verwertbaren Kohlenhydraten”, wird ein risikosenkender Effekt hinsichtlich der Entstehung eines kolorektalen Karzinoms zugesprochen (Mayer und Lohrmann, 1991; Southgate und Englyst*,* 1985). Diese “nicht verwertbaren Kohlenhydrate” sind Substanzen mit unterschiedlichen chemischen und physiologischen Eigenschaften. Sie lassen sich in lösliche und unlösliche Bestandteile einteilen. Die löslichen werden im Darm zu kurzkettigen Fettsäuren abgebaut, die unlöslichen Bestandteile erhöhen das Stuhlvolumen, was zu einer niedrigeren Konzentration fäkaler Komponenten (Bakterien, abgestoßene Epithelien, Gallenfarbstoffe, Kohlenhydrat- und Eiweissfäulnisprodukte) führt. Bislang konnte

noch nicht geklärt werden, welcher Fraktion der Ballaststoffe die protektive Wirkung zuzuschreiben ist (Southgate und Englyst, 1985). Die Ergebnisse verschiedener Untersuchungen und deren Interpretation zu diesem Thema sind widersprüchlich.
Neben den Ballaststoffen werden weitere risikosenkende Faktoren diskutiert. Dazu gehört ein niedriger Stuhl **pH-Wert**. Dieser kann unter anderem durch die mikrobielle Verstoffwechselung der Ballaststoffe zustande kommen. Ebenfalls Gegenstand verschiedener Studien waren Vitamine, Mineralstoffe und Spurenelemente, deren Aufnahme einen protektiven Effekt haben soll. Ein Bestandteil der Glutathionperoxidase, das **Selen**, könnte der Bildung zellschädigender Produkte des oxidativen Sauerstoffs entgegenwirken. Kalzium soll seine protektive Wirkung durch Bindung von Gallensäuren und freien Fettsäuren ausüben, beides Substanzen, von denen man annimmt, sie förderten karzinogene Prozesse im Darm. Auch ein direkter Effekt des **Kalziums** auf die Epithelien ist möglich, z. B. durch Anregung der Zelldifferenzierung. Das auf den Kalziumstoffwechsel wirkende **Vitamin D** soll ebenfalls das Risiko für Kolonkarzinome herabsetzen (Garland *et al,* 1989; Sorensen *et al,* 1988).
Man nimmt an, dass das Milieu, welches im Lumen des Kolons und Rektums herrscht, für das Risiko, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken, entscheidend ist. So wird vermutet, daß eine ballaststoffreiche und fettarme Ernährung die entsprechenden luminalen Faktoren, wie die Konzentration sekundärer Gallensäuren, in Richtung eines erniedrigten Risikos beeinflusst (Gorbach und Goldin, 1990; Mayer und Lohrmann, 1991).

Alle bisher aufgeführten Daten weisen darauf hin, daß die Ernährung einen wesentlichen ätiologischen Beitrag für die Entstehung eines kolorektalen Karzinoms liefert. Trotzdem können keine verbindlichen Ernährungsempfehlungen gegeben werden, da die einzelnen Nahrungsbestandteile nicht eindeutig als ursächliche oder schützende Faktoren identifiziert werden konnten.

1.2.2 Berufliches Risiko

Es existieren bis heute noch keine verbindlichen Daten über einen etwaigen Zusammenhang zwischen beruflicher Exposition und erhöhtem Risiko für kolorektale Erkrankungen. Die Asbestexposition wurde als Risikofaktor für die Entstehung eines kolorektalen Karzinoms diskutiert. Neuere Untersuchungen konnten das jedoch nicht bestätigen (Wahrendorf, 1989). In einer Studie konnte ein risikoerhöhender Zusammenhang zwischen sitzender Tätigkeit und Kolonkarzinomen aufgezeigt werden. Eine denkbare physiologische Erklärung hierfür wäre, daß durch die mangelnde körperliche Bewegung die Darmperistaltik nicht ausreichend angeregt wird, und es durch die verlängerte Exposition der Colonmucosa mit Fäzes oder karzinogenen Substanzen zu lokalen Irritationen kommt (Nomura, 1990).

1.2.3 Iatrogene Faktoren

Ureterosigmoideostomien führen zu einem nachweislich erhöhten Risiko für die Entstehung von Kolonkarzinomen. 15-30 Jahre nach diesem chirurgischen Eingriff wurde bei 5-10% der Patienten ein Kolonkarzinom diagnostiziert. Typischerweise treten diese Tumoren distal der Implantationsstelle der Ureteren im Colon sigmoideum auf, also dort, wo die Mucosa chronisch den Fäces und dem Urin ausgesetzt ist (Mayer und Lohrmann, 1991; Sheldon *et al*, 1983).

Cholezystektomien und Gastrektomien sollen ebenfalls mit einem erhöhten Karzinomrisiko einhergehen. Der Pathomechanismus bei der Cholezystektomie wird der veränderten Gallensekretion und -zusammensetzung zugeschrieben (Adami *et al*, 1983).

1.2.4 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen und kolorektales Karzinom

Zu den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen gehören die Colitis ulcerosa und der Morbus Crohn. Bei der Colitis ulcerosa handelt es sich um eine chronische Entzündung der Dickdarmschleimhaut, die in aller Regel im Rektum beginnt und sich kontinuierlich nach proximal ausdehnt (Böcker *et al,* 1997). Patienten mit Colitis ulcerosa haben gegenüber einer gleichaltrigen Vergleichspopulation ein erhöhtes Risiko, Schleimhautdysplasien bzw. kolorektale Karzinome zu entwickeln. Dieses Risiko steigt mit zunehmender Dauer (> 10 Jahre) und Schwere (Pankolitis) der Erkrankung (Aust *et al,* 1999).

Als Ursache für das erhöhte Karzinomrisiko wird die durch die Entzündung ausgelöste erhöhte Proliferationsrate diskutiert (Böcker *et al*, 1997).

Beim Morbus Crohn handelt es sich eine transmurale Entzündung des Darms, die zumeist im terminalen Ileum beginnt und sich diskontinuierlich im Dünn- und Dickdarm ausbreitet. Auch hier wird ein erhöhtes Karzinomrisiko diskutiert, die Daten sind jedoch nicht ganz so klar wie bei der Colitis ulcerosa (Greenstein und Sachar, 1989).

1.2.5 Genetische Faktoren

Neben den bereits besprochenen exogenen Faktoren spielen bei der Entstehung kolorektaler Karzinome auch endogene Faktoren eine Rolle. Mindestens 25% aller Patienten mit kolorektalem Karzinom haben eine positive Familienanamnese (Mayer und Lohrmann, 1991). In etwa 15% der Patienten mit kolorektalem Karzinom kann eine hereditäre Erkrankung mit Nachweis einer Keimbahnmutation nachgewiesen werden.

Die erblichen Formen der Kolonkarzinome werden in folgende zwei Gruppen unterteilt: zum einen die seltenen, mit einer Polypose des Kolons einhergehenden Syndrome (FAP), Turcot Syndrom, juvenile Polyposis Coli, zum anderen die hereditären Nicht-Polyposis Syndrome (HNPCC) (Lynch und Smyrk, 1996). Der genetische Defekt bei hereditären Tumorerkrankungen ist schon von Geburt an in allen Körperzellen vorhanden. Die Vererbung läuft über die Keimbahn (Keimbahnmutation). Bei den meisten hereditären

Tumorerkrankungen finden sich Keimbahnmutationen in Tumorsuppressorgenen (Kinzler *et al,* 1996; Lynch *et al,* 1993).
Die Keimbahnmutation der HNPCC liegt in den sogenannten Mismatch Repair Genen, die der FAP im APC-Gen.

Beispielhaft sollen nun HNPCC und FAP erläutert werden.

1.2.5.1 Hereditäres Non Polyposis kolorektales Karzinom (HNPCC)

Es gehört zu den häufigsten Erbkrankheiten überhaupt, und nach neueren Schätzungen müssen zwischen 5 und 10% aller Dickdarmkarzinome hierzu gerechnet werden. Man spricht auch vom “Syndrom der Krebsfamilie” oder bezeichnet es nach seinem Erstbeschreiber als Lynch-Syndrom. Dieses wiederum läßt sich unterteilen in das Lynch-I- und -II-Syndrom, wobei sich im Unterschied zum Lynch-I-Syndrom beim Lynch-II-Syndrom noch verschiedene extraintestinale Tumoren (Endometrium, Magen, Pankreas, Urogenitaltrakt) finden (Lynch et al, 1993; Sahm *et al,* 1995). Das autosomal-dominant vererbte Syndrom manifestiert sich vergleichsweise früh, zwischen dem 3. und 5. Lebensjahrzehnt, und in über 70% sind die Tumoren im proximalen Kolon (v.a. im Zökum und Colon ascendens) lokalisiert. Sowohl die Lokalisation, als auch das übliche Erkrankungsalter weichen vom sporadischen kolorektalen Karzinom ab. Histologisch unterscheiden sich die HNPCC`s vorwiegend durch einen höheren Anteil an schlecht differenzierten (solide / medullär) und muzinösen, teils auch siegelringzelligen Karzinomen (Lynch und Smyrk, 1996; Mayer und Lohrmann, 1991). Eine finnische Studie konnte belegen, dass HNPCC-Patienten trotz schlechter Differenzierung eine bessere Prognose aufweisen (Sankila *et al,* 1996). Weitere Unterschiede zwischen sporadisch auftretenden kolorektalen Karzinomen und HNPCC`s sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Charakteristika	sporadisch	HNPCC
mittleres Alter bei Diagnose (Jahre)	67	44,6
multiple Kolontumoren (%)	4-11	34
--synchron	3-6	18,1
--metachron	1-5	24,3
Lokalisation	eher linkskolisch	eher rechtskolisch
gehäuft extrakolische Tumoren	nein	ja
Häufigkeit solitärer Kolonpolypen (%)	10	36
Histologie der Adenome	tubulär	villös
Histologie der Karzinome	glandulär (homogen)	muzinös (heterogen)
Kanzerogenese	Tumorsuppressor-Pathway	Mutator-Pathway mismatch repair-Defekt
Chromosomensatz	aneuploid grobe Aberrationen	diploid
Analogie zu bereits gut untersuchten Krankheitsbildern	FAP	

Tabelle 2: Charakteristika der HNPCC`s und der sporadisch auftretenden kolorektalen Karzinome (nach Sahm et al, 1995, mit eigener Bearbeitung)

In den sogenannten Krebsfamilien ist das Risiko, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken, achtfach erhöht gegenüber Personen mit gesunden Verwandten (Lynch *et al*, 1993). Es scheint noch eine weitere Spielart der Krebsfamilien zu geben: in Kombination mit ungewöhnlich lokalisierten Hauttumoren spricht man vom “Muir-Torre”-Syndrom.
Um die Diagnose HNPCC zu stellen, müssen anamnestisch folgende Kriterien erfüllt sein (Amsterdam-Kriterien zur Diagnose des HNPCC; Vasen *et al,* 1991; Rodriguez-Bigas *et al*, 1997):

- Drei oder mehr Verwandte müssen ein histologisch gesichertes Kolonkarzinom haben.
- Einer davon muß Verwandter ersten Grades der beiden anderen sein und
- die kolorektalen Karzinome müssen in mindestens zwei aufeinanderfolgenden Generationen auftreten.
- Ein Betroffener muß jünger als 50 Jahre und
- eine FAP muß ausgeschlossen sein.

Zusätzliche klinische Kriterien werden in den sogenannten Bethesda-Kriterien erfasst (Rodriguez-Bigas *et al*, 1997): sie enthalten zusätzlich zu den Amsterdam-Kriterien andere zahlreich vorkommende klinische oder histologische Charakteristika bei HNPCC.

- Manifestationsalter einer Tumorerkrankung des Kolons / Rektums ≤ 45 Jahre
- Synchrone / metachrone Zweittumoren (Kolon / Rektum, Endometrium, Urothel, Magen Dünndarm, Mamma, Gehirn), Manifestationsalter beider Tumoren ≤ 60 Jahre
- Mindestens zwei Familienmitglieder ersten Grades mit Kolon- / Rektumkarzinom, Manifestationsalter eines Erkrankten ≤ 50 Jahre
- muzinöses Karzinom
- schlecht differenzierte (G3) Tumoren
- ausgeprägte intra- oder peritumorale Lymphzellinfiltration (Jass, 1998)

Die genetische Grundlage des HNPCC-Syndroms ist erst seit kurzem bekannt. Die Keimbahnmutation tritt hier in den sogenannten Mismatch-Repair-Genen auf. Diese Gene kodieren für Proteine, die neu replizierte DNA „Korrektur lesen". Sind sie mutiert, kommt es zu häufigen Deletionen oder Insertionen einzelner Basenpaare, die dann zu Missense- oder Nonsense-Mutationen und konsekutiver maligner Entartung führen. Der genetische Defekt fiel durch eine DNA-Mikrosatelliten-Instabilität der Karzinome auf.

Mikrosatelliten sind repetitive Di-, Tri- oder Tetranukleotidsequenzen, die über das ganze Genom verteilt vorkommen und charakteristisch häufige Motivwiederholungen aufweisen, die allerdings interindividuell verschieden sein können. Mittels dieser Mikrosatellitenmarker konnte bei HNPCC-Patienten ein Unterschied in der Sequenzlänge zwischen Tumor- und normalem Gewebe nachgewiesen werden, der durch einen Fehler beim „Korrektur lesen" verursacht wurde.

Tumoren, die eine Mikrosatelliten-Instabilität aufweisen, werden deshalb auch als "replication error"- (RER) positiv bezeichnet (Kim *et al,* 1994; Mao *et al*, 1994). Auf diese Weise war ein neuer Diagnose-Marker für das HNPCC gefunden.

In Tabelle 3 sind einige davon aufgeführt:

Reparatur-Gen-Defekt	Chromosom	HNPCC%
hMSH2	2p15-16	50-60
hMSH6	2p21	nicht untersucht
hMLH1	3p21-23	20-30
hPMS1	7q22	selten
hPMS2	2q31-33	sehr selten

Tabelle 3: Abnormalitäten im Mismatch-Reparatursystem

Bislang konnten diese fünf aufgezeichneten Gene beim Auftreten von Mutationen nachgewiesen werden (Bubb *et al*, 1996; Bronner *et al*, 1994; Liu *et al,* 1996; Schmutte *et al*, 1998). Besondere Bedeutung kommt wohl Mutationen im hMSH2-Gen auf Chromosom 2p15-16 zu, denn sie sind in 50-60% aller HNPCC-Patienten nachweisbar (Toyooka *et al,* 1995).

Finnische Untersuchungen konnten Mikrosatelliten-Instabilitäten in 86% der Kolonkarzinome und 57% der Adenome von HNPCC-Patienten nachweisen, sie wurden jedoch nur in 16% sporadischer Karzinome und in 3% der sporadischen Adenome gefunden (Aaltonen *et al*, 1993). Mikrosatelliteninstabilitäten traten auch in Zellen extrakolischer Tumoren von HNPCC Patienten auf (Risinger *et al*, 1993).

1.2.5.2 Familiäre adenomatöse Polypose (FAP)

Die FAP ist charakterisiert durch das gleichzeitige Auftreten von mehr als hundert bis zu mehreren tausend kolorektalen Adenomen. Seit 1991 ist das verantwortliche “adenomatous-polyposis-coli”- (APC) Gen identifiziert und kartiert (Kinzler *et al*, 1991). Ätiologisch konnte ein Allelverlust auf dem langen Arm des Chromosoms 5 (5q21-22), der sog. FAP-Genlokus, ausgemacht werden (Herrera *et al,* 1985). Dabei sind 60% der FAP-Fälle ererbt, es können aber auch spontane neue Keimbahnmutationen im FAP-Gen vorkommen.

Die FAP ist eine obligate Präkanzerose, der ein autosomal dominanter Erbgang zugrunde liegt. Das Risiko der FAP-Patienten an einem Kolonkarzinom zu erkranken, beträgt bis zum 35.Lebensjahr 50%, bis zum 55.Lebensjahr 100%. Wer diesen genetischen Defekt trägt, kann das Karzinom nur durch eine totale Proktokolektomie vermeiden. In den Tumoren fällt initial das zweite APC-Allel durch Mutation oder Verlust der Heterozygotie (LOH) aus. Im weiteren Verlauf der Karzinogenese treten dann Verluste in anderen Tumorsuppressorgenen beziehungsweise Zugewinne in Onkogenen auf.

Die Entwicklung und Möglichkeit genetische Untersuchungen durchzuführen, um frühzeitig eine APC-Gen-Mutation zu erkennen, hat das Patienten-Management verändert. Die Empfehlung lautet heute, daß bei bekannter genetischer Aberration eine endoskopische Kontrolle ab dem Zeitpunkt der Pubertät indiziert ist. Danach sollten jährliche endoskopische Kontrollen bis zum Nachweis von Adenomen und eine prophylaktische Kolektomie folgen, wenn aufgrund der Anzahl der Adenome eine endoskopische Therapie nicht ausreichend ist. Darüberhinaus sollte eine Kontrolle möglicher extraintestinaler Manifestationen in regelmäßigen Abständen erfolgen. Bei Familienmitgliedern ohne APC-Mutation genügen endoskopische Kontrollen um das 18., 25. und 35. Lebensjahr (Petersen, 1994; Ebert *et al*, 1998).

Bei Trägern einer APC-Gen-Keimbahnmutation kommt es nur dann zur Karzinomentstehung, wenn beide Allele defekt sind. Somit gehört dieses Gen in die Klasse der Tumorsuppressorgene.

Neben der klassischen FAP gibt es noch weitere, seltene Polyposis Syndrome, die hier der Vollständigkeit halber erwähnt werden sollen:

- das hereditäre-flat-adenoma-Syndrom (HFAS),
- das Gardner-Syndrom (Koinzidenz von mesenchymalen Neoplasien (Desmoide, Osteome, Fibrome), Epidermoidzysten und einer Polyposis coli (Rustgi, 1994)),
- das Turcot-Syndrom (gleichzeitiges Auftreten von malignen Tumoren im ZNS und einer Polyposis coli (Rustgi, 1994),
- das Peutz-Jeghers-Syndrom
- und die familiäre juvenile Polyposis

1.3 Formale Karzinogenese des kolorektalen Karzinoms

Die beiden beschriebenen Karzinogenesewege für die Entstehung der HNPCC sowie der FAP haben Modellcharakter. Für die Enstehung des sporadischen kolorektalen Karzinoms gilt: 85% der Karzinome laufen über den sogenannten Tumor-Suppressor Signalweg (APC), während 15% den Mutator Signalweg nehmen (HNPCC).

Fearon und Vogelstein veröffentlichten 1990 ein Modell für die formale kolorektale Karzinogenese: Dieses Modell stellt die Karzinogenese des adenomatösen kolorektalen Karzinoms wie Tumore der FAP dar, die über den sogenannten Tumor-Suppressor-Signalweg (APC) entstehen.
Diese Adenom-Karzinom-Sequenz ist deshalb so überzeugend, weil bei Patienten mit kolorektalem Karzinom überzufällig häufig Adenome gefunden werden. Innerhalb der Karzinome werden häufig Adenomreste nachgewiesen. Es sprechen noch weitere Gründe für die Adenom-Karzinom Sequenz (Muto *et al*, 1985):

- Das Verteilungsmuster der Adenome ähnelt dem der Karzinome.
- In Regionen mit niedriger Karzinominzidenz kommen auch nur selten Adenome vor.
- In großen insbesondere villösen Adenomen konnten gehäuft Karzinome und schwere Epitheldysplasien gefunden werden.

Daneben galt die Hypothese der sogenannten “de novo Entstehung von kolorektalen Karzinomen”, d.h. die Entstehung infiltrativen Wachstums ohne die Übergangsphase eines polypösen Adenoms. De-novo-Karzinome entstehen aus sogenannten flachen Dysplasien (“flat adenoma”) (Muto *et al*, 1985). Dieser Entstehungsmechanismus kann aber nur für eine geringere Zahl der Karzinome postuliert werden. Dafür sprechen einerseits die eben erläuterten histologischen, andererseits die molekulargenetischen Aspekte.

Maligne Tumoren entstehen nach dem heutigen Stand der Wissenschaft in einem “Mehrschrittprozess”, wobei die Mutation verschiedener Gene, die für regelrechtes Zellwachstum und -differenzierung wichtig sind, zur Ausbildung eines veränderten Phänotyps beitragen. Die Entartung einer Zelle wird dabei von zwei Klassen von Genen gesteuert: Proto-Onkogene/Onkogene und Anti-Onkogene/Tumorsuppressorgene.

Proto-Onkogene:

Proto-Onkogene wurden erstmals in verschiedenen tumorauslösenden Retroviren nachgewiesen (Bishop und Varmus, 1984). Bei einigen Versuchen konnte man sehen, daß der Transfer dieser Onkogene in normale Zellen einen malignen Phänotyp induzieren kann (Shih *et al*, 1979; Brach *et al*, 1995).

Das Zellwachstum wird bereits durch die Genprodukte der Proto-Onkogene positiv beeinflußt. Durch Mutation zu Onkogenen kommt es zu einer abnorm gesteigerten Zellproliferation und autonomem Wachstum der Zellen. Diese Mutation kann in Form einer Punktmutation, einer Amplifikation oder einer Translokation des Proto-Onkogens stattgefunden haben. Es genügt die Mutation eines der beiden Allele, um ein Onkogen zu aktivieren. Deshalb spricht man auch von einem dominanten Wirkmechanismus.

Tumorsuppressorgene:

Die Aufgabe der Genprodukte der Tumorsuppressorgene ist es, negativ regulierend auf die Zellproliferation einzuwirken, indem die Apoptose genetisch alterierter Zellen eingeleitet wird. Das schützt die Zelle vor maligner Entartung. Hier ist es im Gegensatz zu den Onkogenen notwendig, daß beide Allele eines Suppressorgens in einer Zelle inaktiviert werden, um einen Funktionsverlust herbeizuführen. In diesem Fall handelt es sich um einen rezessiven Wirkungsmechanismus.

Karzinome vom Tumor-Suppressor-Typ haben häufig chromosomale Aberrationen und laufen über Verlust von Tumorsuppressorgenen.

Fearon und Vogelstein (1990) konnten zeigen, daß verschiedene Entwicklungsstadien vom Adenom bis zum kolorektalen Karzinom mit bestimmten Onkogen- und Tumorsuppressorgen-veränderungen korrelierten.

In frühen Entwicklungsstadien eines Adenoms spricht man von einem hyperproliferativen Regenerationszustand von Kolonepithelien (Hahn *et al*, 1995; Schmiegel, 1991). In diesem Stadium konnte bei vielen Adenomen eine Allelmutation/-deletion des APC (adenomatosis-polyposis-coli)-Genlocus auf dem langen Arm des fünften Chromosoms (5q) sowie DNA-Hypomethylierungen nachgewiesen werden. Eine K-ras Mutation (12p12.1) findet sich bei Adenomen, die größer als 1 cm sind und bei etwa der Hälfte aller kolorektalen Karzinome. Kleinere Adenome tragen diese Mutation nur in 10% der Fälle (Schmiegel, 1991). Der Verlust des DCC-Allels (“deleted in colorectal cancer”, 18q21.3) war bei 70% aller Patienten mit kolorektalem Karzinom und bei der Hälfte aller Adenome, die größer als 2 cm waren, zu finden. Das DCC-Gen, ein weiteres Tumorsuppressorgen, greift durch Einwirkung auf die Zell-Zell-Kontakte in die Wachstumskontrolle ein.

Alleldeletionen auf dem Chromosomarm 17p waren in sogar 75% der Karzinome vorhanden. Dieser Verlust war bei den Adenomen zwar seltener (25%) als in den Karzinomen, jedoch umso häufiger zu finden, je größer das Adenom war und je mehr villöse Anteile es hatte.

Ein weiteres Tumorsuppressorgen, das p53, konnte diesem Chromosom zugeordnet werden (17p12-13) (Schmiegel, 1991).
Diese Vorgänge laufen allerdings nicht immer in dieser Sequenz ab; die Summation verschiedener Alterationen ist von größerer Bedeutung als der sequentielle Ablauf. Abbildung 3 soll die Karzinogenese etwas anschaulicher machen:

Genetisches Modell der kolorektalen Karzinogenese
nach Fearon und Vogelstein (1990)

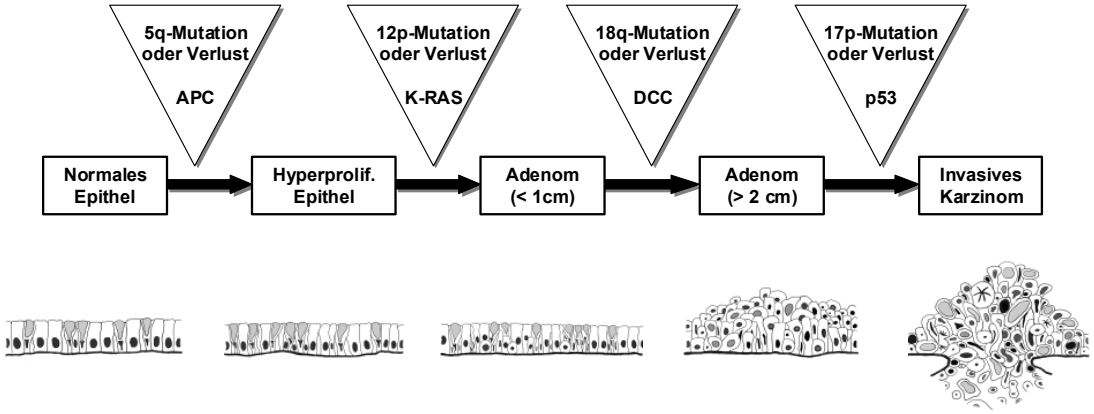


Abbildung 3: Molekulargenetische Veränderungen beim Kolonkarzinom

Neben diesem Tumor-Suppressor-Typ der Karzinogenese, für den modellhaft das Krankheitsbild der FAP steht, gibt es einen Mutator-Typ der Karzinogenese der HNPCC-Tumoren, in dem keine groben chromosomalen Aberrationen, dafür jedoch zahlreiche Punktmutationen auftreten. Diese Karzinome sind mikrosatelliten-instabil und weisen Defekte in den Mismatch-Repair-Proteinen auf.
Diese Mutationen finden nicht wie bei hereditären Erkrankungen in der Keimbahn, sondern in der Tumorzelle selbst statt.

1.4 Staging und Grading

Die histologische Untersuchung der Karzinome ermöglicht eine Einteilung in verschiedene Tumorstadien, die eine prognostische Aussage über den Tumor ermöglichen. Diese Einteilung wird in regelmäßigen Abständen von der UICC (Union Internationale Contre le Cancer) überarbeitet und neu herausgegeben, um klinische und pathologische Erfahrung zusammenzuführen. Mit der TNM-/ pTNM-Klassifikation werden der Primärtumor, die Lymphknoten- und Fernmetastasen beurteilt (TNM entspricht einer klinischen, pTNM einer pathohistologischen Einteilung).
In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden jüngsten Staging-Protokolle der UICC von 1993 und 1997 berücksichtigt.

Die Tumoren wurden nach den üblich geltenden Kriterien des TNM - / pTNM Systems von 1993 (alt) und 1997 (neu) der UICC erfasst, wobei sich der Unterschied beider Klassifikationen auf den Lymphknotenbefall beschränkt: 1993 differenzierte man in pNX (regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden), pN0 (keine regionären Lymphknotenmetastasen), pN1 (Metastasen in 1-3 perikolischen bzw. perirektalen Lymphknoten), pN2 (Metastasen in 4 oder mehr perikolischen bzw. perirektalen Lymphknoten) und pN3 (Metastasen in Lymphknoten entlang eines benannten Gefäßstammes und / oder in apikalen Lymphknoten (wenn vom Chirurgen markiert)) (UICC 1993). 1997 beschränkte man sich auf die Einteilung NX bis N2: NX und N1 blieben identisch mit der vorherigen Klassifikation, N2 hiessen Metastasen in 4 oder mehr regionalen Lymphknoten (UICC 1997). In Tabelle 4 sind die klinischen Stadien der Erkrankung nach der UICC und Dukes abzulesen.

Kurz zur Beschreibung der pT-Stadien: pTX (Primärtumor kann nicht beurteilt werden), pT0 (kein Anhalt für Primärtumor), pTis (Carcinoma in situ), pT1 (Tumor infiltriert Submucosa), pT2 (Tumor infiltriert Muscularis propria), pT3 (Tumor infiltriert durch die Muscularis propria in die Subserosa oder in nichtperitonealisiertes perikolisches oder perirektales Gewebe) und pT4 (Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen und / oder perforiert das viszerale Peritoneum). Das Metastasen- Stadium blieb ebenfalls unverändert: pMX (Fernmetastasen können nicht beurteilt werden, pM0 (keine Fernmetastasen) und pM1 (Fernmetastasen) (siehe Tabelle 5).

Stadium	T/ pT	N/ pN	M/ pM	Dukes
Stadium 0	Tis/ pTis	N0/ pN0	M0/ pM0	
Stadium I	T1/ pT1 T2/ pT 2	N0/ pN0	M0/ pM0	Dukes A
Stadium II	T3/ pT3 T4/ pT4	N0/ pN0	M0/ pM0	Dukes B
Stadium III	jedes T bzw. pT	N1/ pN1 N2/ pN2	M0/ pM0	Dukes C
Stadium IV	jedes T bzw. pT	jedes N	M1/ pM1	Dukes D

Tabelle 4: Stadieneinteilung nach UICC und Dukes (UICC, 1997)

T / pT Primärtumor	
Tx / pTx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0 / pT0	kein Anhalt für Primärtumor
Tis / pTis	Carcinoma in situ; Tumorzellen intraepithelial oder intramukös, keine Ausbreitung durch die Muscularis mucosae
T1 / pT1	Tumor erstreckt sich in die Submucosa
T2 / pT2	Tumor erstreckt sich in die Muscularis mucosae
T3 / pT3	Tumor erstreckt sich durch die Lamina propria hindurch in die Subserosa oder in nicht peritonealisiertes perikolisches oder perirektales Gewebe
T4 / pT4	Tumor infiltriert das viszerale Peritoneum oder direkt anderes Gewebe oder Organe
N / pN Regionäre Lymphknoten	
Nx / pNx	regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0 / pN0	keine Lymphknotenmetastasen
N1 / pN1	Metastasen in 1-3 regionalen Lymphknoten
N2 / pN2	Metastasen in 4 oder mehr regionalen Lymphknoten pN0 regionäre Lymphadenektomie und histologische Untersuchung üblicherweise von 12 oder mehr Lympknoten
M / pM Fernmetastasen	
M0 / pM0	keine Fernmetastasen
M1 / pM1	Fernmetastasen vorhanden
Mx / pMx	Vorhandensein von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden

Tabelle 5: TNM / pTNM-Klassifikation (UICC 1997)

Das Staging in der klinischen Routine wird noch durch die Bestimmung des zytologischen bzw. histologischen Differenzierungsgrades (Grading) ergänzt. Es beinhaltet Kernatypien, Mitosen, morphologische Strukturen und Differenzierungsgrad, d.h. Ähnlichkeit zum Ursprungsgewebe.

Die Primärtumoren werden im histologischen Grading in ausschließlich drüsig differenzierte (Grad 1), überwiegend drüsig (Grad 2) und cribriforme bis solide differenzierte (Grad 3) eingeteilt (WHO, 1989).

1.5 Metastasierungswege

Das kolorektale Karzinom metastasiert am häufigsten lymphogen. Die Lymphabflußwege entsprechen der arteriellen Versorgung, also den Ästen der A. mesenterica superior, bestehend aus den Aa. ileocolica, colica dextra und colica media sowie den Ästen der A. mesenterica inferior mit den Aa. sigmoidales und colica sinistra.
Hämatogene Metastasen folgen den venösen Abflüssen von Kolon und Rektum, es lassen sich unterscheiden:

Metastasen vom Portae-Typ

Hämatogene Metastasen folgen dem venösen Abfluß entsprechend über das Pfortadersystem in die Leber. Sie ist das am häufigsten betroffene primäre Metastasierungsorgan.

Metastasen vom Cava-Typ

Beim Rektumkarzinom treten auch primäre Lungenmetastasen auf, da der venöse Abfluß über die Vv. rectales inferiores zur V. cava führt. In absteigender Häufigkeit folgen als weitere, sekundäre Metastasenlokalisationen Skelett-, Nebennieren- und Gehirnmetastasen.

1.6 Prognose

1.6.1 Klassische Prognosefaktoren

Die Prognose für Patienten, die an einem kolorektalen Karzinom erkrankt sind, hängt vor allem vom Tumorstadium ab:
Die meisten Tumorrezidive treten innerhalb von fünf Jahren nach operativer Resektion auf, d.h. mit der Fünf-Jahres-Überlebensrate läßt sich die Heilungsrate relativ genau erfassen. Diese wiederum weist eine enge Beziehung zum anfänglichen Primärtumorstadium auf (siehe Tabelle 6).
Auch der histologische Differenzierungsgrad hat Einfluß auf die Prognose. Je geringer die Differenzierung, desto schlechter die Prognose.

In Tabelle 6 sind Fünf-Jahres-Überlebensraten kurativ operierter Patienten mit Kolon- und Rektumkarzinom nach Ergebnissen von Cohen, Blum, Eisenberg, Philipsen, Rich, Willet, der GITSG und Hermanek zusammengefasst. Wie man daran sehen kann, bringt die Erfassung nach dem TNM / pTNM-System wesentlich detailliertere Daten als die nach Dukes (Tumorzentrum München, 1993).

Stadium	Kolonkarzinom	Rektumkarzinom
PT1 / pN0	97-100%	100%
pT2 / pN0	90-100%	90%
pT3 / pN0	78-80%	69-78%
pT4 / pN0	63-87%	69%
Dukes A	82-98%	88-93%
Dukes B	73-81%	71-79%
jedes pT / pN1	73%	61%
pT2 / pN1	74%	
pT3 / pN1	48%	
pT4 / pN1	38%	
jedes pN2 / pN3	45%	39%
Dukes C	26-56%	29-41%

Tabelle 6: 5-Jahres-Überlebensrate der Kolon- und Rektumkarzinome in Abhängigkeit vom Primärstadium nach UICC und Dukes (Tumorzentrum München, 1993)

Um den klinischen Verlauf der einzelnen Patienten mit möglichst hoher Wahrscheinlichkeit voraussagen zu können, benutzt man heute die prognoserelevanten Parameter der TNM-Klassifikation. Dadurch ist es möglich, die Patientennachsorge zu verbessern und eine der Prognose angepasste, engmaschige Kontrolle für die einzelnen Subgruppen zu gewährleisten.

1.6.2 Molekulare Prognosefaktoren

Obwohl die konventionellen Prognosefaktoren bereits gute Daten für die klinische Betreuung und klinische Nachsorge liefern, wären neue, zusätzliche Faktoren wünschenswert, um Patienten-Subgruppen zu definieren, natürlich insbesondere in Hinblick auf neue Therapiestrategien.

In den letzten Jahren sind die Erkenntnisse über die molekularen Mechanismen, die das biologische Verhalten von Tumorzellen determinieren, stark angestiegen. Es wurden verschiedene genetische Faktoren und Proteine untersucht.

1.6.2.1 Proteasen

Um sich aus dem komplexen Tumorzellverband zu lösen, regulieren Tumorzellen die Expression von Adhäsionsmolekülen herab. Gleichzeitig kommt es zu einer Überexpression tumorassoziierter Protease / Protease-Inhibitor-Systeme für die Invasion in umliegendes Gewebe. Dies ermöglicht Tumorinvasion und Metastasierung, da sich Tumorzellen aus dem soliden Zellverband lösen und umgebendes Gewebe lysieren können. Die proteolytische Aktivität wird sowohl zur Invasion in Basalmembran und Gefässe, als auch zur eigentlichen Metastasierung benötigt. Der Einbruch der Tumorzelle durch die Basalmembran wird durch

tumorassoziierte Serin-, Aspartyl-, Cystein-, Threonin- und Metalloproteinasen, welche die umgebende Matrixkomponente proteolysieren, ermöglicht. Auf diese Weise gelangt die Tumorzelle in die systemische Zirkulation. Bereits in sehr frühen Stadien solider maligner Tumoren konnte eine systemische Streuung von Tumorzellen dokumentiert werden.
In verschiedenen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass einige Proteinase-Systeme überexprimiert werden. Es wurde ebenfalls entdeckt, dass Tumore mit hoher proteolytischer Aktivität aggressiver waren als die mit niedrigerer Expression proteolytischer Parameter. Im Besonderen gilt das für das **Urokinase-Typ-Plasminogen-Aktivator (UPA)-System**. Eine Assoziation zwischen dem UPA-System und der Prognose wurde für das kolorektale Karzinom festgestellt (Mulcahy *et al*, 1994; Heiss *et al*, 1995).

1.6.2.2 Adhäsionsmoleküle

Das bislang bestuntersuchte Adhäsionsmolekül ist das **E-Cadherin**. Es handelt sich dabei um ein ausschließlich von epithelialen Zellen exprimiertes Kalzium-abhängiges Oberflächenprotein mit einem Molekulargewicht von 120000 Dalton. Invasive Tumor-Zell-Linien zeigen häufig einen Verlust von E-Cadherin, wobei die Invasivität der Tumorzellen durch Transfektion von E-Cadherin-c-DNA herabgesetzt werden kann (Becker *et al*, 1994).

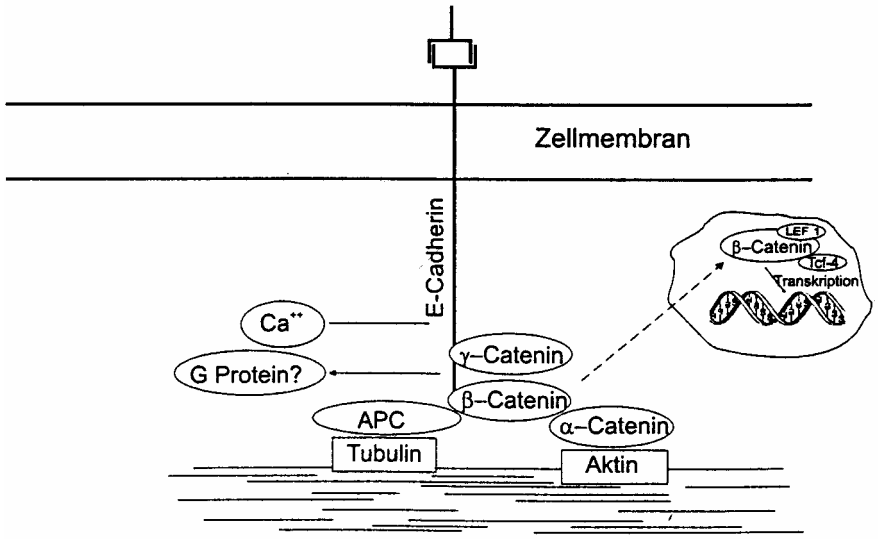


Abbildung 4: Schematische Darstellung des E-Cadherin-Catenin-APC-Komplexes

Cadherine sind Teil eines Multiproteinkomplexes, den man in den Zonulae adhaerentes nachweisen kann, und der benachbarte Zellen mechanisch an deren Zellmembranen festhält (Guilford *et al,* 1998).
Eine zentrale Rolle in dem komplexen Regelkreis in Abbildung 4 spielt das ß-Catenin: es ist ein Bindungspartner von E-Cadherin, darüberhinaus fungiert es als Transkriptionsfaktor. Das APC-Protein (Tumorsuppressor-Protein) und das Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin sind kompetitive Antagonisten für die Bindungsstelle des ß-Catenins (Hulsken *et al*, 1994). Der größte Teil des zellulären ß-Catenin Pools ist an zytoplasmatisches E-Cadherin gebunden.

ß-Catenin wird durch einen Protein-Komplex, zu dem APC, GSK-3ß und Axin gehören, phosphoryliert und für die Ubiquitinierung und den Proteasom-Abbau verarbeitet (Aust *et al*, 2001).
Fällt nun das APC-Protein durch Mutation aus, wie es beim kolorektalen Karzinom häufig der Fall ist, kann ß-Catenin nicht mehr abgebaut werden und initiiert auf diese Weise die Transkription von c-myc, Cyclin D1 und anderen zellzyklusregulierenden Genen. Die Folge ist verstärkte Zellproliferation und Hemmung von Apoptose. Damit ist das Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Zelluntergang gestört.

Ein ebenfalls im Zusammenhang mit malignen Erkrankungen gut untersuchtes Adhäsionsmolekül ist das aus der Hyaluronat-Rezeptoren-Familie stammende **CD44**. Es bindet an Hyaluronsäure und wird von vielen Zellen exprimiert. CD44 existiert in verschiedenen Isoformen, die z.T. ihre Fähigkeit zur Bindung an Hyaluronsäure verlieren. Es wird vermutet, dass abnorme Transkripte und Isoformen von CD44 eine Rolle bei der Tumorinvasion spielen könnten (Mayer *et al*, 1993).

Ein weiteres Adhäsionsmolekül, das **ICAM 1**, stammt aus der Immunglobulin-Superfamilie. Sowohl beim hepatozellulären Karzinom, wie beim Pankreaskarzinom existiert eine systemisch zirkulierende Form, die unter Umständen eine Rolle bei der Tumorprogression spielt.
Allerdings läßt sich keines dieser Moleküle als gesicherter Prognosefaktor werten (Miyasaka, 1995).

1.6.2.3 Weitere genetische Faktoren

Darüberhinaus wurden einige genetische Aberrationen in kolorektalen Karzinomen beschrieben und auf ihre prognostische Relevanz hin untersucht:

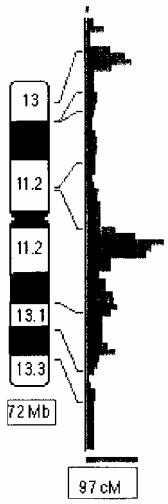
- Onkogene, die für Tyrosinkinase-Rezeptoren kodieren (z.B. *c-erb* B-2),
- Gene, die für Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren kodieren (EGF-Rezeptor),
- Gene, die an der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt sind (*K-ras, N-ras, H-ras*),
- Transkriptionsfaktoren (c-fos, c-jun, c-myc),
- Tumorsuppressorgene (p 53, APC, bcl 2),
- Phänomen der genetischen Instabilität (Mikrosatelliteninstabilität),

(Baretton *et al*, 1996; Benhattar *et al*, 1993; Campo *et al*, 1994; Hamelin *et al*, 1994; Sauter *et al*, 1994; Sauter *et al*, 1995 a und b; Sauter *et al* 1996).

1.6.2.4 20q13

Untersuchungen mit der Comparativen-genomischen-Hybridisierung (CGH) zeigen, dass einige Chromosomenloci im kolorektalen Karzinom hinzugewonnen oder verloren sein können. Die Zugewinne deuten auf einen Onkogen-Locus, Verluste auf einen Tumorsuppressorgen-Locus hin.

Auf 20q13 wurden bislang fünf Gene identifiziert. Diese sind: NABC1, ZNF217, CAS, STK15 und PTPN1. 20q ist im kolorektalen Karzinom der häufigste Zugewinn. Dies deutet darauf hin, dass auf 20q Onkogene liegen könnten. Ein Zugewinn von 20q wurde auch beim Mamma-, Magen- und Ovarialkarzinom (Knuutila *et al*, 1998; Diebold *et al*, 2000, Aust *et al*, 1999) sowie beim Osteosarkom (Tarkkanen *et al*, 1999) gefunden. Beim Mamma- wie beim Ovarialkarzinom korreliert dieser 20q-Zugewinn mit einer signifikant schlechteren Prognose (Tanner *et al*, 1995; Diebold *et al*, 2000).



Folgende Gene liegen im Bereich der Region 20q13:

- NABC1 (20q13.2) (Collins *et al*, 1998)
- ZNF217 (20q13.2) (Collins *et al*, 1998)
- CAS (20q13) (Brinkmann *et al*, 1996)
- STK15, auch bekannt als BTAK und Aurora 2 (Zhou *et al*, 1998)
- PTPN1 (20q13.1) (Tanner *et al*, 1996)

Abbildung 5: Chromosom 20

GEN	ERLÄUTERUNG
NABC1	Funktion unbekannt
ZNF217	Transkriptionsfaktor
CAS	cellular apoptosis susceptility
STK15: Aurora 2 BTAK	Chromosomen-Segregation genomische Instabilität
PTPN1	Phosphotyrosin Phosphatase

Tabelle 7: Gene im Bereich der Region 20q13

Welches der Gene für den 20 q13 Zugewinn verantwortlich ist oder ob mehrere Gene an dem Zugewinn beteiligt sind, ist bislang unklar. Einige Untersuchungen ergaben folgendes: Brinkmann *et al* (1996) fanden heraus, daß das CAS-Gen beim Mamma- und beim Kolonkarzinom amplifiziert ist. Dabei hat das CAS-Gen zwei Funktionen: Apoptose und Zellproliferation. Wenn die Apoptose als natürlicher Zelluntergangsmechanismus nicht mehr regelrecht funktioniert, führt das zu einem Verlust der Wachstumsregulation und damit möglicherweise zur Tumorentstehung.

Die Gene ZNF217 und NABC1 sind beim Mammakarzinom überexprimiert. Dabei wurde ZNF217 als Transkriptionsfaktor mit einer DNA-bindenden Domäne und einer transkriptionsaktivierenden Domäne identifiziert (Collins *et al*, 1998).

Für die vorliegende Arbeit ist die nähere Betrachtung von STK 15 bzw. BTAK, das für eine putative Serin/Threonin-Kinase kodiert, und Aurora 2, ebenfalls eine Kinase, von der onkogene Potenz bekannt ist, interessant (Sen *et al*, 1997; Bischoff *et al*, 1998). Beide Gene sind für eine regelrechte Chromosomensegregation zuständig. Wenn die Chromosomensegregation nicht mehr einwandfrei funktioniert, kommt es zu einer Anhäufung der in der Mitose nicht auseinandergewichenen Chromosomen. BTAK spielt möglicherweise eine Rolle bei onkogener Transformation in Brustkrebszellen (Sen *et al*, 1997). 1998 beschrieb Zhou aus der selben Arbeitsgruppe, dass STK15 bei Überexpression zu einer Zentrosomenamplifikation, zu chromosomaler Instabilität und Transformation in Säugerzellen führt. Eine weitere Untersuchung der Aurora 2-Kinase beim kolorektalen Karzinom (Bischoff et al, 1998), führte zu dem Schluß, die Aurora 2-Kinase könnte das Zielgen der 20q13-Amplifikation sein. In über 50% der untersuchten kolorektalen Karzinome war die DNA amplifiziert und die RNA überexprimiert. Ausserdem war das Enzym verantwortlich für Fibroblastentransformation, womit die potentielle Onkogenität der Aurora 2-Kinase bestätigt wurde.

1.7 Fragestellung

In sporadischen kolorektalen Karzinomen ist in der CGH-Analyse eine Amplifikation im Bereich der Region 20q mit 67% der häufigste Zugewinn (Aust *et al*, 2001). Darüberhinaus wurden signifikante Korrelationen von 20q13-Amplifikationen und ungünstiger Prognose bei anderen soliden Tumoren hergestellt z.B. mit nodal negativen Mammakarzinomen (Tanner *et al,* 1995) und Ovarialkarzinomen im Stadium FIGO III (Diebold *et al*, 2000). Genamplifikationen sind ein wesentlicher Mechanismus der Onkogenaktivierung zusätzlich zu strukturellen Veränderungen, Verlust von Kontroll-Mechanismen, insertionalen Mutagenesen und chromosomalen Translokationen (Knuutila *et al*, 1998).

Damit waren einige Fragen aufgeworfen, die zum Gegenstand der vorliegenden Arbeit wurden:

1. Wie hoch ist die Häufigkeit von 20q13.2 Zugewinnen in der FISH-Analyse bei kolorektalen Karzinomen?
2. Welche Korrelationen lassen sich zu klinisch-pathologischen Parametern herstellen?
3. Lassen 20q13-Zugewinne Rückschlüsse über die indviduelle Prognose zu ?
4. Wie kann man einen Grenzwert für Zugewinne in der Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH) festlegen?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patientengut

Das Untersuchungskollektiv bestand aus insgesamt 146 Patienten, die in den Jahren 1990 und 1991 in der Chirurgischen Klinik, Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität zu München an einem kolorektalen Karzinom operiert wurden. Diese Jahrgänge wurden ausgewählt, um einen gewissen Beobachtungszeitraum für den Verlauf der Erkrankung zu gewährleisten. Die beiden Geschlechter waren im Patientenkollektiv annähernd gleichstark vertreten, 77 der Patienten waren Männer und 69 Frauen. Das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Operation war 61,5 ± 7,25 Jahre. Ein Follow up existierte von 139 Patienten. Der Beobachtungszeitraum lag zwischen 0 und 98 Monaten, im Durchschnitt bei 50,3, im Median bei 60,9 Monaten. Bei 17 Patienten traten innerhalb des Beobachtungszeitraums Lokalrezidive auf, bei 40 Patienten Metastasen. 73 Patienten überlebten, 66 Patienten verstarben während des Beobachtungszeitraumes bis 1999, von 7 Patienten fehlten Angaben zu den Überlebensdaten.

Anzahl (n)	146
männlich	77
weiblich	69
Lokalrezidive	17
Metastasen	40
follow up´s	141
Überlebende	73
Verstorbene	66
fehlende Angaben	7

Tabelle 8: Basisstatistik des Patientenkollektivs

2.1.2 Tumormaterial

Das gesamte Untersuchungsmaterial stammt aus dem Archiv des Pathologischen Instituts der Ludwig-Maximilians Universität München. Alle Gewebeproben waren formalinfixiert und in Paraffin eingebettet. Von insgesamt 146 kolorektalen Karzinomen wurde ein Block mit Tumormaterial für die FISH-Analyse ausgewählt. Bei 5 Patienten konnten aus demselben Gewebeblock Adenomreste identifiziert werden, die vom Karzinom getrennt und separat untersucht wurden. Fünf synchrone Adenome (aus einem anderen Gewebeblock) und eine Lymphknotenmetastase wurden ebenfalls analysiert.

Um eine einheitliche Beurteilung der Histologie für das gesamte Untersuchungskollektiv zu gewährleisten, wurden das Grading und die pTNM-Stadieneinteilung sämtlicher Tumoren überarbeitet. Die histologische Klassifikation erfolgte an Hämatoxilin-Eosin (HE-) Schnitten anhand der Kriterien der UICC von 1993 (alte Klassifikation) und 1997 (neue Klassifikation). Der Unterschied zwischen den beiden Klassifikationen liegt in der Erfassung des Lymphknotenbefalls. Die Klassifikation von 1997 unterscheidet nicht mehr zwischen pN2 (mehr als 3 positive regionäre Lymphknoten (=LK)) und pN3 (positiver LK am Gefäßabsetzungsrand), diese beiden Kategorien fallen in pN2 zusammen.
Zwei Drittel der Tumoren waren pT 3-Tumoren, das restliche Drittel teilte sich in pT1-, -2- und -4-Tumoren. Etwa die Hälfte (53%) der Tumoren hatten mittelhoch bis schlecht differenzierte (G2-3) Karzinome. 16% der Karzinome waren schlecht differenziert (G3), 31% waren mittelhoch differenziert (G2). Gut differenzierte Tumoren (G1) gab es in diesem Kollektiv nicht.

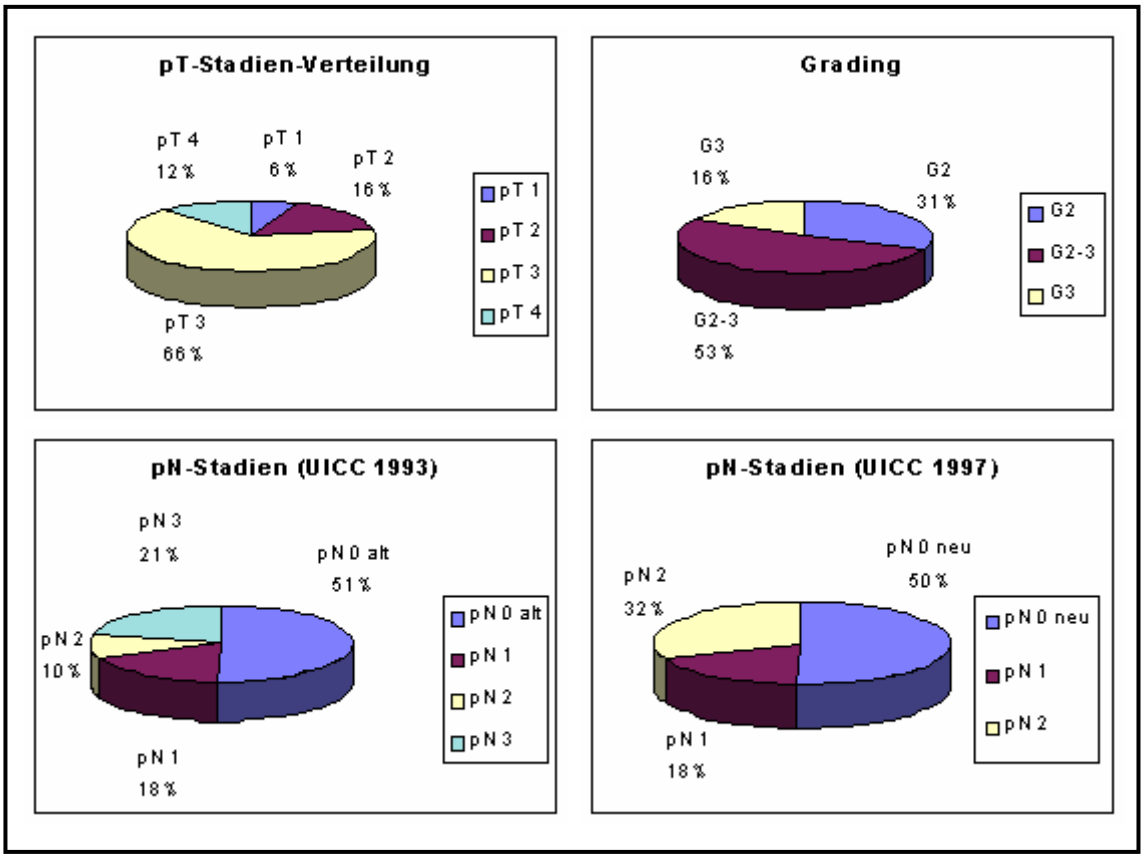


Abbildung 6: Tumorstadien (UICC 1993 und 1997, Sobin und Greene, 2001) und Tumorgrading

Im Untersuchungsgut fanden sich 11 muzinöse Karzinome, d.h. mehr als 50% des Tumors war schleimbildend, 17 teils muzinöse (d.h. der muzinöse Anteil war geringer als 50% des Tumorvolumens) und 3 teils siegelringzellige Karzinome.

2.1.3 Negativkontrollen

Als Negativkontrollen wurden 5 Resektionsränder, also normale kolorektale Schleimhaut, von Patienten mitgeführt, von denen auch Tumormaterial untersucht wurde.

2.2 Methode

2.2.1 Aufarbeitung des Gewebes

Voraussetzung für die gute Beurteilbarkeit der Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH) von paraffineingebettetem Tumormaterial ist die Gewinnung der Zellkerne. Um die Zellen aus dem Gewebeverband und die Kerne aus den Zellen herauszulösen, mussten die Proteine (Zellmembranen, Zell-Zell-Kontakte usw.) mittels einer Proteinasebehandlung (Carlsberg Lösung) verdaut werden, da Proteine den Hybridisierungsprozess sterisch behindern. Die RNA musste mit Hilfe von RNAase abgebaut werden, damit eine Bindung der FISH Probe an RNA-Stränge keine falsch positiven Signale ergeben konnte. Die Suspension aus zerkleinerten Zellbestandteilen und Kernen wurde gefiltert, um eine reine Kernsuspension zu erhalten.

Materialien und Reagenzien:

- Schlittenmikrotom (R. Jung AG)
- 100 ml Erlenmeyerkolben
- Reagenzröhrchen
- aqua bidest
- Wasserbad-Rüttler (Infors AG)
- Carlsberg Lösung
- Puffer I
- Vortexer (Bender & Hobein)
- Tischrüttler KL2 (Bühler)
- Zentrifuge (Heraeus)
- RNAase A1-Lösung
- PBS-Puffer
- Nylon Netze 50 mm, 60 µm (Reichelt Chemietechnik)
- Puffer II

Durchführung: Präparation von Kernen aus Paraffinmaterial (nach Eija Hyyttinen, Tapio Visacorpi, 1994).

1. Pro Patient 10 Schnitte von 25 µm Dicke in einen Erlenmeyerkolben geben.
2. Entparaffinieren in Xylol: Schnitte 1x30 Minuten in Xylol geben, Xylol wechseln 1x10 Minuten
3. Rehydrieren in absteigender Alkoholreihe: 1x10 min 100%iger Ethanol
   1x10 min 95%iger Ethanol
   1x10 min 70%iger Ethanol
   1x10 min 50%iger Ethanol

4. 2x ca.3 min. waschen in aqua bidest.
5. Schnitte in Reagenzröhrchen überführen
6. Protease-Verdau: 1-2 ml Carlsberg-Lösung zugeben
   60 min bei 37°C im Wasserbad schütteln
7. je 3 min stark vortexen
8. Proben auf ca. 10 ml mit Puffer I auffüllen
9. 10 min bei 1200 upm zentrifugieren
10. Überstand absaugen (Wasserstrahlpumpe)
11. RNAase-Verdau: ca. 1,5-2 ml RNAase A1-Lösung auf den Bodensatz pipettieren, resuspendieren und 15 min bei Raumtemperatur schütteln
12. Proben 5 min bei 1000-1100 upm zentrifugieren
13. Überstand absaugen
14. waschen mit PBS-Puffer
15. 5 min bei 1000 upm zentrifugieren
16. Überstand absaugen
17. Bodensatz mit etwa 1-2ml Puffer II aufschütteln
18. Suspension durch Nylonnetze filtern
19. Dichte des Filtrats (Kernsuspension) makroskopisch beurteilen, ggfs. mit Puffer II verdünnen

2.2.2 Cytospin

Für die Fluoreszenz in-situ Hybridisierungen musste die Kernsuspension auf Objektträger (=OT) aufgebracht werden. Die Kernsuspension wäre bei einfachem Auftropfen auf einen Objektträger nicht dicht genug gewesen und hätte zu einer zu grossflächigen Verteilung geführt. Einerseits wäre dadurch die Auswertung erschwert, andererseits sowohl die Kernsuspension, als auch der Hybridsierungsmix zu schnell verbraucht worden. Deshalb wurden die Kerne mit Hilfe einer Cytospin-Zentrifuge auf die Objektträger aufzentrifugiert. Die Kerne befanden sich anschliessend in ausreichender Dichte auf zwei kleinen Bereichen, einmal im oberen und einmal im unteren Drittel des Objektträgers und konnten danach hybridisiert werden.

Materialien

Cytospinzentrifuge (Shandon)
Objektträger Super Frost Plus (Menzel-Gläser)
Double Cytofunnels, Objektträgerhalter (Shandon)

Durchführung:

1. Kontrolle der Kerndichte im Mikroskop: dazu je Patientenprobe einmal 75 bzw 100 µl in die beiden Trichterkammern pipettieren, 5 Minuten bei 900 upm zentrifugieren und die Dichte der Suspension beurteilen. Optimal ist eine Verteilung der Kerne, wenn sie möglichst dicht beieinanderliegen, ohne sich zu überlappen.

2. Neuen OT beschriften und zusammen mit einem Trichter in einen Objektträgerhalter einspannen
3. Je nach beurteilter Dichte der Kerne zwischen 50 und 180 µl aufpipettieren
4. 5 Minuten bei 900 upm zentrifugieren
5. OT entnehmen, trocknen lassen und auf der Unterseite Kernspots markieren (Diamantstift)
6. OT bis zur Hybridisierung bei -18°C aufbewahren.

2.2.3 FISH

Ziel dieser Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH) mit direkt markierter Sonde war die fluoreszenzoptische Darstellung der Region 13.2 auf dem langen Arm des Chromosoms 20. Die Sonde mußte mit einzelsträngiger DNA hybridisieren. Dazu wurde die DNA der Kernspots vordenaturiert und anschliessend die ebenfalls denaturierte Sonde aufpipettiert. Die Denaturierung geschah simultan wie unter Punkt 7 der Durchführung von 2.2.3. beschrieben. Da die Sonde mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert war, genügte eine einfache Gegenfärbung der Kerne mit DAPI, das in die DNA interkalierte. Dadurch konnte man die Kerne besser sichtbar machen, und die hybridisierten Areale hoben sich kontrastreicher vom Untergrund ab. Da fluoreszierende Präparate schnell an Leuchtkraft verlieren, mußten sie in einem Antifade-Eindeckmedium haltbarer gemacht werden.

Hybridisierung

Materialien und Reagenzien

- Hybridisierungsmix (=Hybmix)
- Deckgläser, 18 x 18 mm (Menzel-Gläser)
- Gummidruckball
- Fixogum (Marabu)
- Heizblock (Storck-Tronic)
- feuchte Kammer
- Brutschrank 37°C (Heraeus)

Durchführung:

1. OT auftauen
2. OT 20 min bei 80°C auf der Heizplatte vordenaturieren
3. Deckgläser mit Diamantstift (18x18 cm) in 4 Quadrate schneiden
4. Hybmix (jedesmal neu ansetzen) kurz vortexen und anzentrifugieren
5. OT und Deckgläser mit einem Gummidruckball abblasen, um Glassplitter und Schmutz zu entfernen
6. 2 µl Hybmix direkt auf den Spot auftragen (ohne ihn zu berühren), Deckglas vorsichtig auflegen und warten, bis sich der Hybmix gleichmässig verteilt hat
7. OT und Sonde simultan 10 min bei 80°C auf der Heizplatte denaturieren.
8. Mit Fixogum versiegeln
9. Über Nacht bei 37°C in feuchter Kammer renaturieren.

Detektion

Materialien und Reagenzien

- Küvetten
- Wasserbad 42°C (Kottermann)
- 0,05 x SSC
- BSA/BT
- Vectashield + DAPI
- Deckgläser , 18 x 26 mm (Menzel-Gläser)
- Filterpapierblock (Schleicher & Schüll)

Durchführung:

1. Vorsichtiges Entfernen des Fixogums und der Deckgläser
2. Stringentes Waschen: 3x 10 min bei 42°C in 0,05 x SSC
3. Inkubation in BSA/BT: 5 min bei 42°C (zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen)
4. Waschen in BT: 5 min bei 42°C
5. OT gut abtropfen lassen
6. Gegenfärbung mit DAPI: 10 µl Vectashield+DAPI pro Spot auftragen
7. Deckglas auflegen und im Filterpapierblock trocknen
8. Lagerung der OT bei 4°C.

2.2.4 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden jedes Mal neu angesetzt, mit Ausnahme des PBS-Puffers, der problemlos bei Zimmertemperatur aufbewahrt werden kann, und des Vectashield + DAPI, das bei 4°C gut haltbar ist. Die Waschlösungen 0,05 x SSC, BT-Puffer und BSA/BT für die Detektion der FISH wurden im Wasserbad auf 42°C erwärmt. Die Mengenangaben beziehen sich auf die Untersuchung von jeweils 6 Patientenproben. Vom experimentellen Ablauf her ist es nicht empfehlenswert mehr als maximal 12 Patientenproben auf einmal zu untersuchen.

2.2.4.1 CARLSBERG-Lösung

Protease Typ XXIV (Sigma)	0,01 g
Puffer I	10 ml

2.2.4.2 Puffer I

Trisbase (Sigma)	0,17 g
Tris HCl (Sigma)	1,36 g
NaCl (Fluka)	0,41 g
ad 80 ml aqua bidest	
pH auf 7,2 mit 1 n HCl einstellen	
ad 100 ml aqua bidest	

2.2.4.3 Puffer II

Puffer I	10 ml
EDTA (Serva)	0,029 g
NP 40 (Fluka)	0,3 g
ad 80 ml aqua bidest	
pH auf 7,5 mit 1 n NaCl einstellen	
ad 100 ml aqua bidest	

2.2.4.4 RNAase A 1- Lösung

RNAase Gemisch (Sigma)	1 ml
Puffer II	9 ml

(RNAase Gemisch besteht aus 1 mg Stammlösung pro 1ml Puffer II)

2.2.4.5 PBS

NaCl	85 g
Na2HPO4 x 2 H2O	12,7 g
NaH2PO4 x 2 H2O	3,9 g
ad 10 Liter aqua dest	

2.2.4.6 Hybridisierungs-Mix

Hybridisierungspuffer (Vysis)	9 µl
Aqua bidest	2,5 µl
direkt gelabelte Sonde 20q13 (Vysis)	2 µl

2.2.4.7 0,05xSSC

Aqua bidest	200 ml
20 x SSC	0,5 ml

2.2.4.8 BT-Puffer

Aqua bidest	250 ml
NaHCO3	3,1 g
Natriumcitrat	50 mg
Polyoxyethylensorbitan-monolaurat “Tween 20” (Sigma)	0,25 ml

2.2.4.9 BSA/BT

Spatelspitze BSA (=Rinderalbumin) (Sigma) in eine Küvette geben

Mit warmem BT-Puffer auffüllen

Rühren, bis BSA gelöst ist

2.2.4.10 Vectashield/ DAPI

Vectashield (Vector Laboratories) 1 ml

DAPI-Lösung 1 µl

(aus DAPI-Stammlösung, die aus 0,1 µg DAPI pro ml Antifade (=Vectashield) besteht)

Zur Aufbewahrung bei 4°C Reaktionsgefäss mit Alufolie umwickeln.

2.2.5 Auswertung der FISH

Die Auswertung der FISH-Präparate erfolgte an einem Axioskop Fluoreszenz Mikroskop (Zeiss). Die Daten der digitalen Bildanalyse wurden mit einer Kamera der Firma Photometrics aufgenommen, im Computer gespeichert und mit der Software der Firma Vysis bearbeitet. Die Bilder sind in den Text dieser Arbeit unter Punkt 3.2.5 integriert.

Für die morphologische Beurteilbarkeit der Signale mussten einige Voraussetzungen erfüllt sein: die Kerne mussten nebeneinander liegen, runde oder ovale unbeschädigte Kerngrenzen haben; die Signale mussten innerhalb eines Kernes liegen und als singulär punkt- oder kommaförmig voneinander abgrenzbar sein.

Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung mit der direkt gelabelten Gensonde 20q13.2 erbrachte sehr gute Ergebnisse in Hinblick auf die mikroskopische Beurteilbarkeit. Bei zwei Proben musste eine enzymatische Vorbehandlung erfolgen, um zwischen echtem Hybridisierungssignal und unspezifischer Bindung der Sonde zu differenzieren. Pro Patient wurde die Anzahl der Signale von 120 Kernen gezählt. Dabei beurteilten mehrere voneinander unabhängige Personen dieselben Präparate, zur Vermeidung eines systematischen untersucherabhängigen Fehlers. Zwölf Präparate wurden doppelt gezählt, dabei lag die Differenz in der Beurteilung der Anzahl der Signale durchschnittlich bei 2,8% $\pm$ 2,2%.

Tabelle 9 soll das besser verständlich machen: von den 120 ausgezählten Kernen wurden folgende addiert und in „Kern“-Gruppen sortiert: Kerne, die kein oder ein Signal aufwiesen. Kerne, die genau zwei Signale und solche, die drei bis zehn und solche, die größer gleich elf Signale aufwiesen. 3-10 Signale wurden als 20q13 Zugewinn, größer gleich 11 Signale als Amplifikation gewertet.

Fall-Nr.\Signale	**0-1**	**2**	**3-10**	**≥11**	**Kein Zugewinn**	**Zugewinn**	**High-level-amplification**
Nr.1 (absolut)	4	59	57	0			
Nr.1 (relativ %)	3,3%	49,2%	47,5%	0%		**x (47,5%)**	

Tabelle 9: Auswertungsprotokoll am Beispiel des Patienten Nr.1

2.2.6 Statistik

Der **Chi-Quadrat-Test** für zwei alternative Merkmale wurde angewendet, um voneinander abhängige Variablen zu erkennen, wie beispielsweise das Tumorstadium und die Tumordifferenzierung.

Es wurden **univariate Survivalanalysen** anhand des Log-Rank-Tests durchgeführt. Die graphische Darstellung dieser Ergebnisse erfolgte mittels Kaplan-Meier-Kurven, die das Überleben bestimmter Subgruppen innerhalb eines Beobachtungszeitraumes von 60 Monaten graphisch darstellen. Als vergleichender Graph wird immer die zu erwartende Sterberate einer gleich alten Vergleichspopulation gegenübergestellt.

Um die prognostische Relevanz voneinander unabhängiger Parameter, wie beispielsweise das Tumorstadium, aber auch das Vorliegen eines 20q13.2 Zugewinns zu überprüfen wurden **multivariate Survivalanalysen** nach Cox berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse des Kollektivs auf seine Repräsentativität

Die Gegenüberstellung epidemiologischer und medizinischer Daten des untersuchten Kollektivs mit den Daten des Tumorzentrums München (Engel *et al*, 1997) sollen erläutern, dass die Ergebnisse dieser Arbeit in Hinblick auf das Patientenkollektiv repräsentativ sind.

Vergleichsparameter	**Untersuchungsgut dieser Studie (n=146)**		**Engel *et al,* 1997 (n=4412)**	
Geschlechterverhältnis m/w	1,1		1,0	
Patienten mit follow-up	96,6%		86,1%	
Patienten mit Progression	30,1%		36,1%	
Sterbefälle gesamt	45,2%		39,5%	
Alter	< 60 Jahre 47,3%	≥ 60 Jahre 52,7%	< 65 Jahre 45,0%	≥ 65 Jahre 55,0%
Lokalisation: rechtes Colon linkes Colon	47,3% 52,7%		43,3% 56,7%	
Histologie adenomatös mucinös	92,5% 7,5%		88,9% 11,1%	
pT1+2 pT3 pT4 keine Angaben	21,9% 65,7% 12,3% -		23% 41,6% 12,3% 23,1%	
G1 G2 G2-3 G3 G4	- 30,8% 52,7% 16,4% -		6,3% 67,7% - - 25,9%	

Tabelle 10: Vergleich der klinischen Charakteristika des untersuchten Kollektivs mit den epidemiologischen Daten des Tumorzentrums München

Die leicht abweichenden Daten in Tabelle 10 lassen sich durch die unterschiedliche Gesamtfallzahl erklären. Die Differenz bei den pT3-Tumoren ist möglicherweise durch das Fehlen der Angaben in 20 der Fälle bei Engel *et al.* zu erklären.

Ebenso verhält es sich mit den unterschiedlichen Angaben beim Grading, wobei nochmals darauf hingewiesen werden soll, dass in dieser Arbeit alle Tumoren von einem Untersucher bezüglich des Gradings nachuntersucht wurden, um eine einheitliche Beurteilung zu

gewährleisten. Die Altersgrenze wurde in den beiden verglichenen Kollektiven unterschiedlich festgelegt.

Die statistischen Berechnungen bestehen aus drei Anteilen:
Die Kontingenztafeln (Chi-Quadrat-Tests) zur Beschreibung der einzelnen untersuchten Parameter. Deshalb wurden alle klassischen prognostischen Faktoren in Hinblick auf gegenseitige Abhängigkeiten berechnet. Ein p-Wert kleiner als 0,05 gilt als statistisch signifikant. Es war wesentlich, gleiche Korrelationen wie in vorangegangenen epidemiologischen Studien zu finden.
Die beiden weiteren Anteile sind zum einen die univariate Überlebensanalyse, dargestellt in Überlebenskurven nach Kaplan-Meier, zum anderen die multivariate Survivalanalyse nach Cox (s. Kapitel 3.3). Sie werden nachfolgend näher erläutert.

3.1.1 Kontingenztafeln (Chi-Quadrat-Tests) zur Beschreibung der Abhängigkeit klinischer und pathologischer Parameter

3.1.1.1 Alter und Tumordifferenzierung

Ältere Patienten haben deutlich seltener schlecht differenzierte (G3) Tumoren. Diese scheinen zugunsten der G2-3 Tumoren verschoben zu sein (Tabelle 11).
Die kursiv gedruckten Prozentangaben beziehen sich immer auf das gesamte untersuchte Kollektiv von 146. Die normal gedruckten Prozentangaben beziehen sich auf den jeweils untersuchten Parameter. Ein Beispiel: 60 der untersuchten Patienten waren jünger als 60 Jahre alt (entspricht 100%), von diesen hatten 19 G2 Tumoren (entspricht 31,6%), 26 G2-3 Tumoren (entspricht 43,3%) und 15 G3 Tumoren (entspricht 25%).

Alter/Grading	**G2**	**G2-3**	**G3**	**Summe**
< 60 J.	19/ 31,6%	26/ 43,3%	15/ 25%	60/ *41,1%*
>= 60 J	26/ 30,2%	51/ 59,3%	9/ 10,5%	86/ *58,9%*
Summe	45/ *30,8%*	77/ *52,7%*	24/ *16,4%*	146/ *100%*

Tabelle 11: Verteilung der Tumoren auf verschiedene Differenzierungsgrade in Abhängigkeit vom Alter (p=0,043)

3.1.1.2 Infiltrationstiefe und Tumorlokalisation

Im rechten Kolon findet man viermal häufiger pT4-Tumoren als im linken Kolon. Dagegen findet man im linken Kolon etwa dreimal häufiger Tumoren mit geringer Infiltrationstiefe.

Lokalisation/pT-Stadium	pT1	pT2	pT3	pT4	Summe
re. Colon	3/2,1%	5/3,4%	47/68,1%	14/20,3%	69/ *47,3%*
li. Colon	6/4,1%	18/12,3%	49/63,6%	4/5,2%	77/ *52,7%*
Summe	9/ *6,2%*	23/ *15,7%*	96/ *65,8%*	18/ *12,3%*	146/ *100%*

Tabelle 12: Infiltrationstiefe in Abhängigkeit von der Tumorlokalisation (p= 0,004)

3.1.1.3 Tumorinfiltrationstiefe und Lymphknotenbefall

Je tiefer der Tumor die Darmwand infiltriert hatte, desto wahrscheinlicher traten auch LK Metastasen auf. Wenn der Tumor die Muscularis propria überschritten hat, entsprechend pT3, oder gar umliegende Organstrukturen infiltriert (pT4), sind in weit über 50% der Fälle Lymphknotenmetastasen vorhanden.

pT- / pN-Stadium	PN 0	pN pos.	Summe
pT1+pT2	26/ 81,3%	6/ 18,7%	32/ *21,9%*
pT3	42/ 43,7%	54/ 56,3%	96/ *65,8%*
pT4	6/ 33,3%	12/ 66,6%	18/ *12,3%*
Summe	74/ *50,7%*	72/ *49,3%*	146/*100%*

Tabelle 13: Lymphknotenbefall in Abhängigkeit von der Infiltrationstiefe des Tumors (p<0,0001)

3.1.1.4 Lymphknotenbefall und Fernmetastasen

Bei fortgeschrittenem Lymphknotenbefall hat der Tumor auch häufiger Anschluß an das Gefäßsystem und metastasiert auf diese Weise hämatogen. Bei pN2, also wenn mehr als vier regionale Lymphknoten befallen sind, existieren in 15,2% der Fälle Fernmetastasen (pM1).

pN-/ pM-Stadium	pM 1	pM X	Summe
pN 0	1/ 1,4	73/ 98,6	74/ *50,7*
pN 1	1/ 3,8%	25/ 96,2%	26/ *17,8%*
pN 2	7/ 15,2%	39/ 84,8%	46/ *31,5%*
Summe	9/ *6,2%*	137/ *93,8%*	146/ *100%*

Tabelle 14: Fernmetastasen in Abhängigkeit vom Lymphknotenbefall (p=0,021)

3.1.1.5 Lymphknotenbefall und Grading

Tumoren mit schlechterer Differenzierung zeigen häufiger Lymphknotenbefall. Tumoren ohne positive Lymphknotenmetastasen (pN0) haben nur in 10,8% ein schlechte Differenzierung (G3), während 30,4% der Tumoren im Stadium pN2 schlecht differenziert (G3) sind.

pN-Stadium/ Grading	G2	G2-3	G3	Summe
pN 0	32/ 43,2	34/ 46,0	8/ 10,8	74/ *50,7%*
pN 1	6/ 23,1%	18/ 69,2%	2/ 7,7%	26/ *17,8%*
pN 2	7/ 15,2%	25/ 54,3%	14/ 30,4%	46/ *31,5%*
Summe	45/ *30,8%*	77/ *52,4%*	24/ *16,4%*	146/ *100%*

Tabelle 15: Tumordifferenzierung in Abhängigkeit vom Lymphknotenbefall (p=0,004)

3.1.2 Univariate Survival Analyse

Die univariate Survival-Analyse wurde mit Hilfe des Log-Rank-Tests berechnet und anhand von Kaplan-Meier Kurven graphisch dargestellt.

Signifikante Korrelationen zwischen Überleben und klassischen Prognosefaktoren	p-Wert
pT	0,0001
pT1	0,0001
pN1	0,0001
pM1	0,0001

Tabelle 16: Korrelation zwischen Überleben und TNM-Stadium

In der univariaten Survivalanalyse konnten die konventionellen Prognosefaktoren (pTNM-Stadium) als statistisch signifikant bestätigt werden.

Die Kaplan-Meier Kurven zeigen immer einen Graphen, der das zu erwartende Überleben repräsentiert. Darunter versteht man die ‘natürliche Absterberate’ in einem Vergleichskollektiv mit gleicher Altersverteilung, das nicht an einem kolorektalen Karzinom erkrankt ist.

3.1.2.1 Tumorinfiltrationstiefe und Überleben

Die Tumorinfiltrationstiefe korreliert signifikant mit dem Überleben. Je tiefer der Tumor infiltriert, desto schlechter ist die Lebenserwartung, was man an der deutlichen Diskriminierung der Kaplan-Meier Kurven erkennen kann.

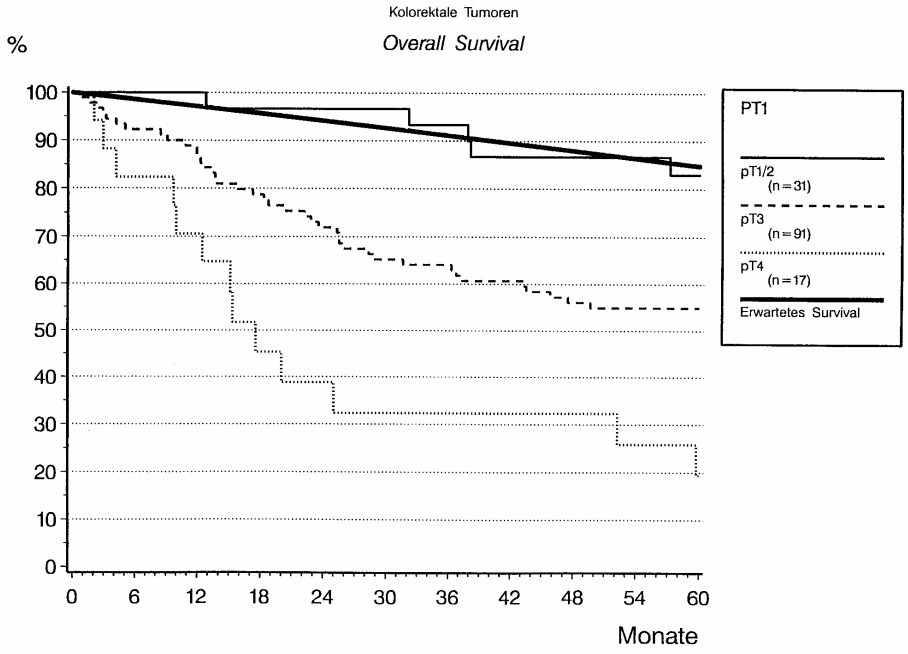


Abbildung 7: Overall Survival in Abhängigkeit von der Infiltrationstiefe (p<0,0001)

Das Fortschreiten der Erkrankung korreliert ebenfalls mit der Tumorinfiltrationstiefe. Unter Erkrankungsprogression versteht man das Auftreten von Lokalrezidiven oder Metastasen. Je tiefer ein Tumor infiltriert, desto früher ist mit dem Auftreten von Rezidiven oder Metastasen zu rechnen.

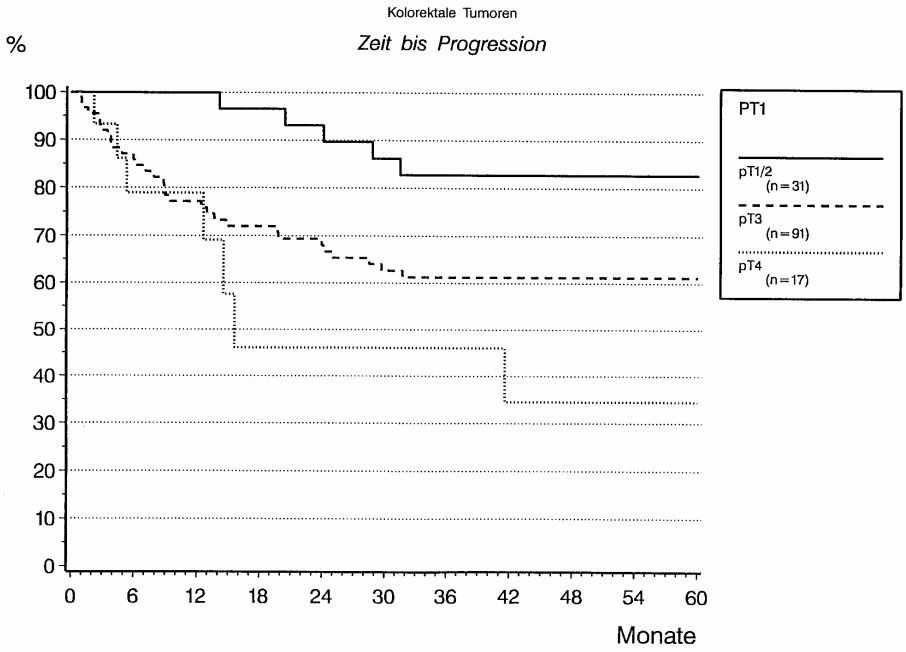


Abbildung 8: Zeit bis Progression in Abhängigkeit von der Infiltrationstiefe (p=0,0269)

3.1.2.2 Lymphknotenbefall und Überleben

Sind keine Lymphknotenmetastasen vorhanden (pN0), bzw. nicht beurteilbar (pNX), so ähnelt die Überlebensrate stark dem erwarteten Survival, d.h. einem gesunden Vergleichskollektiv. Hingegen ist das Überleben verkürzt, wenn Lymphknoten befallen sind.

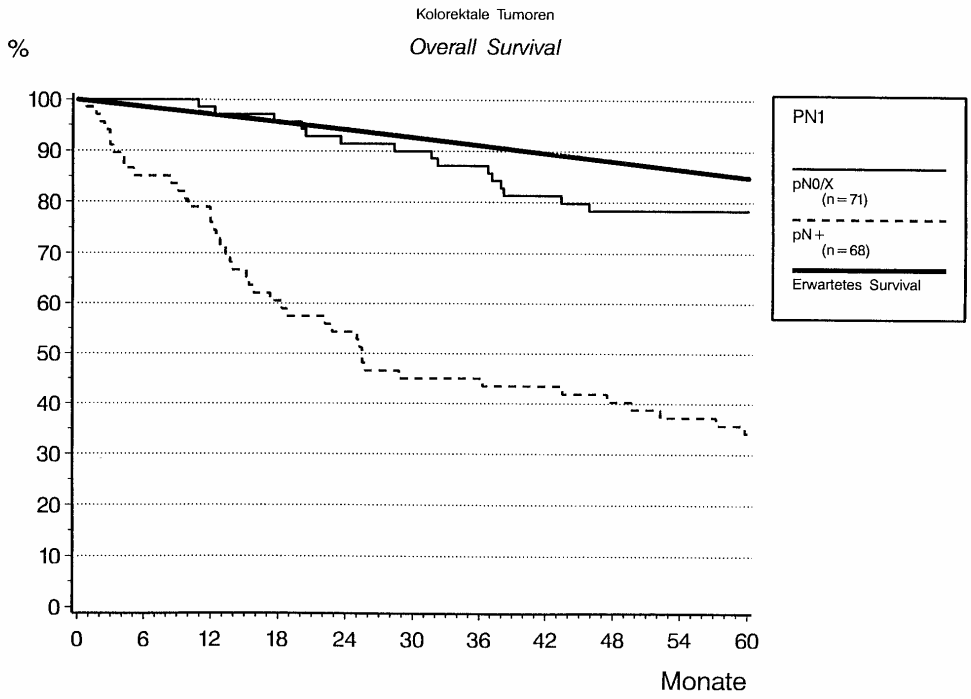


Abbildung 9: Overall Survival in Abhängigkeit vom Lymphknotenbefall (p<0,0001)

Auch die Erkrankungsprogression hängt stark vom Lymphknotenbefall ab. Wenn Lymphknoten befallen sind, hat der Tumor auch schon häufig Anschluß an das Gefäßsystem und kann so Metastasen setzen.

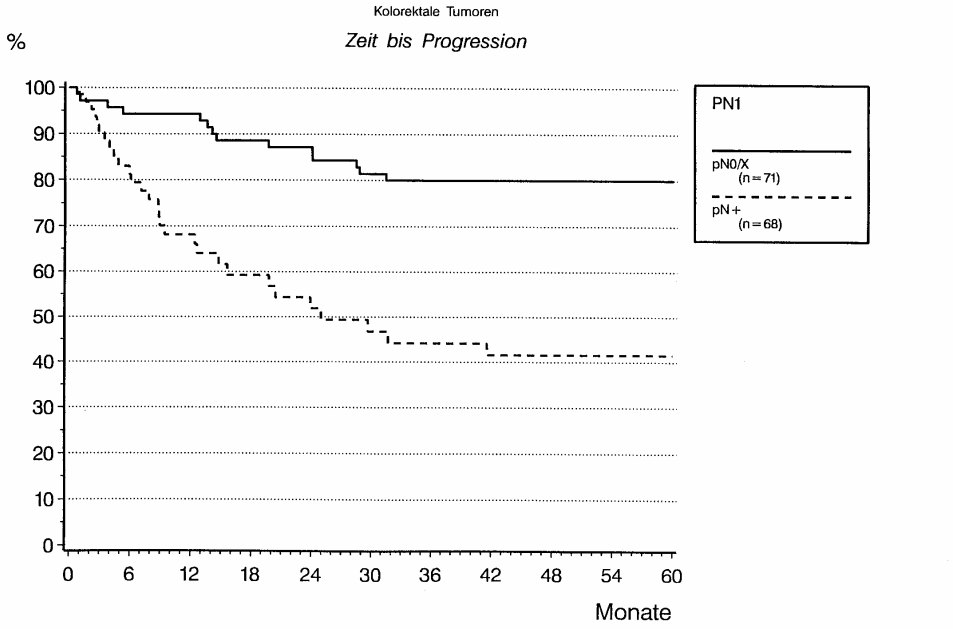


Abbildung 10: Zeit bis Progression in Abhängigkeit vom Lymphknotenbefall (p<0,0001)

3.1.2.3 Hämatogene Metastasen und Überleben

Sind Fernmetastasen nachweisbar, ist das Gesamtüberleben sehr schlecht. Nach gut 42 Monaten waren alle Patienten mit Fernmetastasen verstorben. Die Patienten, bei denen keine Metastasen diagnostiziert (pM0) oder nicht beurteilt werden konnten (pMX), ist das Gesamtüberleben zwar schlechter, als beim gesunden Kollektiv, aber nicht annähernd so schlecht, wie bei gesichert metastasierten Karzinomen.

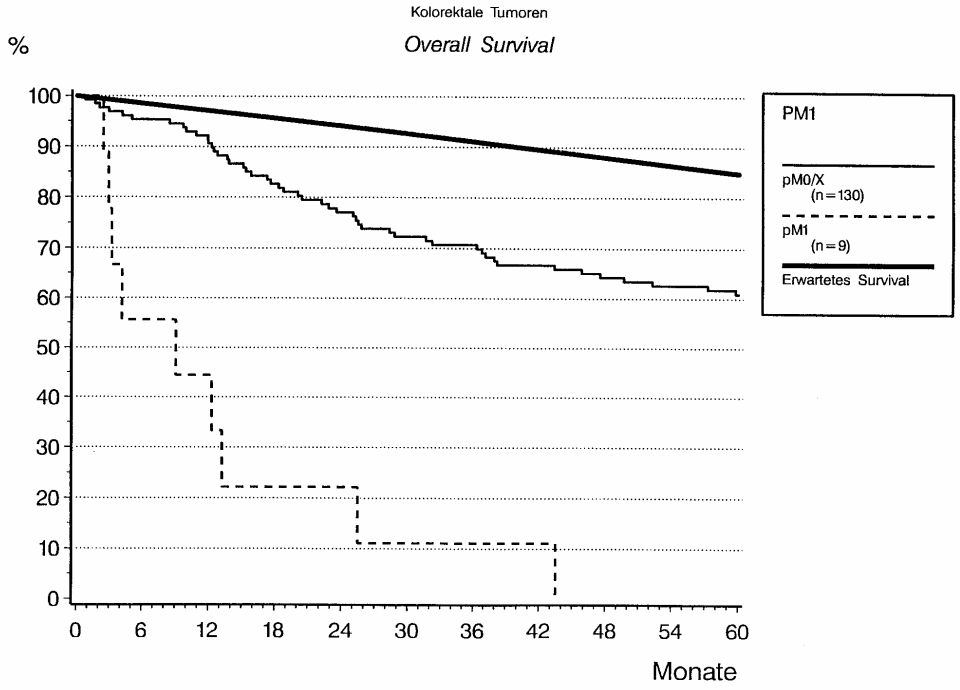


Abbildung 11: Overall Survival in Abhängigkeit von Fernmetastasen (p<0,0001)

3.1.2.4 Nicht signifikante Parameter

Weder Geschlecht noch Alter der Patienten hatten eine signifikante Bedeutung für das Überleben. Gleiches gilt für den histologischen Differenzierungsgrad der Tumoren.

3.2 FISH-Resultate

In jedem Präparat wurden insgesamt 120 Zellkerne ausgezählt und anhand der Anzahl der fluoreszierenden Signale in Gruppen eingeteilt: Zellkerne mit keinem oder einem Signal, Zellkerne mit genau zwei Signalen, Zellkerne mit mehr als zwei und ≤10 Signalen, und schließlich Zellkerne mit 11 oder mehr Signalen. Der Prozentsatz der Zellkerne jeder Gruppe wurde berechnet und ebenso wie die mediane Signalanzahl später für die Grenzwertberechnung verwendet.

3.2.1 Negativkontrollen

Als Negativkontrollen wurden fünf Resektionsränder mit normaler Kolonschleimhaut mitgeführt. Diese zeigten keine Aberrationen des 20q13.2 Lokus.

Pat.Nr.	Resektionsrand Signal MW pro Kern	Resektionsrand Prozentzahl der Kerne mit 20q13 Zugewinn	Karzinom Signal MW pro Kern	Karzinom Prozentzahl der Kerne mit 20q13 Zugewinn
17	1,9	0%	3,1	45%
79	2,0	0%	6,2	88%
80	2,0	0%	4,5	85%
137	2,0	0%	5,6	85%
138	2,0	0,8%	6,0	96%

Tabelle 17: Mittelwert der Signale und Prozentzahl der Kerne in den Resektionsrändern im Vergleich mit den zugehörigen Karzinomen

In den Resektionsrändern hatten alle Kerne durchschnittlich zwei Signale für 20q13.2. Lediglich in einem Resektionsrand (Nr.138) fand sich ein einzelner Zellkern mit drei Signalen, was einem Normalbefund entspricht.

3.2.2 Adenome

Die Untersuchung von fünf synchron vorkommenden Adenomen zeigte, dass drei von ihnen 20q13.2 Zugewinne in 0,8%, 16,7% und eines in 24,2% der Kerne aufwiesen. Da diese Adenome im Kontext mit gleichzeitig vorkommenden Karzinomen bearbeitet wurden, werden in Tabelle 18 die 20q13.2 Zugewinne eines Adenoms mit dem zugehörigen Karzinom gegenüber gestellt.

Pat.Nr.	Adenom	Karzinom
36	0,8%	0,8%
56	0,8%	70,8% Adenokarzinomanteil 6,7% siegelringzelliger Karzinomanteil
102	0,8%	28,3%
125	24,2%	76,1%
141	16,7%	27,5%

Tabelle 18: Vergleich der 20q13.2 Zugewinne zwischen Adenom- und Karzinomanteilen innerhalb eines Tumors

3.2.3 Karzinome

Untersucht wurden 146 Tumoren, deren Tumorzellkerne einen Mittelwert von 3,4 Signalen pro Kern aufwiesen. Die Streubreite lag zwischen 1,9 und 9,6 Signalen pro Kern. Die Standardabweichung betrug 1,5.
Der Median lag bei 2,8 Signalen mit Schwankungen ziwschen 2 und 10 Signalen pro Kern. 44 Prozent aller Tumorzellkerne wiesen mindestens drei Signale pro Kern auf. Hier lag die Streubreite bei 0 bis 96% aller Kerne.

n	146
Mittelwert der Signalanzahl	3,4
Standardabweichung	±1,5
Median	2,8

Tabelle 19: Mittelwert, Standardabweichung und Median der Signalanzahl pro Kern, bezogen auf 146 untersuchte Tumoren

Bei der Berechnung des prozentualen Anteils der Kerne mit mehr als 2 Signalen hatten 109 Tumoren ≥ 10% Kerne mit mehr als 2 Signalen, 94 Tumoren ≥ 20%, 81 Tumoren ≥ 30%, 78 Tumoren ≥ 40% und 64 Tumoren ≥ 50% Kerne mit mehr als 2 Signalen (siehe Tabelle 20). Nur zwei der Tumore hatten >11 Signale in 15% der Kerne (entspricht 1,4% des Gesamtkollektivs), was einer „high level Amplifikation“ gleichkommt.

Prozentsatz der Kerne >2 Signale	Anzahl der Fälle
>=10%	**109**
>=20%	**94**
>=30%	**81**
>=40%	**74**
>=50%	**64**

Tabelle 20: Anzahl der Fälle mit mehr als 2 Signalen bei Grenzwerten von 10 bis 50%

3.2.4 Lymphknoten-Metastase

An dieser Stelle bleibt noch zu erwähnen, dass auch eine Lymphknotenmetastase untersucht wurde, die in 0,8% ihrer Kerne mehr als zwei Signale aufwies. Allerdings zeigte das zugehörige Karzinom ebenfalls nur einen Prozentsatz von 10,8 der Kerne mit mehr als 2 Signalen.

3.2.5 FISH-Bilder

Nachfolgend werden einige Fälle gezeigt, anhand derer der 20q13.2-Zugewinn verdeutlicht werden soll. Blau sind die Zellkerne, Rot hebt sich jedes 20q13.2-Signal hervor. Die Fälle 137 RR und 138 RR sind Zellkerne aus den gesunden Resektionsrändern und zeigen erwartungsgemäß genau zwei Signale. Die zugehörigen (nicht abgebildeten Tumorzellkerne) wiesen in 85% und 96% mehr als zwei Signale auf.

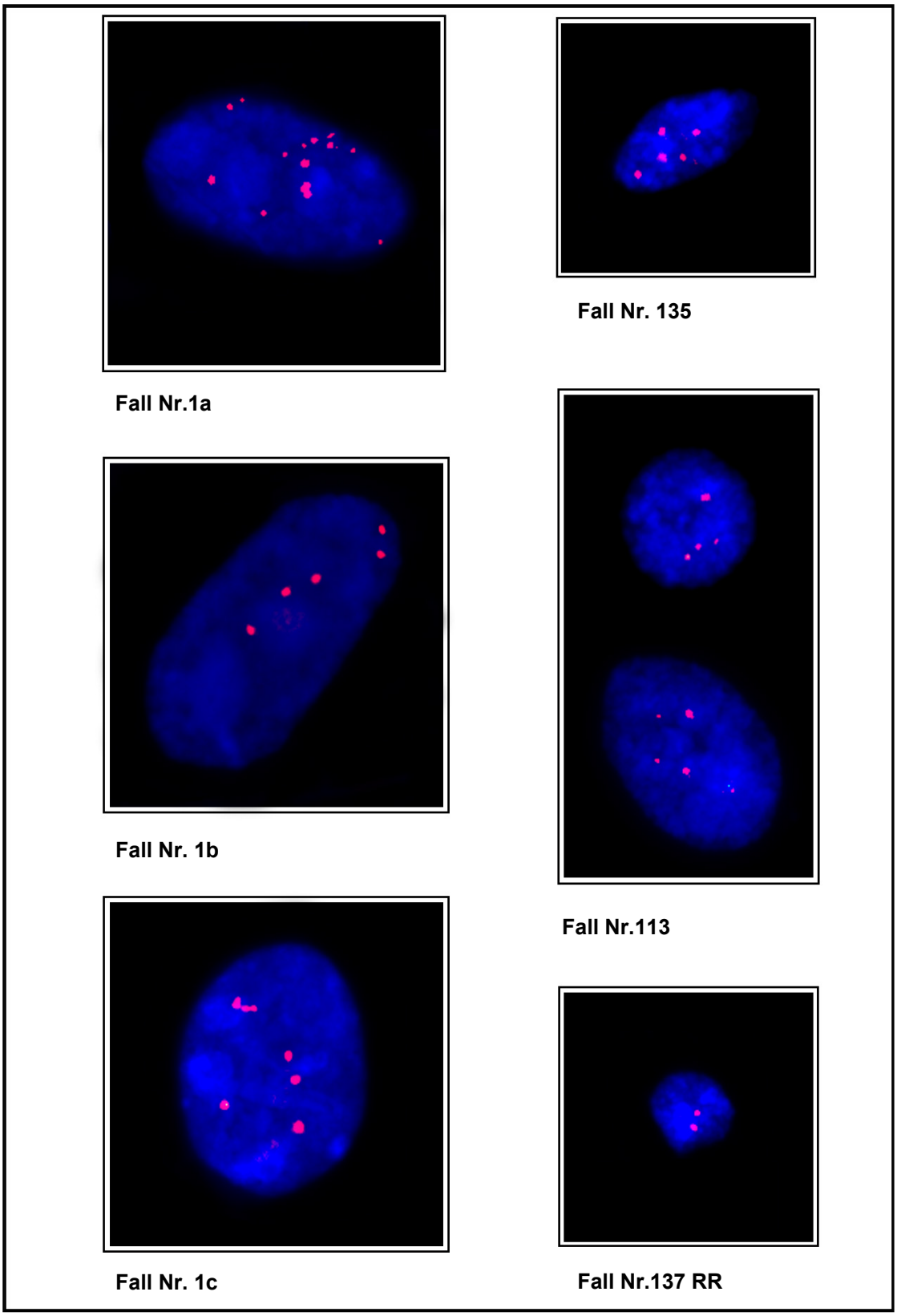


Abbildung 12: FISH-Signale an einzelnen Zellkernen

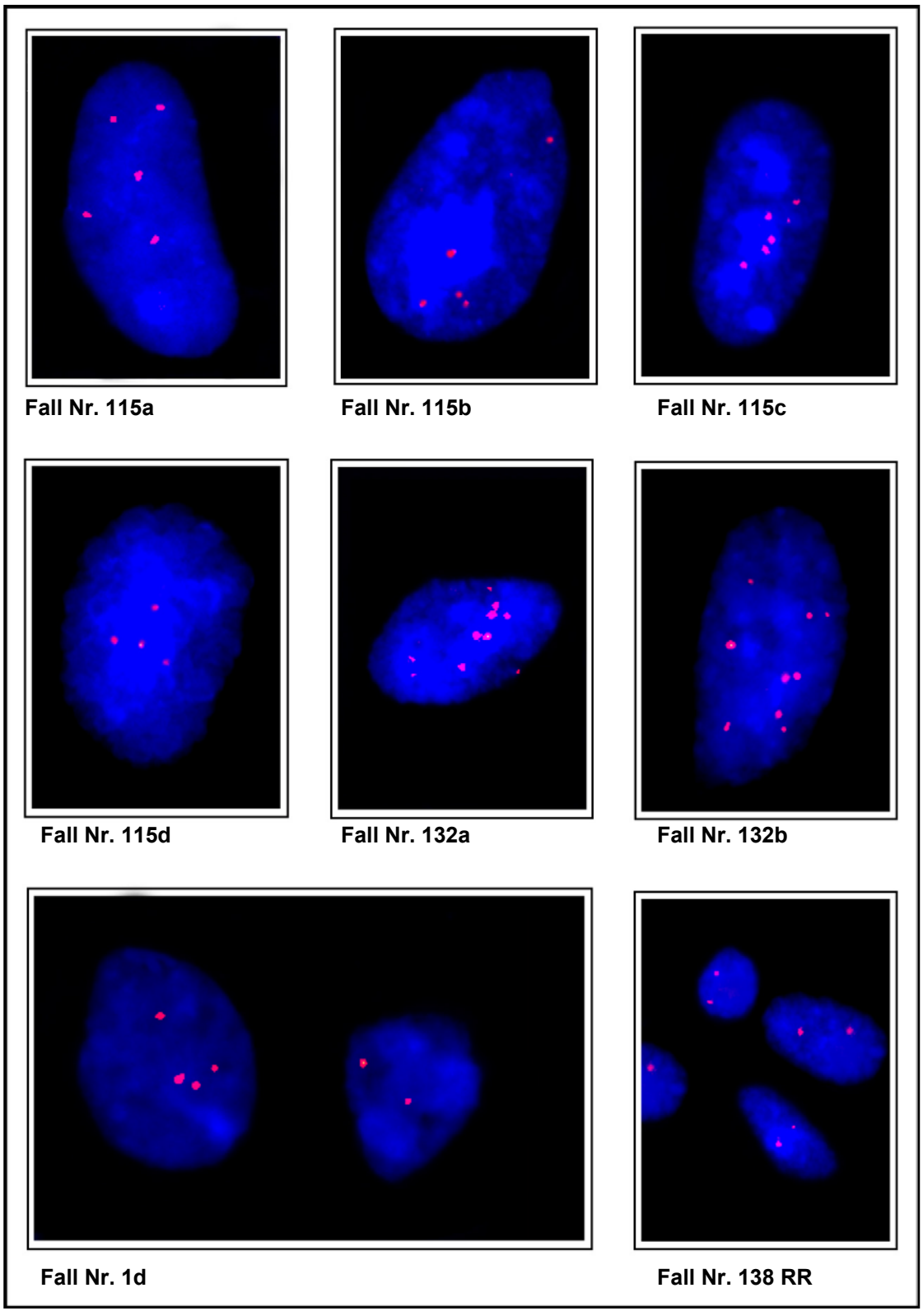


Abbildung 13: Weitere FISH-Signale an einzelnen Zellkernen

3.3 Grenzwertfestlegung

Da bislang einheitliche Grenzwerte für die Festlegung eines Zugewinns fehlen, wurden in dieser Arbeit mehrere Grenzwerte getestet, deren prognostische Aussagekraft später an Korrelationen mit konventionellen Prognosefaktoren ermittelt wurde. Wie bereits anhand der Resektionsränder dargestellt, wies die normale Kolonschleimhaut keine 20q13.2 Zugewinne auf, der mittlere Prozentsatz der Kerne mit mehr als 2 Signalen war ebenso Null wie die Standardabweichung. Alle im Folgenden getesteten Grenzwerte lagen weit über dem Mittelwert ± 2 SD der untersuchten Normalschleimhaut. Da keine Zentromersonde für das Chromosom 20 mitgeführt werden konnte, konnte kein relativer, sondern nur ein absoluter Zugewinn für 20q13.2 ermittelt werden, dessen Aussagekraft in Unkenntnis der Ploidie problematisch ist. Deshalb wurden verschiedene experimentelle Grenzwerte auf ihre Korrelation mit klinisch-pathologischen Merkmalen und mit Überlebensdaten geprüft.
Diese Grenzwerte entstanden entweder aus dem Mittelwert der gezählten Signale oder aus dem Median. Die statistische Regel zur Entscheidung, ob Mittelwerte oder Mediane verwendet werden, liegt in der Verteilung. Üblicherweise werden Mittelwerte benutzt, wenn ein Kollektiv normalverteilt ist. Wenn es das nicht ist, verwendet man die Mediane, da sie gegenüber ‘Ausreißern’ weniger störanfällig sind. Das Problem bei dem vorliegenden Kollektiv bestand darin, dass man weder von Normalverteilung noch von „Nicht-Normalverteilung“ sprechen konnte, da es keine vergleichbaren Voruntersuchungen gab.
Zusätzlich zum Median der in 120 Kernen pro Fall gezählten Signale wurde auch der Prozentsatz der Kerne mit mehr als 2 Signalen errechnet. Korrelationen mit klinisch-pathologischen Parametern wurden für die Grenzwerte von 10, 20, 30, 40 und 50% Zellkerne mit mehr als zwei Signalen bestimmt.

3.3.1 Survivalanalyse in Abhängigkeit von 20q13.2 Zugewinnen

In der univariaten Überlebensanalyse ergab sich mit einem p von 0,354 bei einem Grenzwert von 10% mehr als zwei Signale pro Kern keine signifikante Korrelation zwischen 20q13.2 Zugewinn und Überleben. Bei einem Grenzwert von 20% hingegen ließ sich mit einem p von 0,051 in der univariaten Analyse bereits ein Trend ablesen. Dieser Trend bestätigte sich auch in der multivariaten Analyse (siehe Tabelle 21). Die multivariate Analyse nach Cox sollte darlegen, ob die 20q13-Amplifikation einen unabhängigen prädiktiven Wert repräsentiert. Dazu wurden pT-Stadium, pN-Stadium, Grading, Geschlecht, Alter und die genetische Aberration 20q13 eingerechnet.
Die Beschreibung der pT-Stadien musste als binäre Fragestellung formuliert werden, weswegen sogenannte Dummy-Variablen gebildet wurden. Die Variable pTD2 bedeutet, dass pT1 und pT2 rechnerisch zusammengefasst, und die risk ratio mit Gesunden verglichen wurde: im unten genannten Fall heißt das, dass Patienten, die einen pT1 oder pT2 Tumor haben, ein 2,4-fach höheres Risiko gegenüber Gesunden haben, an diesem Tumor zu versterben. Die Beschreibung pTD3 sagt aus, dass Patienten mit pT3 oder pT4-Tumoren ein

6,4-fach erhöhtes Risiko haben, an dem entsprechenden Tumor zu sterben. Als Vergleichsgruppe dienen die pT1 *und* pT2 Tumoren.

S 2 ≥20%	Variable	p-Wert	rel. Risiko	ß	KI 95%
	pTD2	0,049	2,428	0,9	1,0-5,9
	pTD3	0,0003	6,374	1,9	2,4-17,3
	pN1	<0,0001	3,278	1,2	1,9-5,8
	S 2 20%	0,0269	2,053	0,7	1,1-3,9
	pT	0,0006			

Tabelle 21: Multivariate Survivalanalyse beim Grenzwert von ≥ 20 Prozent

Eine signifikante Korrelation zwischen Überleben und 20q13.2 Status war in der univariaten Analyse ab einem Grenzwert von 30% zu erkennen (p=0,024 für 30%, p=0,006 für 40% und p=0,005 für 50%).

FISH-Ergebnisse	p-Wert
Signal>2 in ≥ 30% der Kerne	0,0214
Signal>2 in ≥ 40% der Kerne	0,0059
Signal>2 in ≥ 50% der Kerne	0,0051
Signal Median1 ≥ 2 / > 2-4 / ≥ 4	0,0196
Signal Median2 < 4 / ≥ 4	0,0335
Signal Median3 ≤ 2 / ≥ 2	0,0051

Tabelle 22: Experimentelle Grenzwerte und ihre p-Werte für die Korrelation mit dem Überleben

Ebenso wie die prozentualen Grenzwerte erwiesen sich die Grenzwerte anhand verschiedener Mediane in einer univariaten Überlebensanalyse als signifikant, die signifikanteste Korrelation ergab sich für Abgrenzung der Fälle mit Median ≥ 2 Signale gegenüber Fällen mit Median ≤ 2 Signalen.

Nun sollen die Ergebisse der univariaten und multivariaten Überlebensanalyse der signifikanten experimentellen Grenzwerte im einzelnen dargestellt werden.

3.3.1.1 Grenzwert ≥ 30% Kerne mit mehr als 2 Signalen

Bei ≥ 30 Prozent Kernen mit zwei Signalen konnte man in der univariaten Überlebensanalyse eine signifikante Unterscheidung der Gruppen mit und ohne Zugewinn feststellen. 58 Patienten hatten entsprechend diesem Grenzwert keinen 20q13 Zugewinn, 81 Patienten hatten einen 20q13 Zugewinn. Die Kurven zeigen eine schlechtere Prognose für alle Patienten, die in mehr als 30% der Kerne mehr als zwei mal die 20q13-Sonde binden konnten.

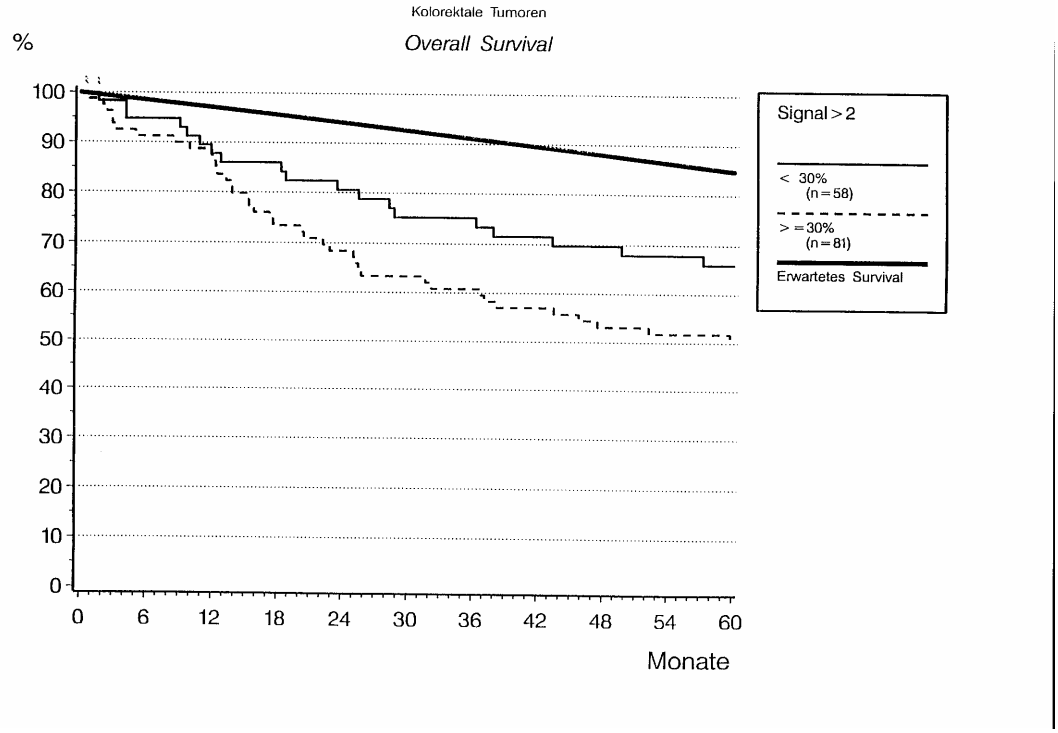


Abbildung 14: Overall Survival Signale>2 Grenzwert ≥30% (p=0,0214)

Bei diesem Grenzwert fand sich jedoch keine signifikante Korrelation zwischen der Zeit bis zur Tumorprogression und dem 20q13.2 Status.

Die nachfolgenden Tabellen zeigen die Ergebnisse der multivariaten Survivalanalyse. Die jeweilige Variable steht für Alter, Geschlecht, pTNM-Stadium oder die 20q13-Amplifikation. Der p-Wert gibt das Signifikanzniveau wieder. Die risk ratio ist ein Wert, der einen Faktor für das Risiko des Überlebens angibt, wenn diese Variable positiv erfüllt ist.

Ein Beispiel: Wenn ein Patient in mehr als 40% seiner Tumorzellkerne mehr als zwei Signale hat, bedeutet das für ihn, dass er ein 2,044-fach höheres Risiko hat zu versterben, als ein Vergleichspatient, der diese Aberration nicht trägt.

Der Koeffizient ß ist notwendig zur Berechnung des Konfidenzintervalls (KI 95). Das Konfidenzintervall gibt an, dass ein Schätzwert (der Variable) mit 95 prozentiger Wahrscheinlichkeit in dem berechneten Bereich liegt.

S 2 ≥30%	Variable	p-Wert	rel. Risiko	ß	KI 95%
	pTD2	0,0945	2,12	0,8	0,9-5,1
	pTD3	0,0011	5,363	1,7	2,0-14,7
	pN1	0,0001	3,448	1,2	1,9-6,1
	S 2 30%	0,0242	1,957	0,7	1,1-3,5
	pT	0,0022			

Tabelle 23: Multivariate Survivalanalyse beim Grenzwert von ≥30 Prozent

Mit einem p-Wert von 0,02 stellte sich der 20q13.2 Status bei einem Grenzwert von ≥ 30% als ein unabhängiger prognostischer Faktor heraus.

3.3.1.2 Grenzwert ≥ 40% der Zellkerne mit mehr als 2 Signalen

Nun erfolgte die Berechnung bei einem Grenzwert von 40%. Die beiden entstehenden Gruppen waren etwas gleichmäßiger verteilt: 65 Patienten hatten in weniger als 40% ihrer Tumorkerne mehr als zwei Signale, während 74 Patienten in mehr als 40% der Kerne die Aberration trugen. Die Diskriminierung der beiden univariaten Überlebenskurven zeigt, dass die Patienten der Gruppe ≥ 40% ein signifikant schlechteres Survival hatten.

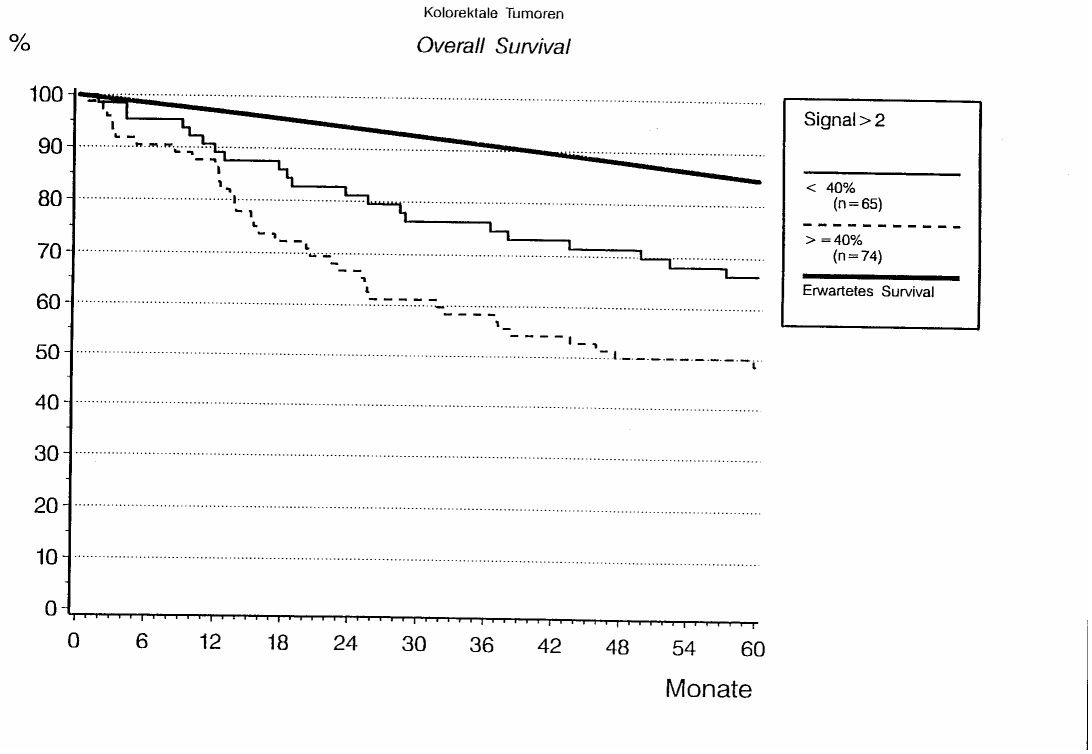


Abbildung 15: Overall Survival Signale>2 Grenzwert ≥ 40% (p=0,0059)

Im Gegensatz zum Grenzwert von ≥ 30% zeigt sich bei ≥ 40% auch eine signifikante Korrelation zur Zeit bis zur Progression.

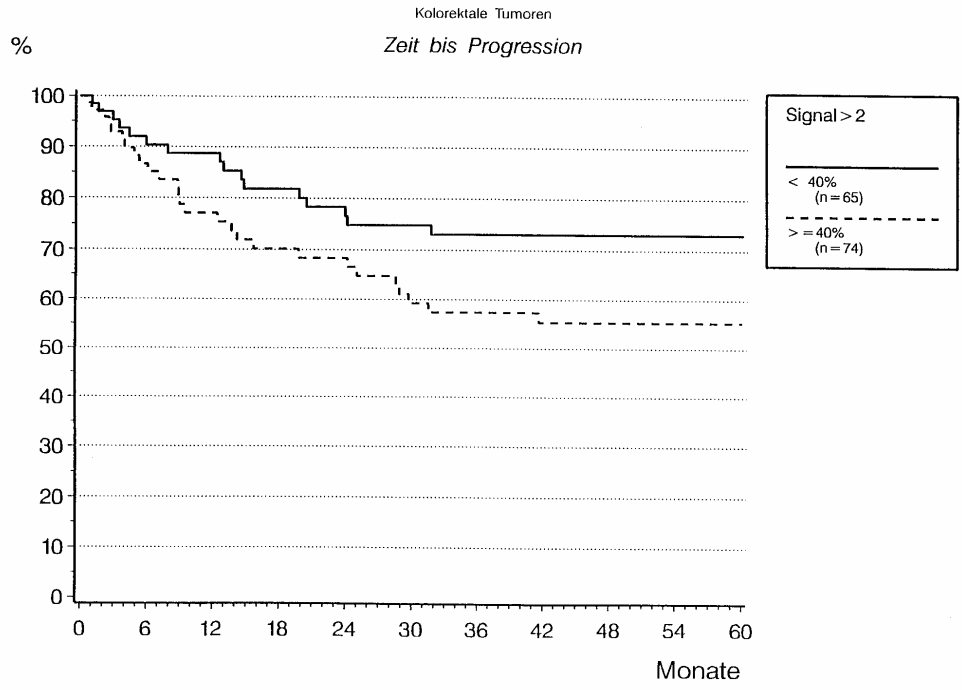


Abbildung 16: Zeit bis Progression- Signale>2 Grenzwert ≥ 40% (p=0,0301)

Auch bei einem Grenzwert von ≥40 Prozent zeigte sich der 20q13.2 Status als unabhängiger prognostischer Parameter. Dieser ist mit einem p von 0,012 sogar noch aussagekräftiger als der Grenzwert bei ≥ 30 Prozent.

S 2≥ 40%	**Variable**	**p-Wert**	**rel. Risiko**	**ß**	**KI 95%**
	age	0,073	1,68	0,5	1,0-3,0
	pTD2	0,089	2,163	0,8	0,9-5,3
	pTD3	0,0003	6,842	2	2,4-19,2
	pN1	0,0001	3,648	1,3	2,0-6,6
	S 2 40%	0,012	2,044	0,7	1,2-3,6
	pT	0,0003			

Tabelle 24: Multivariate Survivalanalyse beim Grenzwert von ≥ 40 Prozent

3.3.1.3 Grenzwert ≥ 50% der Kerne mit mehr als 2 Signalen

Auch der Grenzwert bei 50% war in der univariaten Analyse signifikant, sowohl was das Gesamtüberleben als auch die Erkrankungsprogression anging (siehe Abbildungen 17 und 18).

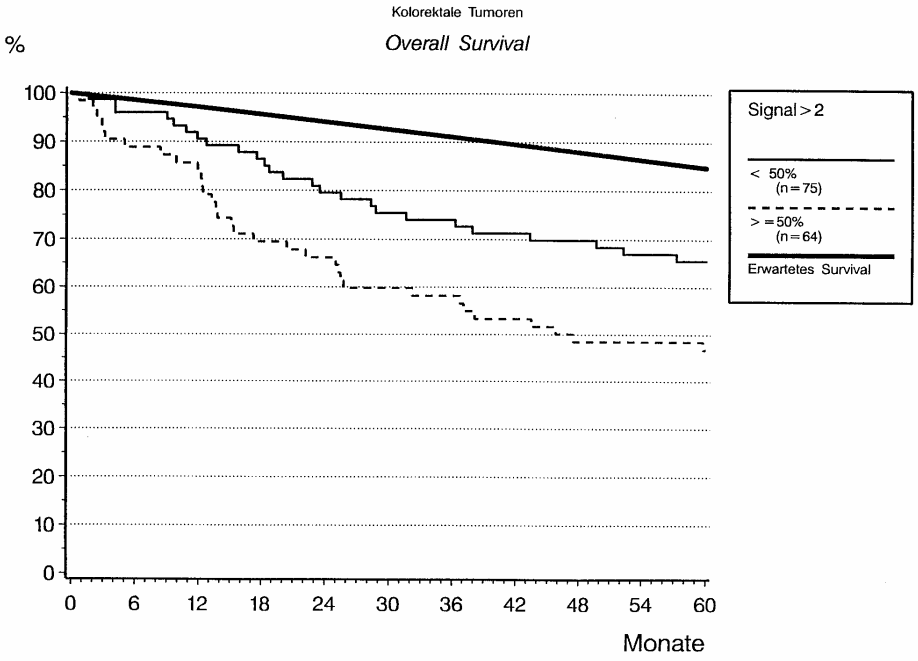


Abbildung 17: Overall Survival- Signale>2 Grenzwert ≥ 50% (p=0,0051)

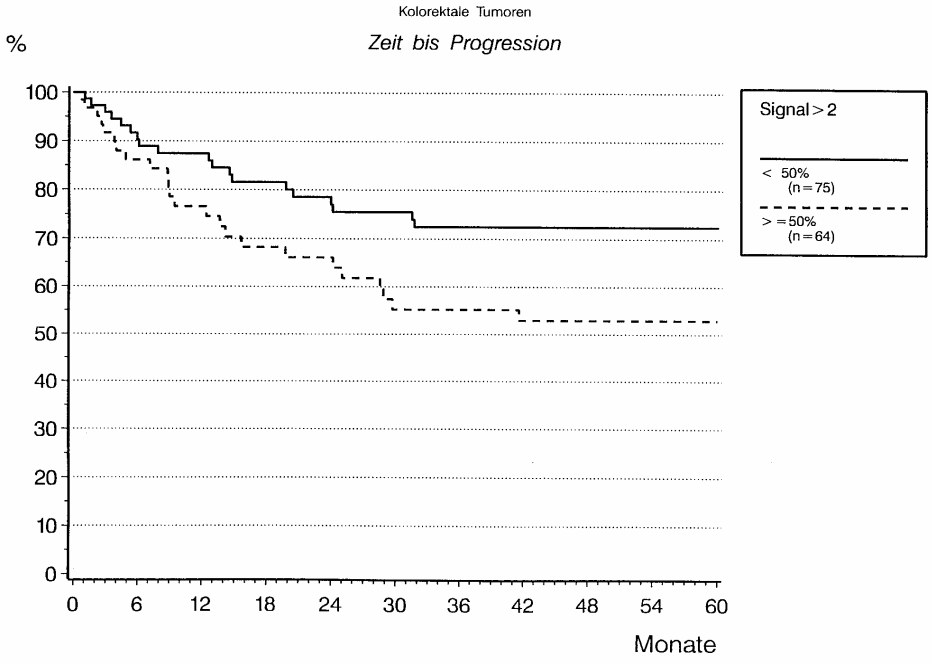


Abbildung 18: Zeit bis Progression- Signale>2 Grenzwert ≥ 50% (p=0,0172)

In der multivariaten Analyse erwies sich der Grenzwert von ≥ 50% interessanterweise nicht als unabhängiger prognostischer Faktor.

3.3.1.4 Grenzwert Median 1

Der Grenzwert „Median 1“ wurde folgendermaßen gebildet: ≤2 Signale im Median war die erste Gruppe (n=75). Zur zweiten Gruppe wurden die Patienten gerechnet, die im Median zwischen zwei und vier Signalen hatten (n=19) und die dritte Gruppe wurde aus denjenigen gebildet, die im Median mehr als vier oder genau vier Signale aufwiesen (n=45).
Auch diese Einteilung brachte ein signifikantes Ergebnis in der univariaten Analyse. Sowohl das Survival als auch die Progression waren signifikant korreliert mit den nach dem Median eingeteilten Gruppen.

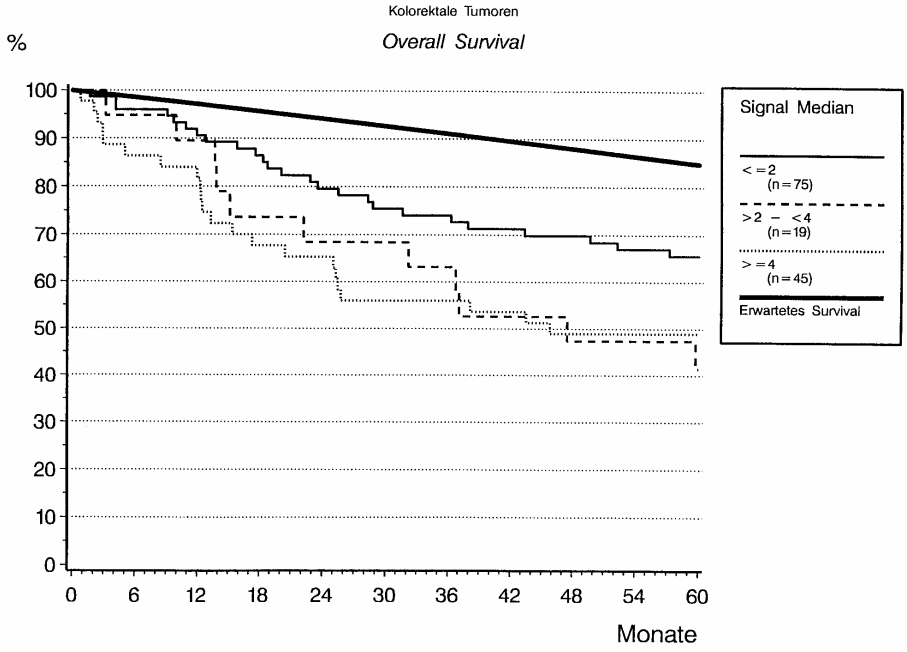


Abbildung 19: Overall Survival- Median 1 (p=0,0196)

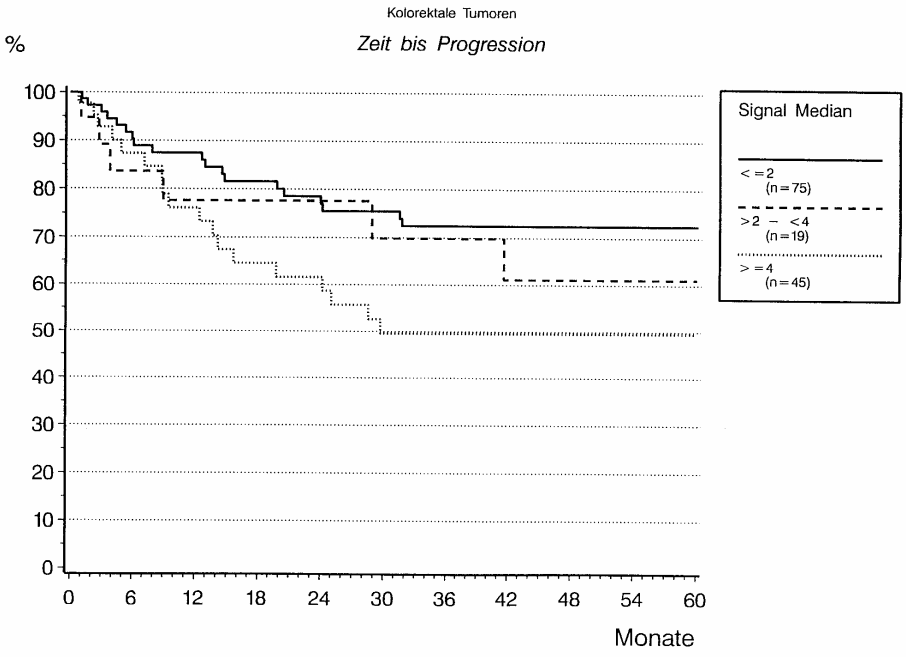


Abbildung 20: Zeit bis Progression- Median 1 (p=0,0343)

Die univariate Signifikanz des 20q13.2 Status anhand des Grenzwertes Median 1 ließ sich in der multivariaten Analyse nicht erkennen. Hier war der 20q13.2 Status, festgelegt an diesem Grenzwert, kein unabhängiger prognostischer Faktor.

3.3.1.5 Grenzwert Median 2

Ein weiterer Versuch war die Einteilung in zwei Gruppen, von denen 94 der Patienten weniger als vier Signale im Median in ihren Kernen hatten und 45 Patienten genau vier oder mehr als vier Signale in ihren Tumorzellkernen aufweisen konnten. Auch hier konnte man eine signifikante Korrelation zwischen den beiden Gruppen in Hinblick auf das Überleben und die Erkrankungsprogression verzeichnen (siehe Abbildung 21).

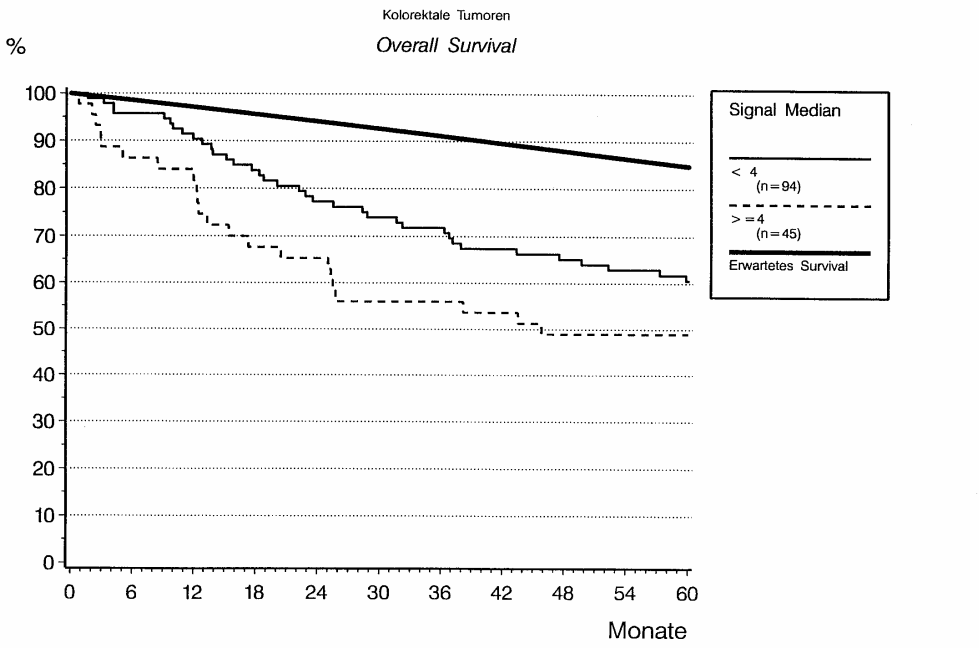


Abbildung 21: Overall Survival- Median 2 (p=0,0335)

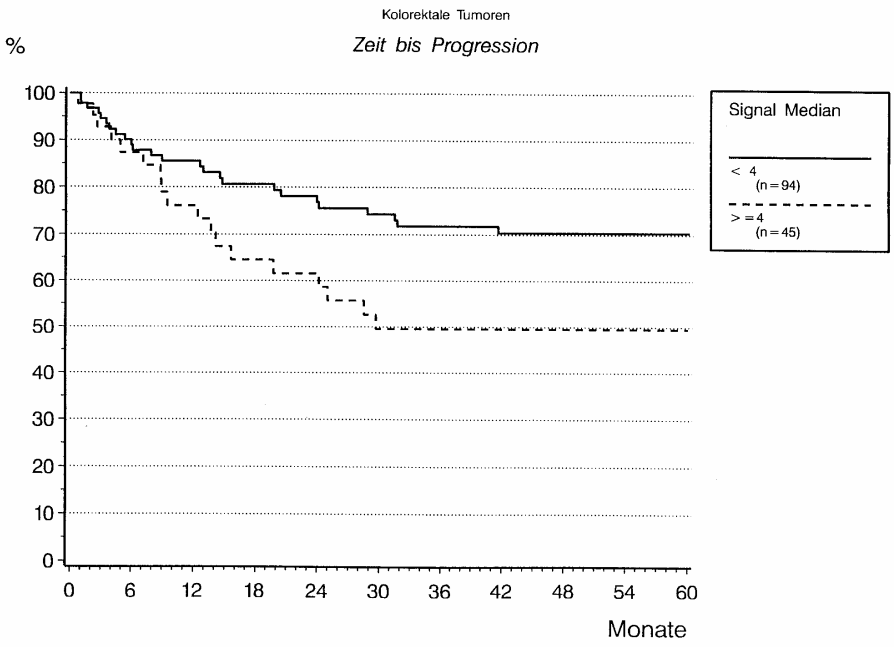


Abbildung 22: Zeit bis Progression- Median 2 (p=0,0135)

In der multivariaten Analyse zeigte sich der 20q13.2 Status mit dem Grenzwert Median 2 nicht als unabhängiger prognostischer Faktor.

3.3.1.6 Grenzwert Median 3

Die letzte Einteilung erfolgte nach der medianen Signalanzahl von kleiner oder gleich zwei (75 Patienten) und größer zwei (64 Patienten). Auch in diesem Fall konnte univariat eine schlechtere Prognose bezüglich Overall Survival und Progression bestätigt werden.
Insgesamt konnte ein Prinzip nachgewiesen werden: je höher die Signalanzahl der Kerne, desto schlechter die Prognose.

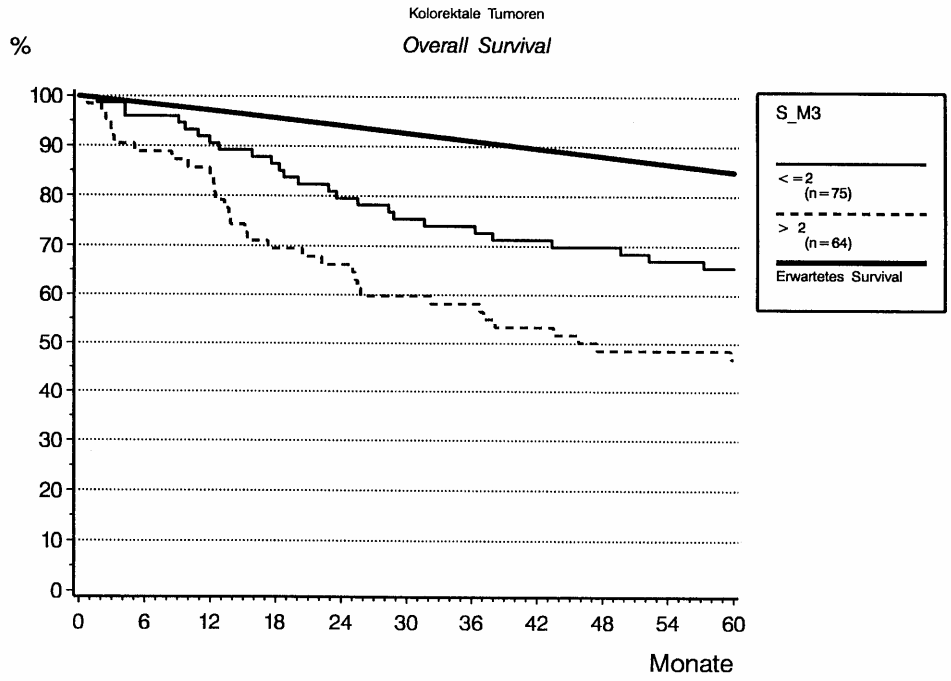


Abbildung 23: Overall Survival- Median 3 (p=0,0051)

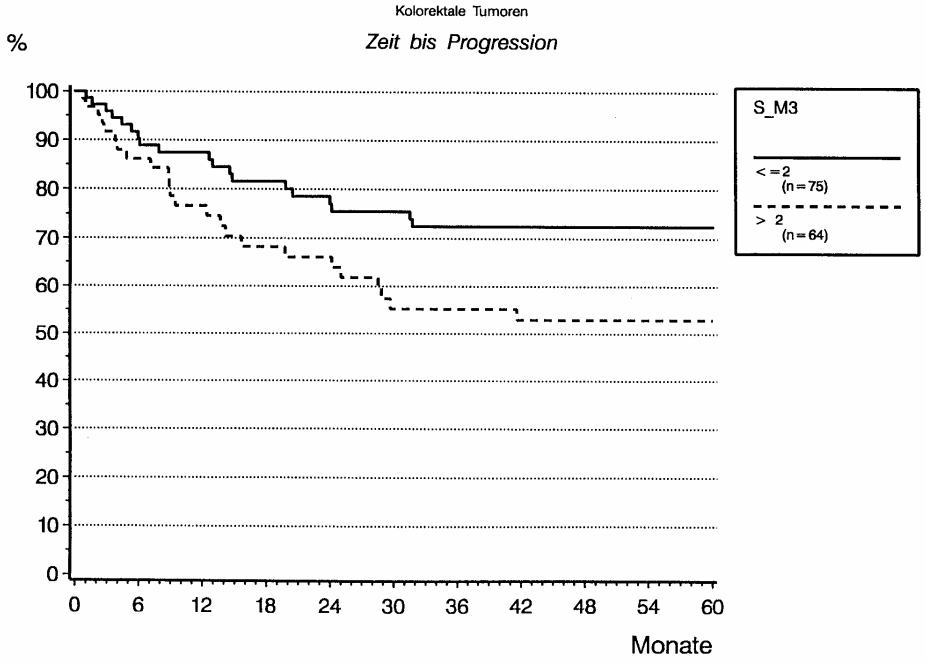


Abbildung 24: Zeit bis Progression- Median 3 (p=0,0172)

Auch mit dem Median 3-Grenzwert erwies sich der 20q13.2 Status in der multivariaten Analyse nicht als unabhängiger Parameter.

3.3.1.7 Zusammenfassung

In der folgenden Tabelle werden die uni- und multivariaten Analysedaten für die Grenzwerte noch einmal zusammengefasst, die sich in beiden Analysen als signifikant erwiesen. *Kursiv geschrieben stehen die Werte von 40%.* Die Fallzahlen sind in dieser Gruppe in etwa gleich groß: kleiner 40% waren 68 Patienten, während 78 Patienten in mehr als 40% der Tumorzellkerne mehr als zwei Signale hatten. Die univariate Survivalanalyse ergab ein p von 0,005, die multivariate Analyse lag mit einem p von 0,012 ebenfalls im signifikanten Bereich. Der Grenzwert bei 50% erwies sich nur in der univariaten Analyse als signifikant, nicht aber in der Multivarianzanalyse. Die 30-Prozent-Grenze war wie der Grenzwert ≥ 40% in beiden Analysen signifikant. Allerdings waren die Fallzahlen mit 61 zu 85 nicht so gleichmäßig verteilt wie bei 40%, und auch die p-Werte der Survivalanalysen waren geringfügig schlechter.

Prozentuale Grenzwerte >2 Signale pro Kern	**Fallzahlen**	**Survival (univariat) p-Wert**	**Survival (multivariat) p-Wert**
<20%:≥20%	48: 98	n.s.	0,0269
<30%:≥30%	61: 85	0,021	0,024
<40%:≥40%	*68: 78*	*0,005*	*0,012*
<50%:≥50%	78: 68	0,005	n.s.

Tabelle 25: Auswertungsparameter der FISH-Daten anhand der prozentualen Grenzwertfestlegung

In Tabelle 26 werden die Median Grenzwerte noch einmal zusammengefasst. Hier wird deutlich, dass sich diese Grenzwerte in der multivariaten Analyse nicht bewährten.

Mediane der FISH-Signale als Grenzwerte	**Fallzahlen**	**Survival (univariat) p-Wert**	**Survival (multivariat) p-Wert**
<=2: >2-4: >4	78: 21: 47	0,019	n.s.
<4: >=4	99: 47	0,033	n.s.
<=2: >2	78: 68	0,005	n.s.

Tabelle 26: Auswertungsparameter der FISH-Daten anhand der Mediane

Die vorliegenden Analysen zeigten den 20q13.2 Zugewinn als ungünstigen prognostischen Faktor. Dabei ergab sich für unterschiedliche willkürlich gesetzte Grenzwerte ein unterschiedliches Signifikanzniveau. In Anbetracht der Tatsache, dass keine Zentromersonde verwendet und somit kein relativer 20q13.2 Zugewinn ermittelt werden konnte, wurde für die folgenden Korrelationen mit konventionellen prognostischen Parametern der sehr

konservative Grenzwert von ≥ 40% der Zellkerne mit mehr als 2 Signalen gewählt, um die Anzahl der 20q13.2 Zugewinne nicht zu überschätzen.

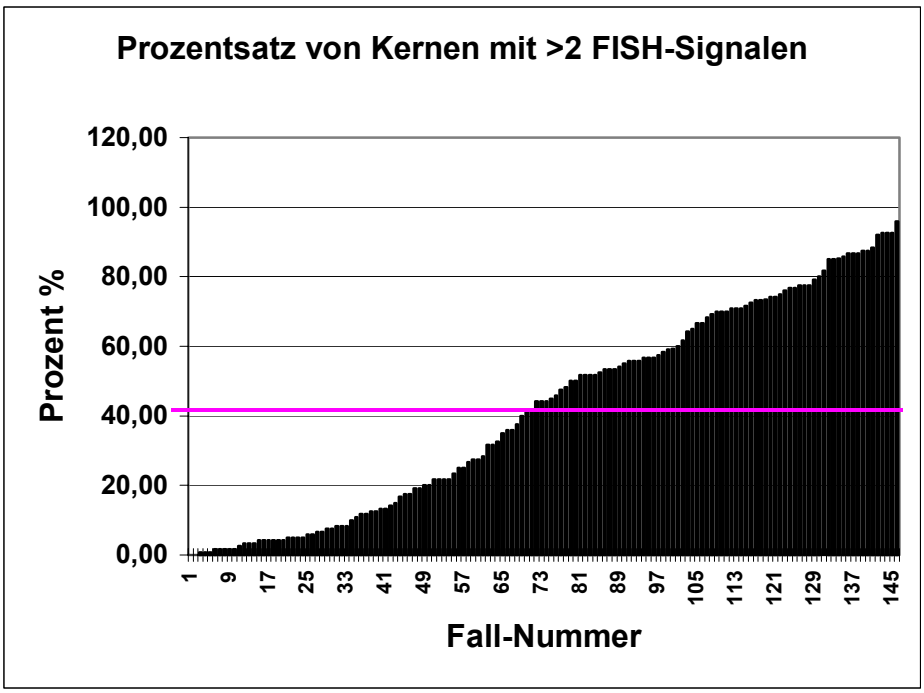


Abbildung 25: Grenzwertfestlegung bei 40%

In Abbildung 25 wurden die FISH-Ergebnisse aller Patienten der Größe nach sortiert und der Grenzwert von ≥ 40% mit einem Querstrich verdeutlicht.

	Kein 20q13.2 Zugewinn	20q12.2 Zugewinn	gesamt
lebt	42 (58%)	31 (42%)	73
verstorben	23 (35%)	43 (58%)	66
gesamt	65 (47%)	74 (53%)	139

Tabelle 27: Korrelation 20q13.2 Zugewinn und Survival-Status - p-Wert: 0,007 (Chi-Quadrat Test)

Anhand der follow up Studien konnte der postoperative Verlauf von 139 Patienten beobachtet werden. Von allen Verstorbenen hatten 58% den untersuchten Zugewinn. Hingegen verstarben in der Gruppe ohne den 20q13.2 Zugewinn nur 35%.

3.4 Korrelation zwischen 20q13-Zugewinn und konventionellen prognostischen Parametern

3.4.1 Grading und 20q13.2-Zugewinn

Je schlechter ein Tumor differenziert bzw. je höher das Grading ist, desto seltener haben die Patienten 20q13-Zugewinne. Hier herrscht also ein inverser Zusammenhang. Während 60% der G2-Tumoren einen 20q13.2-Zugewinn aufweisen, ist dieser in lediglich 29% der G3-Tumoren nachweisbar.

Grading/ S2>40%	kein 20q13.2-Zugewinn	20q13.2-Zugewinn	Summe
G 2	18/ 40%	27/ 60%	45/ *30,8%*
G2-3	33/ 42,9%	44/ 57,1%	77/ *52,7%*
G 3	17/ 70,8%	7/ 29,2%	24/ *16,4%*
Summe	68/ *46,6%*	78/ *53,4%*	146/ *100%*

Tabelle 28: Histologischer Differenzierungsgrad und 20q13.2-Zugewinn (p=0,007; Chi-QuadratTest)

3.4.2 Alter und 20q13.2-Zugewinn

In Tabelle 29 kann man sehen, dass mit steigendem Alter auch die 20q13.2-Zugewinne zunehmen. Jüngere Patienten haben seltener amplifizierte Tumore, als die Älteren. Im Alter steigt also das Risiko, die genetische Aberration 20q13 im Tumor zu tragen.

Alter/Zugewinn	kein 20q13.2-Zugewinn	20q13.2-Zugewinn	Summe
< 60 J.	35/ 58,3%	25/ 41,7%	60/ *41,1%*
>= 60 J	33/ 38,4%	53/ 61,6%	86/ *58,9%*
Summe	68/ *46,6%*	78/ *53,4%*	146/ *100%*

Tabelle 29: 20q13.2-Zugewinn in Abhängigkeit vom Alter (p=0,032)

3.4.3 Tumortyp und 20q13.2-Zugewinn

Ein weiterer Aspekt ist die Korrelation zwischen dem histologischen Typ und der Amplifikation. Es konnte gezeigt werden, dass von elf muzinösen Karzinomen nur zwei 20q13.2 Zugewinne aufwiesen.

	Kein 20q13.2-Zugewinn	**20q12.2-Zugewinn**	**gesamt**
nicht muzinös	59 (44%)	76 (56%)	135
muzinös	9 (82%)	2 (18%)	11
gesamt	68 (47%)	78 (53%)	146

Tabelle 30: Korrelation zwischen 20q13.2-Zugewinn und histologischem Typ (p=0,025; Chi-QuadratTest)

Der 20q13.2 Zugewinn korrelierte **nicht signifikant** mit dem Geschlecht, der Tumorinfiltrationstiefe, dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen und dem Vorliegen von Fernmetastasen.

3.5 Methodenvergleich CGH und FISH

Innerhalb der Arbeitsgruppe wurden zeitgleich zehn Tumorblöcke der 146 Patienten mit der Comparativen Genomischen Hybridisierung (CGH) auf Zugewinne oder Verluste hinsichtlich des Chromosoms 20 untersucht. Diese Untersuchung erfolgte ohne Wissen über den 20q13.2-Status der Fälle. Es ergab sich eine 100%ige Übereinstimmung der beiden Methoden.

Pat.Nr.	CGH	FISH (% der Kerne mit mehr als 2 Signalen)
5	20q+	73,3%
6	20q+	55%
7	keine Aberration auf 20q	kein Zugewinn (19,2%)
8	keine Aberration auf 20q	kein Zugewinn (5%)
17	20q+	45%
28	+20	87%
31	20q+	84,2%
41	20p12-20qter+	68,3%
58	+20	93%
84	20q+	75%

Tabelle 31: Vergleich CGH und FISH bei einem Teilkollektiv von 10 Tumoren

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Häufigkeit und die Bedeutung des 20q13-Zugewinns im kolorektalen Karzinom mit klinisch-pathologischen Parametern zu untersuchen, sowie die prognostische Bedeutung dieses Zugewinns zu prüfen.

4.1 Repräsentativität des Kollektivs

Voraussetzung für die Testung eines prognostischen Markers ist es, ihn an einem repräsentativen Patienten- bzw. Tumorkollektiv zu testen; deshalb wurde das untersuchte Material mit anderen Kollektiven verglichen und auf Stimmigkeit hinsichtlich traditioneller Prognosefaktoren überprüft.

Das untersuchte Patientenkollektiv wies große Ähnlichkeiten mit Kollektiven früherer Studien auf, wie die vergleichende Tabelle in Kapitel 3.1 zwischen den Daten von Engel *et al* (1997) und dem vorliegenden Kollektiv belegen. Die leichten Differenzen bei der Tumorinfiltrationstiefe (pT-Stadium) und dem Grading lassen sich am ehesten durch die unterschiedlichen Fallzahlen erklären.

Die prognostischen Daten von Engel sind vergleichbar mit denen des vorliegenden Kollektivs, die Kontingenztafeln zeigten erwartete Signifikanzen bei traditionellen prognostischen Parametern wie Tumorinfiltrationstiefe, Lymphknotenbefall, Fernmetastasen und Tumordifferenzierung.

Die uni- und multivariate Überlebensanalyse des Kollektivs bestätigt bekannte klinische Korrelationen: je tiefer ein Tumor infiltriert ist, desto häufiger sind Lymphknoten erkrankt und desto häufiger existieren Fernmetastasen. All diese Faktoren sind signifikant korreliert mit schnellerer Erkrankungsprogression und einer niedrigeren Lebenserwartung.

Insgesamt kann man bei den hier untersuchten 146 Patienten von einem repräsentativen Kollektiv sprechen.

4.2 Methodenkritische Diskussion

Die Arbeit bediente sich der Fluoreszenz in-situ Hybridisierung zur Bestimmung des 20q13.2-Zugewinns. Pro Tumor wurden dabei die Signale in 120 Kernen ausgewertet.

In der Literatur liegen bislang keine validen Grenzwerte für Zugewinne oder Verluste bei FISH-Untersuchungen vor. Die Wahl eines bestimmten Grenzwertes ist somit willkürlich.

In dieser Arbeit wurden deshalb verschiedene Auswerte-Algorithmen getestet, die in der retrospektiven Studie einen Anhalt für die klinische Verwendbarkeit eines 20q13.2-Markers liefern sollten. Die klinische Verlaufsbeobachtung ermöglichte es, verschiedene Grenzwerte auf ihre Aussagekraft hin zu überprüfen.

Bei der Grenzwertfestlegung mittels Prozentsatzes der Kerne mit > 2 Signalen zeigte sich, dass Patienten mit Tumoren, deren Kerne in mehr als 20, 30, 40 oder 50% > 2 Signale

aufwiesen, in der univariaten Überlebensanalyse eine signifikant schlechtere Prognose hatten (Tabelle 27 Zugewinn und Überleben), in der multivariaten Analyse zeigten lediglich die Grenzwerte von 30% bzw. 40% eine statistische Signifikanz (p=0,02 bzw. 0,012).

Bei Überprüfung verschiedener Mediane als Grenzwerte zeigte sich bei allen getesteten Grenzwerten in univariaten Analysen eine signifikante Korrelation des 20q13.2-Zugewinns mit kürzerem Overall- und rezidivfreiem Überleben. Die Mediane waren zwar weniger störanfällig gegenüber „Ausreissern" als die Mittelwerte, aber bei der multivariaten Überlebensanalyse erwiesen sie sich als nicht signifikant.

Es zeigte sich also über ein weites Spektrum von Grenzwerten eine statistisch signifikante negative Korrelation zwischen 20q13.2-Zugewinn und Überleben, was die potenzielle Relevanz von 20q13.2 als prognostischen Marker unterstreicht.

Die Grenzwertfestlegung für diese Studie erfolgte bei „≥ 40% der Kerne > 2 Signalen" auf Grund folgender Überlegungen: da in dieser Studie keine Chromosom-20-Zentromersonde verwendet wurde und damit kein relativer Zugewinn errechnet werden, beziehungsweise keine Aussage über die Ploidie der Tumorzellkerne gemacht werden konnte, erschien es sinnvoll, den Grenzwert hoch anzusetzen, um eine Überinterpretation der Daten zu vermeiden.

Die Resektionsränder, die als negative Kontrolle dienten, zeigten in vier Fällen keinen einzigen Kern mit mehr als 2 Signalen und ein Resektionsrand einen Prozentsatz von 0,8. Der gewählte Grenzwert liegt somit weit mehr als zwei Standardabweichungen über diesen Werten. Auf diese Weise wird der Zugewinn von 20q13.2 in dieser Studie methodisch sicher nicht überschätzt.

Dieser für das kolorektale Karzinom festgelegte Grenzwert muß in prospektiven Studien seine Validität unter Beweis stellen. Bei Karzinomen anderer Lokalisation und Histologie ist es möglicherweise nötig, diesen Wert nach völlig anderen Kriterien zu bestimmen und festzulegen.

Da in dieser Arbeit keine Chromosom-20-Zentromersonde verwendet wurde, konnte nur ein „absoluter", kein „relativer" 20q13-Zugewinn bestimmt werden. Dieser „absolute" Zugewinn könnte allein auf einem aneuploiden Chromosomensatz beruhen.

Deshalb wurde ein Teilkollektiv mit Hilfe der Comparativen Genomischen Hybridisierung (CGH) untersucht und ein Vergleich der CGH- mit den FISH-Ergebnissen vorgenommen. Dabei stellte sich heraus, daß beide Methoden eine vollständige Übereinstimmung der Zugewinne aufwiesen. Fälle mit 20q13.2-Zugewinnen in der FISH zeigten einen relativen Zugewinn von 20q in der CGH, während Fälle ohne 20q13.2-Zugewinn auch keine 20q Aberrationen in der CGH aufwiesen. Aus diesen Ergebnissen läßt sich schließen, dass der Zugewinn der Region 20q13.2 nicht allein Ausdruck einer Polyploidie ist, sondern dass es sich hier um einen echten Zugewinn der Chromosomenregion 20q13.2 handelt und dass dort möglicherweise ein oder mehrere Onkogen(e) lokalisiert sind, die für das kolorektale Karzinom von Bedeutung sind (siehe Tabelle 31 in Kapitel 3.5).

4.3 Rolle des 20q13-Zugewinns in der kolorektalen Karzinogenese

Fünf Adenome wurden untersucht, wobei drei in nur 0,8%, eines in 16,7% und eines immerhin in 24,2% der Kerne mehr als zwei FISH-Signale aufwiesen. Das „zugehörige" Karzinom des letztgenannten Adenoms wies mit 76% einen 20q13.2-Zugewinn auf. Eines der Adenome ohne den Zugewinn zeigte in dem koinzidenten Karzinom in knapp 71% der Kerne mehr als 2 Signale. Dieses Ergebnis ist vereinbar mit einer CGH-Untersuchung an 9 Adenomen und 14 Karzinomen von Meijer *et al*, 1998. Dabei stellte sich unter anderem heraus, dass ein 20q13.2-Zugewinn vor allem in den Karzinomen gefunden werden konnte, seltener in den Adenomen. Auf Grund dieser Ergebnisse läßt sich schließen, dass der 20q13.2-Zugewinn erst relativ spät in der Karzinogenese auftritt.

Die 146 untersuchten Karzinome wiesen zu 53% einen 20q13.2-Zugewinn auf. Dieses Ergebnis bestätigt andere Untersuchungen an kolorektalen Karzinomen, die sich der FISH beziehungsweise der CGH als Methode bedienten (Aust *et al*, 2001; Korn *et al*, 1999). Die dort angegebenen Prozentsätze der Tumoren mit 20q13.2-Zugewinnen liegen allerdings etwas höher (67%), was möglicherweise an der unterschiedlichen Methodik und der konservativen Grenzwertfestlegung in unserer Studie liegt (vergleiche methodenkritische Diskussion).

Die statistischen Untersuchungen zeigten keine signifikanten Korrelationen zwischen Tumorstadium und dem Vorhandensein eines 20q13.2-Zugewinns. Man kann also nicht davon ausgehen, dass der Zugewinn bei tieferer Tumorinfiltration auftritt oder verlorengeht.

Allerdings zeigte sich eine Korrelation zwischen Tumorgrading und 20q13.2-Zugewinn. Gering differenzierte Tumoren wiesen seltener einen 20q13.2-Zugewinn auf als hochdifferenzierte. Möglicherweise ist dieser Zusammenhang mit den unterschiedlichen Phänotypen des kolorektalen Karzinoms zu erklären. Tumoren mit sogenanntem „Mutator-Phänotyp" sind häufig diploid und zeigen wenig chromosomale Aberrationen, sie weisen aber ebenfalls häufig eine schlechte histologische Differenzierung auf.

Alternativ könnte die Tumorzellpopulation mit 20q13.2-Zugewinn im Laufe der „Dedifferenzierung" verschwinden. Allerdings kann man bei einem operierten Tumor nicht sagen, ob dieser in einer früheren Phase seiner Entstehung besser differenziert, also seinem ursprünglichen Gewebe ähnlicher war.

Der histologische Tumortyp hatte offenbar ebenfalls Einfluß auf das Auftreten des 20q13.2-Zugewinns. 20q13.2-Zugewinne fanden sich in den nicht-muzinösen kolorektalen Karzinomen häufiger als in den muzinösen. Es konnte gezeigt werden, dass von 11 muzinösen Karzinomen nur zwei 20q13.2-Zugewinne aufwiesen (18%). Dies kann als Bestätigung dafür gewertet werden, dass muzinöse Karzinome möglicherweise häufiger dem pathogenetischen Modell des Mutator-Phänotyps folgen (Lynch und Smyrk, 1996), eher diploid sind und somit weniger chromosomale Aberrationen aufweisen als die nicht muzinösen Adenokarzinome.

Diese Karzinome entstehen durch einen Defekt der Missmatch-Repair-Gene (Lynch *et al*, 1993) und haben ein besseres Gesamtüberleben (Sankila *et al*, 1996) als die nicht muzinösen Tumoren. Im Gegensatz dazu zeigten die nicht-muzinösen Karzinome in dieser Arbeit zu 56% einen 20q13.2-Zugewinn, was bestätigt, dass diese Karzinome dem sogenannten „Tumorsuppressorphänotyp“ entsprechen, eher aneuploid sind und zahlreiche grobe chromosomale Aberrationen aufweisen. Sie entstehen sukzessive durch einen Ausfall von Tumorsupressorgenen (Sahm *et al*, 1995). Auch in diesem Punkt entsprechen die Ergebnisse dieser Arbeit bereits vorhandenem Wissen.

Eine Lymphknotenmetastase konnte in der vorliegenden Studie untersucht werden. Sie wies in nur 0,8% ihrer Kerne mehr als 2 Signale auf. Der Tumor hatte in 10% seiner Kerne den Zugewinn. Da der Primärtumor den 20q13.2-Zugewinn nicht in signifikanter Menge trägt, wäre es möglich, dass der Zugewinn von Anfang an nicht vorhanden war; es wäre aber auch denkbar, dass im Laufe der Erkrankung, beziehungsweise Metastasierung dieser Zugewinn verlorengeht. Korn *et al*, 1999 fanden heraus, dass Primärtumor und Metastase kolorektaler Karzinome ein ähnliches Muster von genetischen Aberrationen aufweisen, was mit dem vorliegenden Ergebnis vereinbar wäre. Es wurden dort allerdings 27 Lebermetastasen und 6 zugehörige Metastasen verarbeitet, was einen Vergleich mit der vorliegenden Arbeit schwierig macht.
Abschließend soll eine Grafik die molekulargenetischen Veränderungen beim kolorektalen Karzinom unter Einbeziehung der Daten dieser Studie erläutern: entsprechend den genetischen Aberrationen vom normalen Epithel über das Adenom bis hin zum Karzinom ergeben die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit, dass das nicht-neoplastische Epithel im Gegensatz zum invasiven Karzinom keinen 20q13.2-Zugewinn aufweist. Schematisch gezeichnet ist das Epithel und darunter der histopathologische Befund des entsprechenden Gewebes bei der 20q13-Fluoreszenz in-situ Hybridisierung. Die Zellkerne des normalen Epithels zeigen genau 2 Signale, wärend die Zellkerne eines invasiven Karzinoms in der Regel mehr als 2 Signale aufweisen.

Genetisches Modell der kolorektalen Karzinogenese

nach Fearon und Vogelstein (1990)

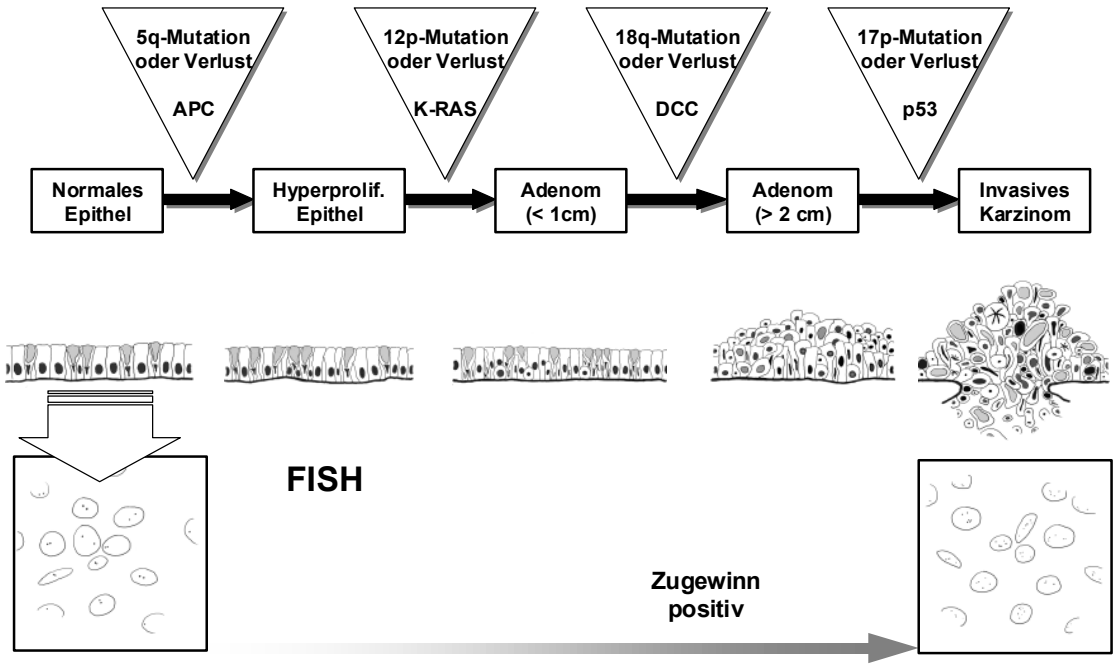


Abbildung 26: Erweitertes Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz

4.4 20q13.2 als prognostischer Marker

Wie bereits in der methodenkritischen Diskussion erwähnt, erwies sich der 20q13.2-Zugewinn in der univariaten Überlebensanalyse als negativer prognostischer Marker, der signifikant mit kürzerem Overall- und rezidivfreiem Überleben korreliert war. Die multivariaten Analysen zeigten darüber hinaus, dass das Vorhandensein eines 20q13.2-Zugewinns einen unabhängigen prognostisch ungünstigen Marker bezüglich des Überlebens darstellte.

Diese Ergebnisse decken sich mit Untersuchungen an anderen soliden Tumoren wie Ovarialkarzinomen (Diebold *et al*, 2000) und Mammakarzinomen (Tanner *et al,* 1996), die ebenfalls einen negativen Effekt des 20q13.2-Zugewinns auf das Patientenüberleben beobachtet haben.

Der Zugewinn von 20q13.2 ergänzt also auch beim kolorektalen Karzinom die bekannten und etablierten Prognosefaktoren wie pTNM-Stadium und Grading, zumindest in den Tumoren, die der Mehrschritt-Karzinogenese des „Tumorsuppressorphänotyps“ folgen. Mit Hilfe dieses Parameters könnten in Zukunft möglicherweise Subpopulationen von Patienten definiert werden, was zu einer Individualisierung der Prognoseabschätzung und der Tumortherapie beitragen kann.

4.5 Putative Onkogene auf 20q13

Die in dieser Region (20q13.2) lokalisierten putativen Onkogene sind zum Teil bekannt. Unklar ist allerdings, welche Gene innerhalb der Region für den Zugewinn verantwortlich sind, ob es überhaupt ein einzelnes Gen ist oder ob mehrere Gene beteiligt sind. Zum besseren Verständnis zeigt Tabelle 32 nochmals die diskutierten Gene.

GEN	ERLÄUTERUNG
NABC1	Funktion unbekannt
ZNF217	Transkriptionsfaktor
CAS	cellular apoptosis susceptility
STK15: Aurora 2 BTAK	Chromosomen-Segregation genomische Instabilität
PTPN1	Phosphotyrosin Phosphatase

Tabelle 32: Gene im Bereich der Region 20q13

Bisherige Untersuchungen ergaben folgendes: Brinkmann *et al*, 1996 wiesen nach, dass das CAS-Gen beim Mamma- und beim Kolonkarzinom amplifiziert ist. Dabei hat das CAS-Gen zwei Funktionen: zum einen die der Apoptose, zum anderen die der Zellproliferation. Bei Störung der Apoptose ist vorstellbar, dass eine gleichbleibende Proliferation zur Tumorentwicklung führt.

Außerdem weiß man von einer Korrelation zwischen 20q13.2-Zugewinn und der Invasivität beim Mammakarzinom (Tanner *et al,* 1995).

Die Gene ZNF217 und NABC1 sind beim Mammakarzinom überexprimiert. Dabei wurde ZNF217 als Transkriptionsfaktor mit einer DNA-bindenen Domäne und einer transkriptionsaktivierenden Domäne identifiziert (Collins *et al*, 1998). Für die vorliegende Arbeit ist die nähere Betrachtung von STK15, beziehungsweise BTAK, dazu eine putative Serin/Threonin-Kinase kodiert, und Aurora 2, ebenfalls eine Kinase, von der onkogene Potenz bekannt ist, interessant (Sen *et al*, 1997; Bischoff *et al*, 1998). Beide Gene sind für eine regelrechte Chromosomensegregation zuständig. Wenn die Chromosomensegregation nicht mehr einwandfrei funktioniert, kommt es zu einer Akkumulation der in der Mitose nicht auseinandergewichenen Chromosomen, das heißt Entstehung von Aneuploidie. BTAK spielt möglicherweise eine Rolle bei onkogener Transformation in Brustkrebszellen (Sen *et al*, 1997). 1998 stellte dieselbe Arbeitsgruppe die Hypothese auf, dass STK15 bei Überexpression zu einer Zentrosomenamplifikation, zu chromosomaler Instabilität und Transformation in Säugerzellen führt (Zhou *et al,* 1998). Eine weitere Untersuchung der Aurora 2-Kinase beim kolorektalen Karzinom (Bischoff *et al*, 1998), führte zu dem Schluß, das Aurora 2-Kinase-Gen könne das entscheidende Korrelat des 20q13.2-Zugewinns sein. In über 50% der untersuchten kolorektalen Karzinome war die entsprechende DNA zugewonnen und die RNA überexprimiert. Außerdem war das Enzym verantwortlich für Fibroblastentransformation, womit die potentielle Onkogenität der Aurora 2-Kinase bestätigt werden konnte.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der prognostischen Relevanz der chromosomalen Region 20q13.2 in der Karzinogenese des kolorektalen Karzinoms. Die Chromosomenregion 20q13 beherbergt mehrere putative Onkogene (CAS, NABC1, Aurora 2, etc.), denen eine wichtige Rolle in der Karzinogenese solider Tumoren zugesprochen wird.
In dieser Studie wurde der 20q13-Zugewinn mittels einer Fluoreszenz in-situ Hybridisierung an 146 kolorektalen Karzinomen untersucht und die Daten mit dem klinischen Verlauf der Erkrankung korreliert. Ziel der Arbeit war es, die Häufigkeit des 20q13.2-Zugewinns anhand uni- und multivariater Überlebensanalysen zu überprüfen. Außerdem sollte in dieser Arbeit die Grenzwertbestimmung bei FISH-Untersuchungen mit Hilfe des Beispiels „20q13.2-Zugewinn“ diskutiert werden.

1. Ein Zugewinn von 20q13.2 wurde mittels Fluoreszenz in-situ Hybridisierung bei festgelegtem Grenzwert von „≥ 40% der Kerne mit > 2 Signalen“ in mehr als der Hälfte (53%) der untersuchten kolorektalen Karzinome festgestellt. Dieser Prozentsatz ist etwas geringer als in den zitierten CGH-Studien, was möglicherweise an der konservativen Grenzwertfestlegung liegt.
2. Beim festgelegten Grenzwert korrelierte der 20q13.2-Zugewinn weder mit dem Geschlecht der Patienten noch mit dem TNM/pTNM-Stadium der jeweiligen Tumoren. Allerdings konnte eine inverse Korrelation zwischen 20q13.2-Zugewinn und histologischem Differenzierungsgrad gezeigt werden: je schlechter die Tumordifferenzierung, desto weniger häufig waren 20q13-Zugewinne. Zudem zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit von 20q13.2-Zugewinnen zwischen muzinösen und nicht-muzinösen Tumoren: muzinöse wiesen lediglich zu 18%, nicht-muzinöse zu 56% 20q13.2-Zugewinne auf. Darüberhinaus waren 20q13.2-Zugewinne in den Tumoren älterer Patienten signifikant häufiger als in den Tumoren jüngerer Patienten.
3. Diese Studie zeigte in uni- und multivariaten Survival-Analysen (p=0,005 bzw. p=0,012), dass der 20q13.2-Zugewinn beim festgelegten Grenzwert signifikant mit einem kürzeren Overall- und rezidivfreiem Überleben korrelierte, also einen negativen prognostischen Marker darstellt.
4. Die Grenzwertfestlegung für die FISH-Untersuchung erfolgte deduktiv. Die Untersuchung zeigt anhand der Korrelationen mit den Überlebensparametern, dass die prognostische Relevanz des 20q13.2-Zugewinns im kolorektalen Karzinom über ein weites Spektrum möglicher Grenzwerte erhalten bleibt. Allerdings muß der hier verwendete Grenzwert in prospektiven Studien validiert werden.

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass der 20q13.2-Zugewinn im kolorektalen Karzinom einen unabhängigen prognostischen Marker darstellt und die bekannten und etablierten Prognosefaktoren wie TNM/pTNM-Stadium und Grading ergänzt. Mit Hilfe dieses Parameters können in Zukunft eventuell Subpopulationen von Patienten definiert werden, was möglicherweise zu einer Individualisierung der Prognoseabschätzung und der Tumortherapie beitragen kann.

6 Literaturverzeichnis

1. Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, Jarvinen H, Powell SM, Hamilton SR (1993) Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science 260: 812-816*

2. Adami HO, Meirik O, Gustavsson S, Nyren O, Krusemo UB (1983) Colorectal cancer after cholecystectomy: absence of risk increase within 11-14 years. *Gastroenterology 85: 859-865*

3. Aust D, Baretton G, Waldman F, Löhrs U (1999) Molecular carcinogenesis in ulcerative colitis-associated and sporadic colorectal carcinomas - differences and similarities *Verh Dtsch Ges Pathol 83: 130-138*

4. Aust D, Terdiman J, Willenbucher R, Chew K, Ferrell L, Molinaro-Clark A, Löhrs U, Baretton G, Waldman F (2001) Altered distribution of ß-Catenin and its binding proteins E-Cadherin and APC in ulcerative colitis-related colorectal cancers *Mod Pathol 14: 29-39*

5. Baretton GB, Vogt M, Diebold J, Müller C, Schneiderbanger K, Schmidt M, Löhrs U (1996) Prognostic significance of p53 expression, chromosome 17 copy number and DNA ploidy in non.metastasized colorectal carcinomas (stages IB and II) *Scand J Gastroenterol 31: 481-489*

6. Becker KF, Atkinson MJ, Reich U, Becker I, Nekarda H, Siewert JR, Hofler H (1994) E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas. *Cancer Res 54: 3845-3852*

7. Benhattar J, Losi L, Chaubert P, Givel JC, Costa J (1993) Prognostic significance of K-ras mutations in colorectal carcinomas. *Gastroenterology 104: 1044-1048*

8. Bischoff JR, Anderson L, Zhu Y, Mossie K, Ng L, Souza B, Schryver B, Flanagan P, Clairvoyant F, Ginther C, Chan CS, Novotny M, Slamon DJ, Plowman GD (1998) A homologue of Drosophila aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *Embo J 17: 3052-3065*

9. Bishop J, Varmus H (1984) Functions and origins of retroviral transforming genes. Molecular biology of tumor viruses.
Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbour 1984

10. Böcker W, Denk H, Heitz PU (1997) Pathologie.
Urban und Schwarzenberg, 1. Auflage, München, Wien, Baltimore pp 645-647

11. Brach M, Sott C, Belka C, Herrmann F (1995) Molekulare Grundlagen der Tumorentstehung.
Dtsch Med Wschr 120: 73-79

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

13. Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, Kane M, Earabino C, Lipford J, Lindblom A et al (1994) Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer.
Nature 368: 258-261

14. Bronner MP, Culin C, Reed JC, Furth EE (1995) The bcl-2 proto-oncogene and the gastrointestinal epithelial tumor progression model.
Am J Pathol 46: 20-26

15. Bubb VJ, Curtis LJ, Cunningham C, Dunlop MG, Carothers AD, Morris RG, White S, Bird CC, Wyllie AH (1996) Microsatellite instability and the role of hMSH2 in sporadic colorectal cancer.
Oncogen 12: 2641-2649

16. Campo E, Miquel R, Jares P, Bosch F, Juan M, Leone A, Vives J, Cardesa A, Yague J (1994) Prognostic significance of loss of heterozygotisity of Nm-23 H1 and p53 genes in human colorectal carcinomas.
Cancer 73: 2913-2921

17. Collins C, Rommens JM, Kowbel D, Godfrey T, Tanner M, Hwang S-I, Polikoff D, Nonet G, Cochran J, Myambo K, Jay KE, Froula J, Cloutier T, Kuo W-L, Yaswen P, Dairkee S, Giovanola J, Hutchinson GB, Isola J, Kallioniemi O-P, Palazzolo M, Martin C, Ericson C Pinkel D, Gray JW, and et al (1998) Positional cloning of ZNF217 and NABC1: genes amplified at 20q13.2 and overexpressed in breast carcinoma.
Proc Natl Acad Sci.USA 95: 8703-8708

18. Diebold J, Mösinger K, Peiro G, Pannekamp U, Kaltz C, Baretton GB, Meier W, Löhrs U (2000) 20q13 and cyclin D1 in ovarian carcinomas. Analysis by fluorescence in situ hybridisation.
J Pathol 190: 564-571

19. Ebert M, Rost H, Malfertheimer P (1998) Molekulargenetik des Kolonkarzinoms: Aktuelle Aspekte und klinische Bedeutung.
Leber, Magen, Darm 28: 55-62

20. Engel J, Hölzel D, Reimer B (1997) Epidemiologie gastrointestinaler Karzinome: Gastrointestinale Tumoren. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge.
Tumorzentrum München (1997)

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

22. Garland CF, Comstock GW, Garland FC, Helsing KJ, Shaw EK, Gorham ED (1989) Serum 25- Hydroxyvitamin D and colon cancer: eight year prospective study.
Lancet 18: 1176-1178

23. Gorbach SL, Goldin BR (1990) The intestinal microflora and the colon cancer connection.
Rev Infect Dis 12: 252-261

24. Greenstein A, Sachar D (1989) Inflammatory bowel disease and colorectal cancer.
In: Seitz HK, Simanowsky UA, Wright NA (eds) Colorectal cancer from pathogenesis to prevention.
Springer; Berlin , Heidelberg, New York, Tokyo pp 61-72

25. Guilford P, Hopkins J, Harraway J, McLeod M, McLeod N, Harawira P, Taite H, Scoular R, Miller A, Reeve AE (1998) E-Cadherin germline mutations in familial gastric cancer.
Nature 392: 402-405

26. Hahn S, Kern SE, Schmiegel W (1995) Molekularbiologische Veränderungen bei gastrointestinalen Tumoren.
Dt. Ärzteblatt 92: 211-217

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

28. Heiss MM, Babic R, Allgayer H, Grützner KU, Jauch KW, Löhrs U, Schildberg FW (1995) Tumor associated proteolysis and prognosis: New functional risk factors in gastric cancer defined by the urokinase-type plasminogen activator system.
J Klin Oncol 13: 2084-2093

29. Herrera L, Kakati S, Gibas L, Pietrzak E, Sandberg AA (1985) Gardner syndrome in a man with an intestinal deletion of 5q.
Am J Med Genet 25: 473-476

30. Hulsken J, Behrens J, Birchmeier W (1994) Tumor-suppressor gene products in cell contacts: the cadherin-APC-armadillo connection.
Curr Opin Cell Biol 6: 711-716

31. Jass J (1998) Diagnosis of hereditary non-polyposis colorectal cancer – Review
Histopathology 32: 491-497

32. Kim H, Jen J, Vogelstein B, Hamilton SR (1994) Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA-replication errors in microsatellite sequences.
Am J Pathol 145: 148-156

33. Kinzler K, Nilbert MC, Su LK, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, Smith KJ, Preisinger AC, Hedge P, McKechnie D, et al. (1991) Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21.
Science 253: 661-665

34. Knuutila S, Bjorkqvist A-M, Autio K, Tarkkanen M, Wolf M, Monni O, Szymanska J, Larramendy ML, Tapper J, Pere H, El-Rifai W, Hemmer S, Wasenius VM, Vidgren V, Zhu Y (1998) DNA copy number amplifications in human neoplasms: review of comparative genomic hybridisation studies.
Am J Pathol 152: 1107-1123

35. Korn WM, Yasutake T, Kuo WL, Warren RS, Collins C, Tomita M, Gray J, Waldman FM (1999) Chromosome 20q gains and other genomic alterations in colorectal cancer metastatic to liver as analyzed by comparative genomic hybridisation and fluorescence in situ hybridisation.
Genes Chromosomes Cancer 25: 82-90

36. Liu B, Parsons R, Papadopoulos N, Nicolaides NC, Lynch HT, Watson P, Jass JR, Dunlop M, Wyllie A, Petomäki P, de la Chapelle A, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW (1996) Analysis of mismatch repair genes in hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients.
Nat Med 2: 169-174

37. Lowenfels A, Anderson M (1987) Diet and cancer
Cancer 3: 1809-1814

38. Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, Lanspa SJ, Lynch JF, Lynch PM, Cavalieri RJ, Boland CR (1993) Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an update review.
Gastroenterology 104: 1535-1549

39. Lynch H, Smyrk T (1996) Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch - syndrome).
Cancer 78: 1149-1167

40. Mao L, Lee DJ, Trockman MS, Erozan YS, Askin F, Sidransky D (1994) Microsatellite alterations as clonal markers of detection of human cancer.
Proc Natl Acad Sci USA 91: 9871-9875

41. Mayer B, Jauch KW, Gunthert U, Figdor CG, Schildberg FW, Funke I, Johnson JP (1993) De-novo expression of CD 44 and survival in gastric cancer.
Lancet 342: 1019-1022

42. Mayer R, Lohrmann H (1991) Karzinome der Gastrointestinaltraktes Gesamtdarstellung und Atlas für Studium, Lehre und Praxis.
Onkologie VIII 1-25

43. Meijer GA, Hermsen MA, Baak JP, van Diest PJ, Meuwissen SG, Belien JA, Hoovers JM, Joenje H, Snijders PJ, Walboomers JM (1998) Progression from colorectal adenoma to carcinoma is associated with non random chromosomal gains as detected by comparative genomic hybridisation.
J Clin Pathol 51: 901-909

44. Miller AB, Berrino F, Hill M, Jensen OM, Riboli E, Wahrendorf J, (1989) Summary: Synthesis and future directions. In: Miller AB (ed)
Diet and the aetiology of cancer. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp 71-73

45. Miysaka M (1995) Cancer metastasis and adhesion molecules
Clin Orthop 312: 10-18

46. Mulcahy HE, Duffy MJ, Gibbons D, McCarthy P, Parfrey NA, O`Donnoghue DP, Sheahan K (1994) Urokinase-type plasminogen activator and outcome in Dukes‘ B colorectal cancer
Lancet 344: 583-584

47. Muto T, Bussey H, Morson B (1985) The evolution of cancer of colon and rectum
Cancer 36: 2251-2279

48. Nomura A (1990) An international search for causative factors of colorectal cancer.
J Natl Cancer Inst 82: 894-895

49. Petersen GM (1994), Knowledge of the adenomatous polyposis coli gene and its clinical application.
Ann Med 26: 205-208

50. Risinger JL, Berchuch A, Kohler MF, Watson P, Lynch HT, Boyd J (1993) Genetic instability of microsatellites in endometrial carcinoma.
Cancer Res 53: 5100-5103

51. Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, Henson DE, Jass JR, Khan PM, Lynch H, Perucho M, Smyrk T, Sobin. L, Srivastava S (1997) A National Cancer Institute workshop on hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: meeting highlights and Bethesda-guidelines.
J Natl Cancer Inst 89: 1758-1762

52. Rustgi AK (1994), Hereditary gastrointestinal polyposis and nonpolyposis syndromes
N Engl J Med 331: 1694-1702

53. Sahm S, Zenzen S, Caspary W (1995) Das hereditäre nicht polypöse Kolonkarzinom.
Dtsch Med Wschr 120: 1631-1635

54. Sankila R, Aaltonen LA, Järvinen HJ, Mecklin JP (1996) Better survival rates in patients with MLH 1- associated hereditary colorectal cancer.
Gastroenterology 110: 682-687

55. Sauter G, Deng G, Moch H, Kerschmann R, Matsumura K, DeVries S, George T, Fuentes J, Carroll P, Mihatsch MJ, Waldman F (1994) Physikal deletion of the p53 gene in bladder cancer: Detection by fluorescence in situ hybridisation.
Am J Pathol 144: 756-766

56. Sauter G, Moch H, Gasser TC, Mihatsch MJ, Waldman FM (1995 a) Heterogeneity of chromosome 17 and erbB-2 gene copy number in primary and metastatic bladder cancer.
Cytometry 21: 40-46

57. Sauter G, Carroll P, Moch H, Kllioniemi A, Kerschmann R, Narayan P, Mihatsch MJ, Waldmann FM (1995 b) c-myc copy number gains in bladder cancer detected by fluorescence in situ hybridisation.
Am J Pathol 146: 1131-1139

58. Sauter G, Feichter G, Torhorst J, Moch H, Novotny H, Wagner U, Dürmüller U, Waldman FM (1996) Fluorescence in situ hybridization to detect erbB-2 amplification in breast tumor fine needle aspiration biopsies.
Acta Cytologica 40: 164-173

59. Schmiegel W (1991) Onkogene und Tumorsuppressorgene: genetische Veränderungen markieren die Adenom-Karzinom Sequenz.
Internist 32: 315-329

60. Schmutte C, Marinescu RC, Copeland NG, Jenkins NA, Overhauser J, Fishel R (1998) Refined chromosomal localisation of the mismatch repair and hereditary nonpolyposis colorectal cancer genes hMSH2 and hMSH6
Cancer Res 58: 5023-5026

61. Seitz HK, Simanowsky UA (1989) Ethanol and colorectal carcinogenesis.
In: Seitz HK, Simanowsky UA, Wright NA (eds) Colorectal cancer. From pathogenesis to prevention.
Springer; Heidelberg, Berlin, New York, Tokyo pp 177-189

62. Sen S, Zhou H, White RA (1997) A putative serine/threonine kinase encoding gene BTAK on chromosome 20q13 is amplified and overexpressed in human breast cancer cell lines.
Oncogene 14: 2195-2200

63. Sheldon CA, Mc Kinley CR, Hartig PR, Gonzalez R (1983) Carcinoma at the site of ureterosigmoidostomy.
Dis Colon Rectum 26: 55-58

64. Shih C, Shilo BZ, Goldfarb MP, Dannenberg A, Weinberg RA (1979) Passages of phenotypes of chemically transformed cells via transfection of DNA and chromatin.
Proc Natl Acad Sci USA 76: 5714-5718

65. Sobin L, Greene F (2001) TNM-Classifikation- Clarification of number of regional lymphnodes for pN0
Cancer suppl 91: 1589-1592

66. Sorensen AW, Slattery ML, Ford MH (1988) Calcium and colon cancer: a review
Nutr Cancer 11:135-145

67. Southgate D, Englyst H (1985) Dietary fible: chemistry, physical properties and analysis.
In: Trowell H, Burkitt D, Heaton K (eds), Dietary fible, fibre depleted foods and disease.
Academic Press, London, pp. 31-55

68. Tanner MM, Tirkkonen M, Kallioniemi A, Holli K, Collins C, Kowbel D, Gray JW, Kallioniemi OP, Isola J (1995) Amplification of chromosomal region 20q13 invasive breast cancer: Prognostic implications.
Clin Cancer Res 1: 1455-1461

69. Tanner MM, Tirkkonen M, Kallioniemi A, Isola J, Kuukasjärvi T, Collins C, Kowbel D, Guan XY, Trent J, Gray JW, Meltzer P, Kallioniemi OP (1996) Independent amplification and frequent co-amplification of three nonsyntenic regions on the long arm of chromosome 20 in human breast cancer.
Cancer Res 56: 3441-3445

70. Tarkkanen M, Elomaa I, Blomqvist C, Kivioja AH, Kellokumpu-Lehtinen P, Bohling T, Valle J, Knuutila S (1999) DNA copy number increase at 8q: a potential new prognostic marker in high-grade osteosarcoma.
Int J Cancer 20: 114-121

71. Toyooka M, Konishi M, Kikuchi Y, Yanoshita R, Iwama T (1995) Somatic mutations of the adenomatous polyposis coli gene in gastroduodenal tumors from patients with familial adenomatous polyposis.
Cancer Res 55: 3165-3170

72. Tumorzentrum München (1993) Gastrointestinale Tumoren
Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge.

73. Tumorzentrum München (1997) Gastrointestinale Tumoren
Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge.

74. UICC, International Union Against Cancer (1993). TNM-Klassifikation maligner Tumore.
Springer, New York, Berlin, Heidelberg 1993; pp. 87-95

75. UICC, International Union Against Cancer (1997) TNM-Classification of Malignant Tumors.
Springer, New York, Berlin, Heidelberg 1997; pp. 66-69

76. Vasen HF, Mecklin JP, Lynch HT (1991) The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC).
Dis Colon Rectum 34: 424-425

77. Wahrendorf J (1989) Dietry fat, dietry cholesterol and obesitas risk faktors for colorectal cancer, kidney cancer and other tumors. In:Miller AB (ed) Diet and aetiology of cancer.
Springer; Berlin, New York, Heidelberg 1989; pp 13-19

78. WHO (1989) Jass J, Sobin L (eds) Histological typing of intestinal tumors.
Springer, Berlin, Heidelberg 1989

79. Wynder E, Reddy B, Weisburger J (1986) Ernährungsfaktoren in der Kolonkrebs Epidemiologie. Kampf dem Krebs.
HRSG von der Arbeitsgemeinschaft für Krebsbekämpfung der Träger der gesetzlichen Renten- und Krankenversicherung im Lande NRW, Bochum: 23:9

80. Zhou H, Kuang J, Zhong L, Kuo WL, Gray JW, Sahin A, Brinkley BR, Sen S (1998) Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation.
Nat Genet 20: 189-193

7 Abbildungsverzeichnis

1. Tumorbedingte Sterbefälle nach Tumorlokalisation
2. Inzidenz und Altersverteilung der kolorektalen Karzinome (Tumorzentrum München; 1997)
3. Molekulargenetische Veränderungen beim Kolonkarzinom
4. Schematische Darstellung des E-Cadherin-Catenin-APC-Komplexes
5. Chromosom 20
6. Tumorstadien (UICC 1993 und 1997, Sobin und Greene, 2001) und Tumorgrading
7. Overall Survival in Abhängigkeit von der Infiltrationstiefe (p<0,0001)
8. Zeit bis Progression in Abhängigkeit von der Infiltrationstiefe (p=0,0269)
9. Overall Survival in Abhängigkeit vom Lymphknotenbefall (p<0,0001)
10. Zeit bis Progression in Abhängigkeit vom Lymphknotenbefall (p<0,0001)
11. Overall Survival in Abhängigkeit von Fernmetastasen (p<0,0001)
12. FISH-Signale an einzelnen Zellkernen
13. Weitere FISH-Signale an einzelnen Zellkernen
14. Overall Survival Signale>2 Grenzwert ≥ 30% (p=0,0214)
15. Overall Survival- Signale>2 Grenzwert ≥ 40% (p=0,0059)
16. Zeit bis Progression- Signale>2 Grenzwert ≥ 40% (p=0,0301)
17. Overall Survival- Signale>2 Grenzwert ≥ 50% (p=0,0051)
18. Zeit bis Progression- Signale>2 Grenzwert ≥ 50% (p=0,0172)
19. Overall Survival- Median 1 (p=0,0196)
20. Zeit bis Progression- Median 1 (p=0,0343)
21. Overall Survival- Median 2 (p=0,0335)
22. Zeit bis Progression- Median 2 (p=0,0135)
23. Overall Survival- Median 3 (p=0,0051)
24. Zeit bis Progression- Median 3 (p=0,0172)
25. Grenzwertfestlegung bei 40%
26. Erweitertes Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz

8 Tabellenverzeichnis

1. Krebsneuerkrankungen im Gastrointestinaltrakt und Sterbefälle differenziert nach Geschlecht und Lokalisation, Angaben bezogen auf 100 000 Einwohner (Engel et al, 1997)
2. Charakteristika der HNPCC`s und der sporadisch auftretenden kolorektalen Karzinome (nach Sahm et al, 1995 mit eigener Bearbeitung)
3. Abnormalitäten im Mismatch-Reparatursystem
4. Stadieneinteilung nach UICC und Dukes (UICC, 1997)
5. TNM / pTNM-Klassifikation (UICC 1997)
6. 5-Jahres-Überlebensrate der Kolon- und Rektumkarzinome in Abhängigkeit vom Primärstadium nach UICC und Dukes (Tumorzentrum München, 1993)
7. Gene im Bereich der Region 20q13
8. Basisstatistik
9. Auswertungsprotokoll am Beispiel des Patienten Nr.1
10. Vergleich der klinischen Charakteristika des untersuchten Kollektivs mit den epidemiologischen Daten des Tumorzentrums München
11. Verteilung der Tumore auf verschiedene Differenzierungsgrade in Abhängigkeit vom Alter (p=0,043)
12. Infiltrationstiefe in Abhängigkeit von der Tumorlokalisation (p= 0,004)
13. Lymphknotenbefall in Abhängigkeit von der Infiltrationstiefe des Tumors (p=0,001)
14. Fernmetastasen in Abhängigkeit vom Lymphknotenbefall
15. Tumordifferenzierung in Abhängigkeit vom Lymphknotenbefall (p= 0,004)
16. Korrelation zwischen Überleben und TNM-Stadium
17. Mittelwert der Signale und Prozentzahl der Kerne in den Resektionsränder im Vergleich mit den zugehörigen Karzinomen
18. Vergleich der 20q13.2 Zugewinne zwischen Adenom- und Karzinomanteilen innerhalb eines Tumors
19. Mittelwert, Standardabweichung und Median der Signalanzahl pro Kern bezogen auf 146 untersuchte Tumoren
20. Anzahl der Fälle mit mehr als 2 Signalen bei Grenzwerten von 10 bis 50%
21. Multivariate Survivalanalyse beim Grenzwert von ≥20 Prozent
22. Experimentelle Grenzwerte und ihre p-Werte für die Korrelation mit dem Überleben
23. Multivariate Survivalanalyse beim Grenzwert von ≥30 Prozent
24. Multivariate Survivalanalyse beim Grenzwert von ≥40 Prozent
25. Auswertungsparameter der FISH-Daten anhand der prozentualen Grenzwertfestlegung
26. Auswertungsparameter der FISH-Daten anhand der Mediane
27. Korrelation 20q13.2 Zugewinn und Survival-Status - p-Wert: 0,007 (Chi-Quadrat Test)
28. Histologischer Differenzierungsgrad und 20q13.2 Zugewinn (p=0,007; Chi-Quadrat-Test)
29. 20q13.2-Zugewinn in Abhängigkeit vom Alter (p=0,032)Korrelation zwischen 20q13.2
30. Zugewinn und histologischem Typ (p=0,025; Chi-Quadrat-Test)
31. Vergleich CGH und FISH bei einem Teilkollektiv von 10 Tumoren
32. Gene im Bereich der Region 20q13

9 Anhang

Legende für das Patientenkollektiv

Fall	Fallnummer
Name	Vorname.Nachname.
Sex	Geschlecht
Alter	Alter *bei Operation*
L	Lokalisation des Tumors: 1=Colon ascendens und Colon transversum 2=Colon descendens und Sigma 3=Rectosigmoidaler Übergang 4=Rectum
pT	Primärtumorstadium
pN (alt)	Lymphknotenbefall nach UICC 1993
pN (neu)	Lymphknotenbefall nach UICC 1997
pM	Primärmetastase
G	Grading
</> 60	Jünger oder älter als 60 Jahre zum Zeitpunkt der Operation
surv	Überlebensstatus zum Zeitpunkt des letzten follow up‘s 1=lebt 2=verstorben
Follow up	Letztes follow up
OP	Operationstermin
LokRez	Datum des diagnostizierten Lokalrezidivs
LeberM	Datum der diagnostizierten Lebermetastasen
PulmM	Datum der diagnostizierten Lungenmatstasen
peritonM	Datum der diagnostizierten peritonealen Metastasen
sonstM	Datum sonstiger diagnostizierter Metastasen

Im Anschluß an das Patientenkollektiv sind die Auswertungsprotokolle der einzelnen Fluoreszenz in-situ Hybridisierungen entsprechend der Nummerierung des Kollektivs angefügt.

Patientenkollektiv

Fall	Name	Sex	Alter	L	pT	pN alt	pN neu	pM	G	</> 60	surv	follow up	OP	LokRez	LeberM	PulmM	peritonM	sonstM
1	F.B.	w	76	1	3	0	0	X	2	>60	2	03.06.96	02.01.90					
2	L.F.	m	53	4	3	3	2	X	1	<60	1	18.02.97	05.01.90					
3	K.A.	m	59	1	3	3	2	X	3	<60	1	01.03.90	05.01.90					
4	H.F.	m	75	1	3	0	0	X	3	>60	1	15.01.98	17.01.90					
5	H.H.	m	59	3	3	1	1	X	1	>60	2	26.02.92	18.01.90	31.10.91	31.10.91	30.01.91		31.10.91
6	J.J.	m	64	2	3	0	0	X	2	>60	2	21.02.93	19.01.90		01.08.90			
7	K.E.	m	75	1	3	2	2	1	2	>60	2	12.03.92	26.01.90		25.04.90			
8	P.H.	m	65	1	3	3	2	1	2	>60	2	01.11.90	29.01.90	01.11.90	26.09.90			26.09.90
9	M.E.	w	60	3	2	1	1	X	2	>60	2	09.11.94	01.02.90		15.12.93	06.11.91		01.03.94
10	B.H.	m	75	3	3	0	0	X	2	>60	1	10.03.95	02.02.90					
11	T.A.	m	40	1	3	0	0	X	3	<60	1	05.02.97	06.02.90					
12	A.A.	m	61	4	3	0	0	X	1	>60	2	24.06.92	14.02.90	18.02.92	18.02.92			
13	I.F.	w	64	3	3	0	0	X	1	>60	1	06.03.97	15.02.90					
14	P.J.	m	62	1	4	0	0	X	2	>60	1	29.02.96	19.02.90					
15	M.P.	w	68	3	3	0	0	X	2	>60	1	30.07.96	19.02.90					
16 I	M.K-C	m	58	1	3	0	0	X	1	<60	1	27.11.95	28.02.90			05.10.92		13.04.95
17 I	S.L.	m	83	1	3	1	1	X	2	>60	2	29.06.91	06.03.90					
18	H.E.	w	76	3	4	0	X	X	2	>60	2	24.08.91	08.03.90	24.05.91	24.05.91			
19	S.M.	w	52	3	2	3	2	X	3	<60	1	27.03.96	15.03.90					

20	S.O.	m	80	3	3	0	0	X	1	>60	2	05.03.92	20.03.90		15.05.91		15.08.91	
21	S.H.	w	48	3	3	3	2	X	2	<60	2	12.02.92	20.03.90	21.09.90	04.06.91	22.02.91		04.06.91
22	W.B.	w	79	4	3	0	0	X	1	>60	1	20.04.95	23.03.90					
23	E.E.	w	40	3	4	1	1	X	2	>60	2	15.03.95	23.03.90			15.11.93		
24	K.E.	w	66	3	3	0	0	X	2	>60	1	26.02.97	28.03.90					
25	S.W.	w	78	3	2	3	2	X	2	>60	2	27.04.91	04.04.90					
26	G.M.	w	57	3	3	3	2	X	2	>60			10.04.90					
27	E.S.	m	55	1	2	0	0	X	1	>60	1	08.04.97	17.04.90					
28	R.W.	m	58	3	3	1	1	X	2	>60	2	06.06.94	17.04.90	08.12.92				08.12.92
29	J.W.	m	69	3	3	0	X	X	2	>60	1	23.04.96	20.04.90					
30	A.H.	w	55	1	3	0	0	X	1	<60	1	20.03.97	23.04.90					
31	B.D.	m	78	1	3	1	1	X	2	>60	2	08.01.91	26.04.90					
32	K.L.	w	56	3	3	3	2	X	3	<60	1	13.05.97	03.05.90					
33	I.R.	m	57	3	3	3	2	X	2	<60	2	17.06.92	04.05.90					
34	B.J.	m	81	1	4	3	2	X	2	>60	2	12.08.91	10.05.90					
35	S.G.	m	54	3	3	0	0	X	2	<60	1	14.05.93	23.05.90					
36 I	B.A.	w	47	1	3	2	2	X	2	<60	1	28.04.97	29.05.90					
37	P.G.	w	46	1	3	2	2	X	2	<60	1	06.05.96	06.06.90					
38	K.S-A.	m	70	1	3	2	2	X	1	>60	1	06.08.97	06.06.90					
39	N.T.	w	65	1	3	2	2	X	2	>60	1	11.06.97	07.06.90		06.05.91			
40	I.F.	m	72	1	3	0	0	X	3	>60	2	06.07.97	20.06.90					
41	L.Z.	w	55	1	4	1	1	X	2	<60	2	15.07.91	02.07.90					
42	G.M.	m	57	3	3	1	1	X	2	<60	2	24.08.92	02.07.90		31.10.90			

43	M.A.	m	79	1	3	0	0	X	2	>60	1	02.08.95	02.07.90					
44	W.I.	w	56	3	2	0	0	X	3	<60	1	25.10.95	02.07.90					
45	M.H.	m	70	3	3	0	0	X	1	>60			03.07.90					
46	S.M.	w	70	1	4	3	2	X	2	>60	2	08.11.90	05.07.90					
47	L.A.	m	79	3	3	3	2	X	2	>60	2	26.01.96	26.07.90	15.01.93	19.07.93			
48	F.H.	m	54	1	3	0	0	X	1	<60	1	10.07.97	27.07.90					
49	J.J.	m	75	3	2	0	0	X	2	>60	1	16.07.97	30.07.90					
50	S.H.	w	57	3	3	3	2	X	2	<60	1	17.10.97	22.08.90			01.03.93		20.12.95
51	K.G.	m	84	1	3	1	1	X	2	>60	2	26.10.90	06.09.90					
52	H.J.	m	69	1	2	0	0	X	2	>60	2	15.11.93	11.09.90			15.07.92		
53 I	T.D.	w	76	1	3	0	0	X	3	>60	1	26.09.97	12.09.90					
54	W.C.	w	41	3	3	3	2	X	1	<60			21.09.90					
55	M.S.	m	54	3	3	2	2	X	2	<60	1	15.10.97	24.09.90		12.03.93			
56 I	S.H.	w	68	3	3	1	1	X	1	>60	2	12.07.96	27.09.90	01.03.93				
57	M.L.	m	58	3	2	0	0	X	2	<60	1	20.01.97	02.11.90					
58	S.G.	w	55	1	2	0	0	X	1	<60	2	28.11.95	07.11.90					
59	S.L.	w	80	1	3	0	0	X	2	>60	2	01.12.93	08.11.90					
60	S.W.	m	45	1	3	0	0	X	3	<60	2	29.05.91	03.07.90	09.11.90				
61	O.W.	m	65	3	2	0	X	X	1	>60	1	07.08.95	16.11.90					
62	J.E.	m	64	3	3	3	2	1	3	>60	2	06.03.91	29.11.90					
63 II	E.M.	w	81	1	3	1	1	X	1	>60	2	08.05.91	06.12.90					
64	M.K.	w	48	1	3	1	1	X	2	<60	2	15.06.92	06.12.90	16.03.92	05.06.91	16.03.92	11.05.92	16.03.92
65	W.H.	m	36	1	3	0	0	X	3	<60	1	21.01.97	11.12.90					

66	L.E.	w	40	1	2	0	0	X	1	<60	1	15.04.97	11.04.91					
67	K.M.	w	69	2	2	0	0	X	1	>60	1	15.05.97	12.04.91					
68	L.O.	m	61	3	2	0	X	X	1	>60	1	10.01.98	17.04.91	27.04.94				
69	B.E.	w	42	3	3	0	X	X	2	<60	1	10.04.97	19.04.91					
70 I	H.M.	m	69	1	2	0	0	X	1	>60	1	02.04.97	27.04.91					
72 I	S.F.	m	59	1	4	3	3	X	2	<60	2	03.11.90	05.01.90					
73	W.H.	m	58	1	4	3	2	X	1	<60	2	17.02.92	17.01.90				07.05.91	07.05.91
74 I	R.O.	m	39	1	3	0	0	X	2	<60	1	28.01.97	16.01.90					
75 I	S.S.	m	50	1	4	3	2	X	2	<60	2	27.03.90	24.01.90					
76	M.K.	m	39	1	3	1	1	X	1	<60	2	22.06.92	29.01.90			15.05.90		
77	F.J.	w	71	3	3	0	0	X	1	>60	1	26.03.97	31.01.90					
78	R.H.	m	69	3	3	3	2	X	2	>60	2	23.02.93	14.02.90		01.02.91			
79 I	J.G.	m	79	4	3	2	2	X	2	>60			27.02.90					
80 II	E.D.	m	80	3	3	3	2	X	3	>60	2	07.03.91	28.02.90		12.12.90			12.12.90
81	W.P.	m	47	1	3	0	0	X	2	<60	1	15.04.97	02.04.90					
82	S.M.	w	69	1	3	2	2	1	3	>60	2	05.07.90	23.04.90					
83	S.A.	w	78	1	3	0	0	X	2	>60	2	25.03.94	31.05.90					
84	R.F.	m	61	4	2	0	0	X	2	>60	2	08.09.93	12.07.90					
85	B.H.	m	68	3	2	0	X	X	1	>60	1	13.02.98	20.07.90			13.02.98		
86	J.M.	w	38	1	4	1	1	X	3	<60	1	30.08.91	24.07.90					
87	J.M.	w	79	2	3	0	X	X	1	>60	1	28.07.94	06.08.90					
88	W.T.	w	76	1	3	3	2	X	2	>60	1	20.08.96	17.08.90					
89 I	P.O.	m	49	3	3	3	2	1	3	<60	2	24.12.90	20.08.90					

90	E.L.	w	68	1	3	2	2	X	2	>60	2	13.10.91	24.08.90		31.01.91			
91	W.M.	w	54	3	2	1	1	X	2	<60	1	17.09.96	04.09.90					
92	S.K.	m	75	4	3	3	2	X	3	>60	2	07.10.91	10.10.90					
93	Z.B.	w	65	3	4	3	2	X	2	>60	2	22.02.95	16.10.90	14.12.93	04.11.91	04.11.91		
94	K.E.	m	56	1	3	1	1	X	1	<60	1	06.12.96	22.11.90					
95	B.M.	m	67	4	3	1	1	1	2	>60	2	13.07.94	27.11.90	25.06.93	22.08.91			25.06.93
96	L-N.H.	w	74	3	2	0	0	X	2	>60	1	15.12.97	17.12.90					
97	M.H.	m	68	3	2	0	X	X	1	>60	1	17.01.97	28.12.90					
98	F.M.	w	55	1	3	0	0	X	1	<60	1	23.12.96	08.01.91					
99	H.I.	w	59	3	3	2	2	X	1	<60	2	31.12.94	16.01.91		02.10.92			
100	I-P.P.	w	58	1	4	1	1	X	3	<60	2	06.11.91	16.01.91		28.06.91			
101	B.K.	w	69	3	2	0	0	X	1	>60	1	15.12.97	18.01.91					
102 I	B.T.	w	67	4	2	2	2	X	1	>60	1	16.01.96	22.01.91					
103	E.B.	w	68	3	2	0	0	X	2	>60	1	02.12.97	23.01.91	21.01.94				
104	P.K-W	m	53	1	3	1	1	X	2	<60	2	15.02.91	23.01.91					
105	D.M.	w	65	3	3	3	2	X	2	>60	1	25.06.91	28.01.91					25.06.91
106	M-F.U.	w	68	1	3	0	0	X	1	>60	1	11.04.96	31.01.91					
107	W.G.	m	64	3	3	1	1	X	2	>60	1	21.01.97	31.01.91					
108	E.M.	w	30	3	3	0	0	X	1	<60	1	13.01.97	04.02.91					
109	K.I.	w	66	3	4	0	X	X	2	>60	2	07.10.92	05.02.91			15.01.92		
110	S.K.	w	64	3	3	3	2	X	3	>60			05.02.91					
111	D.H-J.	m	57	3	3	2	2	X	3	<60	1	15.12.97	12.02.91					
112	B.M.	w	79	1	3	0	0	X	2	>60	2	07.10.93	18.02.91					

113	B.E.	w	67	1	3	0	X	X	2	>60	2	02.11.92	20.02.91	10.04.92	10.04.92		21.05.92	
114	K.H.	m	50	3	3	2	2	X	1	<60	2	15.04.92	21.02.91					
115	G.S.	w	67	1	3	0	X	X	2	>60	1	08.01.97	22.02.91					
116	R.I.	w	70	1	3	1	1	X	2	>60	1	15.05.97	22.02.91					
117	R.A.	w	57	1	4	0	0	X	1	<60	1	12.03.97	05.03.91					
118	M.L.	w	53	1	4	3	2	X	3	<60	2	07.06.91	10.03.91					
119	Z.A.	m	53	1	3	1	1	X	1	<60	2	03.03.97	08.03.91					
120	W.F.	w	83	4	3	1	1	X	2	>60	2	15.01.93	12.03.91	12.11.91	01.08.91	11.04.91		
121	V.M.	m	68	3	3	2	2	X	2	>60	1	11.03.97	13.03.91					
122	S.M.	w	78	3	3	0	X	X	1	>60	2	15.03.97	14.03.91			16.03.94		
123	H.P.	m	36	1	3	0	0	X	2	<60	1	18.03.97	18.03.91					
124	H.E.	m	81	1	3	0	0	1	1	>60	2	27.03.92	19.03.91		10.04.91			
125 I	G.S.	w	58	3	3	0	0	X	1	<60	1	04.04.97	20.03.91					
126	B.J.	m	72	1	4	3	2	X	3	>60	2	30.06.92	22.03.91		27.05.91			17.02.92
127	W.E.	w	53	1	4	0	0	X	3	<60	1	29.07.97	26.03.91					
128 I	T.M.	w	80	1	4	0	0	X	1	>60			27.03.91					
129	R.M.	m	69	1	3	1	1	X	2	>60	2	02.01.97	27.03.91					
130	A.J.	m	85	3	3	0	0	X	1	>60	1	13.05.97	02.04.91					
131	Y.K.	m	26	3	3	3	2	X	3	<60	2	23.10.92	02.04.91					13.07.92
132	K.H.	m	51	3	2	0	0	X	2	<60	1	04.04.97	04.04.97					
133	N.R.	m	80	1	3	0	0	X	1	>60	2	14.11.94	05.04.91					
134	Z.R.	m	58	3	3	2	2	1	2	<60	2	15.05.92	08.04.91		17.07.91			
135	M.T.	w	68	1	3	3	2	X	2	>60	2	17.09.92	11.04.91	14.11.91	14.11.91	21.05.92		

136 II	H.R.	m	78	1	3	1	1	X	2	>60	2	15.04.92	18.04.91					
137 I	S.K.	m	54	3	3	0	0	X	2	<60	1	18.03.97	25.04.91					
138 I	B.B.	w	42	1	3	3	2	1	3	<60	2	23.07.91	26.04.91					
140	S.I.	w	73	3	1	0	0	X	2	>60			07.03.91					
141 I	S.L.	m	78	2	1	0	0	X	2	>60	1	05.03.96	06.02.90					
143	P.W.	m	50	2	1	0	0	X	1	<60	1	15.10.93	30.05.90					
144	M.E.	m	66	1	1	0	0	X	2	>60	1	23.04.97	18.05.90					
145	K.M.	w	48	1	1	0	0	X	2	<60	1	17.10.95	25.09.90					
146	G.A.	w	69	3	1	1	1	X	2	>60	1	20.06.97	17.06.91					
147	G.P.	w	62	3	1	0	0	X	2	>60	1	11.03.97	27.02.90					
149	B.R.	m	74	3	1	0	0	X	1	>60	2	20.12.93	15.04.91			13.12.93		
150	A.A.	m	67	1	1	0	0	X	2	>60	1	11.11.97	25.07.91					

Fall Nr.		Sonde 20q13.2 (Fa. Vysis)			
		0-1 Signal	2 Signale	3-10 Signale	≥11 Signale
1	absolut	4	59	57	0
	relativ (%)	3,3	49,2	47,5	0
2	absolut	0	103	16	1
	relativ (%)	0	85,8	13,3	0,8
3	absolut	6	113	2	0
	relativ (%)	5	94,2	1,6	0
4	absolut	10	105	5	0
	relativ (%)	8,3	87,5	4,2	0
5	absolut	4	28	88	0
	relativ (%)	3,3	23,3	73,3	0
6	absolut	2	52	66	0
	relativ (%)	1,7	43,3	55	0
7	absolut	3	94	23	0
	relativ (%)	2,5	78,3	19,2	0
8	absolut	1	113	6	0
	relativ (%)	0,8	94,2	5	0
9	absolut	2	92	26	0
	relativ (%)	1,7	76,7	21,7	0
10	absolut	3	64	53	0
	relativ (%)	2,5	53,3	44,2	0
11	absolut	5	114	1	0
	relativ (%)	4,2	95	0,8	0
12	absolut	16	71	33	0
	relativ (%)	13,3	59,2	27,5	0
13	absolut	8	88	24	0
	relativ (%)	6,7	73,3	20	0
14	absolut	15	87	18	0
	relativ (%)	12,5	72,5	15	0
15	absolut	2	47	67	4
	relativ (%)	1,7	39,2	55,8	3,3
16I	absolut	1	51	68	0
	relativ (%)	0,4	42,5	56,7	0
16II	absolut	6	105	9	0
	relativ (%)	5	87,5	7,5	0
17I	absolut	3	63	54	0
	relativ (%)	2,5	52,5	45	0

Fall Nr.		Sonde 20q13.2 (Fa. Vysis)			
		0-1 Signal	2 Signale	3-10 Signale	≥11 Signale
17II RR Resektionsrand	absolut	7	113	0	0
	relativ (%)	5,8	94,2	0	0
18	absolut	11	71	38	0
	relativ (%)	9,2	59,2	31,7	0
19	absolut	8	69	43	0
	relativ (%)	6,7	57,5	35,8	0
20	absolut	6	112	2	0
	relativ (%)	5	93,3	1,7	0
21	absolut	0	70	49	1
	relativ (%)	0	58,3	40,8	0,8
22	absolut	4	114	2	0
	relativ (%)	3,3	95	1,7	0
23	absolut	9	42	69	0
	relativ (%)	7,5	35	57,5	0
24	absolut	1	77	42	0
	relativ (%)	0,8	64,2	35	0
25	absolut	3	91	26	0
	relativ (%)	2,5	75,8	21,7	0
26	absolut	5	109	6	0
	relativ (%)	4,2	90,8	5	0
27	absolut	5	115	0	0
	relativ (%)	4,2	95,8	0	0
28	absolut	0	16	104	0
	relativ (%)	0	13,3	86,6	0
29	absolut	1	55	64	0
	relativ (%)	0,8	45,8	53,3	0
30	absolut	2	24	86	8
	relativ (%)	1,7	20	71,7	6,7
31	absolut	0	18	101	1
	relativ (%)	0	15	84,2	0,8
32	absolut	11	83	26	0
	relativ (%)	9,2	69,2	21,7	0
33	absolut	5	31	81	3
	relativ (%)	4,2	25,8	67,5	2,4
34	absolut	1	39	80	0
	relativ (%)	0,8	32,5	66,7	0

Fall Nr.		Sonde 20q13.2 (Fa. Vysis)			
		0-1 Signal	2 Signale	3-10 Signale	≥11 Signale
35	absolut	0	106	14	0
	relativ (%)	0	88,3	11,7	0
36I	absolut	5	114	1	0
	relativ (%)	4,2	91,2	0,8	0
36II$_{Adenom}$	absolut	1	118	1	0
	relativ (%)	0,8	98,3	0,8	0
37	absolut	5	106	9	0
	relativ (%)	4,2	88,3	7,5	0
38	absolut	4	111	5	0
	relativ (%)	3,3	92,5	4,2	0
39	absolut	2	41	49	6
	relativ (%)	1,7	34,2	40,8	5
40	absolut	2	109	9	0
	relativ (%)	1,7	90,8	7,5	0
41	absolut	3	34	82	0
	relativ (%)	2,5	28,3	68,3	0
42	absolut	4	48	68	0
	relativ (%)	3,3	40	56,7	0
43	absolut	5	70	45	0
	relativ (%)	4,2	58,3	37,5	0
44	absolut	0	99	20	1
	relativ (%)	0	82,5	16,7	0,8
45	absolut	1	115	3	1
	relativ (%)	0,8	95,8	2,5	0,8
46	absolut	4	116	0	0
	relativ (%)	3,3	96,7	0	0
47	absolut	4	28	83	5
	relativ (%)	3,3	23,3	69,2	4,2
48	absolut	6	71	43	0
	relativ (%)	5	59,2	35,8	0
49	absolut	9	104	7	0
	relativ (%)	7,5	86,7	5,8	0
50	absolut	5	103	12	0
	relativ (%)	4,2	85,8	10	0
51	absolut	17	73	30	0
	relativ (%)	14,2	60,8	25	0

Fall Nr.		Sonde 20q13.2 (Fa. Vysis)			
		0-1 Signal	2 Signale	3-10 Signale	≥11 Signale
52	absolut	1	42	77	0
	relativ (%)	0,8	35	64,2	0
53I Adeno Ca	absolut	3	107	10	0
	relativ (%)	2,5	89,2	8,3	0
53II mucinöses Ca	absolut	3	116	1	0
	relativ (%)	2,5	96,7	0,8	0
54	absolut	10	50	60	0
	relativ (%)	8,3	41,7	50	0
55	absolut	11	83	26	0
	relativ (%)	9,2	69,2	21,7	0
56I Adeno Ca	absolut	5	30	85	0
	relativ (%)	4,2	25	70,8	0
56II siegelringzellig	absolut	112	8	0	0
	relativ (%)	93,3	6,7	0	0
56III Adenom	absolut	109	10	1	0
	relativ (%)	90,8	8,3	0,8	0
57	absolut	3	92	25	3
	relativ (%)	2,5	76,7	20,8	2,5
58	absolut	0	8	112	0
	relativ (%)	0	6,6	93,3	0
59	absolut	3	50	67	0
	relativ (%)	25	41,7	55,8	0
60	absolut	3	113	4	0
	relativ (%)	2,5	94,2	3,3	0
61	absolut	5	53	62	0
	relativ (%)	4,2	44,2	51,7	0
62	absolut	4	52	64	0
	relativ (%)	3,3	43,3	53,3	0
63I Adeno Ca	absolut	0	39	81	0
	relativ (%)	0	32,5	67,5	0
63II mucinöses Ca	absolut	0	28	92	1
	relativ (%)	0	23,3	76,7	0,8
64	absolut	4	111	5	0
	relativ (%)	3,3	92,5	4,2	0
65	absolut	6	112	2	0
	relativ (%)	5	93,3	1,7	0

Fall Nr.		Sonde 20q13.2 (Fa. Vysis)			
		0-1 Signal	2 Signale	3-10 Signale	≥11 Signale
66	absolut	4	111	5	0
	relativ (%)	3,3	92,5	4,2	0
67	absolut	3	59	58	0
	relativ (%)	2,5	49,2	48,3	0
68	absolut	5	62	53	0
	relativ (%)	4,2	51,7	44,2	0
69	absolut	0	33	87	0
	relativ (%)	0	27,5	72,5	0
70I	absolut	1	55	64	0
	relativ (%)	0,8	45,8	53,3	0
70II	absolut	1	45	73	1
	relativ (%)	0,8	37,5	60,8	0,8
71 k.M.	absolut				
	relativ (%)				
72I	absolut	6	43	69	2
	relativ (%)	5	35,8	57,5	1,7
72II	absolut	2	64	37	17
	relativ (%)	1,7	53,3	30,8	14,2
73	absolut	0	37	83	0
	relativ (%)	0	30,8	69,2	0
74I	absolut	2	115	3	0
	relativ (%)	1,7	95,8	2,5	0
74II	absolut	1	103	16	0
	relativ (%)	0,8	85,8	13,3	0
75I	absolut	5	50	35	30
	relativ (%)	4,2	41,7	29,2	25
75II	absolut	1	13	102	4
	relativ (%)	0,8	10,8	85	3,3
76	absolut	4	110	6	0
	relativ (%)	3,3	91,7	5	0
77	absolut	9	44	67	0
	relativ (%)	7,5	36,7	55,8	0
78	absolut	5	105	10	0
	relativ (%)	4,2	87,5	8,3	0
79I	absolut	1	14	98	7
	relativ (%)	0,8	11,7	81,7	5,8

Fall Nr.		Sonde 20q13.2 (Fa. Vysis)			
		0-1 Signal	2 Signale	3-10 Signale	≥11 Signale
79II RR Resektionsrand	absolut	5	115	0	0
	relativ (%)	4,2	95,8	0	0
80I	absolut	5	37	78	0
	relativ (%)	4,2	30,8	65	0
80II	absolut	1	17	102	0
	relativ (%)	0,8	14,2	85	0
80III	absolut	4	39	77	0
	relativ (%)	3,3	32,5	64,2	0
80IV RR Resektionsrand	absolut	1	119	0	0
	relativ (%)	0,8	99,2	0	0
81	absolut	1	111	8	0
	relativ (%)	0,8	92,5	6,7	0
82	absolut	2	30	75	13
	relativ (%)	1,7	25	62,5	10,8
83	absolut	4	27	73	16
	relativ (%)	3,3	22,5	60,8	13,3
84	absolut	0	30	90	0
	relativ (%)	0	25	75	0
85	absolut	1	22	93	4
	relativ (%)	0,8	18,3	77,5	3,3
86	absolut	0	112	8	0
	relativ (%)	0	93,3	6,7	0
87	absolut	0	9	108	3
	relativ (%)	0	7,5	90	2,5
88	absolut	0	118	2	0
	relativ (%)	0	98,3	1,7	0
89I	absolut	17	90	13	0
	relativ (%)	14,2	75	10,8	0
89II LK-Metastase	absolut	8	111	1	0
	relativ (%)	6,7	92,5	0,8	0
90	absolut	3	55	62	0
	relativ (%)	2,5	45,8	51,7	0
91	absolut	6	90	24	0
	relativ (%)	5	75	20	0
92	absolut	12	104	4	0
	relativ (%)	10	86,7	3,3	0

Fall Nr.		Sonde 20q13.2 (Fa. Vysis)			
		0-1 Signal	2 Signale	3-10 Signale	≥11 Signale
93	absolut	2	79	39	0
	relativ (%)	1,7	65,8	32,5	0
94	absolut	7	35	78	0
	relativ (%)	5,8	29,2	65	0
95	absolut	3	24	89	4
	relativ (%)	2,5	20	74,2	3,3
96	absolut	16	42	62	0
	relativ (%)	13,3	35	51,7	0
97	absolut	2	23	92	3
	relativ (%)	1,7	19,2	76,7	2,5
98	absolut	23	92	5	0
	relativ (%)	19,2	76,7	4,2	0
99	absolut	4	49	67	0
	relativ (%)	3,3	40,8	55,8	0
100	absolut	1	89	30	0
	relativ (%)	0,8	74,2	25	0
101	absolut	1	29	89	1
	relativ (%)	0,8	24,2	74,2	0,8
102I Adeno Ca	absolut	2	84	34	0
	relativ (%)	1,7	70	28,3	0
102II Adenom	absolut	3	100	16	1
	relativ (%)	2,5	83,3	13,3	0,8
103	absolut	1	15	102	2
	relativ (%)	0,8	12,5	85	1,7
104	absolut	0	17	100	3
	relativ (%)	0	14,2	83,3	2,5
105	absolut	1	8	102	9
	relativ (%)	0,8	6,7	85	7,5
106	absolut	8	52	60	0
	relativ (%)	6,7	43,3	50	0
107	absolut	12	36	72	0
	relativ (%)	10	30	60	0
108	absolut	9	79	32	0
	relativ (%)	7,5	65,8	26,7	0
109	absolut	4	66	50	0
	relativ (%)	3,3	55	41,7	0

Fall Nr.		Sonde 20q13.2 (Fa. Vysis)			
		0-1 Signal	2 Signale	3-10 Signale	≥11 Signale
110	absolut	3	47	70	0
	relativ (%)	2,5	39,2	58,3	0
111	absolut	2	97	21	0
	relativ (%)	1,7	80,8	17,5	0
112	absolut	2	70	48	0
	relativ (%)	1,7	58,3	40	0
113	absolut	0	22	98	0
	relativ (%)	0	18,3	81,7	0
114	absolut	2	29	88	1
	relativ (%)	1,7	24,2	73,3	0,8
115	absolut	0	15	104	1
	relativ (%)	0	12,5	86,7	0,8
116	absolut	6	99	15	0
	relativ (%)	5	82,5	12,5	0
117	absolut	5	31	81	3
	relativ (%)	4,2	25,8	67,5	2,5
118	absolut	1	26	91	2
	relativ (%)	0,8	21,7	75,8	1,7
119	absolut	12	102	6	0
	relativ (%)	10	85	5	0
120	absolut	6	40	74	0
	relativ (%)	5	33,3	61,7	0
121	absolut	7	17	91	5
	relativ (%)	5,8	14,2	75,8	4,2
122	absolut	1	15	104	0
	relativ (%)	0,8	12,5	86,7	0
123	absolut	3	103	14	0
	relativ (%)	2,5	85,8	11,7	0
124	absolut	4	30	84	0
	relativ (%)	3,3	25	70	0
125I	absolut	1	28	88	3
	relativ (%)	0,8	23,3	73,3	2,8
125II Adenom	absolut	1	90	29	0
	relativ (%)	0,8	75	24,2	0
126	absolut	0	34	85	1
	relativ (%)	0	28,3	70,8	0,8

Fall Nr.		Sonde 20q13.2 (Fa. Vysis)			
		0-1 Signal	2 Signale	3-10 Signale	≥11 Signale
127	absolut	0	100	20	0
	relativ (%)	0	83,3	16,7	0
128I	absolut	2	55	63	0
	relativ (%)	1,7	45,8	52,5	0
128II mucinöses Ca	absolut	2	112	6	0
	relativ (%)	1,7	93,3	5	0
129	absolut	4	45	70	1
	relativ (%)	3,3	37,5	58,3	0,8
130	absolut	0	104	16	0
	relativ (%)	0	86,7	13,3	0
131	absolut	0	104	16	0
	relativ (%)	0	86,7	13,3	0
132	absolut	0	9	53	58
	relativ (%)	0	7,5	44,2	48,3
133	absolut	0	110	10	0
	relativ (%)	0	91,7	8,3	0
134	absolut	0	10	107	3
	relativ (%)	0	8,3	89,2	2,8
135	absolut	0	40	79	1
	relativ (%)	0	33,3	65,8	0,8
136I	absolut	1	23	96	0
	relativ (%)	0,8	19,2	80	0
136II	absolut	0	16	99	5
	relativ (%)	0	13,3	82,5	4,2
137I	absolut	0	18	99	3
	relativ (%)	0	15	82,5	2,8
137II RR Resektionsrand	absolut	5	115	0	0
	relativ (%)	4,2	95,8	0	0
138I	absolut	0	5	111	4
	relativ (%)	0	4,2	92,5	3,3
138II RR Resektionsrand	absolut	4	115	1	0
	relativ (%)	3,3	95,8	0,8	0
139 k.M.	absolut				
	relativ (%)				
140	absolut	0	113	7	0
	relativ (%)	0	94,2	5,8	0

Fall Nr.		Sonde 20q13.2 (Fa. Vysis)			
		0-1 Signal	2 Signale	3-10 Signale	≥11 Signale
141I	absolut	18	69	33	0
	relativ (%)	15	57,5	27,5	0
141II	absolut	1	99	20	0
	relativ (%)	0,8	82,5	16,7	0
142 k.M.	absolut				
	relativ (%)				
143	absolut	0	82	37	1
	relativ (%)	0	68,3	30,8	0,8
144	absolut	1	96	23	0
	relativ (%)	0,8	80	19,2	0
145	absolut	2	117	1	0
	relativ (%)	1,7	97,5	0,8	0
146	absolut	0	35	85	0
	relativ (%)	0	29,2	70,8	0
147	absolut	0	52	56	12
	relativ (%)	0	43,3	46,7	10
148 k.M.	absolut				
	relativ (%)				
149	absolut	2	56	62	0
	relativ (%)	1,7	46,7	51,7	0
150	absolut	0	67	43	10
	relativ (%)	0	55,8	35,8	8,3

Lebenslauf

Name:	Astrid Karin Hacker
Eltern:	Hanna Helga Hacker, Vorsitzende Richterin am Oberlandesgericht in München a.D.
	Hans Helmut Hacker, Vorsitzender Richter am Bundesverwaltungsgericht in München a.D.
Wohnort:	Barlachstr. 12
	80804 München
Geburtsdatum:	11.12.1970 in Landshut
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulausbildung

1977-1981	Grundschule
1981-1991	Gymnasium, Abschluß mit Abitur

Berufsausbildung und Studium

1991-1993	Ausbildung zur medizinisch-technischen Laboratoriumsassistentin, Abschluß mit Staatsexamen
1993-1994	Studium der Humanmedizin in Leipzig
1994-1997	Studium der Humanmedizin in Innsbruck
1997-2001	Studium der Humanmedizin in München (Ludwig-Maximilians-Universität), Abschluß mit Staatsexamen
1997 -2001	Doktorarbeit zum Thema: Die prognostische Relevanz von 20q13.2 beim kolorektalen Karzinom

Beruf

seit 01.01.2002	Ärztin im Praktikum an der Neurologischen Klinik der Johannes Gutenberg-Universität Mainz