

CharitéCentrum für diagnostische und präventive Labormedizin

Institut für Pathologie/CCM

Direktor: Prof. Dr. med. Manfred Dietel

Habilitationsschrift

**Chromosomale Signaturen und Immunprofile
in der Tumorprogression kolorektaler
Karzinome**

zur Erlangung der Venia Legendi

für das Fach

Pathologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät

Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Herrn Dr. med. Thomas Knösel

aus Hannover

eingereicht: 15. November 2006

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Thomas Kirchner
2. Gutachter: Thomas Ried, MD, PhD

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	3
1.1 <i>Klinik und Klassifikation des kolorektalen Karzinoms</i>	5
1.2 <i>Genetische Veränderungen in der Tumorprogression kolorektaler Karzinome</i> .	6
2. Fragestellung	11
3. Ergebnisse	12
3.1 <i>Chromosomale Alterationen im fortgeschrittenen Dickdarmkrebs und lymphogen und hämatogen metastasierten Karzinomen</i>	12
3.2 <i>Tumorprogressionsmodell mit typischen chromosomalen Alterationen bei gewebespezifischer Metastasierung</i>	14
3.3 <i>Prognoserelevante chromosomale Imbalanzen im kolorektalen Karzinom</i>	27
3.4 <i>Korrelationen zwischen DNA Imbalanzen und Genexpression auf DNA-Ebene und Proteinebene</i>	39
3.5 <i>Immunprofile mit prognostischer und diagnostischer Bedeutung</i>	49
4. Diskussion	63
4.1 <i>Kandidatenregionen während der Metastasierung</i>	65
4.2 <i>Kandidatengenanalyse mittels Proteinexpression</i>	67
5. Zusammenfassung	71
6. Literaturverzeichnis	73
7. Danksagungen	81
8. Eidesstattliche Erklärung	82

1. Einleitung

Die Einführung von Virchows „Cellularpathologie“ 1858, bei dem „die Zelle als letztes wirkendes Element des lebenden Körpers“ erkannt wurde (R. Virchow am 10. Februar 1858, 1. Vorlesung an der Charité), erbrachte für das damalige Krankheitsverständnis und so auch für die Krebsentstehung eine eindrucksvolle Wende. Ein weiterer Meilenstein wird durch die „Molekularpathologie“ eintreten. Sie umfaßt die Durchführung molekularbiologischer Untersuchungsmethoden an einem vom Pathologen nach dem entsprechenden mikroskopischen Bild ausgewählten Zellmaterial. Mit Hilfe molekularpathologischer Methoden wurden und werden am Tumormaterial neue Gene und Biomarker evaluiert, die dann entscheidend für die zielgerichtete Therapie sein können (Höfler et al. 2003, Yang et al. 2006, Dietel et al. 2006). Einige dieser Moleküle können bereits erfolgreich attackiert werden, so gibt es beispielsweise schon ermutigende Resultate wie HER2Neu beim metastasierten Brustkrebs und c-kit bei gastrointestinalen Stromatumoren. Molekulare Marker helfen auch in Zukunft, die einzelnen Tumorentitäten besser zu klassifizieren und werden weitere neue Angriffsziele für moderne Medikamente definieren (Weinstein et al. 2006).

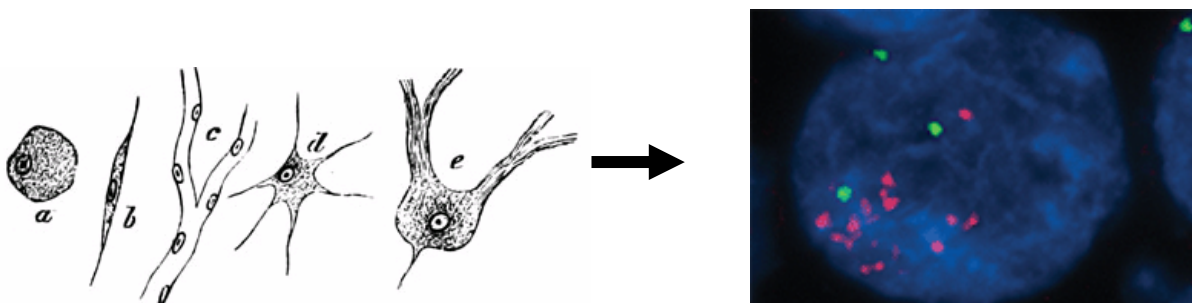


Abbildung 1: Virchows „Cellularpathologie“ war ein Meilenstein in der Kanzerogenese und wird jetzt durch die „Molekularpathologie“ erweitert. Links, vierer Holzchnitt aus Virchows Vorlesung, rechts Detektion einer HER2Neu-Amplifikation (rotes Signal) beim Mammakarzinom.

Für Karzinome des Kolorektums sind jedoch bis jetzt noch keine durchschlagenden Erfolge der sogenannten „zielgerichteten Therapie“ zu verbuchen. Monoklonale Antikörper gegen den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF-R) und den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) werden in erster Linie nur begleitend eingesetzt. Weitere molekularpathologische Erkenntnisse anhand umfangreicher Tumorkollektive mit den entsprechenden klinisch-pathologischen Parametern sind eminent wichtig.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein umfangreiches Tumorkollektiv kolorektaler Karzinome mit Hilfe der Comparativen Genomischen Hybridisierung (CGH) auf DNA-Ebene und auf Proteinebene mit Hilfe der Immunhistochemie (IH) untersucht. Die Ergebnisse wurden dann mit den klinisch-pathologischen Daten verglichen, um zytogenetische und immunhistologische molekulare Signaturen zu erstellen, die mit der Tumorprogression, Metastasierung und auch der Prognose der Patienten korrelieren.

1.1 Klinik und Klassifikation des kolorektalen Karzinoms

Bösartige Neubildungen des Kolorektums sind die zweithäufigste Krebstodesursache bei Männern und die dritthäufigste Krebstodesursache bei Frauen (Jemal 2006). In Deutschland sterben 30.000 Menschen jährlich an dieser Erkrankung. Circa 50.000 bis 52.000 Neuerkrankungen werden pro Jahr mit steigender Tendenz registriert (Vogl et al. 2002). Das Vorkommen des kolorektalen Karzinoms hat sich von 1960 bis 1980 verdoppelt und stabilisiert sich auf hohem Niveau. Das Risiko, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken, beträgt für die Bundesbürger derzeit vier bis sechs Prozent. Ab dem 50. Lebensjahr verdoppeln sich Vorkommen und Mortalität mit jeder Lebensdekade, d.h. gerade wegen der steigenden Lebenserwartung in den letzten Jahren ist mit einem Anstieg der Krankheitsfälle zu rechnen. Die Gesamt- und Folgekosten liegen derzeit bei über 500 Millionen Euro pro Jahr. Weltweit gibt es bezüglich der Sterblichkeit große Unterschiede; in Deutschland ist die Mortalität des Darmkrebs deutlich höher als in den USA und in Japan (Greenlee et al. 2000).

Obwohl in frühen Stadien heilbar, ist der Tumor häufig bei Erstsymptomatik bereits metastasiert, was ein wesentlicher Grund für die hohe Mortalitätsrate ist. Die Prognose kolorektaler Karzinome wird entscheidend durch das Ausmaß der lymphogenen und hämatogenen Metastasierung bestimmt.

Fernmetastasen nach einer primär kurativen Erstoperation findet man vor allem in der Leber (59-66%). Bei Kolonkarzinomen sind zudem peritoneale (25%) und bronchopulmonale (17%) Fernmetastasen und Metastasen in nichtregionalen Lymphknoten (16%) besonders häufig zu beobachten. Bei Rektumkarzinomen sind die Lungen in über 26% beteiligt. Andere Organe wie z.B. Skelett, Gehirn, Nieren

und Haut sind von der Fernmetastasierung selten betroffen (Taal et al. 1992, Remmele et al. 1996).

Das fortgeschrittene Karzinom stellt das Hauptproblem für den klinischen Onkologen und Chirurgen dar. Die postoperative adjuvante Chemotherapie verbessert das Überleben im Stadium III (Dukes Stadium C) und ist als Standardtherapie weitgehend anerkannt (Saunders et al. 2006, Galanis et al. 2000, MacDonald 1999). Auch Patienten mit Stadium II (Dukes Stadium B) haben ein hohes Risiko für ein Wiederauftreten des Tumors und empfangen eine adjuvante Therapie, obwohl der Nutzen in solchen Fällen noch unsicher ist. Molekulare Marker, welche glaubwürdig das Überleben und die Prognose vorhersagen, werden dringend benötigt (Höfler et al. 2003, Knösel et al. 2005, Yang et al. 2006, Dietel et al. 2006).

Da die konventionelle Morphologie und die bis jetzt praktizierte pTNM Klassifikation zur Vorhersage der Tumorprogression nur eine begrenzte Aussagefähigkeit besitzt, wird der Molekularpathologie und damit der Umsetzung der molekularen Erkenntnisse der Tumorprogression in faßbare Parameter (Immunhistologie, m-RNA in situ, FISH) in der zukünftigen Diagnostik und Therapie eine entscheidende Bedeutung zukommen.

1.2 Genetische Veränderungen in der Tumorprogression kolorektaler Karzinome

Studien beim kolorektalen Karzinom haben gezeigt, dass eine Akkumulation von genetischen Veränderungen von der Initialisierung der Neoplasie bis zum invasiven Karzinom stattfindet (Kinzler et Vogelstein 1996, Fearon et Vogelstein 1990). In dem viel beachteten Progressionsmodell spielen Gene wie APC, K-ras und p53 eine wichtige Rolle. Sie werden häufig in unterschiedlichen Phasen der

Tumorentwicklung mutiert, jedoch ist es weniger die Reihenfolge als vielmehr die Anhäufung der Mutationen, die für den Tumorprogress verantwortlich ist.

Durch Studien zum Verlust der Heterozygotie (Loss of heterozygosity, LOH) ist die Identifikation von Tumorsuppressorgenen möglich geworden, welche an der Tumorigenese kolorektaler Karzinome beteiligt sind. LOH auf den Chromosomen 5q, 8p, 17p und 18q sind in hoher Frequenz gefunden worden. Kandidatengene dafür sind APC in 5q, p53 in 17p und SMAD4 in Chromosom 18q. Verluste auf Chromosom 17p sind in nahezu 75% der kolorektalen Karzinome beschrieben worden, selten demgegenüber aber in gutartigen Läsionen, was dafür spricht, daß der Verlust der p53 Funktion eher in der späteren Progression als in der Initialphase involviert ist.

Vogelstein und Kinzler erweiterten auch die Terminologie der Krebsgene um die Begriffe der Gatekeeper und Caretaker. Sie dient vor allem der Unterteilung von Genen, die für die Tumorsuszeptibilität verantwortlich sind. Gatekeeper-Gene kontrollieren häufig die Proliferation und den Zelltod, wohingegen Caretaker-Gene in der Regel in die DNA-Reparatur involviert sind und deren Inaktivierung zu einer genetischen Instabilität führen (Grade et al. 2006, Lengauer et al. et al. 1998, Kinzler et al. 1997). Wichtige Gatekeepergene sind aber wahrscheinlich solche, welche sowohl Gatekeeper als auch Caretaker Funktionen einnehmen (Leedham et al. 2005). Für verschiedene Gewebearten und Tumorentitäten können unterschiedliche Gene diese Rolle übernehmen. Beim kolorektalen Karzinom ist APC der bekannteste Gatekeeper, Mutationen treten zumeist als initiales Ereignis bereits bei Adenomen, d.h. der gutartigen Krebsvorstufe, auf.

Zwei verschiedene Typen der genetischen Instabilität stellen eine zentrale Komponente der Neoplasiegenese beim kolorektalen Karzinom dar. Die

Mikrosatelliteninstabilität (MIN) ist assoziiert mit der HNPCC Erkrankung (hereditary nonpolyposis colorectal cancer), ist aber ebenfalls in einer Untergruppe von sporadischen nicht hereditären kolorektalen Karzinomen zu finden. Die Häufigkeit der MIN beträgt maximal 15%, wohingegen die Mehrheit der kolorektalen Karzinome durch eine chromosomale Instabilität (CIN) charakterisiert ist. Interessanterweise haben kolorektale Karzinome mit einer hohen Mikrosatelliteninstabilität eine bessere Prognose und metastasieren weniger häufig als Mikrosatelliten-stabile Tumoren (Watanabe et al. 2001). Zusätzlich wurde gezeigt, dass MIN-positive Tumoren weniger chromosomale Veränderungen tragen als MIN-negative, obwohl keiner der beiden Typen sich gegenseitig ausschließt, wie zuerst angenommen wurde (Schlegel et al. 1995, Lengauer et al. 1998, Georgiades et al. 1999, Gaasenbeek et al. 2006, Grade et al. 2006).

In späteren Stadien der Tumorprogression ist in einigen Studien gezeigt worden, daß chromosomale Verluste am kurzen Arm von Chromosom 8 (8p) und am langen Arm von Chromosom 18 (18q) detektiert werden können und daß diese Verluste mit einem aggressiven Phänotyp und einer höheren Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs einhergehen (Martinez-Lopez E et al. 1998, Halling et al. 1999, De Angelis et al. 2001, Al-Mullah et al. 2006). Auf 8p liegen einige Kandidatentumorsuppressorgene wie DLC1, CNOT7 und PDGFRL. Mutationsanalysen für DLC1, CNOT7 und PDGFRL haben jedoch in kolorektalen Karzinomen gezeigt, dass nur eine Mutation von 126 Tumoren, 1 von 88 und 1 von 123 Tumoren vorliegt, was dafür spricht, dass in diesen Regionen möglicherweise weitere Tumorsuppressorgene oder Gene liegen, welche für die Aufrechterhaltung der genomischen Integrität verantwortlich sind (Anderson et al. 2001, Flanagan et al. 2004). Metastasierungsassoziierte chromosomale Aberrationen lassen sich auch schon in Primärtumoren und in sehr frühen Stadien der Kanzerogenese nachweisen.

Sie charakterisieren vermutlich eine Subpopulation von Tumorzellen, die das höchste Malignitätspotential aufweisen (Klein 2003, Schardt et al. 2005, Knösel et al. 2006).

Weitere Studien analysieren in letzter Zeit Stammzellen. Stammzellen teilen viele Eigenschaften mit malignen Zellen, so können sie sich selbst erneuern und proliferieren. Krebs soll eine Erkrankung der Stammzellen sein (Leedham et al. 2005). Diese sogenannten „Krebsstammzellen“ wurden beispielsweise in der akuten myeloischen Leukämie (AML) (Wang et al. 2005), aber auch in Tumoren der Lunge, der Prostata, Bauchspeicheldrüse, der Brust, der Leber und auch des Dickdarmes beschrieben (Stuart AC McDonald et al 2006, Clarke and Fuller 2006, Brabletz et al. 2005). Krebsstammzellen haben durch ihre Selbsterneuerung und Proliferation genügend Zeit die chromosomalen Aberrationen und sequentiellen Mutationen zu akquirieren, die bei malignen Neoplasien gefunden werden (Radkte et al. 2005). Einzelne Marker gastrointestinaler Krebsstammzellen wie BMI-1 (Reinisch et al. 2006) werden derzeit in verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht und können in naher Zukunft neue Oberflächenzielproteine für eine Antikörper-Therapie sein (Tan et al. 2006). Andere putative Marker für gastrointestinale Stammzellen sind in der Familie der Integrine zu finden, welche differenziell in der Kryptenachse exprimiert sind (Teller and Beaulieu 2001). Gerade die hochpotenten Krebsstammzellen sollen ein hohes Metastasierungspotential aufweisen und die Keimzellen von Metastasen sein. Wie die Krebsstammzellen, befinden sich die Stammzellen in einem Gewebszellkompartiment, welche auch Nische genannt wird. Dies ist eine Ansammlung von epithelialen, mesenchymalen Zellen und extrazellulärer Matrix, die den Zellen die optimale Umgebung gibt, um zu proliferieren und sich selbst zu erneuern. Im Dickdarm sollen die Stammzellen an der Kryptenbasis lokalisiert sein (Abb. 2).

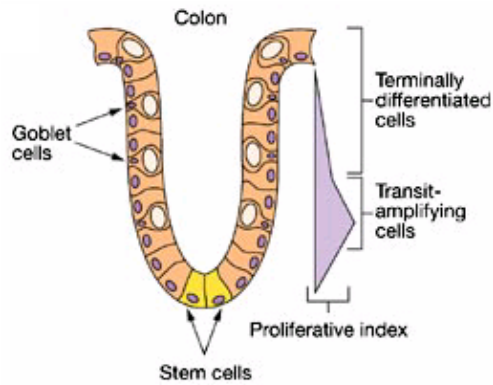


Abbildung 2: Schematische Darstellung einer Dickdarmkrypte mit Lokalisation der Stammzellen (nach McDonald SA et al. 2006, Nature, Clinical Practice)

Zusammenfassend muss festgestellt werden, dass die Karzinogenese in der Tumorprogression und insbesondere der Metastasierung noch unzulänglich erforscht ist und auch nur sehr partiell in den bisherigen Tumormodellen abgebildet wird. Dabei ist es gerade die Metastasierung, die letztendlich über das Schicksal des Patienten entscheidet.

2. Fragestellung

Das Projekt beschäftigte sich mit der Identifizierung und Evaluierung von spezifischen Signaturen auf DNA Ebene und auf Proteinebene in kolorektalen Karzinomen. Das übergeordnete Ziel bestand darin sowohl mit Hilfe chromosomaler Alterationen als auch von Immunprofilen eine bessere Klassifikation dieser Tumorentität in Bezug auf das Metastasierungsverhalten und die Prognose zu erarbeiten. Insbesondere sollten folgende Fragen beantwortet werden.

1. Lassen sich auf DNA Ebene mittels der Comparativen Genomischen Hybridisierung chromosomale Imbalancen detektieren, die mit der Tumorprogression und Metastasierung assoziiert sind?
2. Sind einige dieser chromosomalen Alterationen mit bestimmten Metastasierungsorten assoziiert?
3. Zeigen chromosomale Veränderungen eine Korrelation mit dem kürzeren Überleben der Patienten?
4. Ist eine Amplifikation oder Deletion auf DNA-Ebene auch mit einer entsprechenden Über-/Unterexpression von dort lokalisierten Genen auf der Protein-Ebene korreliert?
5. Gibt es spezifische Immunprofile, die möglicherweise von diagnostischer oder prognostischer Relevanz sind und die Tumore in einzelne Subgruppen einteilen können?

3. Ergebnisse

3.1 Chromosomale Alterationen im fortgeschrittenen Dickdarmkrebs und lymphogen und hämatogen metastasierten Karzinomen

Literatur: Thomas Knösel, Petersen S, Schwabe H, Schlüns K, Stein U, Schlag PM, Dietel M, Petersen I. Incidence of chromosomal imbalances in advanced colorectal carcinomas and their metastases. *Virchows Arch.* 2002 Feb;440(2):187-94.

Thomas Knösel, Karsten Schlüns, Ulrike Stein, Holger Schwabe, Peter Michael Schlag, Manfred Dietel, Iver Petersen. Chromosomal alterations during lymphatic and liver metastases formation in colorectal carcinomas. *Neoplasia*, 2004, Vol. 6, No 1Jan/Febr, 23-28.

Nach unseren CGH-Ergebnissen treten bei fortgeschrittenen kolorektalen Karzinomen in absteigender Häufigkeit folgende chromosomale Veränderungen auf: Deletionen von 18q12-18q23, 4q27-4q28, 4p14, 8p22-8p23, 5q21, 1p21-1p22, 21q21, 9p21, 6q16-6q21, 3p12, 11q22 und 14q13-14q21 sowie Überrepräsentationen auf 20q11.2-20q13.2, 7q11.1-7q12, 13q11.2-13q14, 16p12, 19p13, 9q34, 19q13.1-19q13.2, 17q21, 22q11, 8q und 1q. Lymphogene Metastasen zeigten mehr Alterationen mit Gewinnen auf 8q, 20q und Deletionen auf 8p, 9p, 18 und 21q21. Hämatogene Metastasen zeigten mehr Alterationen als lymphogene Metastasen, speziell mehr Deletionen auf 1p, 3, 4, 5q, 10q, 14, and 21q21 und Gewinne auf 1q, 7p, 12qter, 13, 16, und 22q. Beim Vergleich von Lebermetastasen mit den korrespondierenden Primärtumoren waren bevorzugt Deletionen 2q, 5q, 8p, 9p, 10q, und 21q21 und Gewinne auf 1q, 11, 12qter, 17q12-q21, 19, und 22q zu beobachten. Interessanterweise zeigten die Ergebnisse, daß die lymphogene und hämatogene Metastasierung mit bestimmten nichtzufälligen chromosomalen Alterationen assoziiert sind. Eine Gesamtübersicht der chromosomalen Veränderungen der insgesamt 85 untersuchten Tumore zeigt die Abbildung 3.

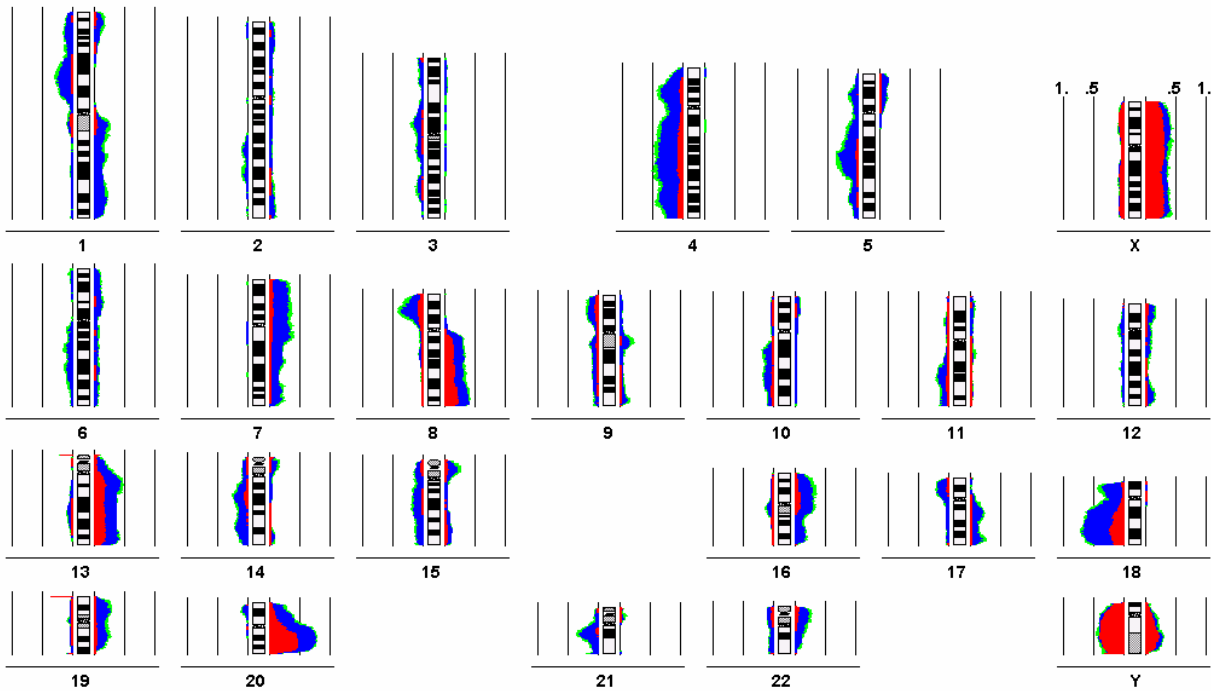


Abbildung 3: Alle chromosomalen Veränderungen an 85 metastasierten kolorektalen Karzinomen. DNA-Verluste sind als Inzidenzkurven auf der linken Seite abgetragen, DNA-Gewinne auf der rechten Seite. In Blau sind Veränderungen mit 99% Signifikanz im Student t-test, in Grün Veränderungen mit 95% Signifikanz wiedergegeben. Pronounced Veränderungen, bei denen die Inzidenzkurven die Schwellenwerte 1.5 und 0.5 überschritten, sind in rot abgetragen und entsprechen sogenannten „Mehrfachamplifikationen“ oder „Mehrfachdeletionen“.

Weitere Diagramme, sowie ein Differenzdiagramm zwischen Lymphknoten – und Lebermetastasen und eine Darstellung, bei der korrespondierende Tumorpaare miteinander verglichen werden, sind der anhängenden Publikation zu entnehmen.

Literatur:

Thomas Knösel, Karsten Schlüns, Ulrike Stein, Holger Schwabe, Peter Michael Schlag, Manfred Dietel, Iver Petersen. Chromosomal alterations during lymphatic and liver metastases formation in colorectal carcinomas. *Neoplasia*, 2004, Vol. 6, No 1Jan/Febr, 23-28.

Aus Urheberrechtsgründen bleibt diese Seite weiß.

Aus Urheberrechtsgründen bleibt diese Seite weiß.

Aus Urheberrechtsgründen bleibt diese Seite weiß.

Aus Urheberrechtsgründen bleibt diese Seite weiß.

Aus Urheberrechtsgründen bleibt diese Seite weiß.

3.2 Tumorprogressionsmodell mit typischen chromosomalen Alterationen bei gewebespezifischer Metastasierung

Literatur: Thomas Knösel, Karsten Schlüns, Manfred Dietel, Iver Petersen. Chromosomal alterations in lung metastases of colorectal carcinomas: associations with tissue specific tumor dissemination. *Clinical & Experimental Metastasis* 2005, 22:533-538.

Wie die Lymphknoten- und Lebermetastasierung ist auch die Lungenmetastasierung mit bestimmten nicht zufälligen chromosomalen Alterationen assoziiert. Lungenmetastasen zeigten an distinkten chromosomalen Banden mehr Alterationen als Lebermetastasen, vorzugsweise mehr Deletionen auf 1p, 3p, 9q, 12q, 17q, 19p und 22q und Gewinne auf 2q, 5p und Chromosom 6. Ein Vergleich der Lungenmetastasen mit den Primärtumoren zeigte zusätzliche Deletionen auf 3p, 8p, 12q, 17q und 21q21 und Gewinne auf 5p (Abbildung 4).

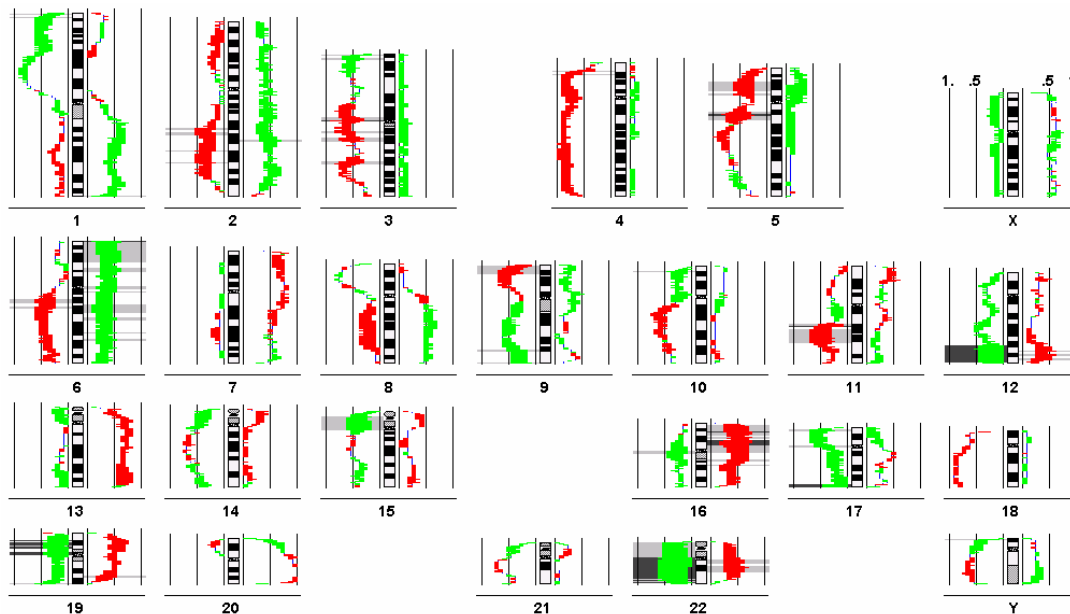


Abbildung 4: Differenzhistogramm der Lungenmetastasen (n=13) versus der Lebermetastasen (n=13), Rote Areale repräsentieren prozentuale Veränderungen, die nur in den Lebermetastasen vorliegen, grüne Veränderungen die nur in den Lungenmetastasen vorliegen. Das weiße Areal unterhalb der farbigen Areale zeigt den prozentualen Anteil, der bei beiden Gruppen gleich ist. Lungenmetastasen zeigen mehr Veränderungen als Lebermetastasen mit signifikanten Veränderungen, die als graue horizontale Linien wiedergegeben werden (hellgrau, Regionen mit 95% Signifikanz, dunkles grau, Regionen mit 99% Signifikanz nach Chi-Quadrat-Test), z. B. Verluste auf 3p, 12q und 17q.

Einzelne Ergebnisse und die Inzidenzkurven sind online verfügbar unter unserer „CGH online tumor database“ auf der Seite <http://amba.charite.de/cgh>. Mit Hilfe der Comparativen Genomischen Hybridisierung wurden insgesamt 85 Tumorproben untersucht. Die Proben stammten von den Primärtumoren (n=36) und von Metastasen, wobei 13 aus der Lunge und der Leber stammten, 12 aus Lymphknoten, sechs aus dem Gehirn, vier aus der Bauchwand und eine aus dem Ovar. In der Zusammenschau zeigen unsere Ergebnisse, daß bestimmte chromosomale Alterationen mit bestimmten Metastasierungswegen assoziiert sind. Einzelne Tumorzellen scheinen ein Metastasierungspotential („ready to go package“) zu haben, daß es den Zellen ermöglicht, die verschiedenen Schritte der Metastasierung, wie Ablösung vom Primärverband, Fähigkeit zur Intravasation, zur Extravasation und zum klonalen Wachstum einer Metastase im ortsfremden Gewebe, zu vollziehen. Diese Alterationen scheinen zum Teil schon im Primärtumor zu existieren.

Eine graphische Darstellung aller chromosomaler Imbalancen der einzelnen Tumorentitäten, ein Differenzdiagramm zwischen Lungen – und Lebermetastasen sowie ein Diagramm, bei dem korrespondierende Tumorpaare miteinander verglichen werden, sind der anhängenden Publikation zu entnehmen.

Literatur:

Thomas Knösel, Karsten Schlüns, Manfred Dietel, Iver Petersen. Chromosomal alterations in lung metastases of colorectal carcinomas: associations with tissue specific tumor dissemination. *Clinical & Experimental Metastasis* 2005, 22:533-538.

Aus Urheberrechtsgründen bleibt diese Seite weiß.

Aus Urheberrechtsgründen bleibt diese Seite weiß.

Aus Urheberrechtsgründen bleibt diese Seite weiß.

Aus Urheberrechtsgründen bleibt diese Seite weiß.

Aus Urheberrechtsgründen bleibt diese Seite weiß.

3.3 Prognoserelevante chromosomale Imbalanzen im kolorektalen Karzinom

Literatur: Thomas Knösel, Karsten Schlüns, Ulrike Stein, Holger Schwabe, Peter Michael Schlag, Manfred Dietel, Iver Petersen. Genetic imbalances with impact on survival in colorectal cancer patients. *Histopathology* 2003, Oct, 43(4):323-31.

In dieser Studie wurden die chromosomalen Imbalanzen mit dem Überleben der Patienten verglichen. Es zeigte sich mit Hilfe der Kaplan-Meier Analyse, daß Gewinne auf 2p14-15, 6q23-6q24, 15q22-15q23, 22q11.2 und Deletionen auf 1p36.1-36.2, 4q31.3, 4q35, 8q12-q21, 8p11.2 und 9p22 signifikant mit einem kürzeren Überleben der Patienten korrelierte, wobei eine Überexpression von 20q13.3 und Deletion von 18q11.2 signifikant mit einem längeren Überleben in diesem Tumorkollektiv korrelierte. Eine Multivariate Analyse identifizierte Gewinne auf 2p14-15, 15q22-23, 22q11.2 und Verluste auf 1p36.1-36.2 und 4q35 als unabhängige Variablen in Bezug auf ein kürzeres Überleben mit besserer Signifikanz als die klassischen klinikopathologischen Parameter wie Lymphknotenstatus und Tumordifferenzierung (Abbildung 5). Diese fünf Marker erlaubten eine Einteilung der Patienten in Gruppen mit „hohem“ und „niedrigem“ Risiko und können so im Rahmen einer „personalisierten Medizin“ als Einleitung einer bestimmten Therapieoption eine wichtige Rolle spielen.

Hinsichtlich weiterer Patientencharakteristika und einer ausführlichen Diskussion der einzelnen Loci sei auf die anhängende Publikation verwiesen.

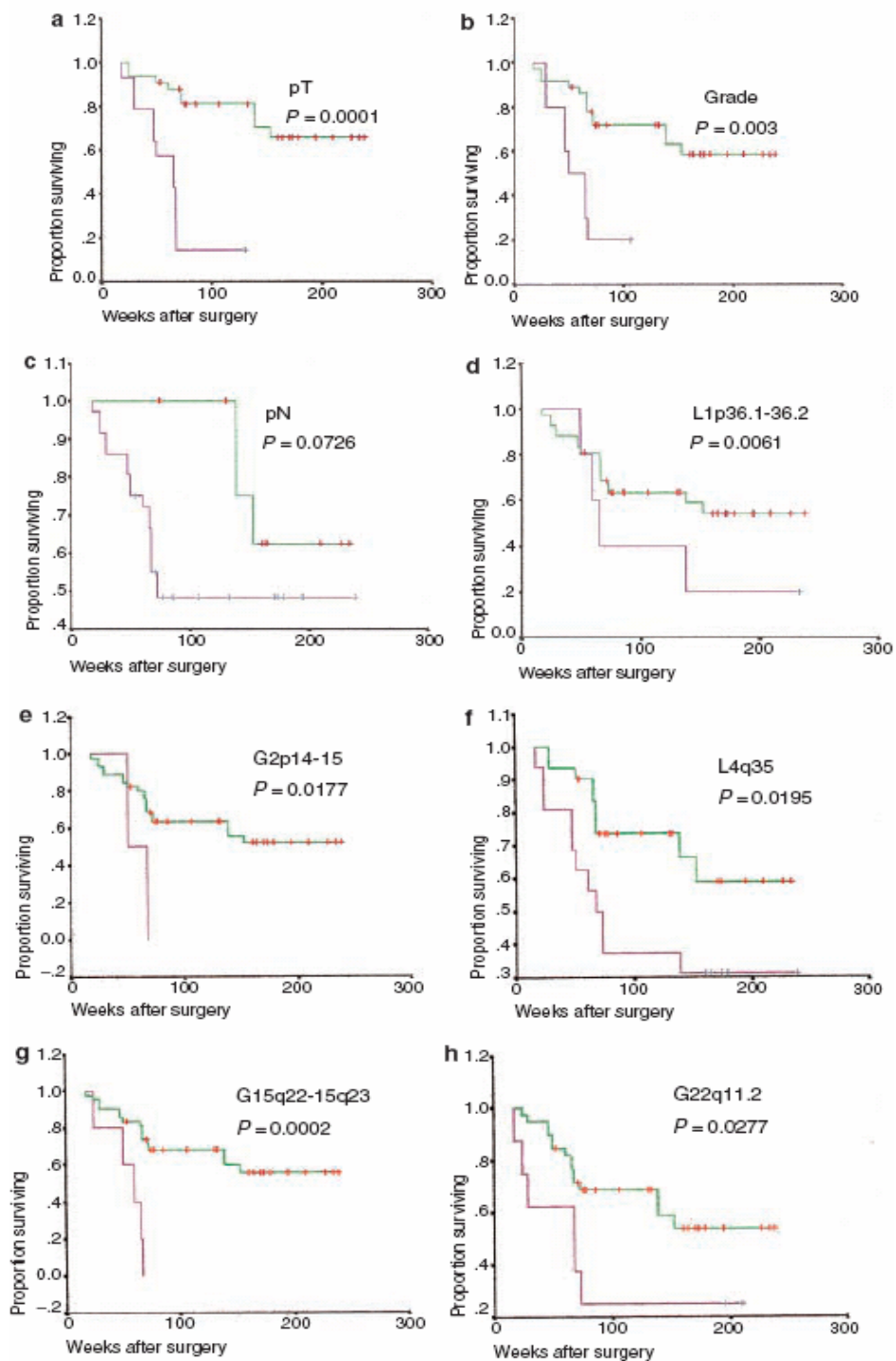


Abbildung 5: Kaplan-Meier Kurven mit krankheitsspezifischem Überleben in kolorektalen Karzinomen. A, pT2 und pT3 versus pT4. B, G1/G2 versus G3/G4. C, pN0 versus pN1 und pN2. D, 1p36.1-36.2 Verlust. E, 2p14-15 Gewinn. F, 4q35 Verlust. G, 15q22-23 Gewinn. H, 22q11.2 Gewinn (aus Knösel et al. 2003)

Literatur:

Thomas Knösel, Karsten Schlüns, Ulrike Stein, Holger Schwabe, Peter Michael Schlag, Manfred Dietel, Iver Petersen. Genetic imbalances with impact on survival in colorectal cancer patients. *Histopathology* 2003, Oct, 43(4):323-31.

Aus Urheberrechtsgründen bleibt diese Seite weiß.

Aus Urheberrechtsgründen bleibt diese Seite weiß.

Aus Urheberrechtsgründen bleibt diese Seite weiß.

Aus Urheberrechtsgründen bleibt diese Seite weiß.

Aus Urheberrechtsgründen bleibt diese Seite weiß.

Aus Urheberrechtsgründen bleibt diese Seite weiß.

Aus Urheberrechtsgründen bleibt diese Seite weiß.

Aus Urheberrechtsgründen bleibt diese Seite weiß.

3.4 Korrelationen zwischen DNA Imbalanzen und Genexpression auf DNA-Ebene und Proteinebene

Literatur: Thomas Knösel, Y. Yu, U. Stein, H. Schwabe, K. Schlüns, P.M. Schlag, M. Dietel, I. Petersen. Analysis of cyclooxygenase-2 expression and chromosomal gain in patients with advanced colorectal carcinomas. *Diseases of the Colon & Rectum* 2004, Jan;47(1):70-7.

Thomas Knösel, Y. Yu, U. Stein, H. Schwabe, K. Schlüns, P.M. Schlag, M. Dietel, I. Petersen. Overexpression of c-erbB-2 correlates with chromosomal gain in patients with advanced colorectal carcinomas. *Clinical and Experimental Metastasis*. 2002, 19: 401-407

Bei dem statistischen Vergleich der Gruppe der Primärtumoren mit derjenigen der Metastasen mittels eines CGH Differenzhistogramms ergab sich bei Chromosom 1q24-q25 eine distinkte Region, die statistisch signifikant häufiger in den Metastasen überrepräsentiert war (Abbildung 6). Genau in diesem Genombereich ist das COX-2 Gen lokalisiert (1q25.2-q25.3), welches im Gegensatz zum COX-1 Gen, einem sog. „House keeping gene“, eine wichtige Bedeutung in der Tumorigenese hat. Wir konnten zeigen, daß eine COX-2 Überrepräsentation auf der DNA Ebene mit einer COX-2 Überexpression auf der Proteinebene korreliert und daß die Veränderungen in den Metastasen stärker ausgeprägt sind. Die Kaplan-Meier Analyse zeigte, dass die COX-2 Überexpression signifikant mit einem kürzeren Überleben assoziiert war und so als prognostischer Marker dienen kann (Knösel et al. 2004).

Als Beispiel einer weiteren Region, die in der CGH signifikant häufiger bei metastasierenden kolorektalen Karzinomen betroffen war, ließ sich die chromosomale Region 17q12-q21 identifizieren. Diese Region beherbergt das c-erbB-2 Gen. Das Onkoprotein c-erbB-2, ein 185kd Protein mit Tyrosin Kinase Aktivität, gehört zur Familie der epithelialen Wachstumsfaktor-Rezeptoren (EGFR), die in der Genese vieler Tumorentitäten involviert ist. Wir konnten mittels unserer CGH Daten und der Immunhistochemie zeigen, daß eine Überexpression des c-erbB-2 Proteins mit einer Überrepräsentation des c-erbB-2 Locus in fortgeschrittenen kolorektalen Karzinomen korreliert und daß außerdem das Überleben der Patienten

von der c-erbB-2 Überexpression abhängig ist. Die c-erbB-2 Überexpression ist mit der Tumorprogression und dem metastatischen Phänotyp assoziiert (Knösel et al. 2002b).

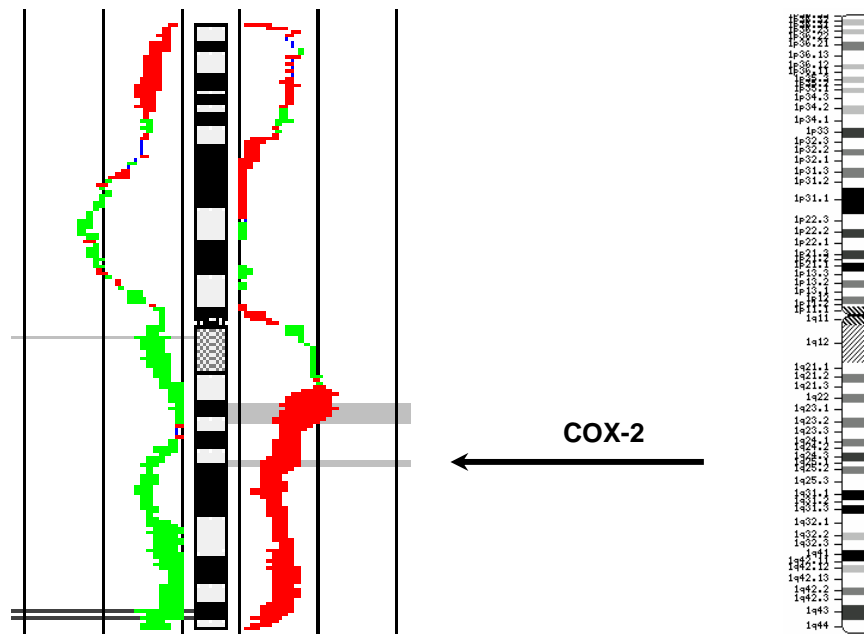


Abbildung 6: Differenzhistogramm von metastasierenden Primärtumoren (n=24) und Metastasen (n=30). Die grün dargestellten Areale zeigen die Prozente an, die zusätzlich bei den Primärtumoren vorlagen. Die roten Areale den prozentualen Anteil der zusätzlichen Veränderungen bei den Metastasen. Das darunterliegende weisse Areal den prozentualen Anteil gleicher Alterationen beider Gruppen. Die grauen horizontalen Striche signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen (Regionen mit 95 Prozent Signifikanz nach dem Chi-Quadrat-Test). Die Region 1q25.2-q25.3 zeigt interessanterweise eine signifikante Überrepräsentierung bei den Metastasen und genau in diesem Bereich ist auch das COX-2 Gen lokalisiert.

Eine ausführliche Diskussion der Ergebnisse ist der anhängenden Publikation zu entnehmen.

Literatur:

Thomas Knösel, Y. Yu, U. Stein, H. Schwabe, K. Schlüns, P.M. Schlag, M. Dietel, I. Petersen.
Analysis of cyclooxygenase-2 expression and chromosomal gain in patients with advanced colorectal carcinomas. *Diseases of the Colon & Rectum* 2004, Jan;47(1):70-7.

Aus Urheberrechtsgründen bleibt diese Seite weiß.

Aus Urheberrechtsgründen bleibt diese Seite weiß.

Aus Urheberrechtsgründen bleibt diese Seite weiß.

Aus Urheberrechtsgründen bleibt diese Seite weiß.

Aus Urheberrechtsgründen bleibt diese Seite weiß.

Aus Urheberrechtsgründen bleibt diese Seite weiß.

Aus Urheberrechtsgründen bleibt diese Seite weiß.

3.5 Immunprofile mit prognostischer und diagnostischer Bedeutung

Literatur: Thomas Knösel, Anna Emde, Karsten Schlüns, Karsten Jürchott, Peter Michael Schlag, Manfred Dietel, Iver Petersen. Immunoprofiles of 11 Biomarkers Using Tissue Microarrays Identify Prognostic Subgroups in Colorectal Cancer. *Neoplasia* 2005, Aug;7(8):741-7.

Thomas Knösel, Valeska Emde, Karsten Schlüns, Peter Michael Schlag, Manfred Dietel, Iver Petersen. Cytokeratin profiles identify Diagnostic Signatures in Colorectal Cancer Using multiplex analysis of tissue microarrays. *Cellular Oncology* 2006;28(4):167-75.

Die genomweiten Expressionsprofile haben eine Reihe von Genen identifiziert, die differentiell beim kolorektalen Karzinom exprimiert sind. Ebenso haben unsere Studien und die Studien anderer Forschungsgruppen relevante Kandidatenregionen identifiziert, die in der Tumorprogression von Bedeutung sind. Unsere Ziele in diesen Studien waren: 1) zu testen, ob diese Gene auch auf Proteinebene unterschiedlich exprimiert waren; 2) diese Biomarker in einem gut charakterisierten Patientenkollektiv zu evaluieren; 3) eine hierarchische Clusteranalyse auf die erhobenen immunhistochemischen Daten anzuwenden.

Gewebearrays von 351 kolorektalen Karzinomen von 270 Patienten wurden hergestellt und mit 21 verschiedenen Antikörpern angefärbt. Insgesamt wurden 6721 Proben ausgewertet. Evaluiert wurden in einer ersten Arbeit die Gene *Adam10*, *Cyclin D1*, *Annexin II*, *NFKB*, *Casein kinase 2 beta (CK2B)*, *YB-1*, *P32*, *Rad51*, *c-fos*, *IGFBP4*, und *Connexin26 (Cx26)*. In einer zweiten Arbeit die Cytokeratine *CK5*, *CK7*, *CK8*, *CK13*, *CK14*, *CK16*, *CK17*, *CK18*, *CK19* und *CK20*. Die Auswertung der einzelnen Gene und exemplarische Expressionsmuster sind in unserem *Berlin TMA-Portal* frei online abrufbar, siehe Abbildung 7 (<http://pathoweb.charite.de/tmaportal>).

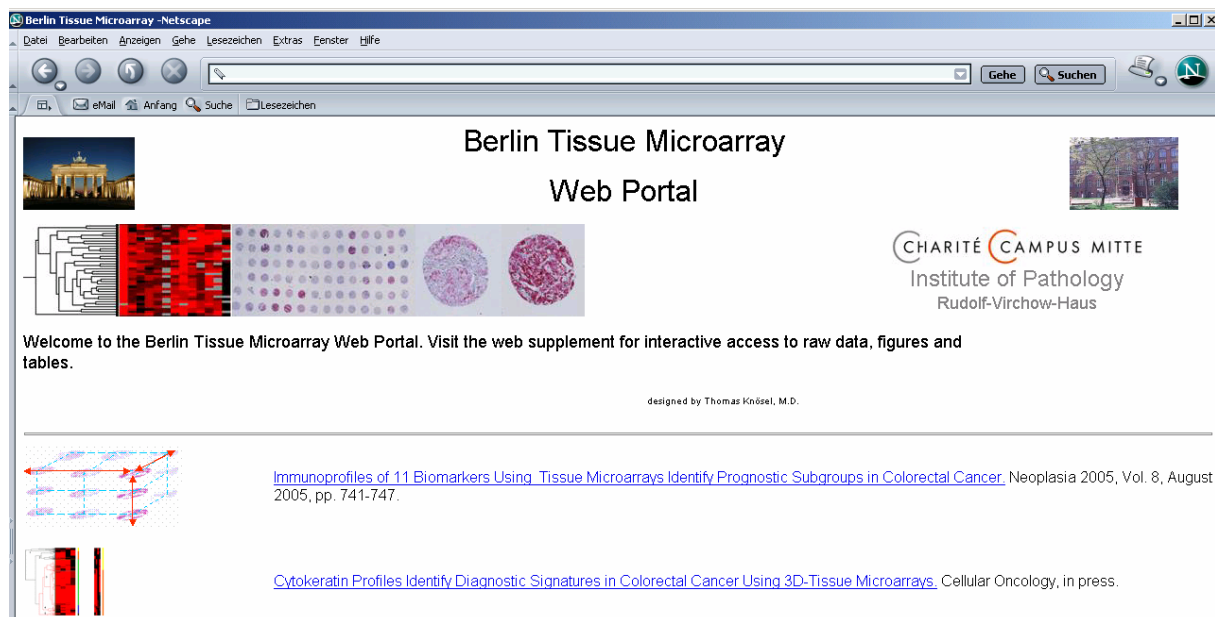


Abbildung 7: Online verfügbare Immunprofile verschiedener, differentiell exprimierter Antigene beim kolorektalen Karzinom.

Interessanterweise konnten durch eine unsupervisierte hierarchische Clusteranalyse verschiedene Subgruppen des kolorektalen Karzinoms identifiziert werden, die sich vom Normalgewebe, vom Tumorstadium und hinsichtlich des Überlebens der Patienten unterschieden (Abbildung 8). Das obere Cluster enthielt zu 85% pT3/4 Tumore und wurde so als „higher tumor stage cluster“ definiert. In diesem Cluster dominierte eine hohe Expression von Adam10 (Abbildung 8, B, vertikale Spalte), welche in der Einzelanalyse signifikant mit einem höheren Tumorstadium korrelierte (pT1/2 vs pT3/4, $P = 0.04$). Im zweiten Cluster, dem sogenannten „shorter survival cluster“, überlebten 79% der Patienten kürzer als 200 Wochen und ein relativ hoher Prozentsatz der Patienten (39%) hatte schlecht differenzierte Tumore (G3). In diesem Cluster dominierte eine verminderte Expression von Connexin 26 (CX26), welche in der Einzelanalyse signifikant mit einem kürzeren Überleben korrelierte und mit einem höheren Tumorstadium (G1/G2 vs G3, $P = 0.02$). Die Kaplan-Meier Analyse der zeigte, dass Cluster 2 („shorter survival cluster“) ein signifikant kürzeres Überleben zeigte als das Cluster 1 („higher tumor stage cluster“).

In der zweiten Arbeit konnte gezeigt werden, dass kolorektale Karzinome bestimmte Cytokeratinprofile besitzen, die prognostisch relevante Signaturen zeigen. Möglicherweise repräsentiert die verminderte Expression von Cytokeratin 8 und Cytokeratin 20 eine wichtige Rolle in der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT), welche eine wichtige Stufe zu sehr aggressiven Tumorzellklonen darstellt. Unsere Ergebnisse zeigten, dass das hierarchische Clustern der immunhistologischen Ergebnisse mit sogenannten 3D-TMAs (Abbildung 9) eine vielversprechende Methode ist, um auch in Zukunft mit verschiedenen Markern bei einzelnen bösartigen Neoplasien Subgruppen mit entsprechenden Signaturen bilden zu können.

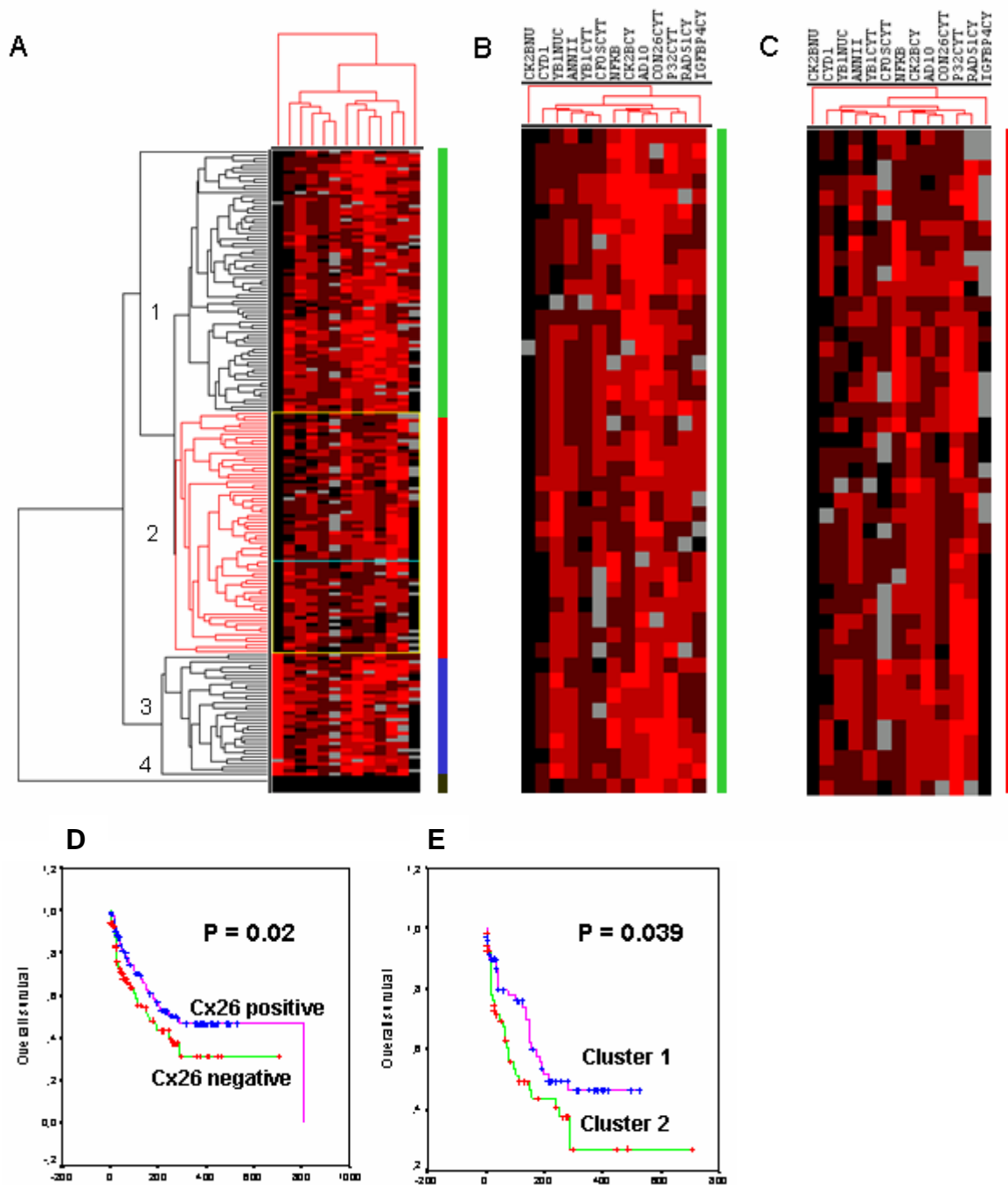


Abbildung 8: (A) Hierarchische Clusteranalyse der TMA Ergebnisse. In den Spalten sind die untersuchten Gene angegeben und in den Zeilen die Tumore. Die Expressionsstärke/Färbintensität des Markers ist über unterschiedliche Färbungen kodiert: rot-starke Expression; hellbraun-mittlere; dunkelbraun-geringe; schwarz-negativ und grau-keine auswertbaren Daten. (B) Vergrößerte Darstellung des sogenannten „higher tumor stage cluster“ (Cluster1) mit prominenter Adam 10 Expression (vertikale Linie). (C) Vergrößerte Darstellung des sogenannten „shorter survival cluster“ (Cluster2) mit reduzierter Cx26 Expression. Cluster 1, grün; Cluster 2 rot; Cluster 3, blau und Clustergruppe 4 als Normalgewebe in schwarz wiedergegeben. (D) Kaplan-Meier Analyse von Connexin 26, (E) Kaplan-Meier Analyse mit Cluster 1 als sogenanntes „higher tumor stage cluster“ und Cluster 2 als „shorter survival cluster“

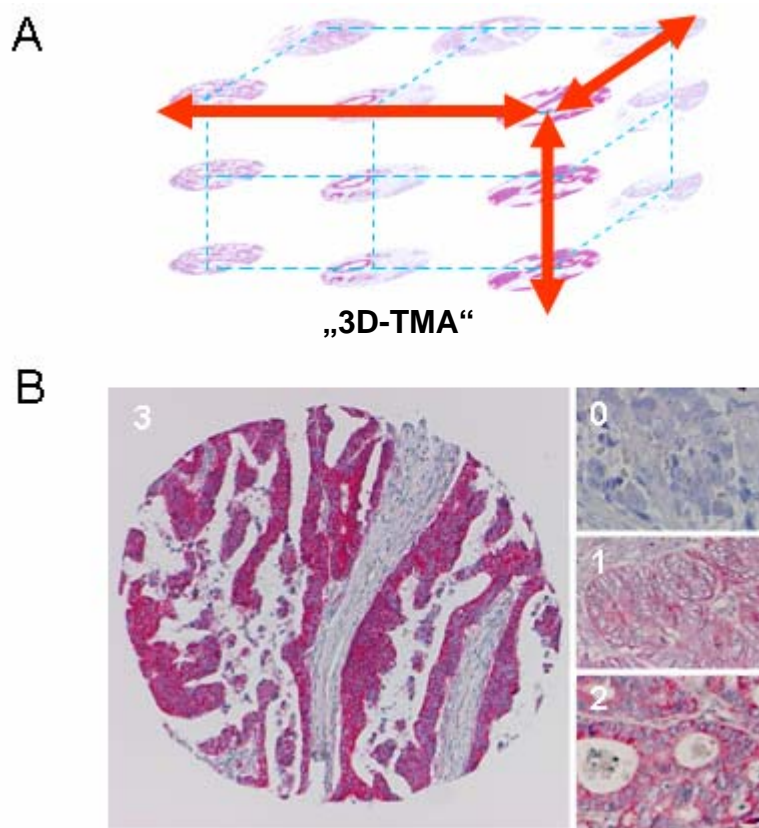


Abbildung 9: (A) Darstellung eines Tissue Microarrays (TMAs) mit Serienschnitten als sogenannter 3D-TMA, (B) Exemplarisches Expressionsmuster von Connexin 26 mit keiner (0), geringer (1), mittlerer (2) und starker Färbekraft (3)

Eine detaillierte Ergebnisdarstellung sowie eine ausführlichere Diskussion auch hinsichtlich der epithelialen-mesenchymalen Transformation (EMT) wird in der anhängenden Publikation dargestellt.

Literatur:

Thomas Knösel, Valeska Emde, Karsten Schlüns, Peter Michael Schlag, Manfred Dietel, Iver Petersen. Cytokeratin profiles identify Diagnostic Signatures in Colorectal Cancer Using multiplex analysis of tissue microarrays. Cellular Oncology 2006;28(4):167-75.

Aus Urheberrechtsgründen bleibt diese Seite weiß.

Aus Urheberrechtsgründen bleibt diese Seite weiß.

Aus Urheberrechtsgründen bleibt diese Seite weiß.

Aus Urheberrechtsgründen bleibt diese Seite weiß.

Aus Urheberrechtsgründen bleibt diese Seite weiß.

Aus Urheberrechtsgründen bleibt diese Seite weiß.

Aus Urheberrechtsgründen bleibt diese Seite weiß.

Aus Urheberrechtsgründen bleibt diese Seite weiß.

4. Diskussion

Krebs ist eine genetische Erkrankung und die Kanzerogenese des kolorektalen Karzinoms wird durch eine Akkumulation von genetischen Alterationen verursacht (Arends et al. 2002, Vogelstein et al. 1988 und 1998). Seit dieser Erkenntnis evaluierten mehrere Studien mittels der Comparativen Genomischen Hybridisierung (CGH) die chromosomalen Imbalanzen, die mit der Tumorentstehung und Tumorprogression assoziiert sind. In der ersten publizierten CGH Studie, welche auf frühe Alterationen in der Tumorprogression des kolorektalen Karzinoms fokussiert war, wurde DNA von normaler Colonschleimhaut, von „low grade“ und „high grade“ Adenomen und von Karzinomen analysiert (Ried et al. 1996). Die Autoren demonstrierten, dass eine Akkumulation von chromosomalen Veränderungen vorlag mit Gewinnen auf Chromosom 7 bei „low grade“ Adenomen, bei „high grade“ Adenomen mit einer Überrepräsentation auf Chromosom 7 und 20 und schliesslich mehreren Alterationen bei den Karzinomen auf Chromosom 1, 7p, 8q, 13 und 20 und Verluste auf Chromosom 4, 8p und 18q. Eine ähnliche Studie von Meijer und Kollegen (Meijer et al. 1998) bestätigte die Resultate. In fortgeschrittenen Stadien jedoch, in großen Tumorkollektiven und bei Metastasen, welche lymphogen oder hämatogen gestreut haben, sind noch keine vergleichenden CGH Analysen durchgeführt worden.

Die Tumorprogression und die Metastasierung jedoch sind verantwortlich für die meisten Todesfälle, welche durch Krebs hervorgerufen werden. Die Metastasierung ist der entscheidende Schritt von einem lokal wachsenden Tumor zu disseminierend proliferierenden zum Tode führenden Zweitgeschwülsten. Deshalb ist ein primäres Ziel unserer Forschung nicht nur die Kanzerogenese des Primärtumors, sondern auch der Prozeß der Metastasierung. Zur Manifestation einer mikroskopisch und

klinisch erkennbaren Metastase müssen die einzelnen Schritte, wie die Loslösung der Tumorzellen vom primären Gewebsverband, die Intravasation, dem Überleben im Lymph- oder Blutgefäß und die Extravasation, um sich in einem anderen Gewebe festzusetzen und dort auch klonal zu wachsen, komplett vollzogen werden. Das Fehlen nur eines Schrittes, wie z. B. der Unfähigkeit in ein anderes Organ einzudringen oder dort zu wachsen, resultiert in der Elimination oder einem Ruhezustand („dormancy“) der Tumorzellen. Nur wenige Gene sind bis jetzt direkt mit diesem Prozeß korreliert worden, wie PRL-3, KAI, nm23, KISS, Osteopontin und TWIST und das Erstellen von sogenannten molekularen Signaturen, die mit der Metastasierung assoziiert sind, ist zur Zeit Gegenstand aktueller Forschung (Bardelli et al. 2003, Yalcinkaya et al. 2006, Liu H et al. 2003, Sagakuchi et al. 2006, Ramaswamy S et al. 2003, Yang et al. 2006). Therapeutische Strategien um die Metastasierung zu verhindern oder zumindest einzugrenzen wären ein großer Fortschritt in der Krebsbehandlung.

Paget postulierte im Jahre 1898, dass die Gewebeumgebung („the soil“ / die Muttererde) die Implantation, die Invasion, das Überleben und schließlich das Wachsen der Tumorzellen („the seeds“ / die Samen) beeinflussen (Paget 1989). Diese Hypothese würde zumindestens Metastasierungsmuster erklären, die nicht allein durch mechanische oder strömungsbedingte Theorien nachvollziehbar sind.

Um einen zytogenetischen Einblick in den komplexen Vorgang der Metastasierung und auch der organspezifischen Metastasierung zu geben, haben wir zum einen 85 Proben kolorektaler Karzinome von verschiedenen Lokalisationen mit den korrespondierenden Metastasen mit Hilfe der Comparativen Genomischen Hybridisierung (CGH) untersucht. Zum anderen sind entsprechende Kandidatengene auf der Proteinebene mittels der Immunhistochemie (IH) validiert und mit den CGH-Ergebnissen und klinischen Parametern korreliert worden. Vielversprechende

Hochdurchsatzmethoden, wie die Gewebearrays (Tissue microarrays, TMAs) und moderne statistische Verfahren, wie das hierarchische Clustering, ermöglichten das Erstellen sogenannter Immunprofile oder auch Proteinsignaturen an insgesamt 6721 Proben.

4.1 Kandidatenregionen während der Metastasierung

Unsere Untersuchungen wiesen insbesondere darauf hin, daß trotz der Variabilität des Tumorgenoms die chromosomalen Alterationen nicht einem „genetischen Chaos“ unterliegen, sondern dass offensichtlich wiederkehrende Aberrationsmuster existieren, die sich mit der Tumorprogression und dem Phänotyp der Metastasierung assoziieren lassen (Knösel et al. 2004, Knösel et al. 2002, Petersen 2000).

Erstaunlich ist, dass sich bereits mit der relativ niedrigen Auflösung der konventionellen CGH auf chromosomaler Ebene Läsionen detektieren lassen, die sich mit der Organ-spezifischen Metastasierung in das Gehirn, den Lymphknoten, der Leber und der Lunge korrelieren lassen (Petersen et al. 2000, Knösel et al. 2004, Knösel et al. 2005). Entsprechende chromosomale Imbalanzen, die bereits gehäuft im Primärtumor nachweisbar sind, spielen möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Initialisierung der Tumorzell dissemination („metastasis initializer lesions“). Dagegen beeinflussen Läsionen, die vermehrt zusätzlich bei den Metastasen zu beobachten sind, womöglich eher den Phänotyp der Metastasierung, wie beispielsweise die organspezifische Metastasierung, und sollten als sogenannte „metastasis modulator lesions“ eingestuft werden (Knösel et al. 2002, Goeze et al. 2002).

Einige der von uns identifizierten chromosomalen Imbalanzen, wie Verluste auf 1p, 3p, 4, 5q, 10q, 14q und 21q und Gewinne auf 1q,11, 12qter, 17q12-21, 19, und 22q sind schon mit der Tumorprogression und partiell auch mit der Tumorzell dissemination assoziiert worden (Knösel et al 2002, Ogunbiyi et al 1997, Diep et al. 2003). Auch wurden schon einige Kandidatengene beschrieben, wie S100A4 und COX-2 auf 1q (Knösel et al. 2003, Li et al. 2006), BLU auf 3p (Agathangelou et al 2003), APC auf 5q21 (Fearon et al. 1990), cerbB2 auf 17q21 (Knösel et al. 2002), AIB1 auf 20q (Ghadimi et al. 1990) und MMP11 auf 22q12.2 (Matrisian 1990).

Eine schematische Übersicht über die detektierten chromosomalen Veränderungen im Rahmen der Tumorprogression von kolorektalen Karzinomen gibt Abb. 10 (chromosomales Tumorprogressionsmodell, Knösel et al. 2005). Ähnlich wie beim Tumorprogressionsmodell von Fearon und Vogelstein (Fearon and Vogelstein 1990), welches sich auf die genetischen Läsionen und Mutationen konzentriert, ist die Akkumulation von chromosomalen Veränderungen wichtiger als die Reihenfolge in der die Alterationen vorliegen. Die unterschiedlichen Pfeile sollen zeigen, dass *kein* lineares Modell vorliegt, sondern dass höchstwahrscheinlich unabhängige Metastasierungswege vorliegen, die durch nicht zufällige chromosomale Alterationen gekennzeichnet sind. Interessanterweise überlappen sich einige der chromosomalen Veränderungen, was klinischerseits damit korreliert, dass einige Tumore sowohl Lymphknotenmetastasen als auch hämatogene Metastasen in Leber und Lunge entwickeln (Knösel et al 2005).

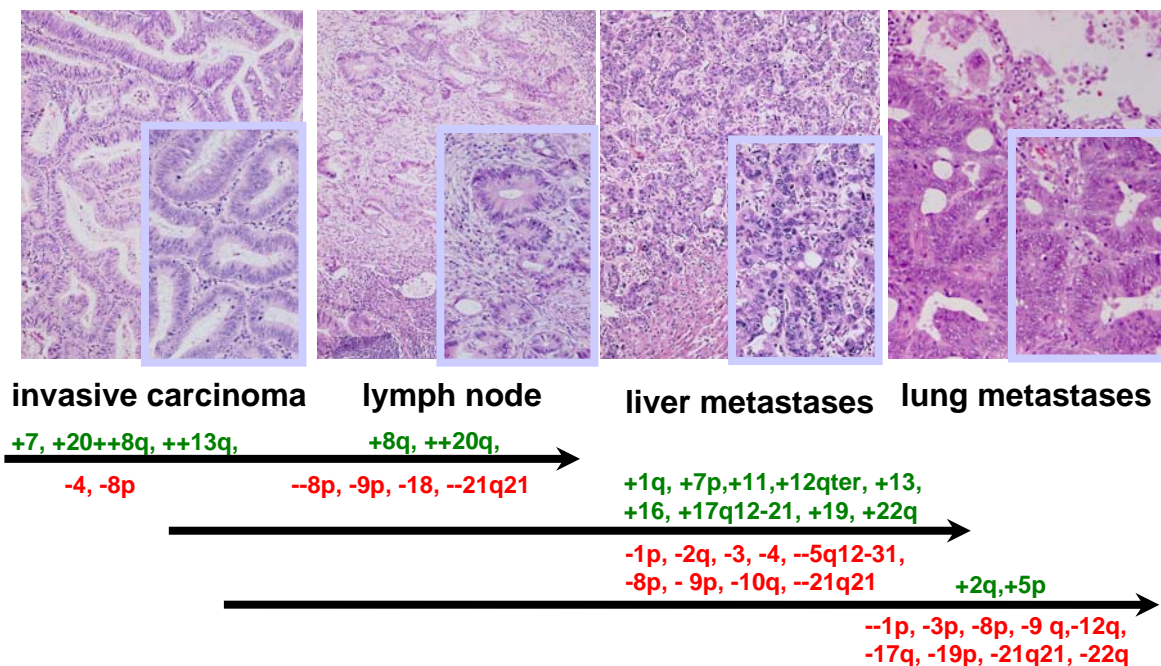


Abbildung 10: Chromosomales Tumorprogressionsmodell kolorektaler Karzinome mit typischen chromosomalen Veränderungen. Gewinne sind in grün, Deletionen in rot wiedergegeben. Die unterschiedlichen Pfeile zeigen an, dass die verschiedenen Metastasierungswegen nicht notwendigerweise linear ablaufen müssen, sondern auch unabhängig von einander vorliegen können. Einige der chromosomalen Alterationen sind jedoch auch bei allen Metastasierungswegen zu detekieren (z. B. Deletionen auf 8p und 21p21) (Knösel et al. 2005).

4.2 Kandidatengenanalyse mittels Proteinexpression

Die Kandidatengene Cyclooxygenase 2 (COX-2) und cerbB-2 wurden bereits am selben Tumormaterial auf Proteinebene mit Hilfe der Immunhistologie evaluiert und es konnten signifikante Korrelationen mit dem krankheitsspezifischem Überleben aufgestellt werden (Knösel et al. 2002, Knösel et al. 2004). Diese Untersuchungen erfolgten bereits unter Einbeziehung mit der oben beschriebenen Methode der Tissue Microarrays (TMAs), siehe auch Abbildung 11.

Darüber hinaus wurde die TMA-Analytik ergänzt durch das hierarchische Clustering der immunhistologischen Daten. Ähnlich wie bei den cDNA- und

Oligonukleotid-Microarrays besteht dadurch die Möglichkeit, ein Tumorkollektiv anhand der Expressionsprofile (Proteinsignaturen) in mehrere Subgruppen zu unterteilen (siehe auch Abb. 12). Insgesamt wurden bisher 22 Biomarker an dem vorhandenen TMA-Tumorkollektiv untersucht (Knösel et al. 2005, Knösel et al. 2006). Die Auswertung der einzelnen Gene und exemplarische Expressionsmuster sind in unserem *Berlin TMA-Portal* über das Internet abrufbar (<http://pathoweb.charite.de/tmaportal>). Insgesamt wurden 6721 Proben untersucht.

> 50 000 Gene / 1 Gewebeprobe 1 Gen / 1000 Gewebeproben

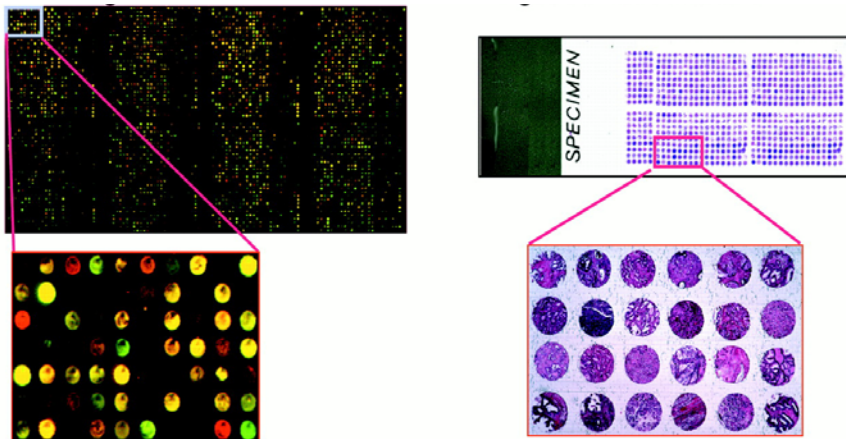


Abbildung 11: Bei der RNA/DNA Analytik von Tumoren werden einzelne Gewebeproben auf mehrere 10000 Parameter/Gene untersucht. Die Tissue Microarray (TMA) Analytik erlaubt die Validierung einzelner Gene durch die simultane Untersuchung von bis zu 1000 Tumore (Abb. adaptiert nach Kononen et al. 1998)

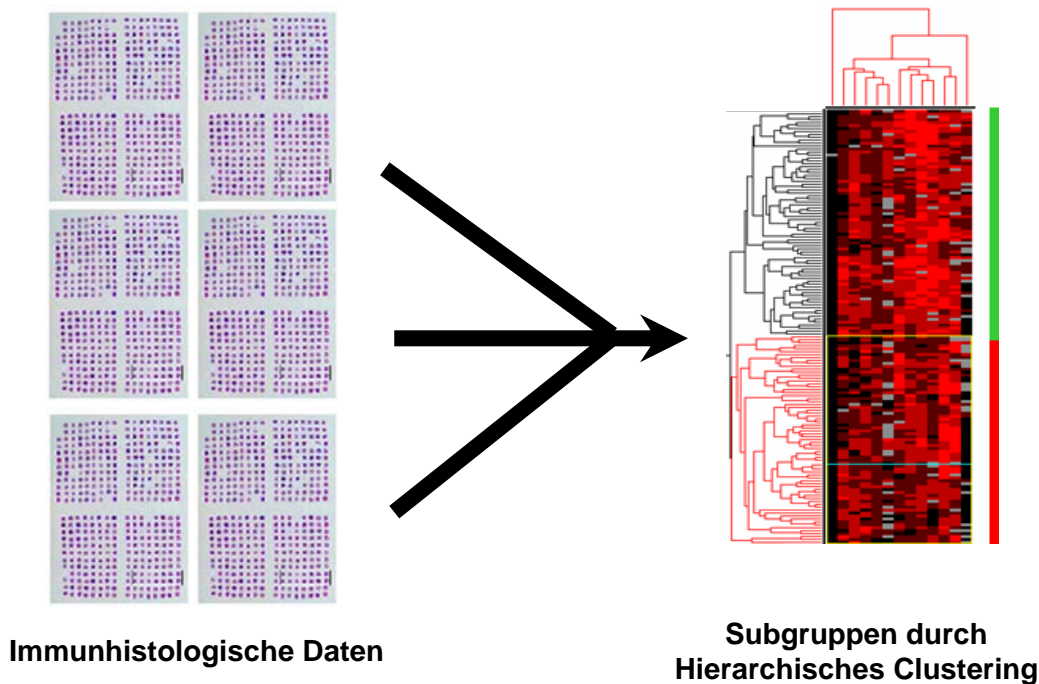


Abbildung 12: Interpretation der immunhistologischen Daten mehrerer TMA-Schnitte in eine hierarchische Clusteranalyse (siehe Knösel et al. 2005).

In der Zusammenschau zeigten unsere Ergebnisse neue chromosomale Alterationen, die mit bestimmten Metastasierungswegen assoziiert sind. Einzelne Tumorzellen scheinen ein Metastasierungspotential („ready to go package“) zu haben, daß es den Zellen ermöglicht, die verschiedenen Schritte der Metastasierung, wie Ablösung vom Primärverband, Fähigkeit zur Intravasation, zur Extravasation und zum klonalen Wachstum einer Metastase im ortsfremden Gewebe, zu vollziehen. Diese Alterationen scheinen zum Teil schon im Primärtumor zu existieren. Die Ergebnisse werden auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt, die chromosomale Alterationen von einzeln disseminierten Tumorzellen im Knochenmark untersuchten und feststellten, dass z. T. die gleichen Alterationen bereits im Primärtumor vorlagen (Klein C 2003).

Des weiteren konnte gezeigt werden, dass innerhalb der entdeckten Kandidatenregionen auf DNA-Ebene auch verschiedene Kandidatengene existieren,

die auf Proteinebene sowohl mit der Überexpression auf DNA-Ebene als auch mit den klinisch-pathologischen Parametern signifikant korrelierten und somit als prognostisch und diagnostisch wichtige Signaturen dienen können.

Die Synergie, der in serienschnitten angefertigten Gewebearrays als sogenannte 3D-TMAs und die hierarchische Clusteranalyse, sind eine vielversprechende Methode, um auch in Zukunft mit verschiedenen molekularen Markern bei einzelnen bösartigen Neoplasien Subgruppen mit entsprechenden Signaturen bilden zu können. Diese Signaturen werden die morphologisch ähnlichen oder gleichen Neoplasien molekularpathologisch weiter subklassifizieren und eine individualisierte Therapieplanung möglich machen.

5. Zusammenfassung

Bösartige Neubildungen des Kolorektums sind die zweithäufigste Krebstodesursache bei Männern und die dritthäufigste Krebstodesursache bei Frauen. Die Tumorprogression und die Metastasierung sind verantwortlich für die meisten Todesfälle. Deshalb ist ein primäres Ziel unserer Forschung nicht nur die molekulare Kanzerogenese des Primärtumors, sondern auch der Prozeß der Metastasierung. Mit Hilfe der Comparativen Genomischen Hybridisierung (CGH) wurden 85 kolorektale Karzinome analysiert und verschiedene neue genomische Alterationen detektiert, die mit bestimmten Metastasierungswegen assoziiert sind. Einzelne Tumorzellen scheinen ein Metastasierungspotential („ready to go package“) zu haben, das es den Zellen ermöglicht, die verschiedenen Schritte der Metastasierung, wie Ablösung vom Primärverband, Fähigkeit zur Intravasation, zur Extravasation und zum klonalen Wachstum einer Metastase im ortsfremden Gewebe, zu vollziehen. Diese Alterationen scheinen zum Teil schon im Primärtumor zu existieren. Die Ergebnisse werden auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt, die chromosomale Alterationen von einzeln disseminierten Tumorzellen im Knochenmark untersuchten und feststellten, dass z. T. die gleichen Alterationen bereits im Primärtumor vorlagen.

Um einen zytogenetischen Einblick in den komplexen Vorgang der Metastasierung und auch der organspezifischen Metastasierung zu geben, stellen wir anhand unserer Ergebnisse ein Tumorprogressionsmodell mit typischen chromosomalen Veränderungen auf. Zum anderen sind entsprechende Kandidatengene auf Proteinebene mittels Immunhistochemie validiert und mit den CGH Ergebnissen korreliert worden, wie COX-2 auf 1q25.2-q25.3 und c-erbB2 auf 17q12-q21, welche mit einem kürzeren Überleben korrelierten. Diese

Untersuchungen erfolgten bereits mit den sogenannten Gewebearrays (TMAs), mit deren Hilfe ein großes und gut charakterisiertes Tumorkollektiv erstellt worden ist. Mit Hilfe einer multiplexen Analyse dieser TMAs in aufeinanderfolgenden Serienschnitten (3D-TMAs) konnten mehrere interessante Kandidatengene analysiert und evaluiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe des hierarchischen Clusters verschiedene Immunprofile erstellt werden, die signifikant mit den klinisch-pathologischen Parametern korrelierten und somit als prognostisch und diagnostisch wichtige Signaturen dienen können.

Diese Signaturen werden die morphologisch ähnlichen oder gleichen Neoplasien molekularpathologisch weiter subklassifizieren und eine individualisierte Therapieplanung möglich machen.

6. Literaturverzeichnis

1. Agathangelou A, Dallol A, Zochbauer-Muller S, Morrissey C, Honorio S, Hesson L, Martinsson T, Fong KM, Kuo MJ, Yuen PW, Maher ER, Minna JD, Latif F. Epigenetic inactivation of the candidate 3p21.3 suppressor gene BLU in human cancers. *Oncogene* 2003; 22, 1580-8.
2. Al-Mulla F, Behbehani AI, Bitar MS, Varadharaj G, Going JJ. Genetic profiling of stage I and II colorectal cancer may predict metastatic relapse. *Mod Pathol.* 2006 May;19(5):648-58.
3. Anderson GR, Brenner BM, Swede H, Chen N, Henry WM, Conroy JM, Karpenko MJ, Issa JP, Bartos JD, Brunelle, Jahreis GP, Kahlenberg MS, Basik M, Sait S, Rodriguez-Bigas MA, Nowak NJ, Petrelli NJ, Shows TB, Stoler DL. Intrachromosomal genomic instability in human sporadic colorectal cancer measured by genome-wide allelotyping and inter-(simple sequence repeat) PCR. *Cancer Res.* 2001 Nov 15;61(22):8274-83.
4. Arends JW, Molecular interactions in the Vogelstein model of colorectal carcinoma, *J. Pathol.* 2000; 190: 412–416.
5. Bardelli A, Saha S, Sager JA, Romans KE, Xin B, Markowitz SD, Lengauer C, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B. PRL-3 expression in metastatic cancers. *Clin Cancer Res.* 2003 Nov 15;9(15):5607-15.
6. Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, Knuechel R, Kirchner T. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Aug 28;98(18):10356-61.

7. Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T. Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2005 Sep;5(9):744-9. Review.
8. Clarke MF, Fuller M. Stem cells and cancer: two faces of eve. *Cell*. 2006 Mar 24;124(6):1111-5.
9. De Angelis PM, Stokke T, Beigi M, Mjaland O, Clausen OP. Prognostic significance of recurrent chromosomal aberrations detected by comparative genomic hybridization in sporadic colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2001 Feb;16(1):38-45.
10. Diep CB, Parada LA, Teixeira MR, Eknaes M, Nesland JM, Johansson B, Lothe RA. Genetic profiling of colorectal cancer liver metastases by combined comparative genomic hybridization and G-banding analysis. *Genes Chromosomes Cancer* 2003; 36: 189-97.
11. Dietel M, Sers C. Personalized medicine and development of targeted therapies: the upcoming challenge for diagnostic molecular pathology. A review. *Virchows Arch*. 2006 Jun;448(6):744-55.
12. Fearon ER and Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61:759-767.
13. Flanagan JM, Healey S, Young J, Whitehall V, Trott DA, Newbold RF, Chenevix-Trench G. Mapping of a candidate colorectal cancer tumor-suppressor gene to a 900-kilobase region on the short arm of chromosome 8. *Genes Chromosomes Cancer*. 2004 Jul;40(3):247-60.
14. Gaasenbeek M, Howarth K, Rowan AJ, Gorman PA, Jones A, Chaplin T, Liu Y, Bicknell D, Davison EJ, Fiegler H, Carter NP, Roylance RR, Tomlinson IP. Combined array-comparative genomic hybridization and single-nucleotide polymorphism-loss of heterozygosity analysis reveals complex changes and

- multiple forms of chromosomal instability in colorectal cancers. *Cancer Res.* 2006 Apr 1;66(7):3471-9.
15. Galanis E, Alberts SR, and O'Connell MJ. New adjuvant therapy for colon cancer: justified hope or commercial hype. *Surg Oncol Clin North Am.* 2000; 9: 813-23.
 16. Georgiades IB, Curtis LJ, Morris RM, Bird CC, Wyllie AH. Heterogeneity studies identify a subset of sporadic colorectal cancers without evidence for chromosomal or microsatellite instability. *Oncogene* 1999; 18: 7933-7940.
 17. Ghadimi M, Schröck E, Walker RL, Wangsa D, Jauho A, Meltzer PS, Ried T. Specific chromosomal aberrations and amplifications of the AIB1 nuclear receptor coactivator gene in pancreatic carcinomas. *Am J Pathol* 1999; 154: 525-536.
 18. Goeze A, Schluns K, Wolf G, Thasler Z, Petersen S, Petersen I. Chromosomal imbalances of primary and metastatic lung adenocarcinomas. *J Pathol.* 2002 Jan;196(1):8-16.
 19. Grade M, Becker H, Liersch T, Ried T, Ghadimi BM. Molecular cytogenetics: genomic imbalances in colorectal cancer and their clinical impact. *Cell Oncol.* 2006;28(3):71-84.
 20. Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA: Cancer statistics 2000. *CA Cancer J Clin* 2000; 50:7-33.
 21. Halling KC, French AJ, McDonnell SK, Burgart LJ, Schaid DJ, Peterson BJ, Moon-Tasson L, Mahoney MR, Sargent DJ, O'Connell MJ, Witzig TE, Farr GH Jr, Goldberg RM, Thibodeau SN. Microsatellite instability and 8p allelic imbalance in stage B2 and C colorectal cancers. *J Natl Cancer Inst.* 1999 Aug 4;91(15):1295-303.

22. Höfler H, Becker KF, Keller G. Molecular carcinogenesis of the upper gastrointestinal tract. *Verh Dtsch Ges Pathol.* 2003;87:123-9.
23. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, Thun MJ. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin.* 2006 Mar-Apr;56(2):106-30.
24. Kinzler KW, Vogelstein B. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature.* 1997 Apr 24;386(6627):761, 763.
25. Klein CA, Klein CA. From single disseminated tumor cells to metastasis insights from molecular genetic analyses of single cells. *Verh Dtsch Ges Pathol.* 2003;87:158-64.
26. Knösel T, Emde A, Schlüns K, Chen Y, Jürchott K, Krause M, Dietel M, Petersen I. Immunoprofiles of 11 biomarkers using tissue microarrays identify prognostic subgroups in colorectal cancer. *Neoplasia.* 2005 Aug;7(8):741-7.
27. Knösel T, Emde V, Schlüns K, Schlag PM, Dietel M, Petersen I. Cytokeratin profiles identify diagnostic signatures in colorectal cancer using multiplex analysis of tissue microarrays. *Cell Oncol.* 2006;28(4):167-75.
28. Knösel T, Petersen S, Schwabe H, Schlüns K, Stein U, Schlag PM, Dietel M, Petersen I. Incidence of chromosomal imbalances in advanced colorectal carcinomas and their metastases. *Virchows Arch.* 2002 Feb;440(2):187-94.
29. Knösel T, Schlüns K, Dietel M, Petersen I. Chromosomal alterations in lung metastases of colorectal carcinomas: associations with tissue specific tumor dissemination. *Clin Exp Metastasis.* 2005;22(7):533-8.
30. Knösel T, Schlüns K, Stein U, Schwabe H, Schlag PM, Dietel M, Petersen I. Chromosomal alterations during lymphatic and liver metastasis formation of colorectal cancer. *Neoplasia.* 2004 Jan-Feb;6(1):23-8.

31. Knösel T, Schlüns K, Stein U, Schwabe H, Schlag PM, Dietel M, Petersen I. Genetic imbalances with impact on survival in colorectal cancer patients. *Histopathology*. 2003 Oct;43(4):323-31.
32. Knösel T, Yu Y, Stein U, Schwabe H, Schlüns K, Schlag PM, Dietel M, Petersen I. Overexpression of cyclooxygenase-2 correlates with chromosomal gain at the cyclooxygenase-2 locus and decreased patient survival in advanced colorectal carcinomas. *Dis Colon Rectum*. 2004 Jan;47(1):70-7.
33. Knösel T, Yu Y, Stein U, Schwabe H, Schlüns K, Schlag PM, Dietel M, Petersen I. Overexpression of c-erbB-2 protein correlates with chromosomal gain at the c-erbB-2 locus and patient survival in advanced colorectal carcinomas. *Clin Exp Metastasis*. 2002;19(5):401-7.
34. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998; 4:844-847.
35. Leedham SJ, Schier S, Thliveris AT, Halberg RB, Newton MA, Wright NA. From gene mutations to tumours--stem cells in gastrointestinal carcinogenesis. *Cell Prolif*. 2005 Dec;38(6):387-405. Review.
36. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature (London)*, 1998 Dec 17; 396, 643-649.
37. Li ZH, Bresnick AR. The S100A4 metastasis factor regulates cellular motility via a direct interaction with myosin-IIA. *Cancer Res*. 2006 May 15;66(10):5173-80.
38. Liu H, Ye SL. Research on functional localization and cloning of metastasis suppressor genes. *Ai Zheng*. 2003 Nov;22(11):1237-40.
39. Macdonald JS. Adjuvant therapy of colon cancer. *CA Cancer J Clin* 1999; 49, 202-19.

40. O'Connell MJ, Schaid DJ, Ganju V, Cunningham J, Kovach JS, and Thibodeau SN. Current status of adjuvant chemotherapy for colorectal cancer: Can molecular markers play a role in predicting prognosis? *Cancer* 1992; 70 Suppl:1732-9.
41. Martinez-Lopez E, Abad A, Font A, Monzo M, Ojanguren I, Pifarre A, Sanchez JJ, Martin C, Rosell R. Allelic loss on chromosome 18q as a prognostic marker in stage II colorectal cancer. *Gastroenterology*. 1998 Jun;114(6):1180-7.
42. Matrisian, LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet*. 1990; 6: 121-125.
43. McDonald SA, Preston SL, Lovell MJ, Wright NA, Jankowski JA. Mechanisms of disease: from stem cells to colorectal cancer. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2006 May;3(5):267-74. Review.
44. Meijer GA, Hermsen MA, Baak JP, van Diest PJ, Meuwissen SG, Belien JA, Hoovers JM, Joenje H, Snijders PJ, Walboomers JM. Progression from colorectal adenoma to carcinoma is associated with non-random chromosomal gains as detected by comparative genomic hybridisation. *J Clin Pathol*. 1998 Dec;51(12):901-9.
45. Ogunbiyi OA, Goodfellow PJ, Gagliardi G, Swanson PE, Birnbaum EH, Fleshman JW, Kodner IJ, Moley JF. Prognostic value of chromosome 1p allelic loss in colon cancer. *Gastroenterology* 1997; 113: 761-6.
46. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev*. 1989; 2: 98-101.
47. Petersen I, Hidalgo A, Petersen S, Schluns K, Schewe C, Pacyna-Gengelbach M, Goeze A, Krebber B, Knösel T, Kaufmann O, Szymas J, von Deimling A. Chromosomal imbalances in brain metastases of solid tumors. *Brain Pathol*. 2000 Jul;10(3):395-401.

48. Radtke F, Clevers H. Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science*. 2005 Mar 25;307(5717):1904-9. Review.
49. Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, Golub TR. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet*. 2003 Jan;33(1):49-54.
50. Reinisch C, Kandutsch S, Uthman A, Pammer J. BMI-1: a protein expressed in stem cells, specialized cells and tumors of the gastrointestinal tract. *Histol Histopathol*. 2006 Nov;21(11):1143-9.
51. Remmele W. *Pathologie des Verdauungstraktes. Band 2.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. 1996, 659-660.
52. Ried T, Knutzen R, Steinbeck R, Blegen H, Schrock E, Heselmeyer K, du Manoir S, Auer G. Comparative genomic hybridization reveals a specific pattern of chromosomal gains and losses during the genesis of colorectal tumors. *Genes Chromosomes Cancer*. 1996 Apr;15(4):234-45.
53. Sakaguchi H, Fujimoto J, Hong BL, Tamaya T. Clinical implications of osteopontin in metastatic lesions of uterine cervical cancers. *Cancer Lett*. 2006 May 2.
54. Saunders M, Iveson T. Management of advanced colorectal cancer: state of the art. *Br J Cancer*. 2006 Jul 17;95(2):131-8.
55. Schardt JA, Meyer M, Hartmann CH, Schubert F, Schmidt-Kittler O, Fuhrmann C, Polzer B, Petronio M, Eils R, Klein CA. Genomic analysis of single cytokeratin-positive cells from bone marrow reveals early mutational events in breast cancer. *Cancer Cell*. 2005 Sep;8(3):227-39.
56. Schlegel J, Stumm G, Scherthan H, Bocker T, Zirngibl H, Rüschoff J, Hofstaedter F. Comparative genomic in situ hybridization of colon carcinomas with replication error. *Cancer research* 1995 Dec 15;55:6002-6005.

57. Taal BG, Hageman PC, Delemarre JF, Bonfrer JM, den Hartog Jager FC. Metastatic ovarian or colonic cancer: a clinical challenge. *Eur J Cancer*. 1992;28(2-3):394-9.
58. Tan BT, Park CY, Ailles LE, Weissman IL. The cancer stem cell hypothesis: a work in progress. *Lab Invest*. 2006 Oct 30; [Epub ahead of print]
59. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*. 1988 Sep 1;319(9):525-32.
60. Vogelstein B, Kinzler K. *The Genetic Basis of Human Cancer*. Mc Graw-Hill. 1998
61. Vogl TJ, Mack MG, Balzer JO. Konressbericht: Innovative Diagnostik und Therapie des kolorektalen Karzinoms. *Deutsches Aerzteblatt* 2002 März, B, 718-719.
62. Wang JC, Dick JE. Cancer stem cells: lessons from leukemia. *Trends Cell Biol*. 2005 Sep;15(9):494-501. Review.
63. Watanabe T, Wu TT, Catalano PJ, Ueki T, Satriano R, Haller DG, Benson AB 3rd, Hamilton SR. Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med*. 2001 April 19; 344 (16):1196-206.
64. Weinstein IB, Joe AK. Mechanisms of disease: Oncogene addiction-a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nat Clin Pract Oncol*. 2006 Aug;3(8):448-456.
65. Yalcinkaya U, Ozuysal S, Bilgin T, Ercan I, Saraydaroglu O, Demir D. Nm23 expression in node-positive and node-negative endometrial cancer. *Int J Gynaecol Obstet*. 2006 Aug 17; [Epub ahead of print]
66. Yang J, Mani SA, Weinberg RA. Exploring a new twist on tumor metastasis. *Cancer Res*. 2006 May 1;66(9):4549-52. Review.

7. Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt dem Direktor des Institutes für Pathologie Herrn Professor Dietel für die Bereitstellung exzellenter Arbeitsbedingungen, die langjährige Zusammenarbeit und die stete Unterstützung während des wissenschaftlichen Arbeitens.

Besonders verbunden bin ich meinem Mentor Professor Iver Petersen, der für mich das Feld der Krebsforschung und überhaupt des wissenschaftlichen Arbeitens erst richtig eröffnet hat. Seine klare und analytische Sicht wissenschaftlicher Sachverhalte hat meine Arbeiten wesentlich geprägt.

Mein herzlicher Dank gilt der Arbeitsgruppe, insbesondere meinen Doktoranden Anna und Valeska Emde, dem Bioinformatiker Dr.-Ing. Karsten Schlüns, den Postdocs Fei Ye und Yuan Chen sowie den technischen Assistentinnen Manuela Pacyna Gengelbach und Nicole Deutschmann und der unterstützenden Sekretariatsarbeit von Martina Eickmann.

Herzlichen Dank an meine vielen Lehrerinnen und Lehrer im Institut für Pathologie, die mich in Rahmen der ärztlichen Weiterbildung betreuten und so auch neue Forschungsansätze entstehen ließen.

Danken möchte ich an dieser Stelle auch den klinischen Kooperationspartnern um Professor Schlag, insbesondere Ulrike Stein, Wolfgang Walther und Ina Wandler.

Vielen Dank an die nationalen und internationalen Kollaborations- und Diskussionspartner für die sehr inspirierenden Anregungen insbesondere an Joelle Tchinda an der Harvard University in Boston, und Mitch Garber von der Stanford-University.

Der Berliner Krebsgesellschaft und der Forschungskommission der Charité möchte ich für Ihre Förderung und Unterstützung an den verschiedenen Projekten danken.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie danken, ohne die ich nicht in der Lage gewesen wäre, diesen Weg zu gehen.

8. Eidesstattliche Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden und
- dass mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, den 06.12.2006

Dr. med. Thomas Knösel