



(10) **DE 10 2010 048 899 B3** 2012.03.01

(12)

Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2010 048 899.2**
(22) Anmeldetag: **19.10.2010**
(43) Offenlegungstag: –
(45) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: **01.03.2012**

(51) Int Cl.: **C12Q 1/68 (2011.01)**
G01N 33/574 (2011.01)

Innerhalb von drei Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 1 Patentkostengesetz).

(73) Patentinhaber:
**Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus
Lübeck, 23562, Lübeck, DE**

(74) Vertreter:
**MÜLLER FOTTNER STEINECKE Rechtsanwälte
Patentanwälte, 52428, Jülich, DE**

(72) Erfinder:
**Haberman, Jens, Prof. Dr., 29227, Celle, DE;
Roblick, Uwe, Dr., 23552, Lübeck, DE; Gemoll,
Timo, 23775, Großenbrode, DE**

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:

**ASHKTORAB, H. u.a.: Global histone H4
acetylation and HDAC2 expression in colon
adenoma and carcinoma. Dig. Dis. Sci. (2009) 54
(10) 2109–2117**

**GEMOLL, T. u.a.: HDAC2 and TXNL1
characterize aneuploid subtypes of
colorectal cancer. Tagung der Vereinigung
nordwestdeutscher Chirurgen, 2.6.-4.6.2011,
Stralsund, Poster 3.2 (gutachtlich)**

**GEMOLL, T. u.a.: HDAC2 and TXNL1
distinguish aneuploid from diploid colorectal
cancers. Cell. Mol. Life Sci. (3.2.2011) DOI:
10.1007/s00018-011-0628-3 (gutachtlich)**

**WEICHERT, W. u.a.: Class I histone
deacetylase expression has independent
prognostic impact in human colorectal cancer:
specific role of class I histone deacetylases in
vitro and in vivo. Clin. Cancer Res. (2008) 14 (6)
1669-77**

**ZHU, P. u.a.: Induction of HDAC2 expression
upon loss of APC in colorectal tumorigenesis.
Cancer Cell. (2004) 5 (5) 455-63**

(54) Bezeichnung: **Verfahren zum Diagnostizieren aneuploider kolorektaler Tumore**

(57) Zusammenfassung: Verfahren zum Diagnostizieren aneuploider kolorektaler Tumore durch Untersuchen einer geeignet aufgearbeiteten Gewebprobe auf ein signifikant erhöhtes Vorliegen des Proteins HDAC2.

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Diagnostizieren aneuploider kolorektaler Tumore.

[0002] Kolorektale Karzinome sind die dritthäufigsten Tumore in der westlichen Welt. In frühem Stadium ist diese Krankheit heilbar. Das Risiko des Wiederauftretens und der Metastasierung ist bei fortgeschrittenem Stadium höher. Die hohe Todesrate bei kolorektalem Krebs kann erfolgreich reduziert werden, indem diese Krankheit bereits in einem früheren Stadium erkannt werden würde. Jedoch werden trotz verschiedener Screening Programme 50% aller Tumore erst in einem fortgeschrittenen Stadium erkannt. Das zeigt die klinische Notwendigkeit für eine individuell zugeschnittene Überwachung und Therapie, um die Prognose des Patienten zu verbessern.

[0003] Kolorektale Karzinome (CRC) können in zwei Gruppen unterteilt werden, die sich hinsichtlich ihrer klinischen Prognose deutlich unterscheiden:

- Chromosomale Instabilität (CIN)
- Mikrosatelliten Instabilität (MSI)

[0004] MSI ist die Ursache für 15–20% aller sporadisch auftretenden kolorektaler Karzinome. Bei Mikrosatelliten-instabilitäten kommt es zu Längveränderungen innerhalb kurzer, repetitiver DNA-Sequenzen als Folge defekter DNA-Reparaturproteine. Normalerweise detektiert und korrigiert das Mismatch-Reparatur-System (MMR) den Einbau von falschen Basen und kleinen Loops in neu hergestellten DNA-Strängen bei der DNA-Replikation. Aufgrund dieser Unfähigkeit spontane, während der Replikation auftretende Fehler, zu reparieren, kann es zum Ausfall des Reparatursystems kommen und in der neu replizierten DNA häufen sich nach und nach Genmutationen an. Solche Mutationen betreffen z. B. das Gen des TGFBR2 (Transforming Growth Factor Beta Receptor 2), der in der Folge Resistenz gegen TGFβ entwickelt und somit ein ungehemmtes Wachstum ermöglicht. MSI Tumore haben diploide Zellpopulationen mit nur wenigen – falls überhaupt – karyotypischen Veränderungen und zeigen eine günstige klinische Prognose.

[0005] Im Gegensatz dazu sind CIN durch Aneuploidie charakterisiert. Auf chromosomaler Ebene zeigen diese aneuploiden Karzinome verschiedene chromosomale Aberrationen. Aneuploide Karzinome sind für 80% aller Tumore beim sporadisch auftretenden Kolonkarzinom verantwortlich sind haben eine wesentlich schlechtere klinische Prognose. Bei Diagnose dieser Erkrankung in einem späten Stadium ist trotz Therapie mit einer hohen Rückfallquote und einer geringen Lebenserwartung zu rechnen. Eine frühzeitige Diagnose würde die Prognose der Patienten deutlich verbessern. Bis heute existieren keine zuverlässigen Biomarker, die die individuelle Prognose kolorektaler Karzinome sicher ermöglicht.

lässigen Biomarker, die die individuelle Prognose kolorektaler Karzinome sicher ermöglicht.

[0006] In der Literaturstelle ASHKTORAB, H, u. a.: Global histone H4 acetylation and HDAC2 expression in colon adenoma and carcinoma. *Dig. Dis. Sci.* (2009) 54 (10) 2109–2117 und in ZHU, P. u. a.: Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis. *Cancer Cell.* (2004) 5 (5) 455–63 wird eine erhöhte Expression von HDAC2 bei kolorektalen Tumoren (CRC) festgestellt. WEICHERT, W. u. a.: Class I histone deacetylase expression has independent prognostic impact in human colorectal specific role of class I histone deacetylases in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res.* (2009) 14 (6) 1669–77 beschreibt die Verwendung des Markers HDAC2 zur Prognose.

[0007] Es ist Aufgabe der Erfindung ein Verfahren bereitzustellen, das die Identifizierung aneuploider kolorektaler Karzinome ermöglicht.

[0008] Die Aufgabe wird gelöst mit den Merkmalen des Hauptanspruches. Die Unteransprüche geben vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung an.

[0009] Mit der Erfindung wird eine Identifizierung aneuploider kolorektaler Karzinome eines Individuums möglich. Der Nachweis der Proteine HDAC2, CAPZA1 und/oder TXNL1 im kolorektalen Karzinom im Vergleich zur gesunden Darmschleimhaut von Patienten wurde als zuverlässiges Merkmal für das Vorhandensein aneuploider kolorektaler Tumore identifiziert.

[0010] Es wurden insgesamt neun kolorektale Zelllinien mittels Bildzytometrie, zweidimensionaler Gelelektrophorese und Massenspektrometrie hinsichtlich genomischer Instabilität und Ploidietypus untersucht. Bei diesem umfassenden Proteindarstellungsansatz wurden insgesamt 64 Proteinspots detektiert, die in aneuploiden und diploiden Zelllinien kolorektaler Karzinome unterschiedlich exprimiert wurden. 20 dieser Proteine konnten identifiziert werden. Pathwayanalysen zeigten, dass 12 dieser Proteine mit Netzwerken in Verbindung stehen, dessen wichtigste Funktionen mit Zellverbindung und -organisation, Zellfunktionen und -erhaltung, Krebs, Zelltod und Zellzyklus zusammenhängen. Beeinträchtigte Zellzykluskontrollpunkte dieses Netzwerkes begünstigen bei bösartigen Zellen die beschleunigte Proliferation und führen daher zu einer klonartigen Zellexpansion mit unvollständiger DNA-Reparatur. Die Beteiligung der unterschiedlichen Proteine an den oben genannten Pathways und Zellfunktionen legte nahe, diese Proteine näher zu untersuchen, um ihren klinischen Wert zu untersuchen.

[0011] Western-Blot Untersuchungen bestätigten für HDAC2, TXNL1 und CAPZA1 signifikante Expressi-

onsunterschiede bei aneuploiden kolorektalen Karzinomen im Vergleich zu diploiden kolorektalen Tumorzelllinien.

[0012] Es kannte erstmalig gezeigt werden, dass CAPZA1 in der aneuploiden Gruppe kolorektaler Krebszelllinien signifikant geringer exprimiert wird. CAPZA1 ist ein Mitglied der F-Aktin Capping-Protein-Alpha-Familie und codiert die Alpha-Untereinheit des Aktin-Bindungsproteins. Dieses Protein reguliert und schützt das Wachstum des Aktin Filamentes, indem es die Enden wachsender Aktinfilamente abdeckt. Bisher konnte keine Verbindung zwischen CAPZA1 und genomischer Instabilität bei Krebs festgestellt werden. Es wäre denkbar, dass CAPZA1 Einfluss auf die Unversehrtheit der Aktinfilamente und Aktinbindungsproteine hat, welche für die sichere Chromosomentrennung notwendig ist. Daher könnte eine verringerte CAPZA1 Expression eine Ursache für die genomische Instabilität sein und zur Tumorentwicklung führen.

[0013] Das TXNL1 Gen kodiert ein Protein, welches zur Thioredoxin-Familie von kleinen redoxaktiven Proteinen gehört. Es ist in der zellulären Antwort auf Stress beteiligt und regelt den Redox-Status in höheren Eukaryonten. Es ist bekannt, dass eine Überexpression von TXNL1 die Repressor-Funktion durch eine Bindung an den Transkriptionsfaktor B-Myb erhöhen kann. In der vorliegenden Studie wurde eine signifikante Unterexpression von TXNL1 in aneuploiden kolorektalen Karzinomen festgestellt.

[0014] HDAC2 wird im Gegensatz zu TXNL1 und CAPZA1 in aneuploiden kolorektalen Krebszelllinien höher exprimiert. HDAC2 gehört zur Histondeacetylase Familie und spielt eine wichtige Rolle bei der Transkriptionsregulation und der Zellzyklusentwicklung. Zwar konnte eine Überexpression in verschiedenen Tumorgeweben inklusive Kolonkarzinomen bereits nachgewiesen werden, jedoch wurde hier erstmalig gezeigt, dass die signifikante Überexpression von HDAC2 ein Nachweis für aneuploiden kolorektalen Krebs ist.

[0015] Für die klinische Validierung der unterschiedlich exprimierten Proteine wurden kolorektale Karzinome und Proben der angrenzenden gesunden Mukosa willkürlich von 97 Patienten (von insg. 1840), die in der Zeit zwischen 1994 und 2007 operiert wurden, genommen. Patienten, die sich einer Bestrahlung unterzogen hatten waren ausgeschlossen. Das Material stammte aus operativ entferntem Material.

auf ein signifikant erhöhtes Vorliegen des Proteins HDAC2.

2. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch Untersuchen der geeignet aufgearbeiteten Gewebprobe auf ein signifikant reduziertes Vorliegen des Proteins CAPZA1 und/oder TXNL1.

3. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch Untersuchen der aufbereiteten Gewebeprobe durch Erstellen eines Proteinexpressionsprofils.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen

Patentansprüche

1. Verfahren zum Diagnostizieren aneuploider kolorektaler Tumore, gekennzeichnet durch Untersuchen einer geeignet aufgearbeiteten Gewebprobe