

4 Ergebnisse

4.1 Herstellung von Seneszenzkontrollen aus Fibroblasten

Analog der Erstcharakterisierung von Onkogen-induzierter Seneszenz (OIS) durch Serrano 1997⁵⁴ sollte die mit dem Onkogen *ras* infizierte Fibroblastenzelllinie IMR90 in dieser Untersuchung als Kontrolle für Seneszenz verwendet werden. Dazu wurde das Onkogen *H-rasV12* bzw. ein Leervektor für die Negativkontrolle mittels retroviraler Infektion mit dem Vektor pBABE-*ras* bzw. pBABE-empty stabil in IMR90eco eingebracht. Nach Antibiotikaselektion mit Puromycin wurden verschiedene OIS-typische Kriterien beobachtet, um den seneszenten Phänotyp der IMR90ras gegenüber der proliferierenden IMR90empty nachzuweisen. Untersucht wurde das Wachstum der Zellpopulation anhand Wachstumskurven mit einer Messung der Viabilität. Beurteilt wurden außerdem die Zellmorphologie und das Färbeverhalten im SA-beta-Gal-Assay. Die Zellzyklusverteilung nach BrdU-PI-Inkorporation und der Nachweis von SAHF durch H3K9me³-Immunfluoreszenzfärbung zusammen mit einer DAPI-Kernfärbung wurden ebenfalls untersucht.

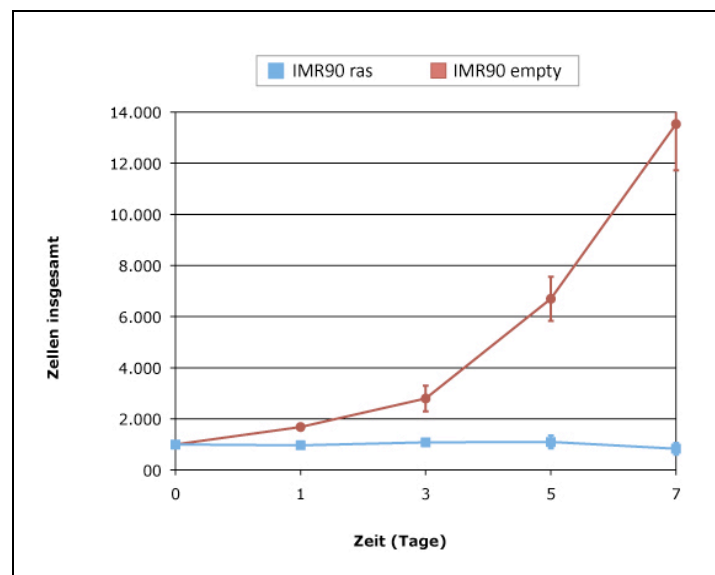


Abbildung 8: Wachstumskurve. Wachstumskurve der IMR90ras (blau) und IMR90empty (rot) ab Beendigung der Antibiotikaselektion an Tag 0. IMR90empty zeigen eine nahezu logarithmische Wachstumskurve während die IMR90ras leicht unter ihren Ausgangswert fallen. Die Viabilität lag konstant bei Werten >80 %. Es zeigt sich der Seneszenz-typische Wachstumsarrest der IMR90ras. Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus drei voneinander unabhängigen Experimenten.

Ergebnisse

Anhand der Wachstumskurven in Abbildung 8 erkennt man deutlich, dass die IMR90ras im dargestellten Zeitraum von sieben Tagen ab Beendigung der Antibiotikaselektion (Tag 0) in ihrer Gesamt-Zellzahl nicht mehr zunahm, sondern sogar ein wenig von 1000,0 Zellen auf $833,3 \pm 225,5$ Zellen abnahmen, wohingegen sich die IMR90empty nahezu exponentiell von 1000,0 Zellen auf $13533,3 \pm 1814,8$ Zellen vermehrten. Da die Viabilität zu allen gemessenen Zeitpunkten bei $>80\%$ lag, kann der Unterschied nicht durch apoptotischen Zellverlust erklärt werden, sondern deutet auf einen Wachstumsarrest hin.

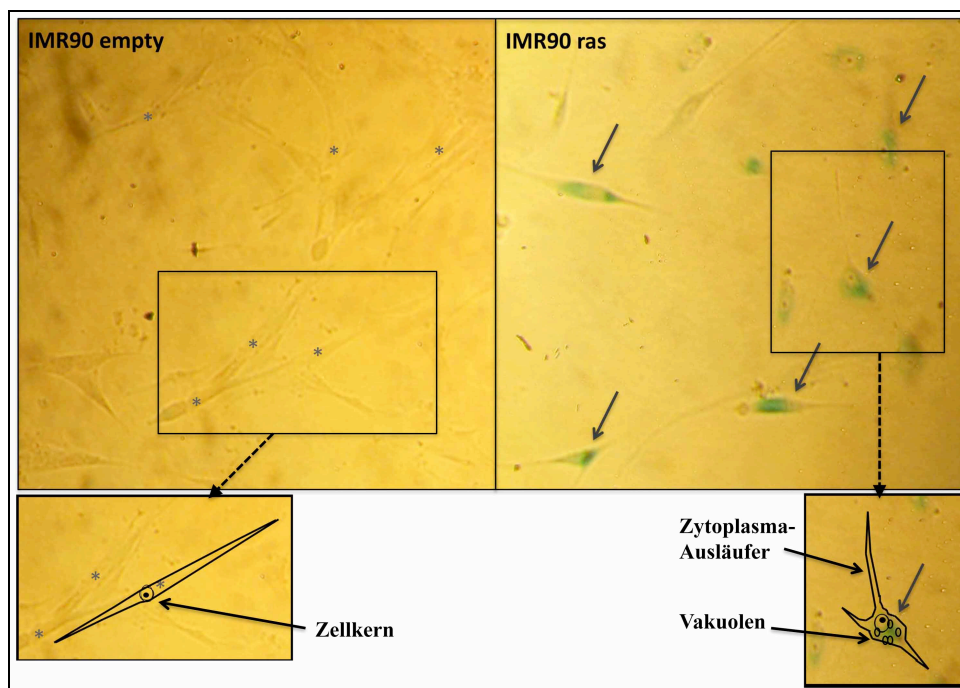


Abbildung 9: SA-beta-Gal-Assay. SA-beta-Gal-Assay der IMR90ras und IMR90empty an Tag 6 nach Antibiotikaselektion. IMR90empty (*) zeigten keine perinukleäre Blaufärbung und behielten ihre normale Spindelform. IMR90ras (→) veränderten sich morphologisch zu größeren Zellen mit Zytoplasmaausläufern und perinukleären Vakuolen. Im SA-beta-Gal-Assay zeigte sich die Seneszenz-typische perinukleäre Blaufärbung. Inkubationszeit des SA-beta-Gal-Assays betrug drei Stunden. 25 x vergrößert. Unten: Schematische Darstellung der Morphologie jeweils einer IMR90ras- und IMR90empty-Zelle.

Im SA-beta-Gal-Assay an Tag 6 nach Beendigung der Antibiotikaselektion zeigte sich bei den IMR90ras durchweg die Seneszenz-typische perinukleäre Blaufärbung wohingegen sich die IMR90empty nicht färbten (Abbildung 9). IMR90ras zeigten außerdem die für Seneszenz

Ergebnisse

typischen morphologischen Veränderungen (große, flache Zellen mit stärker ausgeprägter Granularität) während die IMR90empty die für Fibroblasten typische Spindelform behielten.

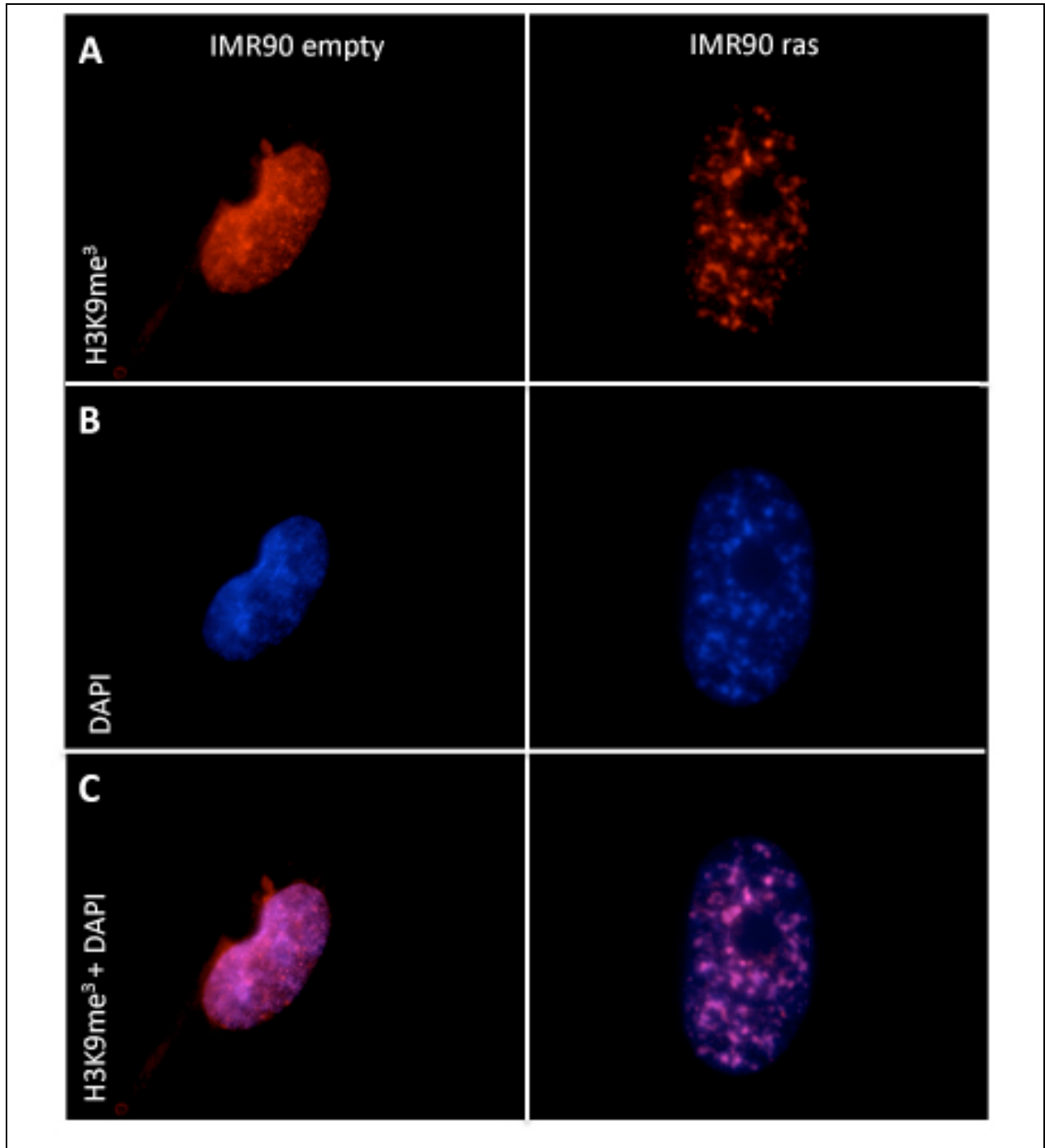


Abbildung 10: SAHF. Immunfluoreszenzfärbung auf H3K9me³ (A) und Gegenfärbung der Kerne mit DAPI (B) an IMR90ras und IMR90empty. C: Überlagerung der beiden Färbungen. IMR90empty zeigten eine diffuse Verteilung von H3K9me³ und DAPI. In den IMR90ras stellten sich sowohl die H3K9me³-, als auch die DAPI-Färbung in punktförmigen einander überlappenden Foci dar. 100 x vergrößert.

Ergebnisse

Die Immunfluoreszenzfärbungen auf SAHF zeigten in den IMR90empty sowohl bei H3K9me³, als auch bei DAPI eine eher homogene diffuse Verteilung im Zellkern (Abbildung 10). Bei den IMR90ras hingegen wurde die Seneszenz-typische Kondensation der DNS zu Heterochromatin durch die DAPI-Färbung sichtbar. Die ebenfalls punktförmige Verteilung in der H3K9me³-Färbung überlappt, wie bei seneszenten Zellen typisch, mit den DAPI-Foci.

Im Zellzyklusprofil der FACS-Analyse nach BrdU-Inkorporation konnte für die seneszenten IMR90ras ein Verlust der Synthese (S)-Phase gezeigt werden (Abbildung 11). Bei den IMR90empty befanden sich 7,6 % der Zellen in der S-Phase, wohingegen sich bei den IMR90ras nur 1,0 % der Zellen in der S-Phase befanden.

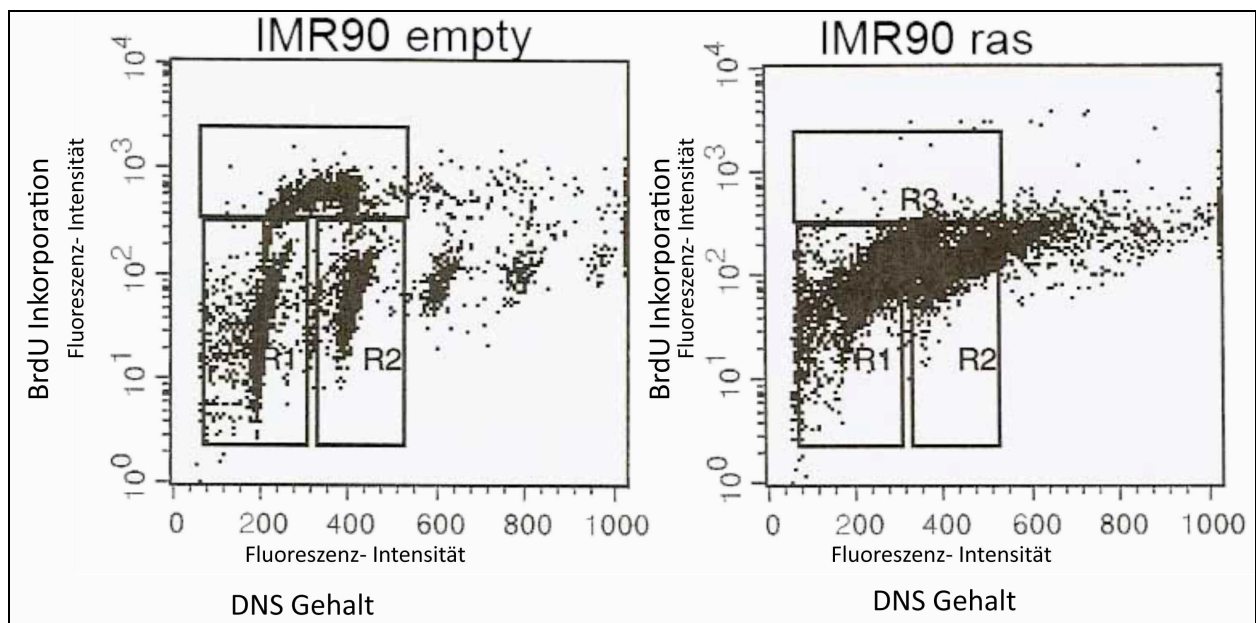


Abbildung 11: Zellzyklusprofil. Darstellung des Zellzyklusprofils der IMR90empty und IMR90ras, ermittelt durch FACS-Analyse nach BrdU-PI-Inkorporations-Assay. PI zeigt den DNS-Gehalt (x-Achse), BrdU zeigt die Syntheseaktivität (y-Achse). Durch das Zusammenspiel von PI und BrdU ergibt sich folgende Zellzyklusverteilung für IMR90empty vs. IMR90ras: In der G1-Phase (R1) befanden sich 69,6 % vs. 59,0 % der Zellen. In der G2/M-Phase (R2) befanden sich 15,0 % v. 23,5 % der Zellen. In der S-Phase (R3) befanden sich 7,6 % vs. 1,0 % der Zellen. Es zeigte sich also ein Verlust der S-Phase für die IMR90ras

Zusammenfassung:

Das Onkogen *ras* konnte mittels retroviraler Infektion stabil in IMR90 Fibroblasten eingebracht werden. Wenige Tage nach Selektion zeigte sich ein seneszenten Phänotyp mit Wachstumsarrest und der typischen Morphologie: Flache Zellen mit mehreren langen Zytoplasmaausläufern und vakuolenreichem Zytoplasma. Als weitere Merkmale seneszenten Zellen konnte die perinukleäre Blaufärbung im SA-beta-Gal-Assay und der Verlust der S-Phase im Zellzyklusprofil nach BrdU-Inkorporation gezeigt werden. SAHF stellten sich in den IMR90ras als kolokalisierte gepunktete nukleäre Fluoreszenz in der Doppelfärbung mit H3K9me³ und DAPI dar. Somit konnte gezeigt werden, dass die hergestellten IMR90ras im Gegensatz zu den mit dem Leervektor infizierten IMR90empty die Schlüsselmerkmale Onkogen-induzierter Seneszenz besitzen.

4.2 Seneszenz in Kryogeweben

Um Kryogewebe der kolorektalen Adenom-Karzinom-Sequenz auf Merkmale von Seneszenz zu untersuchen, wurden ein SA-beta-Gal-Assay, sowie die immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper gegen den Proliferationsmarker Ki67 an aufeinanderfolgenden Schnitten von Kryogewebeproben durchgeführt. Getestet wurden fünf Normalgewebe, zwölf Adenome und sechs Karzinome. Dabei dienten die zu Kryopellets schockgefrorenen IMR90eco und IMR90ras als Kontrollen für den seneszenten bzw. nicht-seneszenten Phänotyp. An den Ki67-Färbungen wurden je Gewebeprobe fünf Areale ausgewählt. In den ausgewählten Arealen wurden mindestens 100 Epithelzellen auf ihre nukleäre Ki67-Färbung ausgezählt. Die damit korrespondierenden Areale wurden in den Schnitten des SA-beta-Gal-Assays aufgesucht und ebenfalls an mindestens 100 Epithelzellen ausgewertet. Gewebe, die stärkere SA-beta-Gal-Färbung als Ki67-Färbung (jeweils als Mittelwert der fünf beurteilten Areale) zeigten, wurden als seneszent gewertet. Ausgewählte Areale sind in Abbildung 12 dargestellt.

Es wurden fünf normale Kolongewebe untersucht, wobei auffiel, dass sich die Färbungen in der Kryptentiefe und am Lumen-nahen Epithelgewebe gegensätzlich verhielten (Beispielhaft an NG1 in Abbildung 12). Die Architektur des normalen Kolongewebes geht von proliferierenden Kolon-Stammzellen in der Kryptentiefe aus, die sich gen Lumen immer weiter differenzieren. Entsprechend dieser Unterschiede wurden in der grafischen Auswertung der Färbungen Epithel der Kryptentiefe und Lumen-nahes Epithel getrennt beachtet. Betrachtet man die Mittelwerte der jeweiligen Gewebeanteile, zeigte sich in der Kryptentiefe proliferierendes Epithel mit einer Ki67-Färbung von 56-68 % und nur 5-23 % SA-beta-Gal-Färbung.

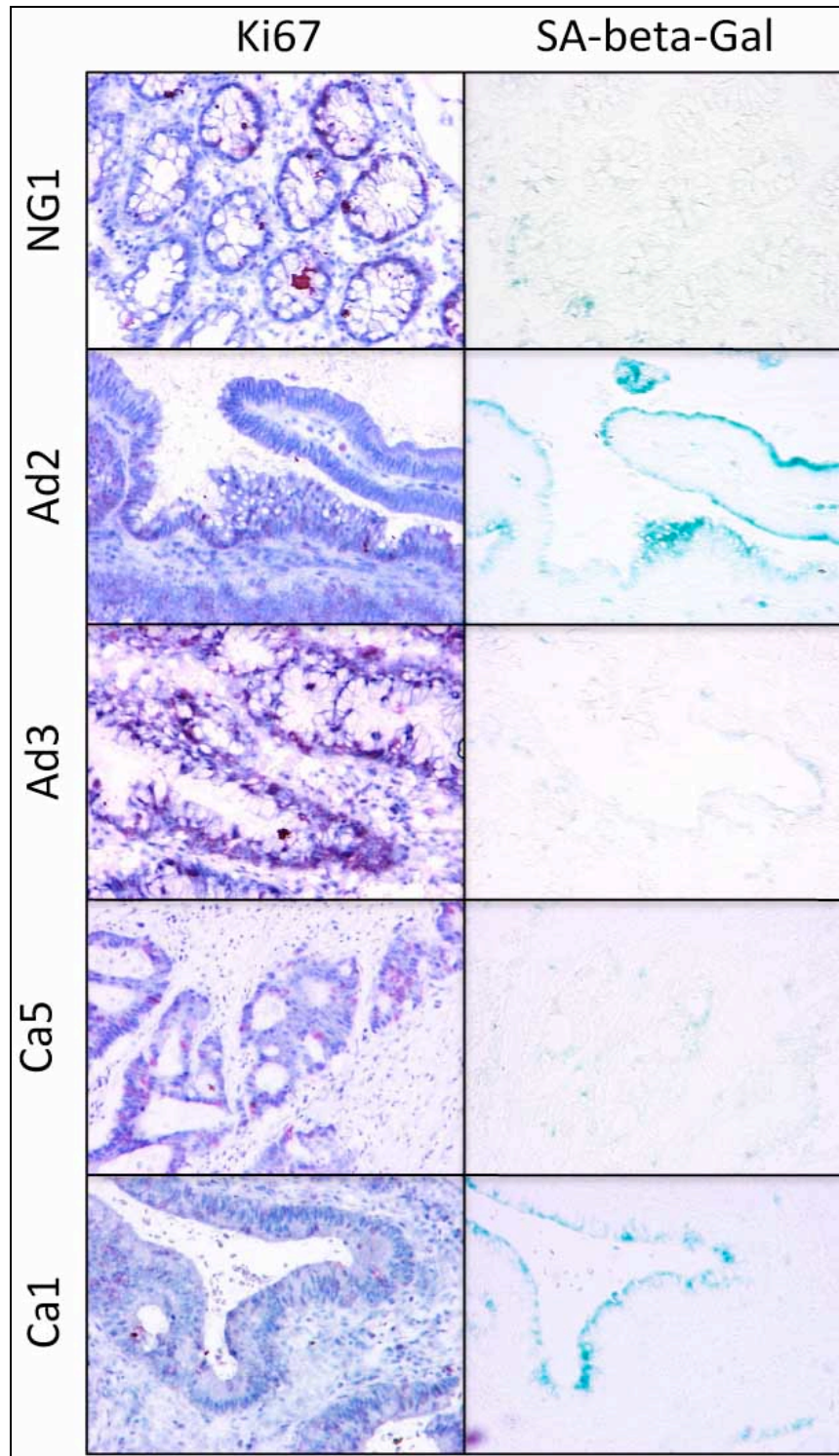


Abbildung 12: Kryofärbungen. Beispiele von Arealen der gefärbten Kryogewebe der kolorektalen Adenom-Karzinom-Sequenz. Links sieht man die immunhistochemische Färbung von Ki67, rechts das korrespondierende Areal des SA-beta-Gal-Assays. Dargestellt sind ein Areal eines normalen Kolongewebes (NG1), je ein Areal zweier Adenome (Ad2, Ad3) und je ein Areal zweier Karzinome (Ca1, Ca5). Ki67-positive Areale korrelieren mit SA-beta-Gal-negativen und umgekehrt. 10 x vergrößert.

Ergebnisse

Im Lumen-nahen Epithel hingegen zeigten sich nur 7-23 % Ki67-Färbung und 42-82 % SA-beta-Gal-Färbung (Abbildung 13 oben). Alle betrachteten Areale zeigten ein ähnliches Färbeverhalten, was an der geringen Streubreite zwischen Minimal- und Maximalwert der Areale jedes einzelnen Gewebes zu erkennen ist (Abbildung 13 unten). Gemessen an den Mittelwerten gelten 5 von 5 Kryptengewebe als nicht-seneszent (SA-beta-Gal < Ki67) und 5 von 5 Lumen-nahen Geweben zeigten Merkmale von Seneszenz (SA-beta-Gal > Ki67).

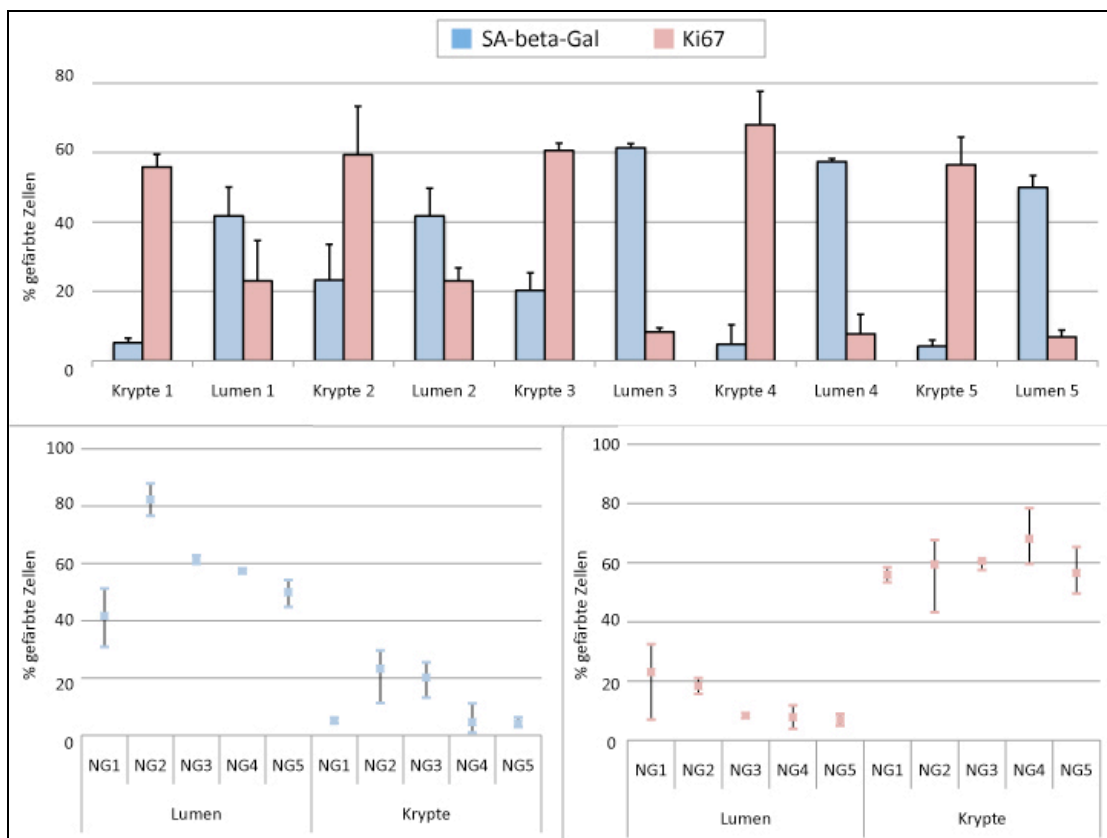


Abbildung 13: Normalgewebe. Von 5 Normalgeweben (NG1-NG5) des Kolons wurden Kryptentiefe (Krypte 1-5) und Lumen-nahes Epithel (Lumen 1-5) getrennt betrachtet. Oben: SA-beta-Gal-Färbung (blau) und Ki67-Färbung (rot) der Normalgewebe. Mittelwerte \pm Standardabweichung von jeweils 5 Arealen jedes einzelnen Gewebes. Unten links: Maximalwert, Mittelwert (Quadrat) und Minimalwert der SA-beta-Gal-Färbung der 5 Areale jedes Normalgewebes. Unten rechts: Minimalwert, Mittelwert (Quadrat) und Maximalwert der Ki67-Färbung der 5 Areale jedes Normalgewebes. Lumen-nahes Epithel zeigte bei 5 von 5 Geweben einen seneszenten Phänotyp mit SA-beta-Gal positivem Ki67 negativem Gewebe. Kryptenepithel zeigte bei 5 von 5 Geweben einen nicht-seneszenten Phänotyp mit Ki67 positivem SA-beta-Gal negativem Gewebe.

Ergebnisse

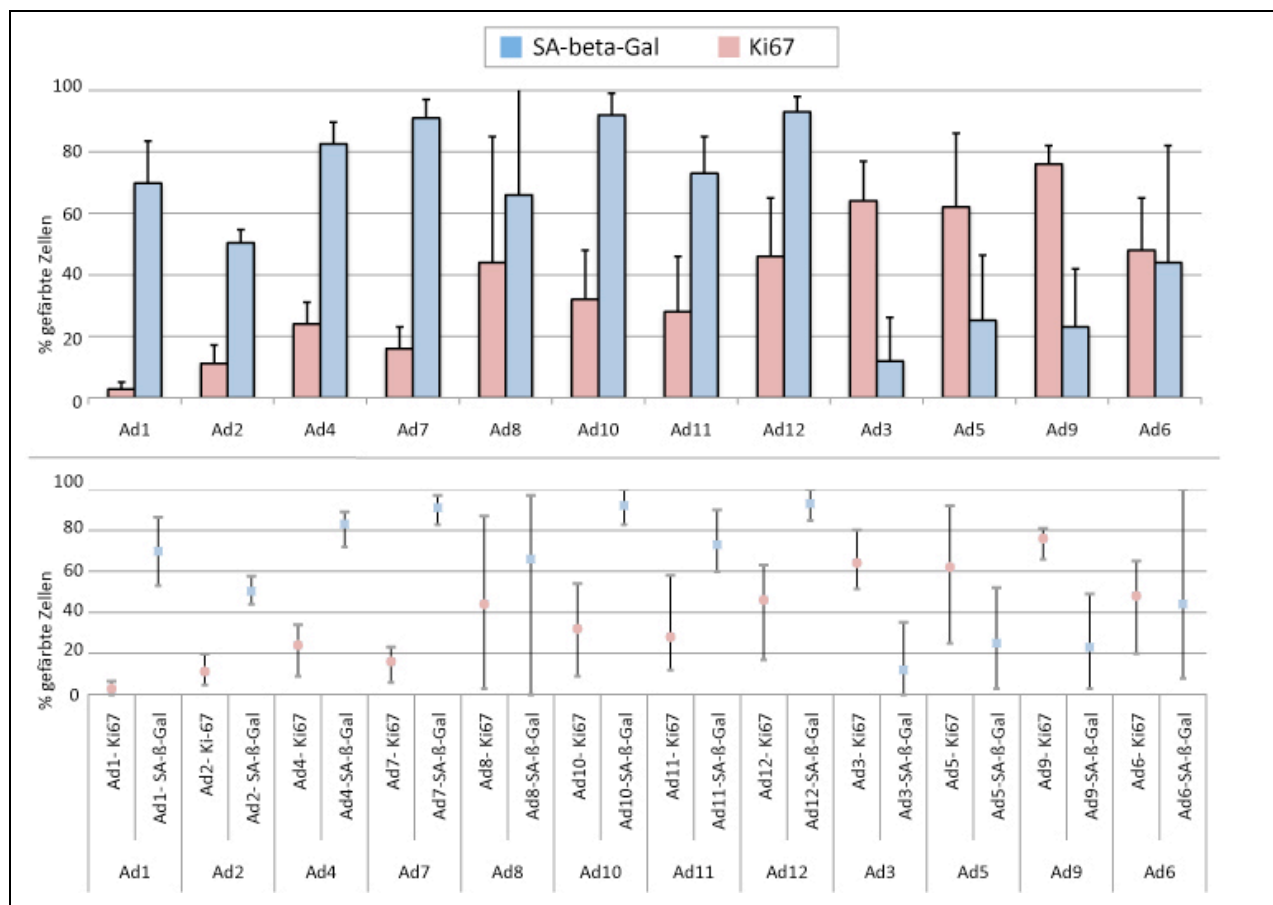


Abbildung 14: Adenome. Oben: SA-beta-Gal-Färbung (blau) und Ki67-Färbung (rot) von 12 Kolonadenomen (Ad1-Ad12). Mittelwerte \pm Standardabweichung von jeweils 5 Arealen jedes einzelnen Gewebes. Unten: Maximalwert (Querstrich), Mittelwert (Quadrat) und Minimalwert (Querstrich) der SA-beta-Gal-Färbung bzw. Ki67-Färbung der 5 Areale jedes Adenoms. Acht Adenome zeigten einen seneszenten Phänotyp (MW SA-beta-Gal > MW Ki67). Drei Adenome zeigten einen nicht-seneszenten Phänotyp (MW Ki67 > MW SA-beta-Gal). Adenom 6 teilte sich in einen Seneszenz-typischen und einen proliferierenden Anteil. Das Färbeverhalten unterschied sich zwischen den verschiedenen Arealen der einzelnen Gewebe zum Teil erheblich (Ad6, Ad8), obwohl die meisten Adenome ein relativ homogenes Muster zeigten.

Stellvertretend für präkanzeröse Läsionen der Adenom-Karzinom-Sequenz wurden zwölf Kryoadenome betrachtet. Zwei Drittel dieser Adenome ($n=8$) zeigten typische Merkmale von Seneszenz bei einer SA-beta-Gal-Färbung von 50-93 % und einer Ki67-Färbung von nur 3-44 % (Beispielhaft an Ad2 in Abbildung 12, Abbildung 14 oben). Drei Adenome (Ad3, Ad5, Ad9) hingegen zeigten überwiegend proliferierendes Gewebe mit 62-76 % Ki67-Färbung und nur 12-25 % SA-beta-Gal-Färbung (Beispielhaft in Ad3 in Abbildung 12, Abbildung 14 oben). Ein Adenom (Ad6) zeigte eine Zweiteilung in einen Anteil, der sich wie die proliferierenden

Ergebnisse

Adenome verhielt und in einen Anteil, der sich wie die Adenome mit Seneszenzmerkmalen verhielt; die Mittelwerte betrachtet lässt es sich nicht eindeutig zuordnen. Die betrachteten Areale der einzelnen Adenomgewebe verhielten sich teilweise noch relativ homogen, andere hingegen zeigten eine große Streubreite der Färbungen zwischen den einzelnen Arealen. So gab es Adenome (z.B. Ad1, Ad2, Ad4, Ad7), in denen sich die Unterschiede zwischen Minimal- und Maximalwert mit Abständen von 6-17 % bei Ki67 und 14-33 % bei SA-beta-Gal relativ gering verhielten. Andere Adenome (z.B. Ad6, Ad8) zeigten sehr ausgeprägte Unterschiede zwischen den Arealen mit einem Unterschied zwischen Minimal- zu Maximalwert von bis zu 84 % bei Ki67 und bis zu 97 % bei SA-beta-Gal (siehe Abbildung 14 unten).

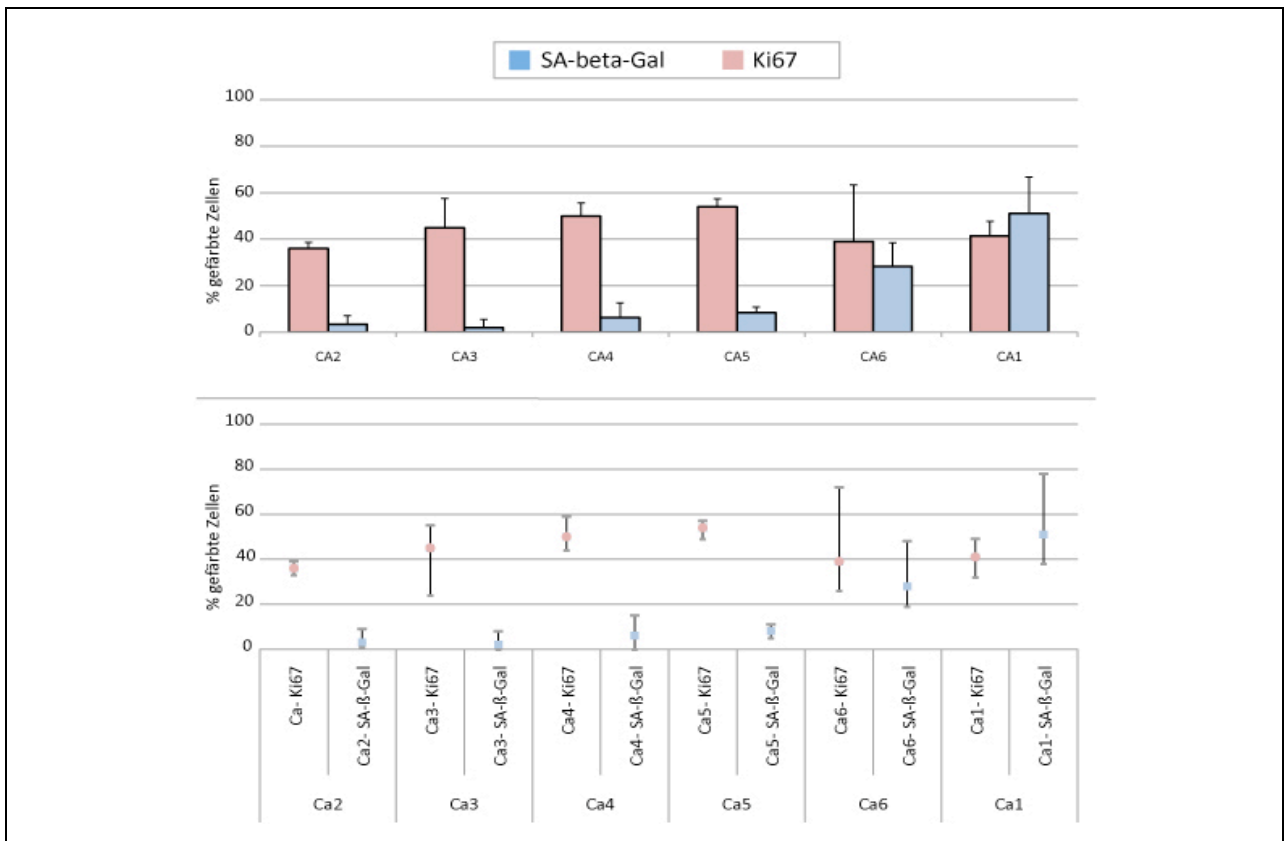


Abbildung 15: Karzinome. Oben: SA-beta-Gal-Färbung (blau) und Ki67-Färbung (rot) der 6 Kolonkarzinome (Ca1-Ca6). Mittelwerte \pm Standardabweichung von jeweils 5 Arealen jedes einzelnen Gewebes. Unten: Maximalwert (Quadrat), Mittelwert (halber Querstrich) und Minimalwert (ganzer Querstrich) der SA-beta-Gal-Färbung bzw. Ki67-Färbung der 5 Areale jedes Karzinoms. Fünf der Karzinome verhielten sich wie nicht-seneszente Gewebe (MW Ki67 > MW SA-beta-Gal), das Karzinom Ca1 dagegen zeigte Seneszenz (MW Ki67 < MW SA-beta-Gal). Auch in überwiegend nicht-proliferierendem Gewebe gab es teilweise Stellen mit Hinweisen auf Seneszenz wie in Ca6 (Arealen mit Ki67 < SA-beta-Gal).

Ergebnisse

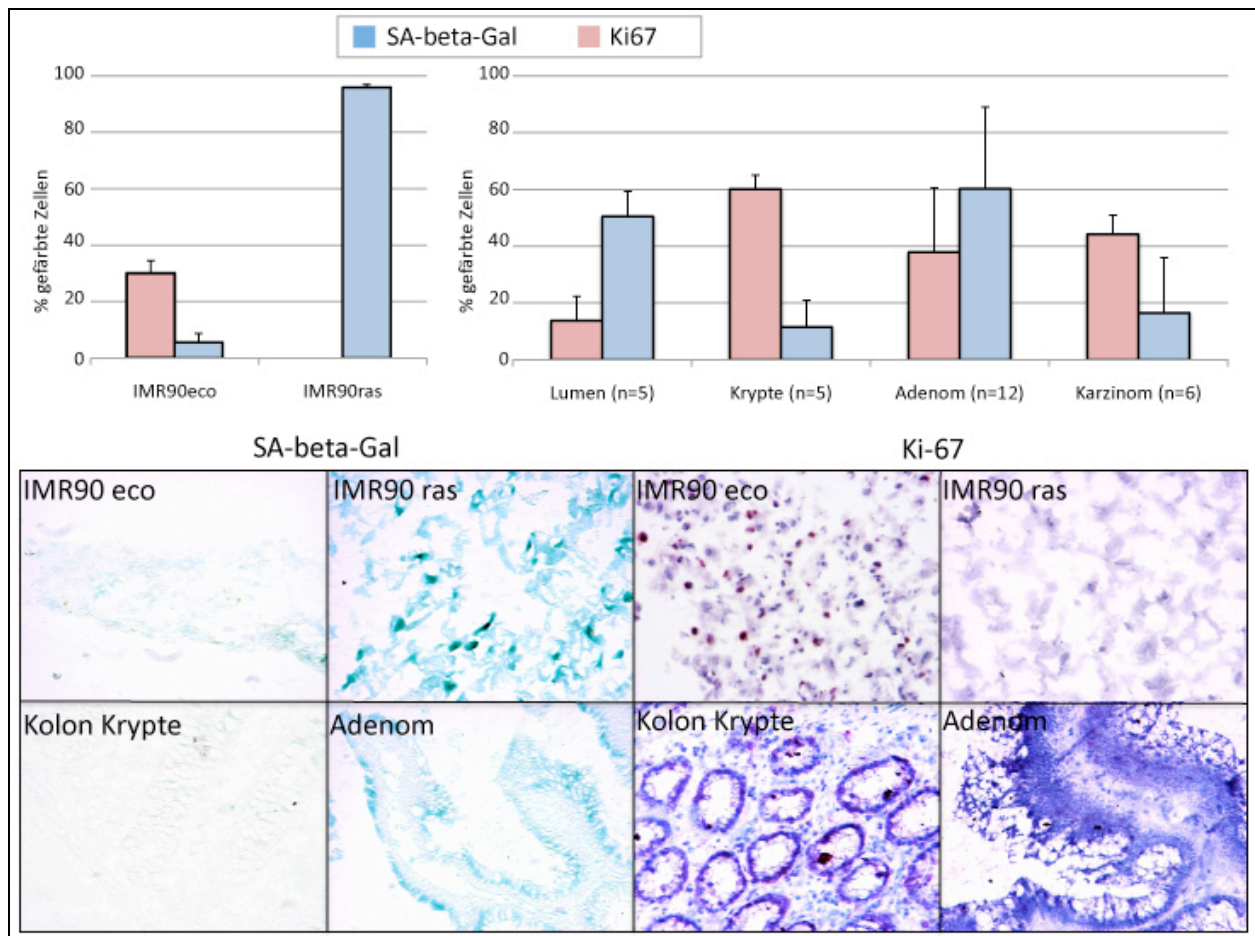


Abbildung 16: Zusammenfassung Kryogewebe. Übersicht über die Seneszenzfärbungen in Kryogewebe. Oben: Mittelwerte \pm Standardabweichung der SA-beta-Gal-Färbung (blau) und der Ki67-Färbung (rot) in den Kontrollen für Seneszenz (IMR90eco als Negativkontrolle, IMR90ras als Positivkontrolle) und weiteren Geweben der kolorektalen Adenom-Karzinom-Sequenz. Unten: Links SA-beta-Gal-Assay und rechts immunhistochemische Färbung auf Ki67 an Kryogewebe. 10 x vergrößert. Epithel der Krypte und die meisten Karzinome zeigten einen nicht-seneszenten Phänotyp mit überwiegend SA-beta-Gal-negativem Ki67 positivem Gewebe. Die meisten Adenome und Lumen-nahes Epithel zeigten einen seneszenten Phänotyp mit SA-beta-Gal-positivem Ki67-schwachem Gewebe.

Es wurden sechs Karzinome betrachtet (Abbildung 15), von denen fünf als nicht-seneszent eingestuft wurden, da sie eine Ki67-Färbung von 36-54 % und eine SA-beta-Gal-Färbung von nur 2-28 % aufwiesen (Beispielhaft an Ca5 in Abbildung 12). Eines der untersuchten Karzinome zeigte mit 41 % Ki67-Färbung und 51 % SA-beta-Gal-Färbung Seneszenz (Beispielhaft in Ca1

in Abbildung 12). Die Areale jedes einzelnen Karzinoms waren größtenteils relativ homogen. Es fiel aber auf, dass in überwiegend proliferierendem, nicht-seneszentem Gewebe zum Teil (v.a. Ca6) vereinzelt nicht-proliferierende Areale mit seneszenten Merkmalen (Areale mit SA-beta-Gal > Ki67) vorlagen.

Zusammenfassend zeigten die Färbungen der Kryogewebe einen nicht-seneszenten Phänotyp mit starker Ki67-Färbung in SA-beta-Gal negativem Gewebe in der Negativkontrolle IMR90eco sowie in der Kryptentiefe von normalem Kolonepithel. Einen seneszenten Phänotyp mit starker SA-beta-Gal-Färbung in Ki67-schwachem Gewebe zeigten dagegen die Positivkontrolle IMR90ras sowie der überwiegende Teil der Adenome (Abbildung 16). Auch das differenzierte Lumen-nahe Kolonepithel zeigte Merkmale von Seneszenz. Karzinome stellten sich überwiegend nicht-seneszent dar, wobei in manchen Proben einzelne Areale mit Merkmalen von Seneszenz auffielen.

Zusammenfassung:

Es wurde ein SA-beta-Gal-Assay und eine immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen Ki67 an Kryogeweben der kolorektalen Adenom-Karzinom-Sequenz durchgeführt. Als Kontrollen für Seneszenz dienten Schnitte von schockgefrorenen IMR90eco- und IMR90ras-Pellets. Ein seneszenten Phänotyp (MW SA-beta-Gal > MW Ki67) zeigte sich an der Positivkontrolle IMR90ras, sowie an den meisten Kolonadenomen und am Lumen-nahen normalen Epithelgewebe. Ein nicht-seneszenten Phänotyp (MW SA-beta-Gal < MW Ki67) zeigte sich an der Negativkontrolle IMR90eco, sowie in den Krypten des normalen Kolonepithels und im überwiegenden Teil der Karzinome. In einem Teil der Karzinome zeigten sich jedoch vereinzelte seneszenten Areale (Areale mit SA-beta-gal > Ki67).

4.3 Seneszenz in Paraffingeweben

Im nächsten Schritt sollte eine Seneszenz-Signatur (Seneszenz-Index, SI) für Paraffingewebe aus verschiedenen Seneszenz-assoziierten Markern ermittelt werden. Dazu wurden IMR90eco- bzw. IMR90ras-Pellets in Paraffin eingebettet, die als Seneszenz-Kontrollen für die Etablierung immunhistochemischer Färbungen von folgenden Seneszenz-assoziierten Markern dienten: Ki67, P53, P16, PAI-1, PML, p-H2A.x, H3K9me³, HP1 γ , P-Chk2, p-P53, p-Erk. Aufeinanderfolgende Schnitte von Proben der kolorektalen Adenom-Karzinom-Sequenz wurden

Ergebnisse

mit den entsprechenden Antikörpern gegen diese Marker gefärbt. An den Ki67-Färbungen wurden je Gewebeprobe fünf Areale ausgewählt, wobei mindestens ein möglichst niedrig-proliferierendes Areal eingeschlossen wurde. In den ausgewählten Arealen wurden mindestens 100 Epithelzellen auf ihre nukleäre Ki67-Färbung ausgezählt. Die mit den Ki67-Stellen korrespondierenden Areale wurden auf den Schnitten der weiteren Marker aufgesucht und an mindestens 100 Epithelzellen ausgezählt. Für die Berechnung des SI wurden fünf Adenome (Lernadenome) mit ihrer jeweils Ki67-negativsten und Ki67-positivsten Stelle herangezogen. Es wurde ein SI entwickelt, der mit PAI-1, HP1 γ und p-Erk noch drei der ursprünglich getesteten Seneszenz-assoziierten Marker umfasste. Der SI wurde an 17 Paraffinadenomen (Validierungsadenome) validiert. Für sieben Proben lag sowohl Paraffin- als auch Kryomaterial vor. An diesen Proben sollte der SI in Paraffin verglichen werden mit dem Seneszenzstatus, der aus der Evaluation von SA-beta-Gal und Ki67 in den passenden Kryogewebe bekannt war.

Die immunhistochemischen Färbungen und deren grafische Auswertung zeigten eine Färbung des Proliferationsmarkers Ki67 von 26 % bei den nicht-seneszenten IMR90eco im Gegensatz zu 0 % bei den seneszenten IMR90ras (Abbildung 18). Als Seneszenz-assoziierte Marker wurden P53, P16, PAI-1, PML, p-H2A.x, H3K9me³, HP1 γ , p-Chk2, p-P53 und p-Erk untersucht. Für alle genannten Marker zeigte sich eine nach dem Mann-Whitney-U-Test statistisch signifikant stärkere Färbung bei den IMR90ras im Vergleich zu den IMR90eco. Die Abbildung 17 stellt diese Unterschiede beispielhaft in 10 x Vergrößerung dar. Das Färbeverhalten auf PML erkennt man in der 40 x Vergrößerung deutlicher (Abbildung 19). Hier sind auch die rot angefärbten charakteristischen PML-Kernkörperchen in den seneszenten IMR90ras sichtbar.

Eine Auswahl an Mediatoren von DNS-Schaden, Zellzyklusregulatoren, Chromatin-zugehörigen Proteinen und anderen sollte zur Erstellung einer Seneszenzsignatur evaluiert werden. Alle Seneszenz-assoziierten Marker wurden dazu in fünf verschiedenen Paraffin-Adenomen gefärbt, die zur Herstellung des SI in Paraffin dienen sollten (Lern-Adenome). Von fünf unterschiedlichen, mindestens 350 Zellen umfassenden Arealen jedes Adenoms wurde das Areal mit der stärksten Ki67-Frequenz als proliferierendes, nicht seneszent Areal, und das Areal mit der geringsten Ki67-Frequenz als nicht-proliferierendes, Seneszenz-typisches Areal definiert (Abbildung 20). Grundlage der Klassifikation eines Gewebes mit unbekanntem Seneszenzstatus durch den SI sollte das Areal mit der geringsten Ki67-Frequenz des Gewebes sein.

Ergebnisse

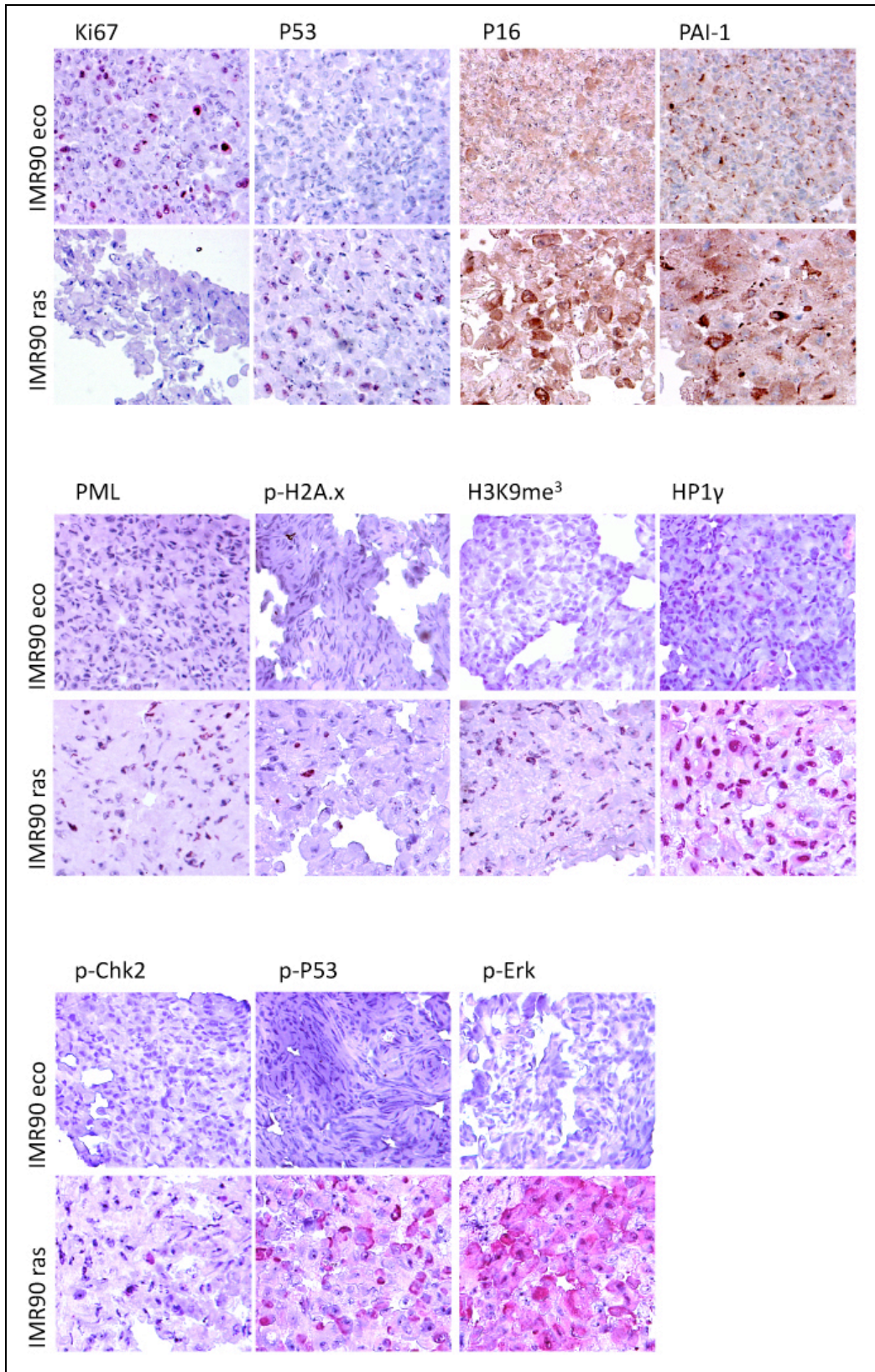


Abbildung 17: Marker in Paraffin-IMR90. Immunhistochemische Färbungen der in Paraffin eingebetteten IMR90eco bzw. IMR90ras auf den Proliferationsmarker Ki67 und verschiedene Seneszenz-assoziierte Marker. 10 x vergrößert.

Ergebnisse

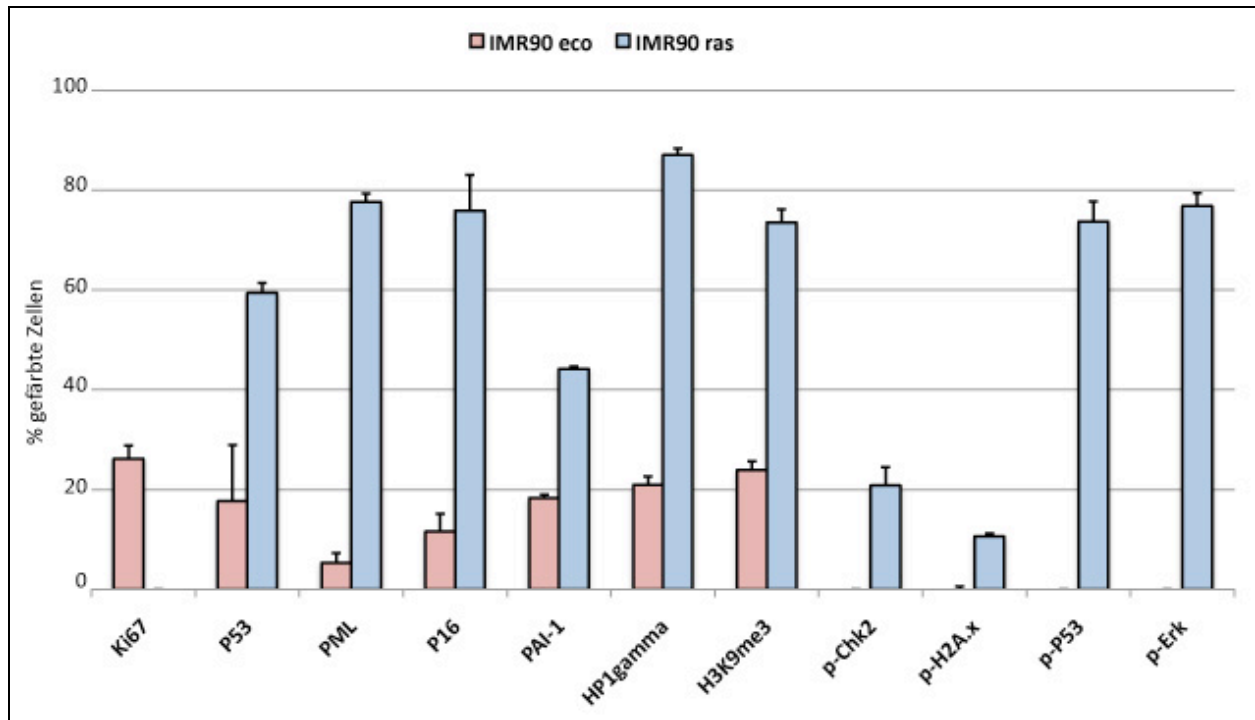


Abbildung 18: Markerverteilung in Paraffin-IMR90. Grafische Darstellung der immunhistochemischen Färbungen der in Paraffin eingebetteten IMR90eco (rot) und IMR90ras (blau). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus jeweils drei verschiedenen Arealen, angegeben in Prozent gefärbter Zellen. Die seneszenten IMR90ras zeigten im Gegensatz zu den nicht-seneszenten IMR90eco keine Färbung des Proliferationsmarkers Ki67, aber eine statistisch signifikant stärkere Färbung aller betrachteten Seneszenz-assoziierten Marker (Mann-Whitney-U-Test).

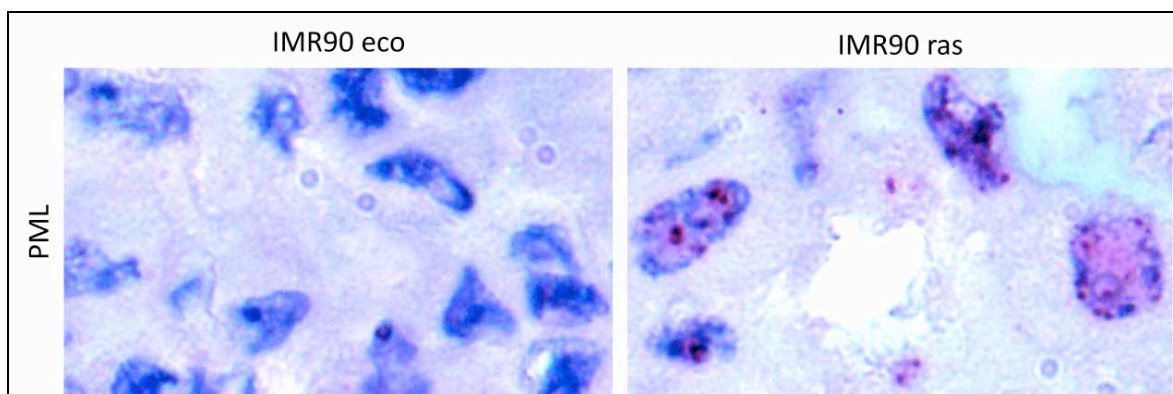


Abbildung 19: PML-Färbung. Immunhistochemische Färbung der in Paraffin eingebetteten IMR90eco bzw. IMR90ras auf PML. 40 x vergrößert. In den seneszenten IMR90ras erkennt man die rot gefärbten PML-Kernkörperchen.

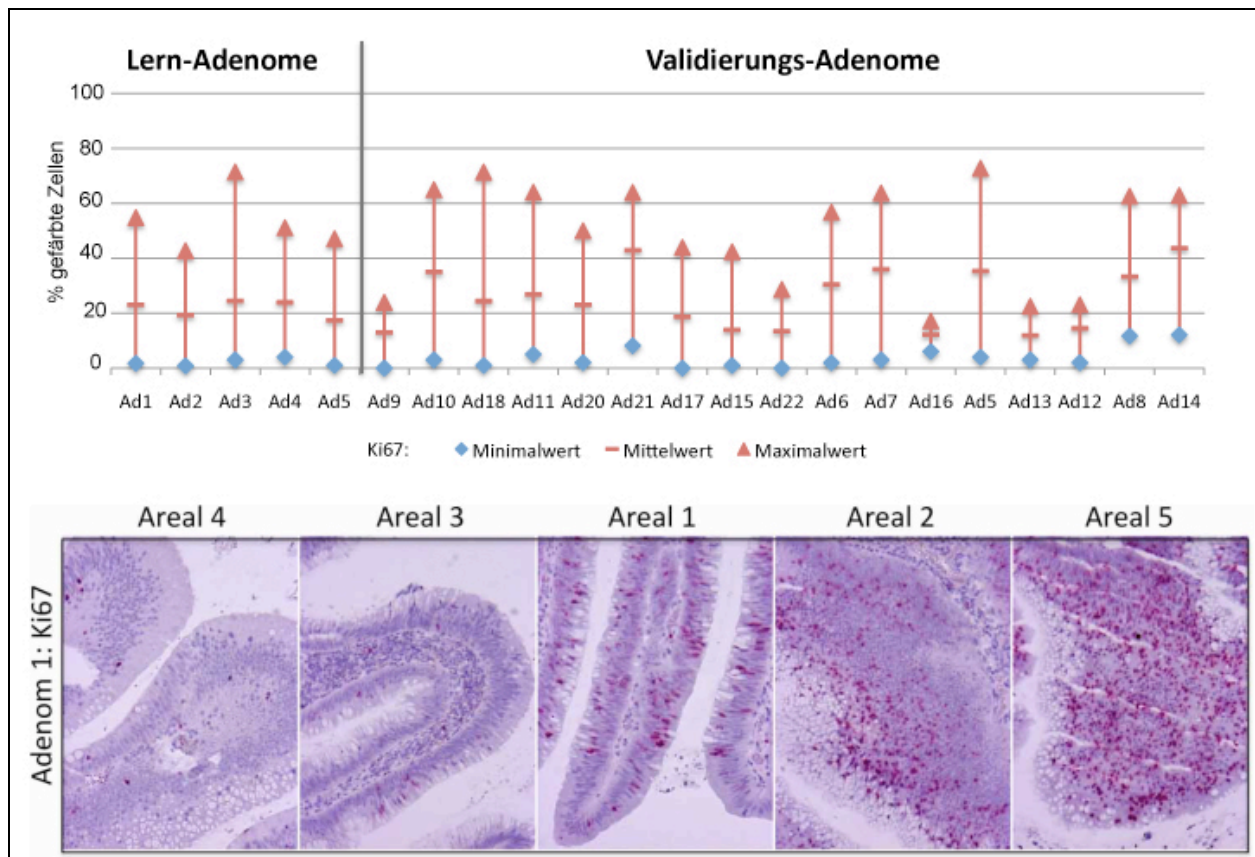


Abbildung 20: Ki67-Färbung in Adenomen. Oben: Grafische Übersicht über die Ki67-Färbung mit Minimalwert, Mittelwert und Maximalwert der fünf Ki67-Areale der verschiedenen Paraffin-Adenome. Gezeigt sind die Lern-Adenome und die Validierungs-Adenome. Unten: Übersicht über die Ki67-Verteilung am Beispiel der fünf beurteilten Areale von Adenom 1, nach aufsteigender Ki67-Färbung geordnet. Zur Klassifikation eines Gewebes mit unbekanntem Seneszenzstatus durch den Seneszenzindex (SI) soll das Areal mit der geringsten Ki67-Frequenz herangezogen werden.

Zu dem Areal mit der höchsten und der niedrigsten Ki67-Frequenz wurde für jedes Adenom das jeweils korrespondierende Areal der folgenden Schnitte mit den Färbungen auf die anderen Seneszenz-Marker aufgesucht und ausgezählt (Abbildung 23). Einige der Marker, die in immunhistochemischen Färbungen der Paraffin-eingebetteten IMR90s gut darzustellen waren, ließen sich mit demselben Protokoll in den Paraffin-Kolongeweben nicht zufriedenstellend auswerten, da wenig bis gar keine Färbung zu verzeichnen war. Zu diesen Markern gehörten p-Chk2, p-H2A.x und p-P53, welche aus diesem Grund bei der Erstellung der Seneszenzsignatur nicht beachtet wurden. Betrachtet man die immunhistochemische Färbung und deren grafische

Ergebnisse

Auswertung der anderen Seneszenz-assoziierten Marker, so zeigte sich, mit Ausnahme von H3K9me³, ein ähnliches Färbeverhalten bei den Paraffinadenomen wie bei Paraffin-IMR90eco bzw. Paraffin-IMR90ras (Abbildung 21): es zeigt sich eine stärkere Färbung in den Seneszenz-typischen Arealen. Der Marker H3K9me³ hingegen zeigt stärkere Färbung mit einem Mittelwert von 70 % in nicht-seneszenten im Gegensatz zu einem Mittelwert von 64 % in Seneszenz-typischen Arealen. Aufgrund der Widersprüchlichkeit mit den Erwartungen aus den Paraffin-IMR90 wurde H3K9me³ ebenfalls von der Signatur ausgeschlossen. HP1 γ wurde trotz eines nur geringen Unterschiedes in der Färbung ($p=0,754$, Mann-Whitney-Test) in die Signatur aufgenommen, weil die SAHF, wie in der Einleitung beschrieben, nach der aktuellen Literatur eine essentielle Rolle im seneszenten Phänotyp spielen. Signifikante Unterscheidungsfähigkeit zwischen seneszenten und nicht-seneszenten Arealen zeigten die Marker PAI-1 ($p=0,04$, Mann-Whitney-Test) und PML ($p=0,01$, Mann-Whitney-Test). Der Marker p-Erk konnte ebenfalls gut zwischen seneszent und nicht-seneszent unterscheiden, obwohl hier das Ergebnis nicht signifikant war ($p=0,08$, Mann-Whitney-Test). In die Signatur eingeschlossen wurden PAI-1 und p-Erk. P53 und P16 zeigten keine signifikanten Unterschiede ($p=0,91$ und $p=0,52$, Mann-Whitney-Test) und wurden deshalb nicht in die Signatur aufgenommen (Mann-Whitney-Test). PML wurde trotz des scheinbar guten Differenzierungsvermögens wegen der breiten Überlappung mit anderen Tumorsuppressormechanismen wie z.B. Apoptose aus der Signatur ausgeklammert.

Aufgrund der geringen Fallzahl ist die Durchführung einer Regressionsanalyse oder einer Diskriminanzanalyse als Methode der statistischen Auswertung nicht zulässig. Der SI sollte über eine Gleichung aus den verschiedenen Seneszenzmarkern die Möglichkeit bieten, Paraffingewebe in solche mit und solche ohne Seneszenz-typische Merkmale einzuteilen. Von fünf Arealen sollte die am wenigsten Ki67 gefärbte, also die niedrigst-proliferierende Stelle, zur Beurteilung durch die Seneszenzsignatur herangezogen werden. Die Prozentwerte der immunhistochemischen Färbungen der unterschiedlichen Marker variierten stark, was in der Gleichung beachtet werden sollte, um keinem Marker von vorne herein größere Bedeutung zu geben. Hierzu wurde jeder Marker mit dem Kehrwert des Mittelwertes desselben Markers in den seneszenten Arealen der Lern-Adenome multipliziert. Der Grenzwert zur Klassifizierung sollte bei Null liegen, so dass ein y-Achsenabschnitt von -19 gewählt wurde (Abbildung 22). Somit klassifiziert der SI anhand des Areals mit der geringsten Ki67-Frequenz über einen negativen Ergebniswert Gewebe ohne Seneszenz-typisches Areal (im Folgenden vereinfachend nicht-seneszente Gewebe genannt) und über einen positiven Ergebniswert Gewebe mit Seneszenz-typischem Areal (im Folgenden vereinfachend seneszentes Gewebe genannt). Ki67 sollte nicht

Ergebnisse

direkt in den SI einfließen, da der Proliferationsmarker bereits als Auswahlkriterium für die zu bewertende Stelle diente und somit mit einem Bias belegt ist. Starke Proliferation und Seneszenz als Zellzyklus-Arrest schließen einander aber aus. Deshalb sollte Ki67 als separates Kriterium für Seneszenz im SI Beachtung finden, ohne mit seinem Absolutwert direkt den berechneten Ergebniswert zu verändern. Um dieser Sonderstellung gerecht zu werden, wurden alle Areale niedriger Ki67-Frequenz mit mindestens 12 % Ki67-Färbung direkt als nicht-seneszent klassifiziert. SI-Werte zwischen -1 und 1 wurden als nicht eindeutig klassifizierbar gewertet.

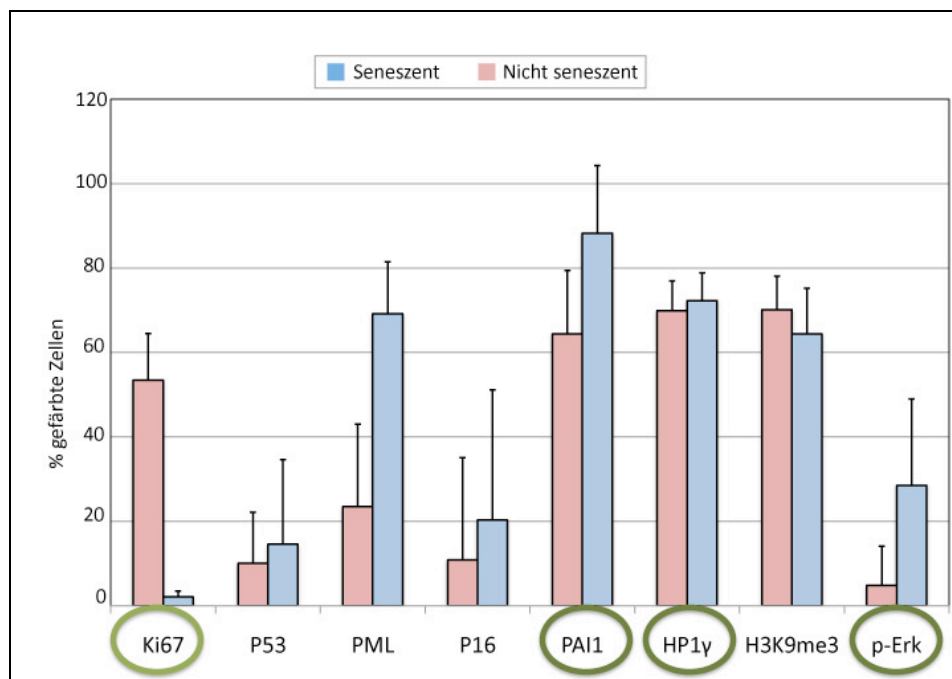


Abbildung 21: Paraffinmarker in Lern-Adenomen. Grafische Darstellung der immunhistochemischen Färbungen der Paraffinproben der fünf Adenome, die zur Herstellung des SI dienen (Lernadenome). In jedem Adenom wurde die Stelle der höchsten Ki67-Frequenz als proliferierendes Areal und die Stelle mit der niedrigsten Ki67-Frequenz als Seneszenz-typisches Areal gewertet. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung der jeweils fünf Areale maximaler Ki67-Frequenz (rot) und der Areale geringster Ki67-Frequenz (blau), angegeben in Prozent gefärbter Zellen. Die seneszenten Stellen zeigten im Gegensatz zu den proliferierenden Stellen, entsprechend der Markerverteilung in Paraffin-IMR90eco bzw. Paraffin-IMR90ras, eine stärkere Färbung auf fast alle betrachteten Seneszenz-assoziierten Marker. H3K9me³ zeigte im Gegensatz zu den Erwartungen aus Paraffin-IMR90s eine stärkere Färbung in den proliferierenden Arealen. Vier Marker flossen in den SI ein (grün umrandet): PAI-1, p-Erk und HP1 γ waren Teil der Formel des SI, Ki67 spielte bei der Auswahl des zu klassifizierenden Areals eine Rolle.

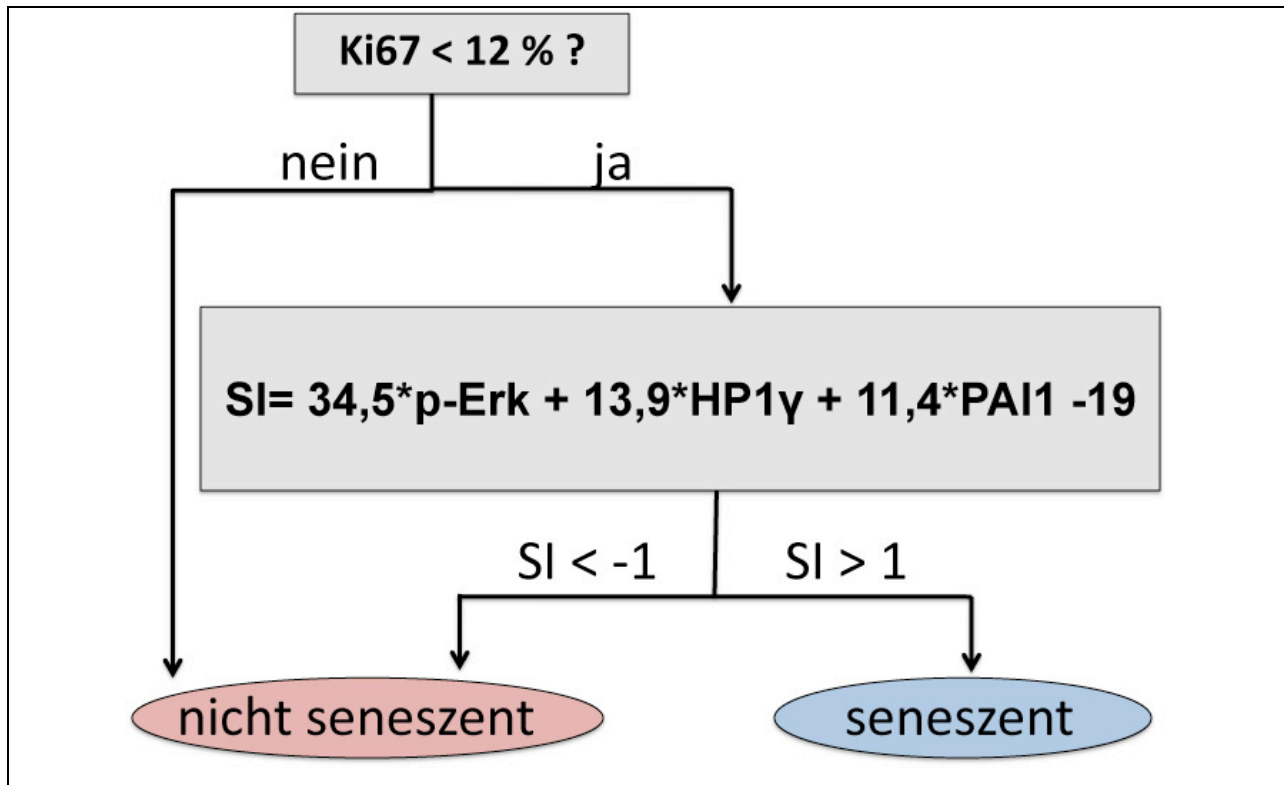


Abbildung 22: Seneszenzsignatur. Darstellung des ermittelten Algorithmus zur Klassifizierung von Geweben in solche mit Seneszenz-typischen (seneszenten) und solche ohne Seneszenz-typische (nicht-seneszente) Areale. Grundlage der Klassifizierung war das Areal mit der geringstens Ki67-Färbung eines Gewebes. Bei einem Ki67-Prozentwert von mindestens 12 % wurde das Gewebe als nicht-seneszent eingestuft. Bei geringerer Proliferation geschah die Einteilung anhand der Seneszenzsignatur, die die Marker p-Erk, PAI-1 und HP1 γ umfasst. Die Koeffizienten vor den einzelnen Variablen entsprechen dem Kehrwert des Mittelwert desselben Markers in den seneszenten Stellen der Lern-Adenome. Zur Berechnung einzusetzen ist der Prozentwert der positiv gefärbten Zellen der drei Marker im Areal mit der geringsten Ki67-Frequenz als Wert zwischen 0 und 1. Bei einem SI größer 1 zählt das Gewebe als seneszent, bei einem SI kleiner 1 als nicht-seneszent. SI-Werte zwischen -1 und 1 gelten als nicht eindeutig klassifizierbar.

Wendet man den SI auf die Lern-Adenome an, so können alle Areale der geringsten Ki67-Frequenz durch den SI korrekt als seneszent klassifiziert werden. Von den stark Ki67-gefärbten Arealen können ebenfalls alle über den SI unter Beachtung der Ki67-Frequenz korrekt als nicht-seneszent klassifiziert werden. Es fällt auf, dass die Werte der Seneszenzsignatur in drei Fällen im nicht-klassifizierbaren Bereich liegen. Lern-Adenom 3 bleibt auch mit Betrachtung von Ki67 nicht klassifizierbar. Hierauf soll im Diskussionsteil näher eingegangen werden.

Ergebnisse

Lern-Adenome	Klassifikation entsprechend dem SI (SI-Wert)
Lern-Adenom 1: Ki67 minimal	Seneszent (3,2)
Lern-Adenom 2: Ki67 minimal	Seneszent (20,6)
Lern-Adenom 3: Ki67 minimal	Seneszent (0,5)
Lern-Adenom 4: Ki67 minimal	Seneszent (15,1)
Lern-Adenom 5: Ki67 minimal	Seneszent (14,8)
Lern-Adenom 1: Ki67 maximal	Nicht seneszent (-4,7)
Lern-Adenom 2: Ki67 maximal	Nicht seneszent (-0,4)
Lern-Adenom 3: Ki67 maximal	Nicht seneszent (-6,3)
Lern-Adenom 4: Ki67 maximal	Nicht seneszent (-0,2)
Lern-Adenom 5: Ki67 maximal	Nicht seneszent (7,6; aber Ki67 > 12 %)

Tabelle 3: Lernadenome. Tabellarische Übersicht über die fünf Lern-Adenome und deren Ergebnisse im SI. Die Areale mit geringer Ki67-Frequenz, die als Areale mit Seneszenzmerkmalen definiert wurden, konnten fast alle über den SI als seneszent klassifiziert werden (4 von 5 seneszenten Fällen, blau). Ein seneszenter Fall (Lern-Adenom 3, hellblau) blieb bei einem SI von 0,5 nicht-klassifizierbar. Von den Arealen mit hoher Ki67-Frequenz, die als Areale ohne Seneszenzmerkmale definiert wurden, konnten alle über den SI als nicht-seneszent kategorisiert werden (rot). Bei den Lern-Adenomen 2, 4 und 5 lagen die SI-Werte nahe dem Grenzwert 0 oder im positiven Bereich. Diese Areale konnten aber allein durch die Betrachtung von Ki67 (Ki67 > 12 %) als nicht-seneszent klassifiziert werden.

Zur Validierung der erstellten Seneszenzsignatur wurden 17 Paraffinadenome (Validierungs-Adenome) klassifiziert. Von sieben der siebzehn Proben standen Paraffin- und Kryomaterial desselben Adenoms zur Verfügung, so dass hier die Klassifikation durch den SI in Paraffin mit dem Seneszenzstatus im zugehörigen Kryogewebe korreliert wurde. In den entsprechenden Kryoproben konnte durch einen SA-beta-Gal-Assay und eine immunhistochemische Färbung auf Ki67 die Einteilung der Gewebe als seneszent (fünf Areale im Gewebe: MW SA-beta-Gal > MW Ki67) oder nicht seneszent (fünf Areale im Gewebe: MW SA-beta-Gal < MW Ki67) vorgenommen werden. Die Ergebnisse der Kryoproben wurden oben bereits dargestellt, es

Ergebnisse

handelt sich um die Kryoadenome 5, 6, 8, 9, 10, 11 und 12. Der Seneszenzstatus der Kryoadenome wurde mit dem Seneszenzstatus der entsprechenden Paraffinadenome nach Einteilung gemäß der Seneszenzsignatur verglichen (Tabelle 4). Von vier seneszenten Kryoadenomen konnten drei der entsprechenden Paraffinadenome ebenfalls als seneszent klassifiziert werden. Das Validierungs-Adenom 11, das dem seneszenten Kryoadenom 11 entspricht, kann nicht korrekt als seneszent klassifiziert werden, sondern wird als nicht-seneszent eingestuft. Von zwei nicht-seneszenten Kryoadenomen werden die entsprechenden Paraffinadenome korrekt ebenfalls als nicht-seneszent klassifiziert. Kryoadenom 6 konnte mit dem SA-beta-Gal-Assay und der Ki67-Färbung nur bedingt klassifiziert werden, da es aus sehr unterschiedlichen Arealen bestand. Betrachtet man das gesamte Gewebe, also mehr als nur fünf Areale, gehört es aber überwiegend zur Gruppe der nicht-seneszenten Gewebe. In Paraffin wurde das entsprechende Validierungs-Adenom 6 als nicht-seneszent klassifiziert. Somit ergibt sich eine konkordante Aussage in 6 von 7 Fällen (entspricht ca. 85 %). Vernachlässigt man das schwer klassifizierbare Kryoadenom 6, so ergibt sich eine konkordante Aussage in 5 von 6 Fällen (entspricht ca. 83 %).

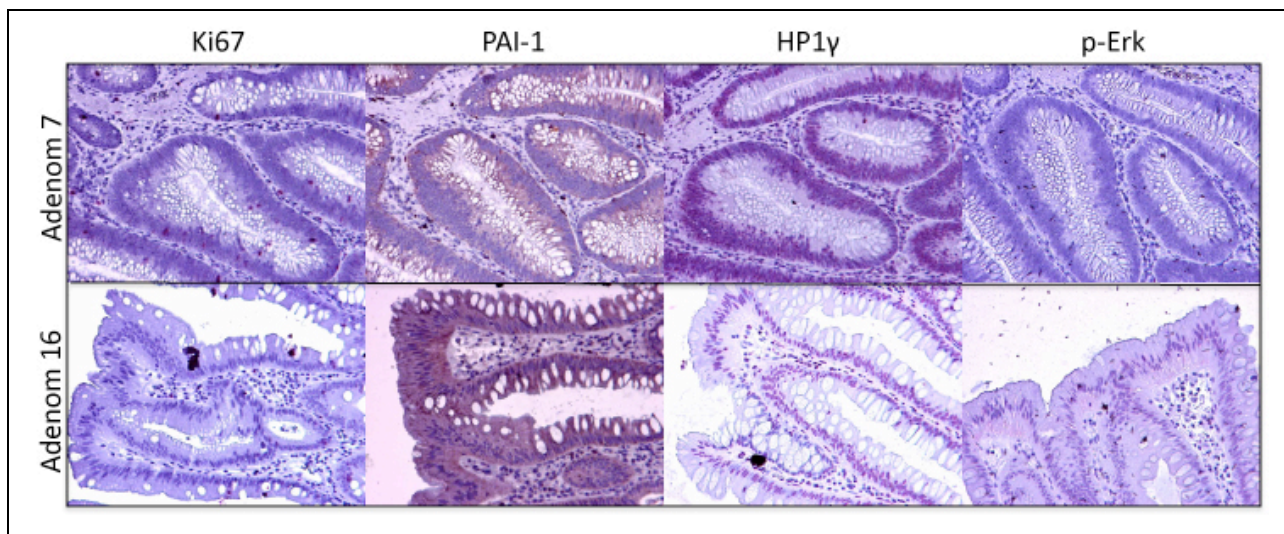


Abbildung 23: Markerverteilung an Beispielen. Zwei Beispiele von Adenomen mit dem zur Klassifikation durch den SI notwendigen Areal. An aufeinanderfolgenden, auf die verschiedenen Marker des SI gefärbten Schnitten wurden die mit dem Areal der geringsten Ki67-Frequenz korrespondierenden Areale aufgesucht und ausgezählt.

Ergebnisse

Validierungs-Adenom	Klassifikation durch SI	Kryo-Adenom	Klassifikation durch SA-beta-Gal und Ki67
Validierungs-Adenom 18	Seneszent (14,8)		
Validierungs-Adenom 7	Seneszent (1,4)		
Validierungs-Adenom 15	Seneszent (1,7)		
Validierungs-Adenom 16	Seneszent (3,4)		
Validierungs-Adenom 17	Seneszent (23,4)		
Validierungs-Adenom 20	Seneszent (22,2)		
Validierungs-Adenom 21	Seneszent (1,3)		
Validierungs-Adenom 22	Seneszent (5,9)		
Validierungs-Adenom 8	Seneszent (16,6)	Kryo-Adenom 8	Seneszent
Validierungs-Adenom 10	Seneszent (1,6)	Kryo-Adenom 10	Seneszent
Validierungs-Adenom 12	Seneszent (14,1)	Kryo-Adenom 12	Seneszent
Validierungs-Adenom 11	Nicht seneszent (-10,4)	Kryo-Adenom 11	Seneszent
Validierungs-Adenom 5	Nicht seneszent (-11,7)	Kryo-Adenom 5	Nicht seneszent
Validierungs-Adenom 9	Nicht seneszent (-6,0)	Kryo-Adenom 9	Nicht seneszent
Validierungs-Adenom 6	Nicht seneszent (-1,6)	Kryo-Adenom 6	Nicht klassifizierbar/ nicht seneszent
Validierungs-Adenom 13	Nicht seneszent (-5,1)		
Validierungs-Adenom 14	Nicht seneszent (16,1), Ki67 > 12 %		

Tabelle 4: Validierungsadenome. Tabellarische Übersicht der 17 Adenome zur Validierung der Seneszenzsignatur. Der Seneszenzstatus der über den SI klassifizierten Validierungs-Adenome wurde für sieben Fälle mit dem Seneszenzstatus verglichen, der aus dem SA-beta-Gal-Assay und der immunhistochemischen Färbung auf Ki67 in Kryoproben derselben Adenome bekannt war. Von vier seneszenten Kryo-Adenomen wurden drei der zugehörigen Paraffinproben ebenfalls als seneszent eingestuft, eines wurde als nicht-seneszent scheinbar falsch eingestuft. Die den zwei nicht-seneszenten Kryo-Adenomen entsprechenden Validierungs-Adenome wurden ebenfalls als nicht-seneszent klassifiziert. Kryo-Adenom 6 war anhand des SA-beta-Gal-Assays und der Ki67-Färbung nur schwer einzustufen. Würde man es einer Gruppe zuordnen, so wäre dies die Nicht-seneszente, da dies dem überwiegenden Anteil dieses sehr heterogenen Adenoms entspricht. Das entsprechende Validierungs-Adenom wurde nach dem SI als nicht-seneszent eingestuft.

Von 17 Validierungs-Adenomen waren also sechs nicht-seneszent und elf seneszent. Das entspricht einem Prozentsatz nicht-seneszenter Adenome von 35,2 %. Der Prozentsatz nicht-seneszenter Adenome in den getesteten Kryoproben befand sich in der gleichen Größenordnung mit 27,2 % ohne Beachtung des schwer einzuordnenden Kryoadenom 6 bzw. 33,3 %, wenn Kryoadenom 6 als nicht-seneszent klassifiziert wird.

Zusammenfassung:

In diesem Schritt wurde ein Seneszenz-Index (SI) aus Seneszenz-assoziierten Markern hergestellt, die Paraffin eingebettete Proben in seneszente und nicht seneszente Proben klassifizieren sollte. Dazu wurden verschiedene Seneszenz-assoziierte Marker an aufeinanderfolgenden Schnitten in Paraffin-eingebetteten IMR90ras bzw. eco und verschiedenen kolorektalen Paraffin-Adenomen immunhistochemisch gefärbt. Fünf Lern-Adenome dienten mit ihrem jeweils maximal Ki6-gefärbten (als nicht-seneszentes) und ihrem minimal Ki67-gefärbten (als seneszentes) Areal zur Herstellung des SI. Klassifiziert wird das Ki67-negativste Areal. In den SI fließen PAI-1, p-Erk und HP1 γ ein. Zur Validierung der Signatur wurden siebzehn Validierungs-Adenome klassifiziert. Für sieben Adenome war der Seneszenzstatus aus korrespondierendem Kryomaterial über einen SA-beta-Gal-Assay und eine Ki67-Färbung bekannt. Es bestand eine Übereinstimmung von 85 %.

4.4 Evaluation klinischer Relevanz

Als nächstes sollte der Frage nachgegangen werden, ob der Seneszenzstatus eines Karzinoms vor Beginn einer Chemotherapie als prognostisches Kriterium für den langfristigen Erfolg der folgenden Chemotherapie gewertet werden kann. Dazu wurden Patienten aus dem Kollektiv der Charité zusammengestellt, bei denen bei Erstdiagnose (ED) bereits ein fernmetastasiertes kolorektales Karzinom (UICC-Stadium IV) vorlag. Als Einschlusskriterium galt weiterhin, dass alle Patienten nach operativer Entfernung des Primärtumors eine Chemotherapie mit 5-Fluorouracil/Leucovorin (5-FU/LV) erhielten. Ausschlusskriterien waren eine First-Line-Chemotherapie mit einem anderen Chemotherapeutikum. Genauso ausgeschlossen wurden Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa oder M. Crohn oder Patienten mit Verdacht auf familiäre kolorektale Karzinomsyndrome, da diesen andere molekulargenetische Veränderungen zugrunde liegen als spontan entstandenen kolorektalen Karzinomen. Weiterhin wurden keine Patienten in die Untersuchung eingeschlossen, die an einer anderen stark lebensverkürzenden Erkrankung wie einem weit fortgeschrittenen Zweitmalignom litten oder die die Chemotherapie vor Eintreten einer Krankheitsprogression abbrechen mussten (z.B. bei Tod durch postoperative Komplikationen oder Angina pectoris als fraglich unerwünschte Wirkung der Chemotherapie). Voraussetzung war ebenfalls, dass die Tumorresektion an der Charité durchgeführt wurde, so dass Paraffinmaterial zur Auswertung und Klassifizierung nach dem SI vorhanden war. Den Ein- und Ausschlusskriterien entsprechend wurden 30 Patienten ermittelt, für die aus Krankenakten folgende Informationen gesammelt wurden: Geschlecht, Alter bei Erstdiagnose, Tumorlokalisierung, TNM-Stadium, Anzahl fernmetastasierter Organe, Grading, Tumormarker CEA-Serumspiegel bei Erstdiagnose, das Vorliegen von Symptomen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und Zeitdauer von Erstdiagnose bis Progression der Erkrankung in Monaten (Tabelle 5). Als Progression der Erkrankung, Progressive Disease (=PD), galten das Neuauftreten von Metastasen, die Vergrößerung bereits bekannter Metastasen, sowie ein Lokalrezidiv, welche durch bildgebende Verfahren oder histologische Untersuchungen nachgewiesen werden konnten.

Für alle 30 Patienten wurde Paraffinmaterial von der Operation zur Tumorresektion nach Erstdiagnose zusammengestellt. Es wurden aufeinanderfolgende Paraffinschnitte hergestellt, die auf Ki67 und die weiteren Marker des SI entsprechend der im Materialteil dargestellten Protokolle immunhistochemisch gefärbt wurden. Jede Tumorprobe wurde nach dem SI klassifiziert (Tabelle 5, letzte Spalte; Abbildung 24).

Ergebnisse

Patidentnummer	Geschlecht	Alter bei ED (Jahre)	Lokalisation	Tumorausbreitung pT	LK-beteiligung pN	Anzahl fernmetastasierter Organe	Grading G	CEA ($\mu\text{g/l}$) bei ED	Symptome bei ED	Dauer von ED bis PD (Monate)	Seneszenzstatus (SI)
1	M	56	Coecum	3	2	1	2	3	Ja	9,7	Nicht seneszent (-3,2)
2	M	63	Sigma	2	2	1	2	236	Ja	8,1	Nicht seneszent (-2,7)
3	W	71	Rektum	3	2	1	2	5820	Ja	6,0	Seneszent (3,7)
4	W	56	Rektum	3	1	1	2	k.A.	Nein	10,0	Seneszent (10,2)
5	M	66	Colon asc.	3	2	1	2	k.A.	Ja	14,0	Seneszent (4,3)
6	M	52	Colon desc.	3	2	2	2	669	Ja	13,0	Seneszent (4,5)
7	W	71	Coecum	4	2	1	2	994	Ja	14,0	Seneszent (1,6)
8	M	52	Rektum	2	2	1	2	49	Nein	12,0	Nicht seneszent (-13,9)
9	M	61	Sigma	3	2	2	2	743	Ja	3,0	Nicht seneszent (-10,8)
10	W	57	Rektum	1	0	1	2	17	Nein	11,0	Seneszent (2,8)
11	M	47	Rektum	3	2	2	2	k.A.	Ja	13,6	Seneszent (5,3)
12	M	68	Re. Flexur	4	1	1	2	32	Nein	12,0	Nicht seneszent (2,4)
13	M	58	Rektum	3	2	1	2	100	Nein	18,0	Nicht seneszent (-0,6; Ki67 > 12 %)
14	M	60	Rektum	4	2	2	3	k.A.	Nein	12,0	Seneszent (2,5)
15	W	71	Coecum	3	2	1	3	12	Nein	16,7	Seneszent (2,1)
16	M	63	Colon asc.	3	0	1	2	6	Ja	8,0	Nicht seneszent (-1,6)
17	W	57	Re. Flexur	4	2	3	3	2	Ja	3,7	Nicht seneszent (-4,8)
18	W	48	Re. Flexur	4	1	1	3	k.A.	Ja	3,0	Nicht seneszent (-8,4)
19	M	56	Transversum	3	2	1	3	141	Ja	6,5	Seneszent (22,6)
20	W	55	Rektum	3	2	1	3	2	Ja	3,2	Nicht seneszent (-10,7)

Ergebnisse

21	M	64	Sigma	4	2	2		k.A.	Ja	3,0	Nicht seneszent (-1,3)
22	W	63	Rektum	4	1	2		k.A.	Ja	17,0	Seneszent (7,6)
23	M	51	Re. Flexur	4	2	3	3	51	Ja	4,0	Nicht seneszent (-9,9)
24	W	59	Sigma	4	2	1		7780	Ja	4,6	Seneszent (5,0)
25	W	61	Sigma	3	2	1	2	37	Ja	4,9	Nicht klassifizierbar (0,7)
26	M	62	Rektum	4	2	2	3	k.A.	Ja	7,0	Nicht seneszent (-1,2)
27	W	64	Colon asc.	4	2	3	2	k.A.	Ja	6,0	Nicht seneszent (-9,4)
28	W	69	Coecum	3	2	1	3	k.A.	Nein	4,9	Nicht seneszent (-12,9)
29	W	80	Rektum	3	2	1	2	k.A.	Ja	10,1	Nicht seneszent (-1,3)
30	W	78	Coecum	4	2	2	3	k.A.	Nein	4,0	Nicht seneszent (-13,1)

Tabelle 5: Patientendaten. Überblick über die zusammengestellten Daten der 30 Patienten, die die Einschlusskriterien erfüllen. Gezeigt sind die Daten für Geschlecht, Alter bei Erstdiagnose, Tumorlokalisation, Tumorausbreitung pT und Lymphknotenbeteiligung pN, Anzahl der fernmetastasierten Organe, Grading, der Tumormarker CEA bei Erstdiagnose, die Anwesenheit von Symptomen bei Erstdiagnose, sowie die Dauer von Erstdiagnose bis Feststellung einer Progression der Erkrankung (Progressive Disease) in Monaten. In der letzten Spalte ist die Klassifikation der Paraffin-Karzinomproben nach dem SI dargestellt.

Ein Fall (Patient 25) wurde von der weiteren Auswertung ausgeschlossen, da der SI-Wert mit 0,07 im nicht eindeutig klassifizierbaren Bereich lag. Für die restlichen 29 Fälle wurde die Zeitdauer von Erstdiagnose bis Feststellung einer Krankheitsprogression per Kaplan-Meier-Kurve und Mantel-Cox/ Logrank-Test für die Gruppen seneszenter und nicht-seneszenter Karzinome verglichen (Abbildung 25).

Die Gruppe der seneszenten Karzinome umfasste 12 Fälle und hatte eine mediane progressionsfreie Überlebensdauer von 12,0 Monaten. Die Gruppe der nicht-seneszenten Karzinome umfasste 17 Fälle und hatte eine mediane progressionsfreie Überlebensdauer von 6,0 Monaten. Es konnte ein statistisch signifikant längeres progressionsfreies Überleben in der Gruppe der seneszenten Karzinome im Vergleich zu den nicht-seneszenten Karzinomen gezeigt

Ergebnisse

werden ($p=0,044$; Mantel-Cox Log-Rank Test). Bei der statistischen Auswertung nach Breslow, bei der Unterschiede zu Beginn von Überlebenskurven stärker einfließen, ergab sich ein p-Wert von 0,009.

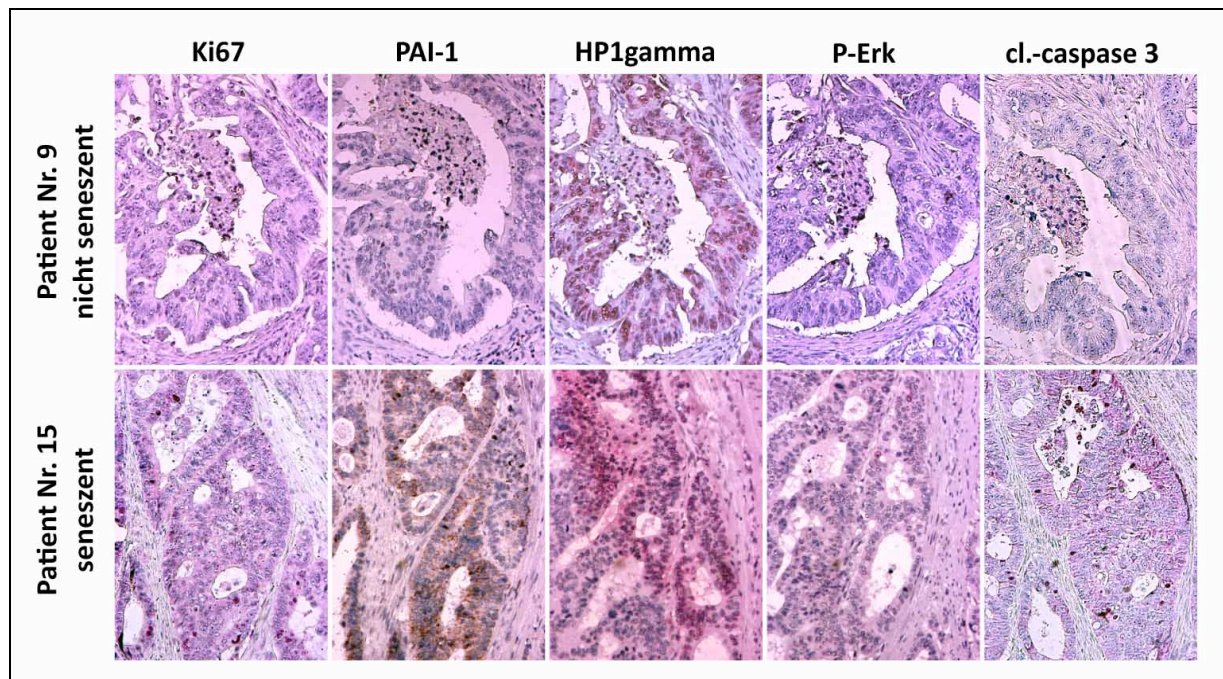


Abbildung 24: Markerverteilung Karzinompatienten. Zwei Beispiele von Karzinomen mit dem zur SI-Klassifikation notwendigen Areal. An aufeinanderfolgenden, auf die verschiedenen Marker des SI gefärbten Schnitten wurden die mit dem Ki67-negativsten Areal korrespondierenden Areale aufgesucht und ausgezählt. Oben das Karzinom von Patient 9 als Beispiel eines als nicht-seneszent klassifizierten Karzinoms, unten das Karzinom von Patient 15 als Beispiel eines als seneszent klassifizierten Karzinoms. Dargestellt sind die für die Seneszenzsignatur relevanten Färbungen, sowie die Färbung auf Cleaved Caspase 3 zur Darstellung von Apoptose.

Die beiden Gruppen wurden nun hinsichtlich der Verteilung anderer Faktoren untersucht, die prognostisch relevant sein könnten und den Überlebensunterschied erklären könnten. Dazu wurden mit verschiedenen statistischen Tests folgende Faktoren auf signifikant unterschiedliche Verteilung in beiden Gruppen getestet (Tabelle 6): Alter bei Erstdiagnose, Geschlecht, Tumorlokalisation (Vergleich von Rektum versus Kolon, sowie Vergleich von linkem versus rechtem Kolon inklusive Transversum), CEA-Spiegel im Serum, Symptome bei Erstdiagnose, Tumorausbreitung pT, Lymphknotenbeteiligung pN, Anzahl metastasierter Organe, Grading. Für keinen Faktor ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen feststellen.

Ergebnisse

Erwähnt werden soll, dass der Unterschied des CEA-Spiegels im Serum einen p-Wert nahe der Signifikanzgrenze erreichte ($p=0,051$). Die seneszenten Karzinome zeigten hier tendenziell höhere CEA-Spiegel als die nicht seneszenten Karzinome. Nicht für alle Patienten konnten CEA-Spiegel zum Zeitpunkt der Erstdiagnose aus den Krankenakten ermittelt werden, so dass unklar bleibt, ob der Unterschied bei höheren Fallzahlen (hier nur 17 von 29 Fällen) statistische Signifikanz erreichen würde. Ein erhöhter CEA-Spiegel zählt beim kolorektalen Karzinom, wie in der Einleitung ausgeführt, als negativer Prognosefaktor für das Überleben.

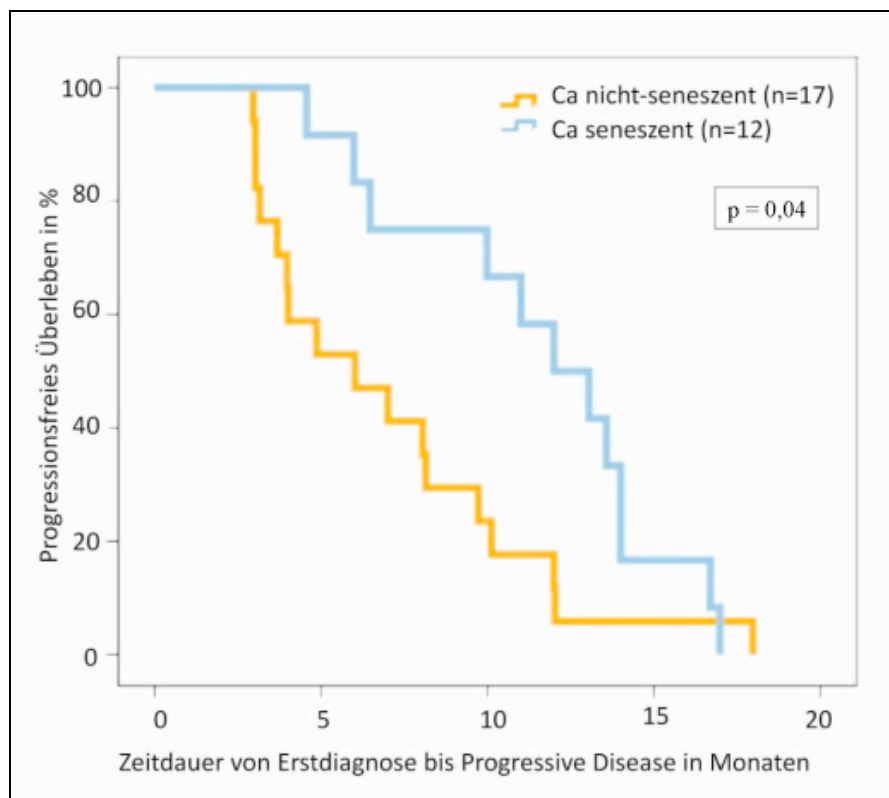


Abbildung 25: Progressionsfreies Überleben. Kaplan-Meier-Kurve zur Darstellung der Wahrscheinlichkeit des progressionsfreien Überlebens von der Erstdiagnose in Monaten in Abhängigkeit vom Seneszenzstatus. Als seneszent klassifizierte Karzinome (blau, $n=12$) zeigen im Vergleich zu nicht-seneszent klassifizierten Karzinomen (orange, $n=17$) einen signifikanten Überlebensvorteil (12,0 vs. 6,0 Monate; $p=0,04$, Mantel-Cox/ Log-Rank Test).

Weiterhin sollten die beiden Gruppen auf Unterschiede von Proliferation, Apoptose und *ras*-Mutationsstatus untersucht werden. Dazu wurde je Probe der Mittelwert der Ki67-Färbung von 10 verschiedenen Arealen als Maß der Proliferation und der Mittelwert der cleaved Caspase 3-Färbung von 10 verschiedenen Arealen als Maß für Apoptose gewertet (Abbildung 24).

Ergebnisse

Variable	Statistischer Test, Fallzahl	p-Wert	Signifikanz?
Alter bei ED in Jahren	Mann-Whitney-Test, n=29	1,00	Nicht signifikant
Geschlecht	Fisher-Test, n=29	0,46	Nicht signifikant
Tumorlokalisation (Rektum vs. Kolon)	Fisher-Test, n=29	0,43	Nicht signifikant
Tumorlokalisation (Linkes vs. rechtes Kolon)	Fisher-Test, n=18	0,34	Nicht signifikant
CEA-Spiegel im Serum	Mann-Whitney-Test, n=17	0,05	Nicht signifikant, Tendenz: höhere Werte bei seneszenten Fällen
Symptome bei ED (ja vs. Nein)	Chi-Quadrat nach Pearson, n=29	0,82	Nicht signifikant
pT	Chi-Quadrat nach Pearson, n=29	0,31	Nicht signifikant
pN	Chi-Quadrat nach Pearson, n=29	0,89	Nicht signifikant
Anzahl der metastasierten Organe (1 vs. >1)	Fisher-Test, n=29	0,71	Nicht signifikant
Grading	Fisher-Test, n=26	0,68	Nicht signifikant
Ki67-Färbung (MW in %)	Mann-Whitney-Test, n=29	0,12	Nicht signifikant
Cl. Caspase 3-Färbung (MW in %)	Mann-Whitney-Test, n=27	0,10	Nicht signifikant
<i>ras</i> -Mutationsstatus: Wildtyp (WT) vs. Mutation (mut)	Fisher-Test, n=17	0,03	Signifikant, seneszente Fälle: 5/6 mut; nicht-seneszente Fälle: 2/11 mut

Tabelle 6: Überprüfung auf Gruppengleichheit. Überblick über die statistische Evaluation der Gruppengleichheit zwischen seneszent und nicht-seneszent klassifizierten Karzinomen. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich lediglich bei Betrachtung des Ras-Mutationsstatus. *Ras* ist häufiger in den seneszenten Karzinomen mutiert. Auffallend ist ebenfalls ein großer, jedoch nicht statistisch signifikanter Unterschied der CEA-Spiegel. Seneszente Fälle erwiesen häufiger erhöhte CEA-Spiegel als nicht-seneszente Fälle.

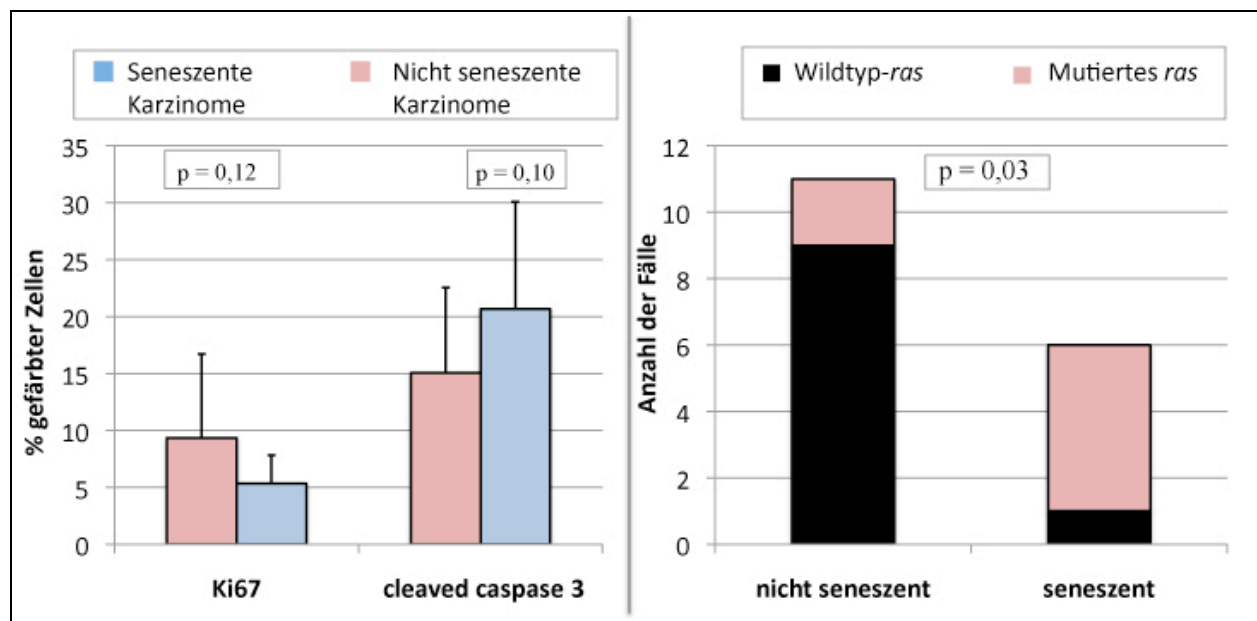


Abbildung 26: Proliferation, Apoptose und *ras*-Mutationen bei Karzinompatienten. Links: Darstellung der immunhistochemischen Färbungen auf den Proliferationsmarker Ki67 und den Apoptosemarker cleaved caspase 3. Mittelwerte \pm Standardabweichung der als seneszent (blau) bzw. als nicht-seneszent (rot) klassifizierten Karzinomfälle. Es zeigte sich weder für Ki67, noch für cleaved caspase 3 ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen seneszenten und nicht-seneszenter Gruppe. Rechts: Darstellung der Ergebnisse des K-*ras*-Mutationsassays zur Bestimmung der Anzahl der *ras*-Mutationen verteilt auf seneszente und nicht-seneszente Karzinome. An Kodon 12 oder 13 mutiertes *ras* (rot) zeigte sich signifikant häufiger bei seneszenten Karzinomfällen als bei nicht-seneszenten ($p=0,03$, exakter Test nach Fisher). Wildtyp-*ras* (schwarz) war häufiger bei nicht-seneszenten Fällen als bei seneszenten.

Der Antikörper auf Cleaved Caspase 3 weist ein Fragment der aktivierten Caspase 3 nach. Der *ras*-Mutationsstatus (Wildtyp=WT versus an Kodon 12/13 mutiertes *ras*=mut) wurde durch Amplifikation und Sequenzierung von Exon 1 des K-*ras* Gens bestimmt (Abbildung 26 rechts).

Ergebnisse

Für Apoptose und Proliferation zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen seneszenten und nicht seneszenten Karzinomen (Abbildung 26 links). Für den *Ras*-Mutationsstatus zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen seneszenten Karzinomen (n(mut)=5; n(WT)=1) und nicht seneszenten Karzinomen (n(mut)=2; n(WT)=9). Im untersuchten Kollektiv war eine *ras*-Mutation also bei den länger progressionsfrei Überlebenden, den seneszenten Patienten häufiger.

Zusammenfassung:

Die Paraffinproben von dreißig Patienten mit kolorektalen Karzinomen im fernmetastasierten Stadium bei Erstdiagnose (UICC IV) und einer first-line Chemotherapie mit 5-FU/LV wurden auf die Marker des SI gefärbt und in eine seneszente und eine nicht-seneszente Gruppe aufgeteilt. Der Vergleich des progressions-freien Überlebens beider Gruppen zeigte eine signifikant längere Überlebenszeit der als seneszent klassifizierten Karzinompatienten. Die Prüfung auf Gleichheit der beiden Gruppen hinsichtlich anderer prognostisch entscheidender Faktoren ergab einen signifikanten Unterschied bezüglich des *ras*-Mutationsstatus, der bei seneszenten Karzinomen häufiger Mutationen zeigte als bei nicht-seneszenten Karzinomen. Alle anderen untersuchten Faktoren zeigten keinen signifikanten Unterschied.

5 Diskussion

Mit zellulärer Seneszenz wird ein terminaler Zellzyklusarrest definiert, der mit in der Literatur ausführlich beschriebenen typischen Hauptmerkmalen einhergeht. Zu diesen gehören neben dem Wachstumsarrest vor allem das Vorliegen sogenannter Seneszenz-assoziiierter heterochromatischer Foci (SAHF) und charakteristischer morphologischer Veränderungen^{71,73}. Seneszenten Zellen sind abgeflachte, vergrößerte Zellen mit Zellausläufern und einem vakuolenreichen Zytoplasma⁶⁶. SAHF entstehen durch eine fokale Heterochromatinisierung der DNS als Antwort auf DNS-Schaden z.B. durch Onkogeneinwirkung. Durch die Heterochromatinisierung werden selektiv Gene abgeschaltet (Gen-Silencing), die für die S-Phase entscheidend sind. Ein Schlüsselmerkmal in Seneszenz arretierter Zellen ist die Blaufärbung im SA-beta-Gal-Assay⁶⁷. Hier ist das Enzym Beta-Galaktosidase in seneszenten Zellen aufgrund ihres hohen Expressionslevels im Gegensatz zu proliferierenden Zellen auch bei einem suboptimalen pH nachweisbar. Zunächst wurde Seneszenz als reines Zellkulturphänomen angesehen⁵⁰. Später erkannte man die replikative Seneszenz, die durch die zunehmende Verkürzung der Telomere verursacht wird, als Ursache für Zellalterung⁵¹. Davon konnte man Jahre später die prämaturre, onkogen-induzierte Seneszenz (OIS) abgrenzen, bei der es ohne Telomerverkürzung auf einen onkogenen Stimulus wie eine *ras*-Mutation hin zum Zellzyklusarrest kommt⁵⁴. Auf diese Weise erfüllt OIS vermutlich genauso wie der programmierte Zelltod Apoptose eine wichtige Funktion als Sicherungsmechanismus vor der Entstehung von Malignomen⁴³. In den letzten Jahren wurden mehrfach Hinweise auf einen seneszenten Arrest in prämaligen Läsionen gefunden^{60,59,75,58,84,85}. Dies stärkt die Vorstellung von Seneszenz als Schutzmechanismus früher Tumorstadien, der während der Progression zum manifesten Tumor verloren geht oder supprimiert wird^{56,84,85,87,123,86,125}. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Gammabestrahlung und zahlreiche Chemotherapeutika die Induktion von Seneszenz bewirken^{129,134,126,132,133,127}.

Die kolorektale Adenom-Karzinom-Sequenz wird durch Fearon und Vogelstein als ein Karzinogenesemodell in mehreren Schritten beschrieben. Von normaler Darmmukosa entsteht das Adenom, eine Dyplasie, die über mehrere Jahre als Präkanzerose bestehen bleibt, bevor sie zum malignen invasiven Karzinom entarten kann. Im Verlauf dieser Veränderung sammeln sich mehrere Mutationen von Tumorsuppressorgenen und Onkogenen an⁷. *K-ras* zählt zu den am häufigsten mutierten Genen und gilt als eine sehr frühzeitige Mutation bei der Entstehung des Kolonkarzinoms^{20,35}.

Welche Rolle spielt Seneszenz in der kolorektalen Adenom-Karzinom-Sequenz? Mit dieser Frage beschäftigt sich die vorliegende Arbeit. Dazu sollte untersucht werden, ob Hinweise auf Seneszenz in den einzelnen Stufen der kolorektalen Adenom-Karzinom-Sequenz zu finden sind. Vorstellbar wäre, dass seneszente Areale in einem invasiven Kolonkarzinom als Zeichen einer im Prinzip noch funktionsfähigen und durch Chemotherapeutika abrufbaren Seneszenz-Maschinerie zu werten sind. Aufgrund dieser Hypothese sollte anschließend untersucht werden, ob Hinweise auf Seneszenz im Kolonkarzinom mit besserem Ansprechen auf Chemotherapie korrelieren. Ein zu dieser Hypothese passendes Modell sieht die in Seneszenz arretierte prämaligene Läsion als Ausdruck von onkogener Aktivität zusammen mit weiteren Seneszenz-begünstigenden Faktoren wie z.B. die Gefäßdichte und Hypoxie. Nimmt der pro-seneszente Druck ab, wird es in diesem Modell also möglich, Seneszenz zu überwinden. Dann kommt es zum Progress in ein invasives Karzinom ohne generellen Funktionsverlust der Seneszenz-Maschinerie.

Das Auftreten von Seneszenz wurde durch einen SA-beta-Gal-Assay und die immunhistochemische Färbung auf den Proliferationsmarker Ki67 in Kryoproben von Kolonnormalgewebe, Kolonadenomen und Kolonkarzinomen untersucht. Für in Paraffin eingebettete Gewebe lässt sich der SA-beta-Gal-Assay nicht nutzen, so dass mehrere immunhistochemisch nachweisbare Seneszenz-assoziierte Marker gemeinsam betrachtet werden sollten. Aus ihnen wurde eine Signatur erstellt, die in Paraffin eingebettete Gewebeproben in seneszente und nicht-seneszente Gewebe unterteilen kann. Mit der Seneszenzsignatur wurden Tumorproben von 30 Patienten mit bei Erstdiagnose bereits fernmetastasierten kolorektalen Karzinomen untersucht, die alle 5-FU/LV als first-line Chemotherapie erhielten. Die Proben wurden als seneszente und nicht-seneszente Gewebe klassifiziert und das progressionsfreie Überleben der beiden Gruppen wurde verglichen.

5.1 Vergleich mit der aktuellen Literatur

Durch Serrano und andere Autoren wurden mit *ras* retroviral infizierte IMR90 Fibroblasten als klassisches Beispiel für Onkogen-induzierte Seneszenz ausgiebig in der Literatur beschrieben^{54,60,139,140}. Für die vorliegenden Untersuchungen sollten diese bereits gut charakterisierten Zellen als Kontrollen für OIS dienen. IMR90_{ras} wurden gemäß der Beschreibung von Serrano infiziert und selektiert. Die Seneszenz-typischen Eigenschaften wie der Wachstumsarrest, der Verlust der S-Phase im Zellzyklusprofil, sowie die charakteristische

Morphologie abgeflachter Zellen mit Zytoplasmaausläufern und vakuolenreichem Zytoplasma und die perinukleäre Blaufärbung im SA-beta-Gal-Assay konnten an den hergestellten IMR90ras erfolgreich rekapituliert werden. In den IMR90ras gelang außerdem auch der Nachweis von SAHF, die seit 2003 ebenfalls als essentielle Merkmale von Seneszenz gelten⁷¹.

Kritisch kann angemerkt werden, dass humane fetale Lungenfibroblasten als Kontrollen für Seneszenz in humanen adulten Epithelzellen der Kolonschleimhaut vielleicht nicht die optimale Wahl sind. In der Literatur finden sich jedoch zahlreiche Hinweise darauf, dass verschiedene Zellarten, unter anderem auch Epithelzellen, Melanozyten, Endothelzellen, Fibroblasten und Gliazellen, die Fähigkeit besitzen, in Seneszenz zu arretieren, und dass sich die Seneszenz-typischen Veränderungen weitgehend gleichen^{141,142,62,63,64,65}. Aufgrund dieser Studien und der guten Charakterisierung der IMR90ras in der aktuellen Literatur wurden Zellpellets mit IMR90ras Fibroblasten schockgefroren oder mit Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet als Seneszenzpositivkontrollen für die vorliegenden Untersuchungen an Gewebeschnitten gewählt.

Die Untersuchung an Kryoproben von Kolonnormalgeweben, Kolonadenomen und Kolonkarzinomen erfolgte mit Hilfe des SA-beta-Gal-Assays und immunhistochemischer Färbung auf den Proliferationsmarker Ki67. Ein Gewebe wurde als seneszent gewertet, wenn der Mittelwert SA-beta-Gal-positiver Zellen über dem Mittelwert Ki67-positiver Zellen lag. In der Literatur gibt es bisher keine allgemein anerkannte Definition, wann ein Gewebe mit teilweise seneszenten und teilweise nicht seneszenten Zellen als seneszent klassifiziert werden soll. Meist wird lediglich vom Vorkommen seneszenten Zellen in den untersuchten Geweben berichtet, manchmal werden die seneszenten Zellen quantifiziert, manchmal wird die Intensität der SA-beta-Gal-Färbung beschrieben^{59,143}. SA-beta-Gal positive Areale und Ki67 positive Areale schließen sich gegenseitig aus, weshalb hier der Mittelwert der ausgewerteten Einzelareale zu Hilfe genommen wurde, um den überwiegenden Teil einer Gewebeprobe zu ermitteln.

In dieser Studie wurde bei normaler kolorektaler Schleimhaut in der Krypte kein Hinweis auf Seneszenz gefunden, wohingegen die Lumen-nahe Oberfläche Seneszenzmerkmale mit teilweise SA-beta-Gal positiven Ki67 negativen Zellen zeigte. Die fünf Proben normaler Schleimhaut wurden jeweils in Lumen und Krypte geteilt. Alle Krypten wurden als nicht-seneszent, alle Lumen-nahen Epithelanteile als seneszent klassifiziert. Beschrieben wurde die SA-beta-Gal-Färbung an normaler kolorektaler Mukosa durch Bartkova, welcher im Gegensatz zu den von ihm untersuchten Adenomproben keine SA-beta-Gal positiven Zellen fand⁸⁵. Andere Autoren hingegen berichten von Seneszenz-assoziierten Markern an kryptenfernen Bereichen von in Paraffin eingebettetem normalem Kolonepithel¹⁴⁴, was wiederum den Beobachtungen der vorliegenden Studie entspricht. Die Kolonmukosa ist in Krypte und Lumen architektonisch und

Diskussion

funktionell unterschiedlich aufgebaut. Die Kryptenbasis beherbergt die multipotenten Stammzellen mit hohem mitotischem Potential, die Lumen-wärts immer weiter ausdifferenzieren und sich nicht mehr teilen^{145,146}. In Kenntnis der Epithelarchitektur und der Eigenschaften der in der Krypte gelegenen Stammzellen, sowie der zunehmenden Differenzierung der Zellen während der Verschiebung in Richtung Lumen, scheint das Ergebnis der vorliegenden Studie durchaus plausibel und könnte einen im Vergleich zur bisherigen Literatur etwas differenzierteren Blick darstellen.

Die zwölf untersuchten Kryoadenome wurden überwiegend als seneszent klassifiziert. Eines der Adenome enthielt Anteile mit sehr unterschiedlichem Färbeverhalten, so dass die Klassifikation schwer fiel. Von den übrigen elf Adenomen wurden 8 als seneszent klassifiziert, drei galten als nicht-seneszent. Es gibt bisher nur wenige Studien, die humane Kolonadenome auf Seneszenz untersuchten. Kuilman et al. berichten von Seneszenz-assoziierten Markern wie IL-8 und P16 an Ki67-negativen Stellen in 19 von 20 untersuchten Paraffinproben¹⁴⁴. Eine Quantifizierung der Seneszenz-typischen und der proliferierenden Areale in einzelnen Proben wird nicht aufgeführt. SA-beta-Gal-Färbungen an Kolongeweben wurden durchgeführt von Bartkova und Fujita. Bartkova wies an allen 25 untersuchten Kolonadenomen SA-beta-Gal positive Areale in unterschiedlicher Intensität nach⁸⁵. Fujita untersuchte acht Kolonadenome, sowie neun Kolonnormalgewebe und 29 Kolonkarzinome. Die SA-beta-Gal-Färbung zeigt er nur exemplarisch an einem Kolonadenom im Gegensatz zu SA-beta-Gal negativem Normalgewebe¹⁴⁷. In mehreren Studien benignen bzw. prämaligener Läsionen anderen Gewebeursprungs konnten ebenfalls in einem Großteil der Gewebe seneszente Zellen nachgewiesen werden. So berichteten Courtois-Cox z.B. von SA-beta-Gal positiven Zellen in 5 von 5 benignen Neurofibromen⁶⁰ und weitere Arbeitsgruppen zeigten SA-beta-Gal positive Zellen in humanen intraepithelialen Neoplasien der Prostata^{59,148}. Somit befinden sich die hier dargestellten Beobachtungen im Einklang mit Ergebnissen aus anderen Studien.

Die sechs Kryokarzinome wurden überwiegend als nicht-seneszent, eines der Karzinome jedoch als seneszent klassifiziert. Betrachtet man die einzelnen ausgewerteten Areale finden sich in zwei von sechs Karzinomen als seneszent zu klassifizierende Areale mit mehr SA-beta-Gal gefärbten als Ki67 positiven Zellen. Bartkova beschreibt in seiner Studie den Nachweis von Seneszenz-assoziierten Markern in Paraffingeweben von Kolonadenomen, zeigt aber in Kolonkarzinomen ebenfalls vereinzelt gefärbte Stellen⁸⁵. Fujita zeigte in seiner Studie keine SA-beta-Gal-Färbung von Kolonkarzinomgeweben. Er zeigt jedoch eine Verteilung von p53-Isoformen in Kolonadenomen, die er für Seneszenz-typisch hält. In den Kolonkarzinomen kann er diese nicht nachweisen und erklärt dies damit, dass die Karzinomzellen dem seneszenten

Diskussion

Arrest entkommen sind¹⁴⁷. In der Literatur finden sich dennoch immer wieder Hinweise darauf, dass ein kleiner Teil maligner Lymphome, Lungen-, Prostata- und Brustkrebsproben bei Tumormanifestation einen signifikanten Anteil seneszenter Zellen zeigt^{57,129,134,59,85}. So berichtet Reimann von 12-20 % SA-beta-Gal positiver Zellen in murinen Lymphomen zum Zeitpunkt der Diagnose⁵⁷. Roberson untersucht sechs Proben nichtkleinzelliger Bronchiakarzinome, von denen die Hälfte neoadjuvant mit Carboplatin und Taxol behandelt waren. Auch bei den unbehandelten Karzinomen gab es in einer von drei Proben vereinzelte SA-beta-Gal positive Karzinomzellen¹²⁹. In Te Poeles Untersuchung von zwanzig unbehandelten Brustkrebsproben konnte er in zwei SA-beta-Gal positive Zellen nachgewiesen¹³⁴. Auch in einigen Prostatakarzinomen wurde eine schwache SA-beta-Gal Färbung beobachtet⁵⁹. Die Beobachtung, dass seneszente Zellen in unbehandelten malignen Läsionen vorkommen, kann durch die vorliegende Studie in Kolonkarzinomen bestätigt werden. Für dieses Phänomen könnte man zwei sehr unterschiedliche Erklärungshypothesen aufstellen. Zum einen könnte es sich lediglich um Überreste der Seneszenz der prämaligen Läsion handeln, die sich nach jahrelangem Arrest nun in ein invasives Karzinom weiterentwickelt. Andererseits könnte diese residuelle Seneszenz jedoch auch als Zeichen eines im Prinzip noch intakten aber nur sporadisch ausgelösten Seneszenzprogrammes des manifesten Karzinoms zu werten sein. Als mögliche Auslöser wären z.B. heterogen vorliegende Lokalfaktoren wie die Sauerstoffspannung, die Gefäßversorgung oder stromale Zytokine vorstellbar. Um diesen Sachverhalt aufzuklären, sind weitere Studien nötig, die zum Beispiel direkt die Möglichkeit der Seneszenzinduktion in Karzinomen mit oder ohne sporadisch seneszente Zellen untersuchen.

SA-beta-Gal kann nur in nativen Zellen oder in Kryogewebe zuverlässig gefärbt werden. Bisher konnte kein anderer für Seneszenz spezifischer alleiniger Marker ermittelt werden, obwohl viele verschiedene Marker in Seneszenz bekannterweise hochreguliert werden^{76,74}. Deshalb sollte in der vorliegenden Studie ein Seneszenzindex aus verschiedenen Seneszenz-assoziierten Markern entwickelt werden, der es ermöglicht in Paraffin eingebettete Gewebeproben als seneszent oder nicht-seneszent zu klassifizieren. Zunächst wurden immunhistochemische Färbeprotokolle mit Hilfe von in Paraffin eingebetteten Zellpellets aus mit *ras* retroviral infizierten oder Kontroll-IMR90-Fibroblasten etabliert. Für diverse Seneszenz-Marker wurden Färbeprotokolle aufgestellt, die signifikant stärkere Färbungen in seneszenten Fibroblasten zeigten, was den Kenntnisstand über die Rolle dieser Marker in der Literatur widerspiegelt^{71,90,75,58,94,101,111}. Aufeinanderfolgende Schnitte von fünf Lernadenomen wurden entsprechend dieser Protokolle gefärbt. Das Areal mit den wenigsten Ki67 positiven Zellen wurde als seneszent definiert, das Areal mit den meisten Ki67 positiven Zellen als nicht-seneszent. Mit Hilfe dieses Lernsystems

Diskussion

wurden drei Marker ermittelt, die in den Seneszenzindex einfließen. Zur Klassifizierung eines Gewebes mit dem SI sollte das Ki67 negativste Areal betrachtet werden. Alle Lernadenome konnten richtig klassifiziert werden, wobei ein seneszenten Fall zu nahe am Schwellenwert Null lag, so dass er als nicht-klassifizierbar gewertet werden musste. Dies könnte dadurch verursacht sein, dass zur Normalisierung durch die Mittelwerte des jeweiligen Markers der fünf Lernadenome geteilt wurde. Dadurch sind die Seneszenzindexwerte bei den Lernadenomen teilweise sehr niedrig. Mit größeren Fallzahlen könnte und sollte man den Seneszenzindex für weitere Studien noch robuster aufstellen. Bei größeren Fallzahlen könnte man den Index auch über eine Regressionsanalyse oder eine Diskriminanzanalyse statistisch fundierter aufstellen, was bei den niedrigen Fallzahlen der vorliegenden Studie statistisch nicht korrekt wäre. Der Seneszenzindex wurde anschließend an 17 Validierungs-Paraffinadenomen angewandt, deren Seneszenzstatus in sieben Fällen durch SA-beta-Gal- und Ki67-Färbungen in korrespondierendem Kryomaterial bekannt war. Der richtige Seneszenzstatus konnte in den Validierungsadenomen anhand des SI in 85 % der Fälle ermittelt werden. Damit besteht mit dem SI zum ersten Mal die Möglichkeit, den Seneszenzstatus von in Paraffin eingebetteten Gewebeproben zu bestimmen.

Die klinische Bedeutsamkeit von seneszenten Arealen in einem invasiven Karzinom sollte in einer retrospektiven Studie von 30 Patienten untersucht werden, die an einem zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits fernmetastasierten Karzinom (UICC IV) litten und die nach der operativen Entfernung des Primärtumors als erste Chemotherapie 5-FU/LV erhielten. Mit dem SI wurde der Seneszenzstatus an Tumorproben zum Diagnosezeitpunkt bestimmt. Das Progressions-freie Überleben der seneszenten Gruppe war signifikant länger als das der nicht-seneszenten Gruppe. Obwohl es sich lediglich um eine geringe Fallzahl und eine retrospektive Untersuchung handelt, werden hier zum ersten Mal Daten gezeigt, die den prädiktiven Wert des Seneszenzstatus eines Karzinoms für das Ansprechen auf Chemotherapie aufzeigen. Betrachtet man die zunehmenden Publikationen, die Seneszenz als Tumorsuppressormechanismus in prämaligen Läsionen und die Induzierbarkeit von Seneszenz durch Chemotherapeutika oder Bestrahlung darlegen^{126,84,85,58,59,134,129}, so passt das Ergebnis der vorliegenden Studie nicht nur gut zur aktuellen Sicht über die Rolle von Onkogen-induzierter Seneszenz, sondern gibt erste Hinweise für mögliche weiter gehende klinische Implikationen. So zeigt das Ergebnis den Zusammenhang von Onkogen- und Therapie-induzierter Seneszenz.

Die univariate Überprüfung beider Gruppen auf Gleichheit hinsichtlich zahlreicher anderer prognostisch entscheidender Faktoren ergab nur für den *ras*-Mutationsstatus einen signifikanten Unterschied, nicht aber für Geschlecht, Alter, Tumorlokalisation, CEA-Serumspiegel, T- und N-Stadium, Grading, Wachstumsfraktion und Apoptoserate. Eine multivariate Analyse ließ sich

Diskussion

aufgrund der geringen Fallzahl nicht durchführen. Seneszente Karzinome zeigten häufiger *ras*-Mutationen als nicht-seneszente Karzinome. Mutationen des Onkogens *ras* gelten sonst häufig als schlechter Prognosefaktor, so wird in der RASCAL-Studie das Vorkommen einer *ras*-Mutation in einem kolorektalen Karzinom mit einem 26 % höheren Risiko, zu sterben korreliert^{149,36}. Somit erscheint das vorliegende Ergebnis auf den ersten Blick der aktuellen Literatur zu widersprechen. In der RASCAL II-Studie wurden *ras*-Mutationen differenzierter betrachtet und es konnte lediglich für Mutationen von Glycin zu Valin auf Kodon 12 ein signifikant schlechteres Überleben festgestellt werden. Diese Mutation wurde nur in 8,6 % des untersuchten Kollektivs nachgewiesen. Andere Mutationen von *ras* konnten nicht statistisch signifikant mit schlechteren Überlebensraten korreliert werden³⁷. Auch in einer weiteren erst kürzlich publizierten großen Studie konnte weder für das Gesamtüberleben, noch für das Progressions-freie Überleben eine prognostische Relevanz von *ras*-Mutationen im kolorektalen Karzinom nachgewiesen werden³⁸. Die hier vorliegende Studie betrachtet nicht die Art der *ras*-Mutation, was ein Grund dafür sein könnte, dass der *ras*-Mutationsstatus nicht mit schlechterem Überleben einhergeht. Die vorliegende Studie liefert Grund zur Annahme, dass *ras*-Mutationen, die mit einem seneszenten Phänotyp einhergehen, nicht wie sonst üblicherweise angenommen mit einer schlechten Prognose korrelieren. Bei einem seneszenten Phänotyp könnte eine *ras*-Mutation sogar mit einer besseren Prognose verbunden sein.

Die Färbung auf Ki67 hat zwar für Diagnose und Prognose eine weite klinische Verbreitung gefunden, ein direkter Vorhersagewert für das Therapieergebnis konnte bisher aber nicht nachgewiesen werden¹⁵⁰. Auch für den prädiktiven Wert von Apoptose für das Ansprechen auf Chemotherapie konnten bisher keine eindeutigen Ergebnisse gefunden werden^{151,152,153}. Bezüglich der Verteilung des Proliferationsmarkers Ki67 und des Apoptosemarkers cleaved Caspase 3 ließ sich in den beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied zeigen. Das unterschiedliche Progressions-freie Überleben der seneszenten Gruppe kann somit nicht auf den Proliferations- oder den Apoptosestatus zurückgeführt werden.

Andere Faktoren mit bekanntem prognostischem Wert wie die Tumordinvasion, der Lymphknotenbefall, die Anzahl metastasierter Organe, das Grading, Alter und Geschlecht, sowie Lokalisation des Primärtumors, Symptomatik bei Erstdiagnose und Serumspiegel des Tumormarkers CEA unterschieden sich in den beiden Gruppen ebenfalls nicht signifikant. Erwähnenswert ist, dass der Unterschied für den Tumormarker CEA allerdings nahe der Signifikanzgrenze lag. Dies könnte bei einer größeren Stichprobe eventuell zu einem signifikanten Ergebnis führen. Höhere CEA-Serumspiegel korrelierten mit den Karzinomen mit seneszenten Arealen, also auch mit dem besseren Progressions-freien Überleben. Dies scheint

zunächst eher widersprüchlich mit dem gegenwärtigen Stand der Literatur. Präoperativ erhöhte Konzentrationen werden in einigen Studien mit schlechteren 5-JÜR und kürzerem Progressionsfreiem Überleben assoziiert. Diese Korrelation trifft allerdings vor allem auf frühe Stadien kolorektaler Karzinome zu, in fortgeschrittenen Karzinomen konnten diese Ergebnisse nicht bestätigt werden^{154,155}.

5.2 Kritische Bemerkungen

Onkogen-induzierte Seneszenz ist ein erst seit wenigen Jahren bekanntes Phänomen. Das aktuelle Verständnis von OIS hat sich seit seiner ersten Beschreibung stark verändert. Die ihr zugrunde liegenden molekularen Veränderungen und molekularen Mechanismen sind nach wie vor nur unvollständig geklärt. Deshalb hat sich auch das breite Spektrum an Seneszenz-assoziierten Markern in den letzten Jahren immer wieder verändert und immer wieder werden neue potentielle Seneszenzmarker in der wissenschaftlichen Diskussion aufgeworfen⁷⁶. Ein Beispiel dafür stellt die Studie von Sporn et al. dar, in der als möglicher Surrogatmarker für Seneszenz mit prognostischer Aussagekraft die Histonvariante MacroH2A.1 untersucht wird^{156,157}. In dieser Studie wird nachgewiesen, dass MacroH2A1.1 in seneszenten Zellen hochreguliert ist. Gleichzeitig zeigten die Autoren, dass Proben von humanen nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen, die stärkere MacroH2A1.1-Expression aufwiesen, mit einem statistisch signifikant längeren Tumor-freien Überleben korrelierten. Außerdem gibt es zahlreiche Überlappungspunkte mit anderen Tumorsuppressionsmechanismen wie Apoptose und auch Autophagie^{158,159,160}, was die Bewertung einzelner Seneszenzmarker erschwert. Dies macht die Auswahl der Marker für einen Seneszenzindex zu einem kritischen Punkt, der bei der Bewertung der vorliegenden Ergebnisse zu beachten ist. Statistisch erstrebenswert wäre die Ermittlung des Seneszenzindex mittels einer Varianzanalyse oder einer Regressionsanalyse, in der eine große Breite an Seneszenzmarkern untersucht wird. Dazu wären wesentlich größere Fallzahlen notwendig. Wünschenswert wäre weiterhin die Validierung des SI an einem größeren Umfang von Kryogewebe. Dies war in der vorliegenden Studie aufgrund von begrenzter Zeit und begrenztem Material nicht durchführbar.

Die Aussage dieser Studie ist deshalb vor allem durch die geringen Fallzahlen bei der Erstellung des Seneszenzindex und auch in der Überlebensanalyse limitiert, generiert aber eine wichtige Hypothese, die in Folgestudien mit entsprechender Teststärke zu validieren ist. Die Ermittlung

und Validierung eines SI basierend auf größeren Fallzahlen und zusätzliche prospektive Untersuchungen an einem größeren Patientenkollektiv sind notwendig.

Zu bedenken ist außerdem, dass die vorliegende Studie nur korrelative Daten erhebt und keine molekularen Mechanismen analysiert hat. Denkbar ist zwar ein Modell, in dem ein kolorektales Adenom als prämaligne Läsion nach anfänglicher Proliferation durch OIS in einen jahrelangen Wachstumsarrest verfällt und erst nach Überwinden dieses Schutzmechanismus ein invasives Karzinom entsteht. Vorstellbar ist daran anknüpfend auch, dass es Karzinome mit noch intakter Seneszenzmaschinerie gibt, die durch Chemotherapie abrufbar und einsetzbar wäre und damit zu einem längeren Progressions-freien Intervall führen als dies durch dieselbe Chemotherapie an einem nicht mehr Seneszenz-fähigen Karzinom möglich ist. Dies wäre eine Vorstellung, mit der die vorliegenden Daten erklärt werden könnten. Ob sporadisch vorliegende seneszente Zellen tatsächlich eine allgemein im Karzinom intakt vorgehaltene Seneszenzmaschinerie widerspiegeln und ob Chemotherapie dann auch tatsächlich in relevantem Ausmaß Seneszenz auslöst, war nicht Gegenstand der vorliegenden Studie, muss aber mechanistisch zukünftig untersucht werden.

5.3 Ausblick

Diese Studie berichtet zum ersten Mal, wie ein Seneszenzindex in unbehandelten humanen Tumorproben zum Zeitpunkt der Diagnose als Vorhersageparameter für das Ergebnis der anschließenden Chemotherapie verwendet werden kann. Damit wird auch zum ersten Mal zelluläre Seneszenz mit dem Therapieergebnis in Zusammenhang gebracht. Ob sporadische seneszente Zellen in einem manifesten Tumor kleine Überbleibsel des prämaligen Zustandes darstellen oder ob sie ein erhaltenes und abrufbares Seneszenzprogramm im gesamten Tumor widerspiegeln ist bisher unklar. Die Daten dieser Studie unterstützen das zweite Modell. Hier wird in Seneszenz-fähigen Tumorzellen Therapie-induzierte Seneszenz durch DNS-schädigende Chemotherapeutika ausgelöst, welche zum Gesamtansprechen auf die Therapie beiträgt. Mit Sicherheit sind weitere Studien erforderlich, um festzustellen, ob ein größeres Ausmaß an sporadischen seneszenten Krebszellen wirklich mit mehr TIS-positiven Zellen *in situ* einhergeht. Dazu sollten Tumorbiopsien vor und einige Tage nach Chemotherapie auf Seneszenz untersucht werden. Außerdem könnte man die erhaltene Seneszenz-Fähigkeit eines Malignoms therapeutisch nutzen, wenn man neue Therapien entwickelt, die nicht mehr die DNS schädigen, sondern direkt Seneszenz-induzierend wirken. Die Vorstellung von Seneszenz-anschaltenden

Diskussion

Modulatoren als eine neue Form der gezielten Krebstherapien klingt zunächst vielversprechend. Möglicherweise könnten aber in Seneszenz arretierte, sozusagen schlafende Tumorzellen ein gefährliches Potential für Tumorrezidive darstellen. Diese Gefahr ist einerseits als direkte tumorigene Wirkung auf Nachbarzellen vorstellbar¹⁶¹. Andererseits bleibt die Gefahr eines möglichen Überwindens von Seneszenz und damit des Wieder-Eintritts in den Zellzyklus, wenn Seneszenz-begünstigende Faktoren abnehmen. Deshalb sind auch die Mechanismen, die für die Beseitigung der seneszenten Tumorzellen verantwortlich sind, für Folgestudien von großem Interesse. Seneszente Zellen sezernieren eine Vielzahl pro-inflammatorischer Zytokine, Chemokine und Gewebe-verändernder Enzyme, bekannt als Seneszenz-assoziiierter sekretorischer Phänotyp^{144,148}. Die sezernierten Faktoren scheinen einerseits über parakrine Funktionen benachbarte Zellen in Seneszenz zu bringen, andererseits könnten sie über die Stimulation des Immunsystems an der Beseitigung seneszenten Zellen beteiligt sein¹²². Es gibt aber auch Hinweise darauf, dass diese sezernierten Faktoren den malignen Phänotyp benachbarter Tumorzellen stimulieren könnten¹⁶¹. Dies sind nur einige Punkte, die auf dem Weg zu einem möglichen zukünftigen Einsatz Seneszenz-induzierender Krebstherapeutika besser verstanden werden müssen. Die Bedeutung seneszenten Zellen zum Zeitpunkt der Diagnose als Prognosefaktor für das Therapieergebnis sollte in größeren prospektiven Studien noch genauer evaluiert werden.

6 Zusammenfassung

Die Entstehung des kolorektalen Adenokarzinoms wird über das Mehrstufen-Karzinogenesemodell beschrieben. Mehrere Mutationen bedingen zusammen den Übergang von normalem Schleimhautepithel zum prämaligen Adenom und schließlich zum malignen invasiven Karzinom. Neben dem programmierten Zelltod Apoptose wird auch der terminale Proliferationsarrest, die sogenannte zelluläre Seneszenz, zunehmend als Schutzmechanismus der Zelle vor der malignen Transformation angesehen. Diese Hypothese wird unter anderem durch den Nachweis von Seneszenz in verschiedenen prämaligen Läsionen wie z.B. humanen Naevuszell-Naevi gestützt. Seneszenz kann durch die Aktivierung von Onkogenen wie *K-ras* einem der häufigsten Mutationsereignisse im kolorektalen Adenokarzinom, aber auch durch DNS-schädigende Chemotherapeutika wie 5-Fluorouracil ausgelöst werden. Seneszente Zellen zeigen charakteristische morphologische Veränderungen und die typische perinukleäre Blaufärbung im Seneszenz-assoziierten-beta-Galaktosidase-(SA-beta-Gal-)Assay bei saurem pH, der nur in kryokonserviertem Material durchführbar ist. Bisher konnte kein alleiniger Seneszenzspezifischer Marker eruiert werden, der auch in Paraffin eingebetteten Proben nachweisbar ist.

So wurde in dieser Arbeit untersucht, welche Rolle Seneszenz in den verschiedenen Stufen der kolorektalen Adenom-Karzinom-Sequenz spielt und ob der Nachweis von Seneszenz in Karzinomen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose prädiktiven Aussagewert für den Langzeitverlauf nach Chemotherapie hat.

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst kryokonservierte Gewebe der kolorektalen Adenom-Karzinom-Sequenz durch den SA-beta-Gal-Assay zusammen mit immunhistochemischen Färbungen auf den Proliferationsmarker Ki67 auf Seneszenz untersucht. In kolorektalen Adenomen konnte Seneszenz in den meisten untersuchten Proben nachgewiesen werden. Die kolorektalen Karzinome zeigten überwiegend keine Seneszenz, aber hier ließen sich teilweise auch vereinzelte seneszente Areale nachweisen. Durch die Zusammenschau immunhistochemischer Färbungen verschiedener Seneszenz-assoziiierter Marker konnte im nächsten Schritt ein Seneszenzindex für in Paraffin eingebettete Proben erstellt werden. Der Seneszenzindex wurde an Paraffinadenomen validiert, deren Seneszenzstatus teilweise bereits aus Untersuchungen an korrespondierendem Kryomaterial bekannt war. Schließlich sollte der prädiktive Wert von Seneszenz auf das Therapieansprechen evaluiert werden. Hierzu wurde der Seneszenzstatus zum Zeitpunkt der Diagnose von dreißig Patienten mit fernmetastasierten kolorektalen Karzinomen ermittelt. Sie wurden mit Hilfe des Seneszenzindexes in eine seneszente und eine nicht-seneszente Gruppe aufgeteilt. Alle Patienten erhielten postoperativ

Zusammenfassung

eine Chemotherapie mit 5-Fluorouracil/Leucovorin. Die retrospektive Analyse der Überlebensdaten zeigte mit median 12,0 versus 6,0 Monaten ein statistisch signifikant längeres progressions-freies Überleben in der seneszenten Gruppe im Vergleich zu der nicht seneszenten Gruppe.

Der Seneszenzindex unbehandelter humaner Tumorproben zum Zeitpunkt der Diagnose konnte gemäß dieser Studie demnach erfolgreich als Vorhersageparameter für das Ergebnis der anschließenden Chemotherapie verwendet werden. Damit zeigt diese Studie zum ersten Mal den Zusammenhang von zellulärer Seneszenz mit dem Therapieergebnis. Sollte sich dieser Zusammenhang in weiteren Studien bestätigen, könnte die Seneszenzfähigkeit eines Tumors in Zukunft als ein Entscheidungskriterium bei der Auswahl der Chemotherapeutika zu Hilfe genommen werden oder spezielle Seneszenz-anschaltende Modulatoren könnten eine neue Form der gezielten Krebstherapien darstellen.

7 Anhang

7.1 Literaturverzeichnis

- Ref. 1 Bertz J, Kaatsch P, Schön D, et al. Krebs in Deutschland: Häufigkeiten und Trends. 4 Edition: Arbeitsgemeinschaft bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland/ Robert Koch Institut, 2004:28-31.
- Ref. 2 Gesundheit. Todesursachen in Deutschland. Statistisches Bundesamt. Fachserie 12, Reihe 4, 2008:21. (www.destatis.de, Artikelnummer: 2120400087004, erschienen am 23.02.2010)
- Ref. 3 Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer MJ, et al. Intake of fat, meat, and fiber in relation to risk of colon cancer in men. *Cancer Res* 1994; 54:2390-2397.
- Ref. 4 Russo A, Franceschi S, Vecchia CL, et al. Body size and colorectal-cancer risk. *Int J Cancer* 1998; 78:161-165.
- Ref. 5 Hsing AW, McLaughlin JK, Chow WH, et al. Risk factors for colorectal cancer in a prospective study among U.S. white men. *Int J Cancer* 1998; 77:549-553.
- Ref. 6 Müller A, Fishel R. Mismatch repair and the hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome (HNPCC). *Cancer Invest* 2002; 20:102-109.
- Ref. 7 Fearon ER, Vogelstein BA. Genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61:759-767.
- Ref. 8 Van Hogezaand RA, Eichhorn RF, Choudry A, et al. Malignancies in inflammatory bowel disease: fact or fiction? *Scand J Gastroenterol Suppl* 2002; 48-53.
- Ref. 9 Junqueira LC, Carneiro J, Gratzl M. Histologie. 6. Auflage. Springer-Verlag 260-263.
- Ref. 10 Southern Illinois School of Medicine. Histological images of the lower gastrointestinal tract (<http://www.siumed.edu/~dking2/erg/colon.htm>)
- Ref. 11 O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96:1420-1425.
- Ref. 12 Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, et al. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124:979-994.
- Ref. 13 Hölzel D, Schubert-Fritschle G, Schmidt M, et al. Jahresbericht 1998 des klinisch-epidemiologischen Krebsregisters am Tumorzentrum München. Schwerpunkt: Kolorektale Karzinome. 1998 (http://www.tumorregister-muenchen.de/annals/J1998/_____J199800119990830JB19980110.pdf).
- Ref. 14 Quaglia A, Tavilla A, Shack L, et al. The cancer survival gap between elderly and middle-aged patients in Europe is widening. *Eur J Cancer* 2008.

Anhang

- Ref. 15 Massacesi C, Pistilli B, Valeri M, et al. Predictors of short-term survival and progression to chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer treated with 5-fluorouracil-based regimens. *Am J Clin Oncol* 2002; 25:140-148.
- Ref. 16 Wolters U, Stützer H, Keller HW, et al. Colorectal cancer--a multivariate analysis of prognostic factors. *Eur J Surg Oncol* 1996; 22:592-597.
- Ref. 17 Zucchetti F, Negro F, Matera D, et al. Colorectal cancer: obstruction is an independent negative prognostic factor after radical resection. *Ann Ital Chir* 2002; 73:421-425.
- Ref. 18 Expectancy or primary chemotherapy in patients with advanced asymptomatic colorectal cancer: a randomized trial. Nordic Gastrointestinal Tumor Adjuvant Therapy Group. *J Clin Oncol* 1992; 10:904-911.
- Ref. 19 Hermanek P. Dysplasia in the gastrointestinal tract: definition and clinical significance. *Surg Endosc* 1987; 1:5-10.
- Ref. 20 Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med, Department of Pathology* 1988; 319:525-532.
- Ref. 21 Cheng L, Lai M. Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2003; 9:2642-2649.
- Ref. 23 Kim EC, Lance P. Colorectal polyps and their relationship to cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 1997; 26:1-17.
- Ref. 24 Vogelstein, B. Cancer. A deadly inheritance. *Nature* 1990; 348:681-682.
- Ref. 25 Harvey JJ. An unidentified virus which causes the rapid production of tumours in mice. *Nature* 1964; 204:1104-1105.
- Ref. 26 Kirsten WH, Mayer LA. Morphologic responses to a murine erythroblastosis virus. *J Natl Cancer Inst* 1967; 39:311-335.
- Ref. 27 Parada LF, Tabin CJ, Shih C, et al. Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. *Nature* 1982; 297:474-478.
- Ref. 28 Shimizu K, Goldfarb M, Suard Y, et al. Three human transforming genes are related to the viral ras oncogenes. *Proc Natl Acad Sci* 1983; 80:2112-2116.
- Ref. 29 Land H, Parada LF, Weinberg RA. Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 1983; 304:596-602.
- Ref. 30 Bos JL. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989; 49:4682-4689.
- Ref. 31 Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 1987; 327:293-297.
- Ref. 32 Takayama T, Ohi M, Hayashi T, et al. Analysis of K-ras, APC, and beta-catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 2001; 121:599-611.
- Ref. 33 McLellan EA, Owen RA, Stepniowska KA, et al. High frequency of K-ras mutations in sporadic colorectal adenomas. *Gut* 1993; 34:392-396.

Anhang

- Ref. 34 Smith AJ, Stern HS, Penner M, et al. Somatic APC and K-ras codon 12 mutations in aberrant crypt foci from human colons. *Cancer Res* 1994; 54:5527-5530.
- Ref. 35 Takayama T, Miyanishi K, Hayashi T, et al. Colorectal cancer: genetics of development and metastasis. *J Gastroenterol* 2006; 41:185-192.
- Ref. 36 Benhattar J, Losi L, Chaubert P, et al. Prognostic significance of K-ras mutations in colorectal carcinoma. *Gastroenterology* 1993; 104:1044-1048.
- Ref. 37 Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, et al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. *Br J Cancer* 2001; 85:692-696.
- Ref. 38 Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, et al. Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *J Clin Oncol* 2010; 28:466-474.
- Ref. 39 Heidelberger C, Chaudhuri NK, Danneberg P, et al. Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature* 1957; 179:663-666.
- Ref. 40 Parker WB, Cheng YC. Metabolism and mechanism of action of 5-fluorouracil. *Pharmacol Ther* 1990; 48:381-395.
- Ref. 41 Major PP, Egan E, Herrick D, et al. 5-Fluorouracil incorporation in DNA of human breast carcinoma cells. *Cancer Res* 1982; 42:3005-3009.
- Ref. 42 Von Gerok W, Huber C, Meinertz T, et al. *Die innere Medizin: Referenzwerk für den Facharzt*. Edition 11, Schattauer Verlag 2006:1224.
- Ref. 43 Lowe SW, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumour suppression. *Nature* 2004; 432:307-315.
- Ref. 44 Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26:239-257.
- Ref. 45 Kroemer G, Zamzami N, Susin SA. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 1997; 18:44-51.
- Ref. 46 Golstein P. Controlling cell death. *Science* 1997; 275:1081-1082.
- Ref. 47 Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 1997; 22:299-306.
- Ref. 48 Walker PR, Smith C, Youdale T, et al. Topoisomerase II-reactive chemotherapeutic drugs induce apoptosis in thymocytes. *Cancer Res* 1991; 51:1078-1085.
- Ref. 49 Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 2002; 108:153-164.
- Ref. 50 Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1965; 37:614-636.
- Ref. 51 Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 1990; 345:458-460.
- Ref. 52 Herbig U, Jobling WA, Chen BPC, et al. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol Cell* 2004; 14:501-513.

- Ref. 53 d'Adda di Fagagna F, Teo S, Jackson SP. Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response. *Genes Dev* 2004; 18:1781-1799.
- Ref. 54 Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, et al. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 1997; 88:593-602.
- Ref. 55 Pascal T, Debaq-Chainiaux F, Chrétien A, et al. Comparison of replicative senescence and stress-induced premature senescence combining differential display and low-density DNA arrays. *FEBS Lett* 2005; 579:3651-3659.
- Ref. 56 Braig M, Lee S, Loddenkemper C, et al. Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* 2005; 436:660-665.
- Ref. 57 Reimann M, Lee S, Loddenkemper C, et al. Tumor stroma-derived TGF-beta limits myc-driven lymphomagenesis via Suv39h1-dependent senescence. *Cancer Cell* 2010; 17:262-272.
- Ref. 58 Michaloglou C, Vredeveld LCW, Soengas MS, et al. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 2005; 436:720-724.
- Ref. 59 Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, et al. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* 2005; 436:725-730.
- Ref. 60 Courtois-Cox S, Williams SMG, Reczek EE, et al. A negative feedback signaling network underlies oncogene-induced senescence. *Cancer Cell* 2006; 10:459-472.
- Ref. 61 Dhomen N, Reis-Filho JS, da Rocha Dias S, et al. Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice. *Cancer Cell* 2009; 15:294-303.
- Ref. 62 Nicke B, Bastien J, Khanna SJ, et al. Involvement of MINK, a Ste20 family kinase, in Ras oncogene-induced growth arrest in human ovarian surface epithelial cells. *Mol Cell* 2005; 20:673-685.
- Ref. 63 Denoyelle C, Abou-Rjaily G, Bezrookove V, et al. Anti-oncogenic role of the endoplasmic reticulum differentially activated by mutations in the MAPK pathway. *Nat Cell Biol* 2006; 8:1053-1063.
- Ref. 64 Uhrbom L, Nistér M, Westermarck B. Induction of senescence in human malignant glioma cells by p16INK4A. *Oncogene* 1997; 15:505-514.
- Ref. 65 Takaoka M, Harada H, Deramaudt TB, et al. Ha-Ras(G12V) induces senescence in primary and immortalized human esophageal keratinocytes with p53 dysfunction. *Oncogene* 2004; 23:6760-6768.
- Ref. 66 Angello JC, Pendergrass WR, Norwood TH, et al. Cell enlargement: one possible mechanism underlying cellular senescence. *J Cell Physiol* 1989; 140:288-294.
- Ref. 67 Dimri GP, Lee X, Basile G, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92:9363-9367.
- Ref. 68 Kurz DJ, Decary S, Hong Y, et al. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci* 2000; 113(Pt 20):3613-3622.
- Ref. 69 Bérubé NG, Smith JR, Pereira-Smith OM. The genetics of cellular senescence. *Am J Hum Genet* 1998; 62:1015-1019.

- Ref. 70 Hirose Y, Katayama M, Mirzoeva OK, et al. Akt activation suppresses Chk2-mediated, methylating agent-induced G2 arrest and protects from temozolomide-induced mitotic catastrophe and cellular senescence. *Cancer Res* 2005; 65:4861-4869.
- Ref. 71 Narita M, Nunez S, Heard E, et al. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 2003; 113:703-716.
- Ref. 72 Adams PD. Remodeling of chromatin structure in senescent cells and its potential impact on tumor suppression and aging. *Gene* 2007; 397:84-93.
- Ref. 73 Narita M, Narita M, Krizhanovsky V, et al. A novel role for high-mobility group a proteins in cellular senescence and heterochromatin formation. *Cell* 2006; 126:503-514.
- Ref. 74 Collado M, Serrano M. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer* 2010; 10:51-57.
- Ref. 75 Collado M, Gil J, Efeyan A, et al. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* 2005; 436:642.
- Ref. 76 Collado M, Serrano M. The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. *Nat Rev Cancer* 2006; 6:472-476.
- Ref. 77 Gerdes J, Schwab U, Lemke H, et al. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983 31:13-20.
- Ref. 78 Lopez F, Belloc F, Lacombe F, et al. Modalities of synthesis of Ki67 antigen during the stimulation of lymphocytes. *Cytometry* 1991; 12:42-49.
- Ref. 79 Workman JL, Kingston RE. Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu Rev Biochem* 1998; 67:545-579.
- Ref. 80 Tse C, Sera T, Wolffe AP, et al. Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III. *Mol Cell Biol* 1998; 18:4629-4638.
- Ref. 81 Nielsen SJ, Schneider R, Bauer UM, et al. Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature* 2001; 412:561-565.
- Ref. 82 Lachner M, O'Carroll D, Rea S, et al. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* 2001; 410:116-120.
- Ref. 83 d'Adda di Fagagna F. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat Rev Cancer* 2008; 8:512-522.
- Ref. 84 Bartkova J, Horejsí Z, Koed K, et al. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* 2005; 434:864-870.
- Ref. 85 Bartkova J, Rezaei N, Liontos M, et al. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* 2006; 444:633-637.
- Ref. 86 Gorgoulis VG, Vassiliou LF, Karakaidos P, et al. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* 2005; 434:907-913.

Anhang

- Ref. 87 Micco RD, Fumagalli M, Cicalese A, et al. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* 2006; 444:638-642.
- Ref. 88 Burma S, Chen BP, Murphy M, et al. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 2001; 276:42462-42467.
- Ref. 89 Hirao A, Kong YY, Matsuoka S, et al. DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science* 2000; 287:1824-1827.
- Ref. 90 d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, et al. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 2003; 426:194-198.
- Ref. 91 Gire V, Roux P, Wynford-Thomas D, et al. DNA damage checkpoint kinase Chk2 triggers replicative senescence. *EMBO J* 2004; 23:2554-2563.
- Ref. 92 Bartek J, Falck J, Lukas J. CHK2 kinase--a busy messenger. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2:877-886.
- Ref. 93 Dyson N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* 1998; 12:2245-2262.
- Ref. 94 Beauséjour CM, Krtolica A, Galimi F, et al. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J* 2003; 22:4212-4222.
- Ref. 95 Sage J, Miller AL, Pérez-Mancera PA, et al. Acute mutation of retinoblastoma gene function is sufficient for cell cycle re-entry. *Nature* 2003; 424:223-228.
- Ref. 96 Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358:15-16.
- Ref. 97 Iacopetta B. TP53 mutation in colorectal cancer. *Hum Mutat* 2003; 21:271-276.
- Ref. 98 Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, et al. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 1989; 244:217-221.
- Ref. 99 Russo A, Bazan V, Iacopetta B, et al. The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment. *J Clin Oncol* 2005; 23:7518-7528.
- Ref. 100 Alcorta DA, Xiong Y, Phelps D, et al. Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93:13742-13747.
- Ref. 101 Kortlever RM, Higgins PJ, Bernards R. Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. *Nat Cell Biol* 2006; 8:877-884.
- Ref. 102 Dass K, Ahmad A, Azmi AS, et al. Evolving role of uPA/uPAR system in human cancers. *Cancer Treat Rev* 2008; 34:122-136.
- Ref. 103 Berger DH. Plasmin/plasminogen system in colorectal cancer. *World J Surg* 2002; 26:767-771.
- Ref. 104 Abe J, Urano T, Konno H, et al. Larger and more invasive colorectal carcinoma contains larger amounts of plasminogen activator inhibitor type 1 and its relative ratio over urokinase receptor correlates well with tumor size. *Cancer* 1999; 86:2602-2611.

- Ref. 105 Fredstorp-Lidebring M, Bendahl PO, Br nner N, et al. Urokinase plasminogen activator and its inhibitor, PAI-1, in association with progression-free survival in early stage endometrial cancer. *Eur J Cancer* 2001; 37:2339-2348.
- Ref. 106 Nielsen HJ, Pappot H, Christensen IJ, et al. Association between plasma concentrations of plasminogen activator inhibitor-1 and survival in patients with colorectal cancer. *BMJ* 1998; 316:829-830.
- Ref. 107 Borden KLB. Pondering the promyelocytic leukemia protein (PML) puzzle: possible functions for PML nuclear bodies. *Mol Cell Biol, Structural Biology Program* 2002; 22:5259-5269.
- Ref. 108 Salomoni P, Pandolfi PP. The role of PML in tumor suppression. *Cell* 2002; 108:165-170.
- Ref. 109 Guo A, Salomoni P, Luo J, et al. The function of PML in p53-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol* 2000; 2:730-736.
- Ref. 110 Pearson M, Carbone R, Sebastiani C, et al. PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature* 2000; 406:207-210.
- Ref. 111 Ferbeyre G, de Stanchina E, Querido E, et al. PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes Dev* 2000; 14:2015-2027.
- Ref. 112 de Stanchina E, Querido E, Narita M, et al. PML is a direct p53 target that modulates p53 effector functions. *Mol Cell* 2004; 13:523-535.
- Ref. 113 Gurrieri C, Capodiecici P, Bernardi R, et al. Loss of the tumor suppressor PML in human cancers of multiple histologic origins. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96:269-279.
- Ref. 114 Gambacorta M, Flenghi L, Fagioli M, et al. Heterogeneous nuclear expression of the promyelocytic leukemia (PML) protein in normal and neoplastic human tissues. *Am J Pathol* 1996; 149:2023-2035.
- Ref. 115 Cowley S, Paterson H, Kemp P, et al. Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell* 1994; 77:841-852.
- Ref. 116 Marshall CJ. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 1995; 80:179-185.
- Ref. 117 Sherr CJ, DePinho RA. Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell* 2000; 102:407-410.
- Ref. 118 Guerra C, Mijimolle N, Dhawahir A, et al. Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context. *Cancer Cell* 2003; 4:111-120.
- Ref. 119 Dankort D, Filenova E, Collado M, et al. A new mouse model to explore the initiation, progression, and therapy of BRAFV600E-induced lung tumors. *Genes Dev* 2007; 21:379-384.
- Ref. 120 Sarkisian CJ, Keister BA, Stairs DB, et al. Dose-dependent oncogene-induced senescence in vivo and its evasion during mammary tumorigenesis. *Nat Cell Biol* 2007; 9:493-505.
- Ref. 121 Ventura A, Kirsch DG, McLaughlin ME, et al. Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature* 2007; 445:661-665.

Anhang

- Ref. 122 Xue W, Zender L, Miething C, et al. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* 2007; 445:656-660.
- Ref. 123 Campisi J. Suppressing cancer: the importance of being senescent. *Science* 2005; 309:886-887.
- Ref. 124 Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100:57-70.
- Ref. 125 Halazonetis TD, Gorgoulis VG, Bartek J. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science* 2008; 319:1352-1355.
- Ref. 126 Schmitt CA, Fridman JS, Yang M, et al. A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell* 2002; 109:335-346.
- Ref. 127 Chang B, Swift ME, Shen M, et al. Molecular determinants of terminal growth arrest induced in tumor cells by a chemotherapeutic agent. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 99:389-394.
- Ref. 128 Chang BD, Broude EV, Dokmanovic M, et al. A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents. *Cancer Res* 1999; 59:3761-3767.
- Ref. 129 Roberson RS, Kussick SJ, Vallieres E, et al. Escape from therapy-induced accelerated cellular senescence in p53-null lung cancer cells and in human lung cancers. *Cancer Res* 2005 65:2795-2803.
- Ref. 130 Holliday R, Tarrant GM. Altered enzymes in ageing human fibroblasts. *Nature* 1972; 238:26-30.
- Ref. 131 Rebbaa A, Zheng X, Chou PM, et al. Caspase inhibition switches doxorubicin-induced apoptosis to senescence. *Oncogene* 2003; 22:2805-2811.
- Ref. 132 Schmitt CA. Senescence, apoptosis and therapy--cutting the lifelines of cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:286-295.
- Ref. 133 Schmitt CA, Lowe SW. Bcl-2 mediates chemoresistance in matched pairs of primary E(mu)-myc lymphomas in vivo. *Blood Cells Mol Dis* 2001; 27:206-216.
- Ref. 134 te Poele RH, Okorokov AL, Jardine L, et al. DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2002; 62:1876-1883.
- Ref. 135 Webseite des Nolan Lab der Stanford University. Retroviral systems. Phoenix helper-free retrovirus producer lines (http://www.stanford.edu/group/nolan/retroviral_systems/phx.html)
- Ref. 136 Nichols WW, Murphy DG, Cristofalo VJ, et al. Characterization of a new human diploid cell strain, IMR-90. *Science* 1977; 196:60-63
- Ref. 137 Webseite Addgene. Plasmid 1764. pBABE-puro (www.addgene.org)
- Ref. 138 Brink M, de Goeij AFPM, Weijnenberg MP, et al. K-ras oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study. *Carcinogenesis* 2003; 24:703-710.
- Ref. 139 Lin AW, Barradas M, Stone JC, et al. Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev* 1998; 12:3008-3019.

- Ref. 140 Zhu J, Woods D, McMahon M, et al. Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes Dev* 1998; 12:2997-3007.
- Ref. 141 Boucher M, Jean D, Vézina A, et al. Dual role of MEK/ERK signaling in senescence and transformation of intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286:G736-G746.
- Ref. 142 Fridman AL, Tainsky MA. Critical pathways in cellular senescence and immortalization revealed by gene expression profiling. *Oncogene* 2008; 27:5975-5987.
- Ref. 143 Gray-Schopfer VC, Cheong SC, Chong H, et al. Cellular senescence in naevi and immortalisation in melanoma: a role for p16? *Br J Cancer* 2006; 95:496-505.
- Ref. 144 Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld LCW, et al. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell* 2008; 133:1019-1031.
- Ref. 145 Humphries A, Wright NA. Colonic crypt organization and tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2008; 8:415-424.
- Ref. 146 D'Errico I, Moschetta A. Nuclear receptors, intestinal architecture and colon cancer: an intriguing link. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65:1523-1543.
- Ref. 147 Fujita K, Mondal AM, Horikawa I, et al. p53 isoforms Delta133p53 and p53beta are endogenous regulators of replicative cellular senescence. *Nat Cell Biol, genesis* 2009; 11:1135-1142.
- Ref. 148 Acosta JC, O'Loughlen A, Banito A, et al. Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell* 2008; 133:1006-1018.
- Ref. 150 Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, et al. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol* 2010; 11:174-183.
- Ref. 151 Schmitt CA. Cellular senescence and cancer treatment. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1775:5-20.
- Ref. 152 Brown JM, Attardi LD. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nat Rev Cancer* 2005; 5:231-237.
- Ref. 153 Hector S, Prehn JHM. Apoptosis signaling proteins as prognostic biomarkers in colorectal cancer: a review. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1795:117-129.
- Ref. 154 Huh JW, Oh BR, Kim HR, et al. Preoperative carcinoembryonic antigen level as an independent prognostic factor in potentially curative colon cancer. *J Surg Oncol* 2010; 101:396-400.
- Ref. 155 Staab HJ, Anderer FA, Brümmendorf T, et al. Prognostic value of preoperative serum CEA level compared to clinical staging. I. Colorectal carcinoma. *Br J Cancer* 1981; 44:652-662.
- Ref. 156 Sporn JC, Kustatscher G, Hothorn T, et al. Histone macroH2A isoforms predict the risk of lung cancer recurrence. *Oncogene* 2009; 28:3423-3428.
- Ref. 157 Zhang R, Poustovoitov MV, Ye X, et al. Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev Cell* 2005; 8:19-30.

Anhang

- Ref. 158 Vicencio JM, Galluzzi L, Tajeddine N, et al. Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path--a mini-review. *Gerontology* 2008; 54:92-99.
- Ref. 159 Cagnol S, Chambard J. ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS J* 2010; 277:2-21.
- Ref. 160 Steeves MA, Dorsey FC, Cleveland JL. Targeting the autophagy pathway for cancer chemoprevention. *Curr Opin Cell Biol* 2010; 22:218-225.
- Ref. 161 Coppé J, Patil CK, Rodier F, et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol* 2008; 6:2853-2868.

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Kolonschichten	Seite 4
Abbildung 2:	Adenom-Karzinom-Sequenz	Seite 6
Abbildung 3:	Seneszente Fibroblasten	Seite 11
Abbildung 4:	Seneszenzmarker	Seite 14
Abbildung 5:	Therapie-induzierte Seneszenz	Seite 17
Abbildung 6:	Methodenübersicht	Seite 25
Abbildung 7:	Vektorkarte pBABE-puro	Seite 29
Abbildung 8:	Wachstumskurve	Seite 40
Abbildung 9:	SA-beta-Gal-Assay	Seite 41
Abbildung 10:	SAHF	Seite 42
Abbildung 11:	Zellzyklusprofil	Seite 43
Abbildung 12:	Kryofärbungen	Seite 45
Abbildung 13:	Normalgewebe	Seite 46
Abbildung 14:	Adenome	Seite 47
Abbildung 15:	Karzinome	Seite 48
Abbildung 16:	Zusammenfassung Kryogewebe	Seite 49
Abbildung 17:	Marker in Paraffin-IMR90	Seite 52
Abbildung 18:	Markerverteilung in Paraffin-IMR90	Seite 53
Abbildung 19:	PML-Färbung	Seite 53
Abbildung 20:	Ki67-Färbung in Adenomen	Seite 54
Abbildung 21:	Paraffinmarker in Lern-Adenomen	Seite 56
Abbildung 22:	Seneszenzsignatur	Seite 57
Abbildung 23:	Markerverteilung an Beispielen	Seite 59
Abbildung 24:	Markerverteilung Karzinompatienten	Seite 65
Abbildung 25:	Progressionsfreies Überleben	Seite 66
Abbildung 26:	Proliferation, Apoptose und <i>ras</i> -Mutationen bei Karzinompatienten	Seite 68

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Paraffineinbettung	Seite 33
Tabelle 2:	Immunhistochemische Färbungen	Seite 35
Tabelle 3:	Lernadenome	Seite 58
Tabelle 4:	Validierungsadenome	Seite 60
Tabelle 5:	Patientendaten	Seite 63
Tabelle 6:	Überprüfung auf Gruppengleichheit	Seite 67

7.4 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
5-FU	5-Fluorouracil
5-JÜR	5-Jahresüberlebensrate
ACF	aberrante Krypten (aberrant crypt foci)
Ad	Adenom
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APC- Gen	Adenomatous polyposis coli- Gen
BrdU	Bromid-Uracil
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca	Karzinom
cdk	Cyclin abhängige Kinasen
cDNS	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CEA	Carcinoembryonales Antigen
cl.Casp.3	cleaved Caspase 3
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DABCO	1,4-Diazabicyclooctan
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCC- Gen	Deleted in colorectal cancer- Gen
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DNS	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
ED	Erstdiagnose
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Durchflußzytometrie (Fluorescence activated cell sorting)
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
FBS	Fetales Kälberserum
G	Grading
HBS	Hepes-gepufferte Salzlösung

Anhang

HE	Hämatoxylin-Eosin
HNPCC-Syndrom	hereditäres nicht-polypöses kolorektales Karzinomsyndrom
HRP	Meerrettichperoxidase
LB	Lysogeny broth
LSAB	Labelled-Streptavidin-Biotin
LV	Leucovorin
MAP	mitogen-activated protein
mut	mutiert
MW	Mittelwert
NG	Normalgewebe
OIS	Onkogen-induzierte Seneszenz
p-	Phospho-
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-inhibitor-1
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PD	Krankheitsprogress (Progressive Disease)
PI	Propidium-Jodid
PML	Promyelozytisches Leukämie Protein
Rb	Retinoblastom-Protein
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SA-beta-Gal	Seneszenz-assoziierte-beta-Galaktosidase
SAHF	Seneszenz-assoziierte Heterochromatin-Foci
SDS	Natriumdodecylsulfat
SI	Seneszenz-Index
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TIS	Therapie-induzierte Seneszenz
TNM-Klassifikation	Einteilung nach Tumorausbreitung (T), Lymphknotenbefall (N) und Metastasierung (M)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u-PA	Plasminogen-Aktivator vom Urokinase-Typ
UICC	Union International Contra Cancer
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp

7.5 Publikationsverzeichnis

Folgende Publikationen basieren auf dieser Arbeit:

Haugstetter, A. M.; Loddenkemper, C.; Lenze, D. et al. Cellular senescence predicts treatment outcome in metastasised colorectal cancer. Br J Cancer 2010; 103:505-509.

Abstract mit Poster:

Haugstetter, A.M.; Standfuss, C.; Petersen, I. et al. „An immunohistochemical marker signature detects cellular senescence and might predict response to 5-FU in patients with colorectal cancer UICC stage IV“ P198 Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO) 2.-6. Oktober 2009 in Heidelberg/ Mannheim

Folgender Vortrag basiert auf dieser Arbeit:

Vortrag auf dem Minisymposium der 2. MKFZ „Rising Star“-Awards: „Cellular senescence predicts treatment outcome in metastasised colorectal cancer“. 15. Dezember 2010 in Berlin, sowie Preisverleihung für die Kategorie medizinischer Doktorand

Stipendium:

Promotionsstipendium der Charité

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, herzlich danken.

Meinem Doktorvater und Betreuer Prof. Dr. med. Clemens Schmitt danke ich für die engagierte und intensive fachliche Betreuung während des experimentellen Teils der Arbeit und für die große Diskussionsbereitschaft bei der Auswertung der Ergebnisse und bei vielen Labortreffen.

Dem Direktor der medizinischen Klinik für Hämatologie und Onkologie des Virchowklinikums der Charité Herrn Prof. Dr. med. Dörken danke ich für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seiner Abteilung durchführen zu dürfen.

Mein Dank gilt auch meinen Kooperationspartnern, den Pathologen Prof. Dr. med. Christoph Loddenkemper und Prof. Dr. med. Iver Petersen, die mir bei fachlichen Fragen oft zur Seite standen und immer wieder für Durchhaltevermögen sorgten.

Ganz besonders danke ich allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der AG Schmitt, insbesondere Dr. rer. nat. Mehtap Kilic und Dr. med. Mathias Rosenfeld, die mich bei der Laborarbeit motiviert und beratend unterstützt haben. Dank auch an Gabriele Fernahl, Simone Spieckermann, Ines Schildhauer, Carmen Judis und Janna Frombach für die nette Zusammenarbeit im Labor.

Christoph Standfuß sei gedankt für die geduldige Beratung hinsichtlich der statistischen Verfahren zur Auswertung meiner Daten.

Vielen Dank an Dido Lenze im Institut für Pathologie der Charité für die Durchführung der *ras*-Mutations-Analyse.

Eike Wolter sei für die hilfreiche Durchsicht des Manuskripts und seine konstruktive Kritik gedankt.

Vor allem gilt mein allergrößter Dank aber meinen Eltern Margarete und Jörg, meinem Bruder Sven, sowie meinen besten Freundinnen Olga und Judith für die unverzichtbare psychologische und sonstige Allround-Unterstützung während der gesamten Zeit, ohne die ich wahrscheinlich mehrmals verzweifelt aufgegeben hätte.

9 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

10 Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Anja Haugstetter, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **Onkogen-induzierte Seneszenz in der kolorektalen Adenom-Karzinom-Sequenz und ihre Funktion als Prädiktor für das Ansprechen auf 5-FU in der primär metastasierten Situation** selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 15. Mai 2011

Anja Haugstetter