

Expressionsprofilierung zur Identifizierung von Markergenen als additive Prognosefaktoren für das kolorektale Karzinom

vorgelegt von
Diplom-Biologe
Christian Astrosini

von der Fakultät III - Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Lothar Kroh
Berichter: Prof. Dipl.-Ing. Dr. Ulf Stahl
Berichter: PD Dr. Wolfgang Kemmner

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 29.08.2006

Berlin 2006
D 83

Diese Dissertation wurde am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin-Buch in der Abteilung Chirurgie/Chirurgische Onkologie unter Anleitung von PD Dr. W. Kemmner gefertigt.

Zur Erlangung der Doktorwürde des Fachbereiches Prozesswissenschaften der Technischen Universität Berlin erfolgte die Einreichung am Institut für Biotechnologie bei Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr. U. Stahl.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	ZIELSETZUNG	1
1.2	DAS KOLOREKTALE KARZINOM	3
1.2.1	Anatomie und Physiologie des gesunden Kolons und Rektums	3
1.2.2	Karzinogenese	4
1.2.3	Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms	5
1.2.4	Diagnose des kolorektalen Karzinoms	6
1.2.5	TNM-Klassifikation und Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms.....	7
1.2.6	Prognostische Faktoren in der klinischen Routine.....	8
1.3	VERWENDETE MOLEKULARBIOLOGISCHE TECHNIKEN ZUR IDENTIFIZIERUNG VON EXPRESSIONSMARKERN	9
1.3.1	Microarray-Technologie	9
1.3.2	Quantitative Real-Time PCR.....	10
1.3.3	<i>in situ</i> -Hybridisierung	11
2	MATERIAL UND METHODEN	13
2.1	MATERIAL.....	13
2.1.1	Patientengewebeprobe n	13
2.1.2	Eukaryote Zellen	14
2.1.3	Bakterien	14
2.1.4	Molekularbiologische Kits und Standards.....	14
2.1.5	Plasmid-DNA.....	14
2.1.6	Primer und Assays-on-Demand.....	15
2.1.7	Antikörper, Enzyme und sonstige Proteine.....	15
2.1.8	Antibiotika.....	16
2.1.9	Chemikalien	16
2.1.10	Puffer, Lösungen und Kulturmedien	18
2.1.11	Geräte	19
2.1.12	Computerprogramme und Online-Dienste	20
2.1.13	Verbrauchsmaterialien	20
2.2	METHODEN	21
2.2.1	Microarray	21
2.2.1.1	Laser Capture Microdissection.....	21
2.2.1.2	GeneChip-Experimente.....	22
2.2.2	Bioinformatische Auswertung der Microarray-Daten	22
2.2.3	Validierung der Microarray-Resultate mittels quantitativer Real-Time PCR.....	24
2.2.3.1	Gewebeaufarbeitung.....	24
2.2.3.2	RNA-Isolation	24
2.2.3.3	cDNA-Synthese.....	25
2.2.3.4	Quantitative Real-Time PCR.....	25
2.2.3.5	Auswertung der quantitativen Real-Time PCR.....	26

2.2.4	Tissue Microarray-basierte <i>in situ</i> -Hybridisierung.....	27
2.2.4.1	Herstellung von Tissue Microarrays	27
2.2.4.2	Durchführung der TMA-basierten <i>in situ</i> -Hybridisierung	27
2.2.5	Statistische Analyse der qPCRs und <i>in situ</i> -Hybridisierungen	28
2.2.6	Tests zur Abklärung der Genfunktion	29
2.2.6.1	Expressionsvektorgenerierung und Transfektion	29
2.2.6.2	Test auf DNA-Methylierung	29
2.2.6.3	Adhäsionstest (Zell-Matrix-Adhäsion)	30
2.2.6.4	Aggregationstest (Zell-Zell-Adhäsion)	30
2.2.6.5	Wound-Healing Assay.....	30
2.2.6.6	Caspase-Assay und Lebendzellzahl-Bestimmung	31
2.2.7	Allgemeine Methoden	31
2.2.7.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	31
2.2.7.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA.....	31
2.2.7.3	Agarose-Gelelektrophorese	32
2.2.7.4	Zellkultivierung	32
3	ERGEBNISSE	33
3.1	MICROARRAY-EXPRESSIONSANALYSEN AN FRÜH DIAGNOSTIZIERTEN KOLONKARZINOMPATIENTEN UND KONTROLLINDIVIDUEN.....	33
3.1.1	Extraktion von Transkripten mit differenzieller Expression in verschiedenen Patientengruppen.....	33
3.1.2	Bioinformatische Validierung der extrahierten putativen Markergene über Experiment- Dendrogramme	36
3.1.3	Expression allgemein bekannter im Kolonkarzinom deregulierter Gene.....	39
3.2	VALIDIERUNG DER MICROARRAY-DATEN DURCH QUANTITATIVE REAL-TIME PCR.....	40
3.2.1	<i>Claudin 8 (CLDN8)</i>	41
3.2.1.1	Primärtumoren und Normalgewebe	41
3.2.1.2	Biopsiematerial.....	42
3.2.2	<i>Regenerating Islet-Derived 1 Alpha (REG1A)</i>	43
3.2.2.1	Primärtumoren	43
3.2.2.2	Metastasenmaterial.....	47
3.2.2.3	Adenome und Normalgewebe.....	47
3.2.2.4	Biopate von kolorektalen Karzinomen und gesundem kolorektalen Gewebe.....	48
3.2.2.5	Expression des REG1A-Rezeptors <i>Exostososes (Multiple)-Like 3 (EXTL3)</i> in Tumor- und Normalgewebe	49
3.2.3	<i>Chemokine (C-C Motif) Receptor 3 (CCR3)</i>	51
3.2.3.1	Primärtumoren und Normalgewebe	51
3.2.3.2	Expression des CCR3-Liganden <i>Chemokine (C-C Motif) Ligand 28 (CCL28)</i> in Tumor- und Normalgewebe	52
3.2.4	Sieben weitere ausgewählte Transkripte.....	52
3.3	TISSUE MICROARRAY BASIERTE <i>IN SITU</i> -HYBRIDISIERUNG.....	57
3.3.1	<i>Claudin 8</i> -Expression im Kolorektum.....	57
3.3.1.1	TMA-Serie „Kolon M0/1“.....	57
3.3.1.2	TMA-Serie „G2A/G2B“	59

3.3.2	<i>REG1A</i> -Expression im Kolorektum und Magen.....	60
3.3.2.1	TMA-Serie „Kolon M0/1“.....	60
3.3.2.2	TMA-Serie „G2A/G2B“.....	61
3.3.2.3	TMA-Serie „Magen M0/1“.....	61
3.4	TESTS ZUR FUNKTIONELLEN ABKLÄRUNG.....	63
3.4.1	<i>Claudin 8</i>	63
3.4.1.1	Test auf DNA-Methylierung.....	63
3.4.1.2	Adhäsionstest (Zell-Matrix-Adhäsion).....	64
3.4.1.3	Aggregationstest (Zell-Zell-Adhäsion).....	64
3.4.1.4	Wound-Healing Assay.....	65
3.4.2	Überprüfung der antiapoptotischen Eigenschaften von <i>REG1A</i>	65
4	DISKUSSION	67
5	ZUSAMMENFASSUNG	85
6	LITERATUR	86
7	APPENDIX	98
7.1	PATIENTENDATEN.....	98
7.2	ZAHLENERGEBNISSE UND ZUSÄTZLICHE ABBILDUNGEN.....	100
7.3	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	121
7.4	POSTERPRÄSENTATIONEN.....	123
7.5	VORTRÄGE.....	123
7.6	DANKSAGUNG.....	124

1 Einleitung

1.1 Zielsetzung

Das kolorektale Karzinom ist die zweithäufigste Krebstodesursache in Deutschland (Bertz et al. 2006). Obwohl die Heilungsaussichten für früh diagnostizierte Erkrankungsfälle ohne Lymphknoten- und Fernmetastasen (N0 M0) im Allgemeinen günstig gelagert sind, versterben bis zu 30 % dieser Patienten dennoch innerhalb von 5 Jahren (Ratto et al. 1998; O'Connell et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, ob sich kolorektale Karzinome mit divergierendem Krankheitsverlauf bereits zum Zeitpunkt der Operation auf der Ebene der Genexpression unterscheiden lassen. Die hieraus gewonnenen Erkenntnisse könnten eine erweiterte Differentialdiagnose ermöglichen, welche dem individuellen molekularen Krankheitsgeschehen besser Rechnung trägt als die derzeitigen histopathologischen Techniken allein.

Zunächst sollten umfassende Expressionsprofile von Kolonkarzinompatienten mit infaustem (High Risk) und günstigem klinischen Verlauf (Low Risk) sowie von gesunden Kontrollindividuen (Healthy) mittels der GeneChip-Technologie von Affymetrix erfasst werden. Nach bioinformatischer Erstellung diskriminativer Expressionssignaturen, sollten diese hinsichtlich ihrer Vorhersagekraft *in silico* getestet werden.

Ziel war es dann, ausgewählte Transkripte aus den Microarray-Analysen an einem neuen Patientenkollektiv kolorektaler Karzinompatienten zu validieren. Um Aufschluss über das prädiktive Potenzial zu erhalten, sollten Korrelationen zwischen der Stärke der Genexpression und dem Patientenüberleben bzw. wichtigen klinischen Parametern überprüft werden. Dabei war es von besonderem Interesse zu klären, ob „frühe Marker“ existieren, welche bereits im Adenomstadium oder im peritumoralen Normalgewebe einer Deregulation unterliegen. Darüber hinaus galt es auch, die generelle Vertrauenswürdigkeit der Microarray-Daten zu evaluieren.

Abschließend sollte die Expression besonders vielversprechender Gene räumlich im Gewebe lokalisiert und die entsprechenden Gene in Zellkulturassays hinsichtlich verschiedener funktioneller Aspekte analysiert werden. Der generelle Aufbau dieser Arbeit ist in Abb. 1 veranschaulicht.

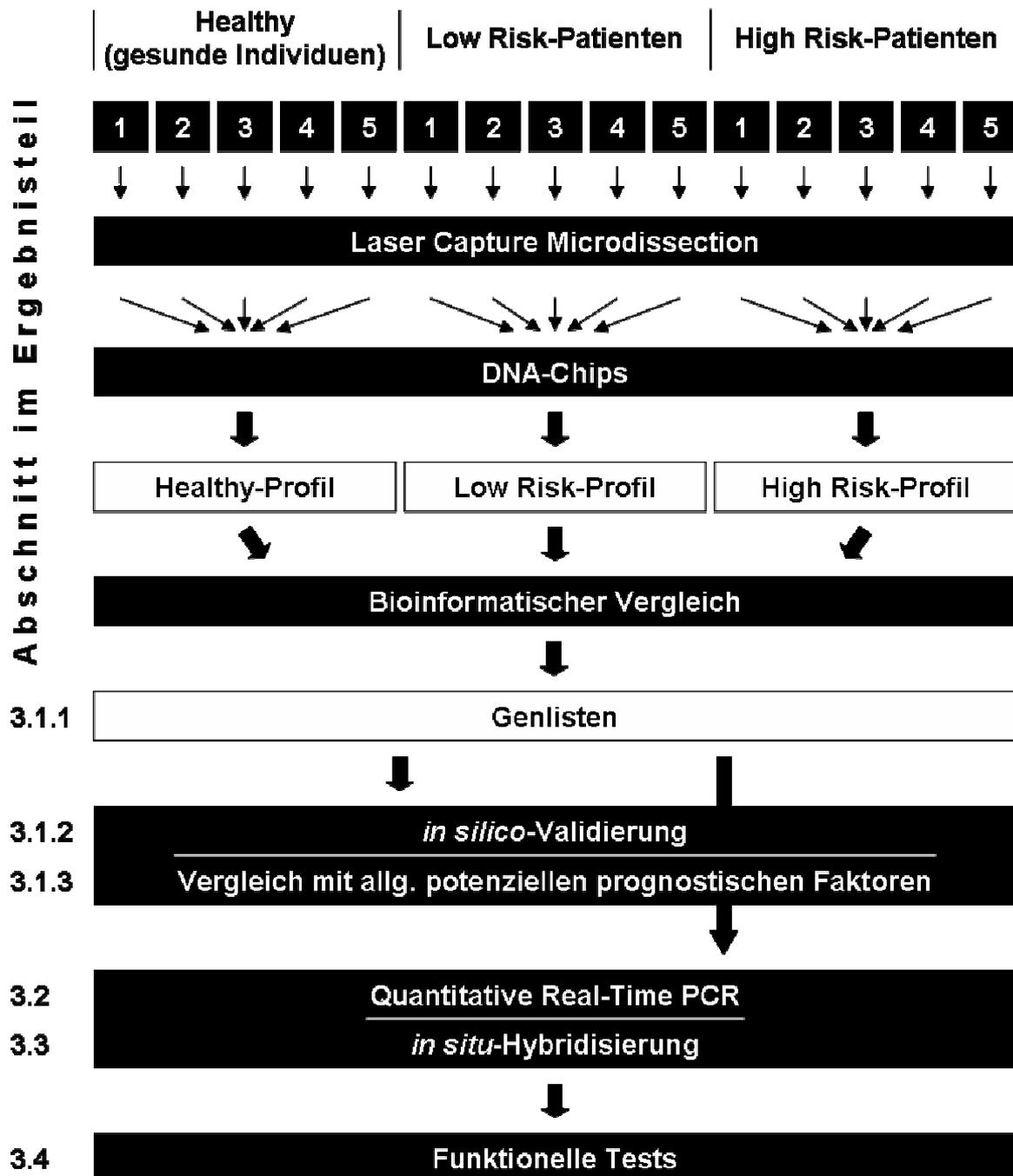


Abb. 1: Fließschemadarstellung der prinzipiellen experimentellen Gestaltung der vorliegenden Arbeit.

1.2 Das kolorektale Karzinom

1.2.1 Anatomie und Physiologie des gesunden Kolons und Rektums

Der kaudale Abschnitt des Magen-Darm-Kanals wird vom Grimmdarm (Kolon) und Mastdarm (Rektum) gebildet und besitzt eine Länge von etwa 1,5 m. Grimm- und Mastdarm werden zusammen als Dickdarm bezeichnet. Das Kolon untergliedert sich in einen rechts liegenden, aufsteigenden Teil (Colon ascendens), einen von rechts nach links ziehenden Mittelteil (Colon transversum) sowie einen linksseitigen, absteigenden Abschnitt (Colon descendens), welcher über das S-förmige Sigmoideum in das Rektum mündet. Je nach Position in der Bauchhöhle ist das Kolon gänzlich von Bauchfell (Peritoneum) umhüllt oder nur an seiner ventralen Seite mit ihm verwachsen. Das Rektum besitzt hingegen keinen Kontakt zum Peritoneum.

Histologisch sind Kolon und Rektum aus verschiedenen Gewebeschichten aufgebaut. Luminal findet man zunächst eine Schleimhautschicht (Tunica mucosa) mit einer dünnen Bindegewebs- und Muskelschicht. Weiter abluminal liegt eine bindegewebige Verschiebeschicht (Tela submucosa) gefolgt von einer Muskelschicht (Tunica muscularis propria), die sowohl aus einer Ring- als auch einer Längsmuskulatur besteht. Diese Längsmuskulatur ist im Bereich des Kolons zu drei Streifen, den Tänien, gebündelt. Nach außen hin wird das Darmrohr schließlich durch eine fettreiche Bindegewebeschicht (Tunica serosa oder Tunica adventitia) abgegrenzt.

Kolon und Rektum dienen der Speicherung des Darminhalts vor der Defäkation. Die Hauptfunktion des Kolons liegt jedoch in der Absorption von Wasser, Elektrolyten und kurzkettigen Fettsäuren, woraus eine Eindickung des Stuhls resultiert. Ring- und Längsmuskulatur bewirken eine Durchmischung und den Transport des Stuhls (Peristaltik). Dabei entstehen in regelmäßigen Abständen Einschnürungen des Kolons (Haustrien).

Die lediglich aus einer Epithelzellschicht bestehende Tunica mucosa ist durch drüsenartige Einsenkungen, die Krypten, gekennzeichnet. Diese werden vorwiegend von den Schleim produzierenden Becherzellen ausgekleidet. Durch den sezernierten Schleim wird die Gleitfähigkeit des Stuhls erhöht und die Verletzungsgefahr für das Darmepithel reduziert. Neben den Becherzellen findet man resorptive Zellen mit einem Mikrovilli-Saum auf der luminalen Seite, welche der Absorption dienen.

1.2.2 Karzinogenese

Maligne Tumoren zeichnen sich prinzipiell durch folgende zwei Charakteristika aus:

- (A) Ungehemmtes Wachstum aufgrund unkontrollierter Zellteilung. Diese Eigenschaft ist auch benignen Tumoren zu eigen.
- (B) Gewebegrenzen überschreitende Proliferation. Zunächst lokaler Einbruch in umliegende Gewebe, später systemische Ausbreitung in Lymphknoten und andere Organe.

Maligne Tumoren mit epithelialeem Ursprung bezeichnet man als Karzinome. Die meisten kolorektalen Karzinome entwickeln sich schrittweise über die Zwischenstufe des Adenoms aus gesunder Darmschleimhaut (Muto et al. 1975). Dieser Prozess ist als Adenom-Karzinom-Sequenz bekannt. Die Ursachen für diese maligne Transformation sind auf genetischer Ebene zu suchen. Hinsichtlich der molekularen Pathogenese des kolorektalen Karzinoms werden traditionell zwei verschiedene Pathways diskutiert (Kinzler und Vogelstein 1997).

Schätzungsweise 70 – 80 % aller sporadischen kolorektalen Karzinome sowie solche auf dem Boden einer familiären adenomatösen Polypose (FAP) entstehen über den Gatekeeper Pathway. Er ist durch chromosomale Instabilität (CIN) gekennzeichnet, die sich neben Punktmutationen vor allem in Aneuploidie und Chromosomenrearrangements manifestiert (Lengauer et al. 1998).

Aus CIN resultieren Mutationen in Genen mit Zellzyklus-regulierender Funktion („Gatekeeper“). Dabei werden Tumorsuppressorgene und Protoonkogene mit negativer bzw. positiver Wirkung auf die Zellteilung unterschieden. Während sich Mutationen mit Funktionsverlust („Loss of Function“) in Suppressorgenen rezessiv verhalten, wirken überaktivierende Mutationen („Gain of Function“) in Protoonkogenen dominant. D.h. für die Umwandlung in ein Onkogen kann bereits eine solitäre Mutation hinreichend sein, wohingegen für den Ausfall eines Tumorsuppressors beide Allele betroffen sein müssen. Der mutationsbedingte Verlust der Proliferationskontrolle infolge von CIN führt zur klonalen Expansion von Zellen mit Wachstumsvorteil, die immer weiter genetische Alterationen akkumulieren und entarten (Nowell 1976).

Für das kolorektale Karzinom sind Mutationen in einer Reihe von definierten Tumorsuppressoren und Onkogenen dokumentiert, welche sich im Rahmen der Adenom-Karzinom-Sequenz mit morphologischen Veränderungen des Dickdarmepithels korrelieren lassen (Fearon und Vogelstein 1990). Ein Schlüsselereignis des Gatekeeper Pathways stellen Mutationen des Tumorsuppressorgens *APC* (*Adenomatosis Polyposis Coli*) dar. *APC* ist in den Wingless/Wnt Pathway involviert, indem es die proteasomale Degradierung von

β -Catenin vermittelt. Nach funktionellem Verlust von APC unterbleibt der proteasomale Abbau von β -Catenin. Daraufhin kann β -Catenin vermehrt in den Zellkern translozieren. Dort transaktiviert es im Verbund mit weiteren Transkriptionsfaktoren Gene, die den Zellzyklus beeinflussen (Fodde et al. 2001). APC-Mutationen wurden bereits im Adenomstadium in über 60 % der Fälle nachgewiesen (Powell et al. 1992). Weitere in den Gatekeeper Pathway involvierte Gene sind die Protoonkogene *K-Ras* (*v-Ki-ras2 Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog*) und *c-MYC* (*v-myc Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog*) sowie die Suppressoren *Tumorprotein p53* und *DCC* (*Deleted in Colorectal Cancer*) (Calvert und Frucht 2002).

Etwa 10 – 15 % aller sporadischen kolorektalen Karzinome sowie Krankheitsfälle des hereditären nicht-polypösen kolorektalen Krebsyndroms (HNPCC) entstehen über den Caretaker Pathway. Grundlage dieses Pathways ist Mikrosatelliteninstabilität (MSI) (Ionov et al. 1993; Lengauer et al. 1998).

Voraussetzung für MSI sind genetische Alterationen in DNA-Reparaturenzymen („Caretaker“), wie z.B. *MLH1* (*mutL Homolog 1*) und *MSH2* (*mutS Homolog 2*) (Calvert und Frucht 2002). Infolgedessen resultieren Mutationen in repetitiven Sequenzelementen nicht-transkribierter Bereiche des Genoms sowie auch innerhalb kodierender Sequenzen. Bei diesen Genen kann es sich um Gatekeeper, wie z.B. häufigerweise *TGFBR2* (*Transforming Growth Factor, Beta Receptor II*) oder andere Caretaker handeln (Calvert und Frucht 2002). Im Gegensatz zum Gatekeeper Pathway kommt es zunächst zu keiner territorialen Expansion der betroffenen Zellen (Perucho 1996) und diese bleiben i.d.R. diploid.

Neben Mutationen können auch epigenetische Ereignisse, wie Hypermethylierung von Promoterregionen und Histon-Deazetylierung, eine Genrepression bewirken (Momparker 2003). Des Weiteren wurde für chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) und Polyposis juvenilis eine maligne Transformation gesunder Epithelzellen durch Einflüsse des angrenzenden abnormalen Gewebes vorgeschlagen (Kinzler und Vogelstein 1998).

1.2.3 Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms

Die internationale Klassifikation für Krankheiten ICD-10 (International Classification of Diseases, Injuries and Causes of Death) kodiert Neoplasien des Kolons, Sigmoides und Rektums mit C18, C19 bzw. C10.

Zusammen zeigten die drei Tumorentitäten mit 70.400 geschätzten Neudiagnosen und 28.868 Todesfällen im Jahr 2002 die zweithäufigste Inzidenz und Mortalität aller Krebserkrankungen in Deutschland. Nur bei Brust- und Prostatakarzinomen lag die Zahl der Neuerkrankungen für Frauen bzw. Männer höher. 16 % aller neu registrierten Krankheitsfälle von C18-20 traten in

einem Alter vor dem 60. Lebensjahr auf (Bertz et al. 2006). Weniger als 10 % aller kolorektalen Karzinome gehen auf hereditäre Prädispositionen wie FAP und HNPCC zurück (Calvert und Frucht 2002). Die Erkrankungsrate scheint in Deutschland nach Zunahmen in den letzten Dekaden konstant zu bleiben (Bertz et al. 2006). Bösartige Neubildungen des Kolons und Sigmoideums treten zusammengenommen geringfügig häufiger auf als solche des Rektums. So ergab eine Online-Abfrage des saarländischen Krebsregisters (www.krebsregister.saarland.de/datenbank/datenbank.html) für den Zeitraum von 1970 – 2003 die folgende prozentuale Inzidenzaufteilung: 38,3 % aller Neudiagnosen entfielen auf Kolonkarzinome, 14,8 % auf sigmoidale und 46,8 % auf rektale Neoplasien. Dabei wird in der letzten Zeit eine Häufigkeitsverschiebung von rektalen zu weiter proximalen Tumoren beobachtet (Obrand und Gordon 1998).

Risikofaktoren für Darmkrebs sind eine an tierischen Fetten reiche Ernährung, Verzehr von rotem Fleisch (Rind und Schwein), Alkohol- und Tabakkonsum, wenig körperliche Aktivität und Übergewicht (Stein und Colditz 2004). Nicht-steroidale Antiphlogistika, wie z.B. Aspirin, besitzen einen protektiven Effekt (Peleg et al. 1994). Dies gilt auch für postmenopausal verabreichte Hormonersatzpräparate, welche allerdings gleichzeitig das Brustkrebsrisiko erhöhen können (Enserink 2002). Fälle von CED (Colitis ulcerosa und Morbus Crohn) gehen mit einem leicht erhöhten Risiko am kolorektalen Karzinom zu erkranken einher (Bertz et al. 2006).

1.2.4 Diagnose des kolorektalen Karzinoms

In Deutschland können Frauen und Männer ab dem 50. Lebensjahr eine Früherkennungsuntersuchung auf Vorliegen eines kolorektalen Karzinoms in Anspruch nehmen. Diese umfasst eine digitale Abtastung des Rektums und einen Test auf okkultes Blut im Stuhl (Hämokkulttest). Durch Anwendung des Hämokkulttests konnte eine Mortalitätsreduktion um 33 % demonstriert werden (Mandel et al. 1999). Jedoch kommt es beim Hämokkulttest vermehrt zu falsch positiven Ergebnissen (Towler et al. 1998), welche unnötige Koloskopien nach sich ziehen. Denn neben Tumoren können auch entzündliche Prozesse im Verdauungstrakt oder gerinnungshemmende Medikamente intestinale Blutungen verursachen. Obwohl auch die Detektion von Adenomen per Hämokkulttest berichtet wird (Towler et al. 1998), bleibt prämalignes Risikoepithel ohne Blutung unerkannt. Genauso ist die palpatorische Inspektion des Rektums zum Nachweis weiter proximal lokalisierter Tumoren ungeeignet. Ab einem Alter von 55 wird von den gesetzlichen Krankenkassen eine Kontrollkoloskopie zur Früherkennung von Darmkrebs in zehnjährigem Turnus angeboten. Jedoch ist die Compliance für Koloskopien gering (Vogel et al. 2005). Molekularbiologische

Marker zur Überwindung der Limitationen der derzeitigen Nachweisverfahren wurden bereits in einzelnen Studien erfolgreich getestet (Ahlquist et al. 2000; Cruz-Correa et al. 2004), befinden sich aber noch nicht in der Phase einer klinischen Anwendung. Außerhalb von Vorsorgeuntersuchungen erfolgt die Detektion kolorektaler Karzinome zunächst über Koloskopie, Ultraschall und Röntgenuntersuchungen. Endoskopisch abgetragene Biopate werden einer histopathologischen Begutachtung zugeführt.

1.2.5 TNM-Klassifikation und Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms

Zur Klassifizierung maligner Tumorerkrankungen ist heutzutage das TNM-System weit verbreitet. Dabei beschreibt T (Tumor) die Ausdehnung des Primärtumors, N (*lat.* Nodi lymphatici = Lymphknoten) das Ausmaß des lokalen Lymphknotenbefalls und M (Metastasen) das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit von Fernmetastasen. Für das kolorektale Karzinom sind folgende Kategorien möglich: T1 bei Invasion der Tela submucosa, T2 bei Einbruch in die Muscularis propria, T3 bei Infiltration in die abluminale Schicht der Tunica serosa und T4 bei Befall anderer Organe nach Perforation des Peritoneums. N0 bezeichnet Metastasenfreiheit der regionären Lymphknoten, N1 1 – 3 metastasenpositive, N2 4 oder mehr betroffene Lymphknoten. M0 bedeutet Abwesenheit, M1 Nachweis von Fernmetastasen.

Diese drei Parameter werden nach Empfehlung der UICC (*franz.* Union Internationale Contre le Cancer) auf die in Tab. 1 angegebene Weise zur Stadieneinteilung (Staging) benutzt (Sobin und Wittekind 2002).

Der Metastasierungsort kann durch Dreibuchstabenkürzel näher spezifiziert werden. Dabei stehen M HEP, M PER und M PUL für eine Filialisierung in der Leber, im Peritoneum bzw. in den Lungen. Postoperativ folgt dem klinischen Staging eine histopathologisch abgesicherte Stadieneinteilung, die als pTNM-Klassifikation bezeichnet wird. Darüber hinaus werden die Größen R, G, L und V zur Charakterisierung der Tumorkrankheit verwendet. R gibt Auskunft über die Ausdehnung eines nach der Operation vorhandenen Residualtumors (R0 = kein verbleibendes Tumorgewebe). G beschreibt den Umfang der Zellentdifferenzierung (G4 = vollständig undifferenziert) und wird als histopathologisches Grading bezeichnet. L und V geben Auskunft über die Lymphgefäß- bzw. Veneninvasion (L0/V0 = keine Gefäßinvasion). Bei Unklarheit wird anstatt der Zahl ein x (überhaupt nicht beurteilbar) oder auch, obwohl offiziell nicht vorgesehen, ein + (Parameter > 0) als Suffix verwendet. Also z.B. N+ für N1 oder N2.

Tab. 1: UICC-Stadiengruppierung für das kolorektale Karzinom.

Stadium	T ¹	N ²	M ³	5-Jahres-Überleben von Kolonkarzinompatienten [%] ⁴
I	T1–T2	N0	M0	93,2
IIa	T3	N0	M0	84,7
IIb	T4	N0	M0	72,2
IIIa	T1–T2	N1	M0	83,4
IIIb	T3–T4	N1	M0	64,1
IIIc	jedes T	N2	M0	44,3
IV	jedes T	jedes N	M1	8,1

Erklärung:¹ Tumorgröße² Nodalstatus³ Fernmetastasierung⁴ nach O'Connell et al. (2004), ohne Rektumkarzinome

1.2.6 Prognostische Faktoren in der klinischen Routine

Die Prognose ergibt sich primär aus dem UICC-Stadium des Patienten. Daneben gilt der Zustand der Resektionsränder des Tumors nach der Operation als einer der wichtigsten prognostischen Faktoren (Sobin und Wittekind 2002; Compton 2003). Eine postoperative Tumorfreiheit (R0) geht mit deutlich verbesserten Überlebensaussichten einher.

Des Weiteren scheinen die Überlebenschancen in spezialisierten Krankenhäusern mit hohem Patientendurchsatz („High Volume-Kliniken“) wegen des kontinuierlichen Trainings des Ärzteteams erhöht zu sein (Brennan 2004). Auch wird das Überleben kolorektaler Karzinompatienten signifikant von der Intensität des Follow-ups beeinflusst (Renehan et al. 2002; Figueredo et al. 2003). Neben Kontroll-Koloskopien wird für die Nachbeobachtung eine Konzentrationsbestimmung des carcinoembryonalen Antigens (CEA) in zeitlich definierten Abständen empfohlen (Schlag und Kretzschmar 2006).

Das in Abschnitt 1.2.5 dargestellte TNM-System ist Grundlage für therapeutische Entscheidungen, erlaubt allerdings keine völlig präzise Prognosenstellung für den individuellen Patienten. Analoges gilt auch für die im Rahmen der Verlaufskontrolle herangezogenen Tumormarker CEA und CA 19-9 (Lamerz et al. 2001).

Zur Überwindung dieses Dilemmas sind etliche potenzielle molekulare Marker wie in Appendix-Tab. 7 beschrieben (Kahlenberg et al. 2003; Galizia et al. 2004). Zur Erprobung von prognostisch relevanten Expressionssignaturen, also ganzen Sätzen von Markergenen, werden in der medizinischen Forschung seit einigen Jahren DNA-Chips und Tissue Microarrays erfolgreich getestet (Prall et al. 2004; Wang et al. 2004b). Jedoch findet z.Zt. kein einziger dieser Faktoren Verwendung in der klinischen Routine.

Für eine zukünftige klinische Anwendung von Expressionsmarkern sind Methoden der Nukleinsäurequantifizierung wahrscheinlich immunhistochemischen Verfahren überlegen, obschon das Krankheitsgeschehen letztendlich von Proteinen determiniert wird. Jedoch ist die Immunhistochemie bislang genauso subjektiv wie die konventionelle Histologie (Chung et al. 2002). Beispielsweise führte der immunhistochemische HercepTest bei Brustkrebspatientinnen zu vielen falsch-positiven Befunden hinsichtlich eines möglichen Ansprechens auf Herceptin (Jacobs et al. 1999; Tubbs et al. 2001).

1.3 Verwendete molekularbiologische Techniken zur Identifizierung von Expressionsmarkern

1.3.1 Microarray-Technologie

Microarrays (DNA-Chips) erlauben die simultane Erfassung der Transkription einer Vielzahl verschiedener Gene (Schena et al. 1995). Das Nachweisprinzip basiert auf der Hybridisierung komplementärer Nukleinsäuren (Southern 1975). Zur Herstellung von Microarrays werden DNA-Moleküle definierter Sequenz („Sonden“) an definierten Koordinaten einer festen Unterlage (z.B. Glas oder Nitrozellulose-Membran) immobilisiert. Anschließend hybridisieren die komplementären und zuvor fluoreszenzmarkierten Nukleinsäuren einer zu untersuchenden Probe an den korrespondierenden Orten des DNA-Chips. Nach Fortwaschen ungebundener Einzelstrangmoleküle kann anhand der Fluoreszenz definierter Orte des Microarrays die Abundanz der entsprechenden mRNAs in der Probe ermittelt werden (Schena et al. 1995).

Es werden cDNA-Chips und Oligonukleotid-Arrays unterschieden (Mello-Coelho und Hess 2005). Erstere besitzen als Sonden cDNAs, welche erst nach ihrer Synthese auf den Microarray aufgebracht („gespottet“) werden. Letztere werden hingegen in einem der Halbleiterindustrie entlehnten fotolithografischen Verfahren produziert, bei dem die Sonden direkt auf dem Trägermaterial des DNA-Chips synthetisiert werden (www.affymetrix.com/technology/manufacturing/index.affx). Diese ausschließlich von der Firma Affymetrix hergestellten Microarrays werden auch als GeneChips bezeichnet.

Für die Expressionsprofilierung in dieser Arbeit wurden GeneChips vom Typ U95A, B, C, D und E verwendet. Sie besitzen Oligonukleotidsonden von 25 Nukleotiden Länge. Zur Kontrolle auf unspezifische Hybridisierung existieren neben den eigentlichen Sonden sog. Mismatch-Sonden mit einer zentralen Punktmutation (13. Nukleotid). Sie erlauben die Berechnung eines Detection p-values, der ein Maß für die Reliabilität des Expressionssignals

eines bestimmten Transkripts darstellt. Der Detection p-value kann Werte von 0 bis 1 annehmen. Je kleiner der p-value, desto größer die Vertrauenswürdigkeit eines Fluoreszenzsignals (Affymetrix 2001).

Die beiden kritischen Punkte der Microarray-Technologie liegen in der Spezifität der Hybridisierung und der Datenauswertung. Von den benutzten U95-GeneChips vermag jeder einzelne mehr als 12.000 verschiedene Sequenzen nachzuweisen. D.h. anders als beim Northern Blot, wo i.d.R. lediglich eine solitäre Sonde verwendet wird, müssen beim GeneChip mehr als 12.000 verschiedene Hybridisierungen unter den gleichen chemischen Bedingungen ablaufen. Dies erklärt, weshalb Affymetrix zur Detektion von Fehlhybridisierungen die Berechnung des Detection p-value eingeführt hat. Zur Analyse der großen Datenmengen aus DNA-Chip-Experimenten steht eine Vielzahl von statistischen Methoden und Computerprogrammen zur Verfügung (Mello-Coelho und Hess 2005). Dabei handelt es sich neben Verfahren der Datennormalisierung prinzipiell um

(A) die Gruppierung von Genen („Clustering“) und

(B) das Filtern von Genen (Selektion von Transkripten aufgrund von definierten Regeln) anhand der Expression in verschiedenen Konditionen (Wu 2001).

1.3.2 Quantitative Real-Time PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht auf der Amplifikation von Nukleinsäuren (Mullis und Faloona 1987). Deshalb sind PCR-Befunde im Vergleich zu Microarray-Daten als vertrauenswürdiger einzustufen. Allerdings sind bei der klassischen PCR die Vervielfältigung und der DNA-Nachweis zeitlich von einander getrennt (Endpunktbestimmung). Im Gegensatz dazu erlaubt die quantitative Real-Time PCR (qPCR) die Amplifikation von Transkripten in Echtzeit („Real-Time“) zu verfolgen. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass der Vergleich von PCR-Produktmengen verschiedener Proben während der exponentiellen Phase der Amplifikation erfolgt. Die qPCR besitzt einen dynamischen Bereich von 10^7 (Jung et al. 2000). Dies bedeutet, dass sich selbst Transkripte mit einem Konzentrationsunterschied von 10.000.000 hinsichtlich ihrer Quantität vergleichen lassen. Im Rahmen dieser Arbeit kamen mit der SYBR-Green PCR und dem Taqman Assay zwei unterschiedliche Formen der qPCR zum Einsatz.

Die SYBR-Green PCR basiert auf der Fluoreszenz eines in doppelsträngige DNA (dsDNA) interkalierenden Farbstoffs (Higuchi et al. 1992; Higuchi et al. 1993). Freies SYBR-Green fluoresziert nur in geringem Maße, wohingegen an dsDNA gebundenes SYBR-Green gut nachweisbares Fluoreszenzlicht emittiert. Deswegen verhalten sich die Menge an gebildetem PCR-Produkt und Fluoreszenzstärke in der SYBR-Green PCR proportional zu einander

(Rasmussen et al. 1998). Da SYBR-Green sequenzunabhängig an dsDNA bindet, kann zunächst nicht zwischen spezifischen und etwaigen unspezifischen Amplikons unterschieden werden. Nach Beendigung der PCR kann jedoch durch schrittweise Erhöhung der Temperatur auf 95 °C (Schmelzkurvenaufzeichnung) über den Temperaturpunkt, bei dem die maximale Abnahme der Fluoreszenzintensität beobachtet wird, auf die Größe der PCR-Produkte geschlossen werden (Ririe et al. 1997).

Beim Taqman Assay ist hingegen eine sehr hohe Spezifität durch Verwendung einer fluorogenen Oligonukleotidsonde gewährleistet (Holland et al. 1991; Lee et al. 1993; Livak et al. 1995). Diese Sonde bindet sequenzspezifisch zwischen den beiden Primer-Anlagerungsstellen an die Template-DNA. An ihrem 5'-Ende besitzt sie einen fluoreszierenden Reporter-Farbstoff, am 3'-Ende einen sog. Quencher-Farbstoff (*engl.* to quench = löschen). Zunächst wird die Fluoreszenz des Reporters durch die räumliche Nähe des Quenchers unterdrückt, indem der Reporter den größten Teil der zuvor absorbierten Lichtenergie über einen Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) auf den Quencher überträgt (Förster 1948). Während der Extensionsphase hydrolysiert die Taq-Polymerase aufgrund ihrer 5'-3'-Exonuklease-Aktivität die gebundene Sonde vom 5'-Ende her. Dadurch wird die Reportergruppe räumlich vom Quencher getrennt und beginnt zu fluoreszieren. Mit jedem neusynthetisierten Doppelstrang wird ein Reportermolekül freigesetzt und unterliegt keinem FRET mehr. Damit ist das Fluoreszenzsignal proportional zur Menge an spezifisch-generiertem PCR-Produkt. Zwar könnten auch unspezifische Amplifikationen resultieren, jedoch haben diese wegen der hier unterbleibenden Bindung der Oligonukleotidsonde keinen Einfluss auf die Fluoreszenz.

1.3.3 *in situ*-Hybridisierung

Dieses Verfahren basiert wie die DNA-Chip-Technologie auf der Hybridisierung komplementärer Nukleinsäuren. Zweck ist aber in erster Linie die Lokalisierung zellulärer mRNA und weniger eine Quantifizierung. D.h. im Gegensatz zum Arbeiten mit Microarrays wird die RNA nicht extrahiert, sondern direkt am Gewebepreparat („*in situ*“) nachgewiesen (Singer und Ward 1982). Es eignen sich sowohl Paraffin- als auch Gefrierschnitte.

Einen sehr kritischen Schritt stellt bei der *in situ*-Hybridisierung die Fixierung dar. Dabei muss unter Erhalt der Zellmorphologie sowohl die Inaktivierung jeglicher RNasen als auch die Permeabilität der Zytoplasmamembran für die *in situ*-Sonde gewährleistet werden. Die *in situ*-Sonde ist ein zur lokalisierenden Sequenz komplementäres Nukleinsäuremolekül. Sie ist entweder

(A) radioaktiv markiert,

(B) kann über ein Fluoreszenz-System nachgewiesen werden oder

(C) wird von einem Enzym-konjugierten Antikörper erkannt, welcher die Umwandlung eines zunächst farblosen Substrats in ein farbiges Produkt vermittelt.

Mit der Erfindung von Tissue Microarrays (TMAs) wurde die parallele *in situ*-Hybridisierung an multiplen Gewebepräparaten auf einem Objektträger unter exakt denselben chemischen Bedingungen möglich (Kononen et al. 1998). Die TMA-Technologie zeigte im Vergleich zur Benutzung von Einzelpräparaten in einer Reihe von immunhistochemischen Studien über unterschiedliche Tumorentitäten gute Genauigkeit (Giltane und Rimm 2004). Eventuell ist sie sogar dem Arbeiten mit singulären Gewebeschnitten überlegen (Torhorst et al. 2001). Im Gegensatz zu immunhistochemischen Untersuchungen sind TMA-basierte *in situ*-Hybridisierungsstudien bislang weniger verbreitet. Dessen ungeachtet stellen TMAs wegen der Selektion repräsentativer Gewebeareale durch einen Pathologen ein sehr konsequentes Qualitätsmanagement dar (Giltane und Rimm 2004).

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patientengewebeproben

Für die Microarray-Analysen wurden Tumorproben von 10 Kolonkarzinompatienten (Appendix-Tab. 1) sowie Kolongewebe von 5 gesunden Kontrollindividuen benutzt (Healthy). Alle Tumorpatienten waren zum Zeitpunkt der Operation lymphknoten- und fernmetastasenfrei (N0 M0) und besaßen mehrheitlich ein frühes Tumorstadium (T1/2). Trotz vollständiger Tumorentfernung (R0) kam es bei einem Teil der Patienten zu Rezidivierung oder Entwicklung metachroner Metastasen mit Todesfolge (High Risk). Die übrigen Patienten zeigten hingegen bei einer medianen Follow-up Zeit von 90,2 Monaten weder Rezidivbildung noch metachrone Metastasierung (Low Risk). Umfassende Recherchen ergaben, dass die High Risk-Gruppe irrtümlicherweise einen rezidiv- sowie von metachronen Metastasen freien Karzinompatienten enthielt.

Zur Validierung der Microarray-Daten wurden Tumor- und Normalgewebeproben von 63 Patienten mit kolorektalem Karzinom verwendet. Die mediane Follow-up Zeit dieses Stammkollektivs lag bei 47,4 Monaten (69,2 Monate für alle Überlebenden). Das mediane Alter zum Zeitpunkt der Operation betrug bei einer Altersspanne von 37,9 bis 91,9 Jahren 65,7 Jahre und der Anteil männlicher Individuen belief sich auf 57,1 %. Bei 25 Patienten war das Karzinom im Kolon, bei 18 im Sigmoideum sowie bei 15 im Rektum lokalisiert. Für 5 Individuen war keine eindeutige Lokalisationsangabe möglich. Nach der UICC-Stadieneinteilung befanden sich 11,1 % der Patienten im Stadium I, 38,1 % im Stadium II, 6,4 % im Stadium III und 44,4 % im Stadium IV. Appendix-Tab. 2 zeigt wichtige klinische Parameter für alle 63 Patienten. Für Expressionsuntersuchungen an Adenomen, weiteren Primärtumoren sowie Metastasenmaterial wurden Proben von zusätzlichen Patienten verwendet. Alle Gewebeproben wurden nach der chirurgischen Resektion in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Des Weiteren wurden Biopate von 14 Tumoren sowie 31 kolorektalen Gewebeproben ohne pathologischen Befund für die GeneChip-Validierungen benutzt. Die Lagerung der Biopsieproben erfolgte in RNAlater-Lösung.

2.1.2 Eukaryote Zellen

COS-7	American Tissue Culture Collection
HT-29	American Tissue Culture Collection
LS 174T	American Tissue Culture Collection
MDA-MB 435	American Tissue Culture Collection
SW480	American Tissue Culture Collection

2.1.3 Bakterien

pGIKS-BioB #87487	American Tissue Culture Collection
pGIKS-BioC #87488	American Tissue Culture Collection
pGIKS-BioD #87489	American Tissue Culture Collection
pGIKS-CRE #87490	American Tissue Culture Collection
chemisch kompetente TOP10 <i>E. coli</i>	Invitrogen

2.1.4 Molekularbiologische Kits und Standards

Apo-ONE(R) Homogeneous Caspase 3/7 Assay	Promega
BioArray HighYield RNA Transcript Labeling Kit	Enzo Diagnostics
Calcein-AM	Molecular Probes
DNA-Molekulargewichtsmarker VIII (19 – 1114 bp)	Roche
RNase-Free DNase Set (50)	Qiagen
OneStep RT-PCR Kit	Qiagen
pcDNA3.1/V5-His-TOPO TA Expression Kit	Invitrogen
Qiagen Plasmid Maxi Kit (25)	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit (250)	Qiagen
QIAshredder (250)	Qiagen
RiboGreen RNA Quantitation Reagent and Kit	Molecular Probes
RNA 6000 Nano LabChip Kit	Agilent
RNeasy Mini Kit (250)	Qiagen
Superscript Choice System	Gibco BRL
SYBR-Green PCR Master Mix	Applied Biosystems
Taqman Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG	Applied Biosystems

2.1.5 Plasmid-DNA

pcDNA3.1/V5-His-TOPO	Invitrogen
----------------------	------------

2.1.6 Primer und Assays-on-Demand

Das Design der Primer zur Generierung von Sonden zur *in situ*-Hybridisierung erfolgte mithilfe des Online-Dienstes HUSAR. Die Primer für die qPCR ohne Sonde (SYBR-Green) wurden mit der Software Primer3 entworfen. Die Primersequenzen lauteten wie folgt:

<u>Primerset</u>	<u>Forward Primer (5'→3')</u>	<u>Reverse Primer (5'→3')</u>
784	TCCTGTTGAATTTAATAGGCTCTCTTT	TGATAGCTCCCAAATAAATTATTAGAAATC
804	TTGTGCTGTGGACCAGTAAATACA	GCATGTCTGAAGGTTTGTCTTCTTG
814	TCTGTATTAAGGCCTCCATTTTCAGT	CGGGTTCATTAAGAGACAAATAGACA
910	TCTCTGCAGGGCGCTTTG	GTTACCGCACCTGCCTTCAC
CHO-15/16 ¹	GGCATCGTGATGGACTCCG	GCTGGAAGGTGGACAGCGA
CLDC	AGTAGCAGTTCCGGAGTCCA	CAAAGTTTCTTTGGGGTCCA
EXT	CACTCTGGATGAGGCTGATGAG	TCACCTCGCACAGCTCGTT
ICLD-1	AAACCCAATGCTTTGATTGTTT	CAAGAAAAAAAAAGCCTCTGGG
ICLD-2	TGTCATGCCTCAGTGGAGAG	TGATGATGAAGATGATTCCAGC
IREG-1	AGACCTGGGTTGATGCAGATCT	GGTTGCCCGAATTCATGTTCT
MEC	TTGGCTGCTGTCATCCTTCAT	CGGGCTGACACAGATTCTTCT
QAC	TCAGCAAGCAGGAGTATGACGA	CGCAACTAAGTCATAGTCCGCC
RAB	TTTGTGAGCCAGTTCCCGA	GGCAACAAGGCAGACCTACC
RCL ²	GATTGTTGATTGCTCTTA	TCCAGCTGCCTCTAGTTTTTTGAA
REG	AGACCTGGGTTGATGCAGATCT	GGTTGCCCGAATTCATGTTCT
SER	TGTGGAAATCACGGTTCCAAC	CCACGAAAGTGCGTTTCTTTG
SMA	CCTGCACCAAAAACCTTTAGGATTC	TCCAGAGCCCCAACCCTT
BGH		TAGAAGGCACAGTCGAGG
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	
T7 (dT) ₂₁ ³	GCATTAGCGGCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGA(T) ₂₁ V, V = A, C, oder G	

¹ De Smet et al. (1994)

² Higham et al. (1999)

³ Baugh et al. (2001)

Diese Oligonukleotide wurden genauso wie die Random Hexamer-Primer von der Firma BioTez bezogen. Für die qPCR mit Sonde (Taqman Assay) wurden die folgenden Assays-on-Demand (im Fall von β -Aktin: Pre-Developed Assay) von Applied Biosystems verwendet:

<u>Gensymbol</u>	<u>Gename</u>	<u>Identifier</u>
<i>AQP8</i>	<i>Aquaporin 8</i>	Hs00154124_m1
<i>ACTB</i>	β -Actin	4310881E
<i>CCR3</i>	<i>Chemokine (C-C Motif) Receptor 3</i>	Hs00266213_s1
<i>CLDN7</i>	<i>Claudin 7</i>	Hs00600772_m1
<i>CLDN8</i>	<i>Claudin 8</i>	Hs00273282_s1
<i>REG1A</i>	<i>Regenerating Islet-Derived 1 Alpha</i>	Hs00602710_g1

2.1.7 Antikörper, Enzyme und sonstige Proteine

Azetyl-BSA	Gibco BRL
Akkutase	PAA Laboratories
AmpliTaq DNA Polymerase	Applied Biosystems

AmpliTaq Gold DNA Polymerase	Applied Biosystems
AmpliTaq PCR-Puffer mit 25 mM MgCl ₂	Applied Biosystems
anti-DIG-AP-Fab-Fragmente	Roche
anti-Streptavidin-Antikörper (Ziege), biotinyliert	Vector Laboratories
Bovines Serumalbumin	Sigma
Hind III mit 10 × Restriktionsendonuklease-Puffer R	Fermentas
Kpn I mit 10 × Restriktionsendonuklease-Puffer KpnI	Fermentas
M-MLV Reverse Transcriptase mit 5 × RT-Buffer	Promega
Paclitaxel	Sigma
R-Phycoerythrin Streptavidin	Molecular Probes
Proteinase K	Roche
RNasin	Promega
T7 RNA-Polymerase	Roche
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories
Xho I mit 10 × Restriktionsendonuklease-Puffer R	Fermentas
Ziege IgG	Sigma
2.1.8 Antibiotika	
Ampizillin-Natriumsalz	Roth
Gentamycin (10 mg/mL)	PAA Laboratories
Penizillin/Streptomycin (× 100)	PAA Laboratories
2.1.9 Chemikalien	
Antifoam O-30	Sigma
5'-Azacytidin	Sigma
Borsäure	Roth
Bromphenolblau	Roth
DEPC-H ₂ O	Ambion
Dextransulfat	Amersham-Pharmacia
DIG RNA Labeling Mix	Roche
DMEM Low Glucose without L-Glutamine	PAA Laboratories
DMEM ohne Phenolrot	Biochrom
DMSO (steril)	Sigma
dNTPs (100 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP)	Amersham-Pharmacia
EDTA	Sigma

EDTA-diNatriumsalzlösung	Sigma
Eisessig	Roth
Eosin	Sigma
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid (10 mg/mL)	Roth
Euparal	Roth
FCS Gold	PAA Laboratories
Fibronectin (human)	BD Biosciences
Ficoll	Fluka
Formamid	Fluka
Glutamin ($\times 100$)	PAA Laboratories
Glycerol	Merck
Glycin	Roth
HBSS	PAA Laboratories
Hefe-tRNA	Roche
Kaisers Glyceringelatine für die Mikroskopie	Merck
Kaliumazetat	Roth
Kollagen Typ I (Ratte)	BD Biosciences
Kontroll-Oligonukleotid B2	Affymetrix
Lachsspermien-DNA	Sigma
Magnesiumazetat-Tetrahydrat	Roth
Mayer's Hematoxylin Solution (0,1 %)	Sigma
Medim-Plast 58 Gewebepflegeeinbettmittel	Medim-Histotechnologie
2-Mercaptoethanol	Fluka
MES Monohydrat	Sigma
MES-Natriumsalz	Sigma
5 M NaCl, RNase-frei, DNase-frei	Ambion
Natriumchlorid	Roth
Natriumzitat	Sigma
Nitroblau Tetrazolium/Bromochloroindolyl-Phosphat	Roche
PBS, pH = 7,2	Gibco BRL
PBS (steril)	PAA Laboratories
95 % Polyvinylpyrrolidon	Roth
Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bradford-Reagenz)	Bio-Rad

RNAlater	Ambion
Roti-Phenol/Chloroform	Roth
Salzsäure	Roth
Seakem LE Agarose	BioWhittaker
20 × SSPE	BioWhittaker
TransFectin Lipid-Reagenz	Bio-Rad
Trizma Base	Sigma
Trizol LS-Reagenz	Gibco BRL
Trypton	BD
10 % Tween 20	Calbiochem
Xylene Cyanol	Bio-Rad
Xylol	Roth
Yeast Extract	Serva
Zitronensäure	Roth

2.1.10 Puffer, Lösungen und Kulturmedien

in situ-Hybridisierung:

0,2 % Glycin/PBS:	0,2 g Glycin in 100 mL PBS
PBT:	0,1 % Tween 20 in PBS
20 × SSC:	3,0 M NaCl 0,3 M Natriumzitat pH = 7,0, autoklavieren
50 % Dextransulfat:	50 g Dextransulfat in 100 mL DEPC-H ₂ O
100 × Denhardts-Lösung:	2 g BSA 2 g Ficoll 2 g Polyvinylpyrrolidon ad 100 mL mit DEPC-H ₂ O
Hybridisierungslösung:	20 µL 20 × SSC 10 µL 50 % Dextransulfat 1 µL 100 × Denhardts-Lösung 50 µL 50 % Formamid 1 µL Hefe-tRNA 2 µL Lachsspermien-DNA ad 100 µL mit DEPC-H ₂ O

Bakterienkultur:

LB-Medium: 10 g Trypton
5 g Yeast Extract
10 g NaCl
ad 1000 mL mit H₂O, autoklavieren

50 µg/mL Ampizillin frisch hinzufügen

Zellkultur:

Kulturmedium: 5 mL Penizillin/Streptomycin
5 mL Glutamin
50 mL FCS Gold (10 %) oder 5 mL FCS Gold (1 %)
ad 500 mL mit DMEM

PBS: 2,5 mL Gentamycin
5 mL Penizillin/Streptomycin
ad 500 mL PBS (steril)

Gelelektrophorese:

10 × TBE-Puffer: 54,0 g Trizma Base
27,5 g Borsäure
20,0 ml 0,5 M EDTA, pH = 8,0
ad 1 L mit H₂O, autoklavieren

Probenpuffer: 0,05 g Bromphenolblau
8,7 mL Glycerol
3,0 mL Ficoll
0,04 g Xylene Cyanol
ad 20 mL mit DEPC-H₂O, bei -20 °C lagern

Molekulargewichtsmarker VIII: 20 µL Stammlösung (250 µg/mL)
160 µL DEPC-H₂O
20 µL Probenpuffer
aliquotieren und bei 4 °C lagern

2.1.11 Geräte

Begasungsbrutschrank HERA Cell 240	Heraeus
2100 Bioanalyzer	Agilent
Biofuge 28 RS mit Festwinkelrotor HFA28.1	Heraeus Sepatech
BioPhotometer	Eppendorf
Gelelektrophoresekammer M.A.K.1	Bächler FeinTech
GeneArray Scanner	Agilent
GeneChip Fluidics Station 400	Affymetrix
GeneChip Hybridization Oven 640	Affymetrix
Ionenaustauscher E-pure	Barnstead
Kryotom CM3000	Leica

Laser Capture Microdissection-Gerät SL μ Cut	MMI
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank	BDK
Mikropipetten	Eppendorf
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss
Mikroskop BX50	Olympus
Mirkowelle R-3V14	Sharp
MTA1 Manual Tissue Arrayer	Alphamatrix
Peltier Thermal Cycler PTC-200	Biozym
pH-Meter 766	Calimatic
Prism 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems
Saugapparatur für Zellaggregationstest	Spezialanfertigung
Spannungsversorgung für Elektrophorese Phero-stab. 500	Biotec-Fischer
Spectra Fluor Fluorometer	Tecan
Thermomixer 5436	Eppendorf
Tischzentrifuge 5415 C mit Rotoren F-45-18-11/F-45-24-8	Eppendorf
Transilluminator UVT-28 MP	Herolab
Varifuge 3.0R mit Ausschwingrotor 8074	Heraeus Sepatech
Vortexer Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Waage 510-33	Kern & Sohn
Wärmeschrank B15	Heraeus

2.1.12 Computerprogramme und Online-Dienste

GeneSpring Version 4.2	Silicon Genetics
HUSAR Bioinformatics Lab	DKFZ
Microarray Suite Version 5.0	Affymetrix
NetAffx Analysis Center	Affymetrix
Primer3	Whitehead Institute
SPSS Version 12.0	SPSS

2.1.13 Verbrauchsmaterialien

Combitips	Eppendorf
Deckgläschen	Roth
DIG-Quantifizierungsstreifen	Roche
Einmalküvetten	Plastibrand
Human Genome U95A Array	Affymetrix

Human Genome U95B Array	Affymetrix
Human Genome U95C Array	Affymetrix
Human Genome U95D Array	Affymetrix
Human Genome U95E Array	Affymetrix
Injektionsspritzen	Braun
Kanülen	Braun
Nylon Cell Strainer (40 μm)	Falcon
Nylonfilter (10 μm)	VWR
Nylonfilter (40 μm)	VWR
Optical Adhesive Covers	Applied Biosystems
Phase Lock Gels	Eppendorf
Pipettenspitzen	Eppendorf
Rähmchen mit RNase-freier Polyethylen-Naphthalat-Membran	MMI
Reaktionsgefäße	Eppendorf
Spitzröhrchen	Falcon
Sterilfilter (0,22 μm) für große Volumina	Millipore
Sterilfilter (0,2 μm) für kleine Volumina	Schleicher & Schuell
Superfrost Objektträger	Menzel
Test3 Array	Affymetrix
3 mL-Tropfpipetten	VWR
96-Well Optical Reaction Plate	Applied Biosystems
Zellkulturplastikwaren	TPP

2.2 Methoden

Soweit nicht anders angegeben, wurden Standardprotokolle nach Ausubel et al. (1987) verwendet.

2.2.1 Microarray

2.2.1.1 Laser Capture Microdissection

Die Laser Capture Microdissection (LCM) ermöglicht es, definierte Areale einer Gewebesektion unter direkter Kontrolle am Mikroskop mit einem Laserstrahl zu isolieren und anschließend für molekularbiologische Untersuchungen zu benutzen (Emmert-Buck et al. 1996). Hierzu wurden 10 μm dicke Kolongewebeschnitte im Kryostaten auf Metallrähmchen

mit Polyethylen-Naphthalat-Trägerfolie aufgezogen und nach einminütiger Fixierung in 70 % Ethanol unter RNase-freien Bedingungen mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Anschließend wurden karzinomatöse bzw. epitheliale Gewebeareale mit dem SL μ Cut selektiv angereichert. Die LCM erfolgte bei 20-facher Vergrößerung, wobei die Laser-Leistung zwischen 25 – 75 % der totalen Leistung variiert wurde.

2.2.1.2 GeneChip-Experimente

Die Durchführung der DNA-Chip-Analysen sowie aller vorher notwendigen Prozesse erfolgte nach Empfehlungen des Herstellers. Die isolierten RNAs einer definierten Patientengruppe (Healthy, Low Risk oder High Risk) wurden vor der Synthese von Copy DNA (cDNA) vereinigt, sodass 2 μ g totale RNA eingesetzt werden konnten. Abweichend vom Affymetrix-Protokoll wurde für die cDNA-Synthese ein T7 (dT)₂₁-Primer (Baugh et al. 2001) verwendet. Anschließend erfolgte die Herstellung von Biotin-markierter Copy RNA (cRNA) mittels T7 RNA-Polymerase. Da jedes cDNA-Molekül hierbei i.d.R. mehrmals revers transkribiert wird, kommt es zu einer Amplifikation um etwa den Faktor 25. Zur Vermeidung der Einführung von Konzentrationsunterschieden zwischen verschiedenen RNA-Spezies wurde auf eine weitergehende Amplifikation verzichtet. Nach Fragmentierung der cRNA, Hybridisierung und Waschen, wurden auf dem GeneChip gebundene Nukleinsäuren mit Streptavidin-Phycoerythrin gefärbt und fluorimetrisch quantifiziert. Die Gruppen High Risk und Low Risk wurden stets als präparative Duplikate, Healthy je nach Microarray-Typ doppelt oder dreifach erfasst.

2.2.2 Bioinformatische Auswertung der Microarray-Daten

Nach der primären Datenerfassung wurde der Skalierungs- und Normalisierungsfaktor innerhalb der Software Microarray Suite bei 1 belassen. Die Auswertung der Expressionssignale erfolgte mit dem Programm GeneSpring nach Import der Microarray-Daten im Excel-Format. Um zwischen tatsächlichen (biologischen) Genexpressionsunterschieden und messtechnischen Schwankungen zu differenzieren, mussten die Microarray-Daten vor jeder Analyse normalisiert werden. Hierzu wurden die Rohsignale aller Sequenzen eines GeneChips nach Formel (1) durch das mediane Rohsignal des gesamten Microarrays dividiert („Per-Chip Normalization“):

$$\text{Normalisiertes Signal} = \frac{\text{Rohsignal von Transkript } X}{\text{Median der Rohsignale aller Transkripte}} \quad (1)$$

Sequenz-Annotationen wurden mittels der GeneSpider-Funktion automatisch über das Internet aktualisiert. Für ausgewählte Gene wurden Gene Ontology-Beschreibungen über das Internetportal NetAffx bezogen.

Zur Expressionsdatenanalyse wurden für jeden der 5 verschiedenen GeneChips der U95'er Serie (U95A, B, C, D sowie E) 4 verschiedene Genlisten erstellt (20 Listen insgesamt). Diese enthielten Transkripte mit mindestens um den Faktor 4

1. erhöhter Expression in der High Risk- im Vergleich zur Low Risk-Gruppe, d.h. $\text{Fold Change}_{\text{High Risk/Low Risk}} \geq 4$,
2. erniedrigter Expression in der High Risk- im Vergleich zur Low Risk-Gruppe, d.h. $\text{Fold Change}_{\text{High Risk/Low Risk}} \leq 0,25$,
3. erhöhter Expression im Tumor (High Risk + Low Risk) im Vergleich zu gesundem Kolongewebe (Healthy), d.h. $\text{Fold Change}_{\text{Tumor/Healthy}} \geq 4$ bzw.
4. erniedrigter Expression im Tumor (High Risk + Low Risk) im Vergleich zu gesundem Kolongewebe (Healthy), d.h. $\text{Fold Change}_{\text{Tumor/Healthy}} \leq 0,25$.

Darüber hinaus mussten die extrahierten Sequenzen zwei weitere Bedingungen erfüllen:

- (A) Die Signale durften zwischen Replikaten nicht mehr als um den Faktor 0,4 voneinander divergieren.
- (B) Der Detection p-value musste für den überexprimierten Zustand in mindestens 50 % der Replikate 0,04 oder weniger betragen.

In 6 Fällen wurden für die Validierung per quantitativer Real-Time PCR auch Transkripte nach weniger restriktiven Kriterien (Fold Change, Schwankung der Replikate sowie Detection p-value) außerhalb dieser 20 Genlisten selektiert. Zur bioinformatischen Vorab-Validierung wurden die Expressionsdaten der Genlisten für die Erstellung von Experiment-Dendrogrammen herangezogen. Hierbei wurde für jeden Microarray-Typ die Gesamtheit aller Transkripte aus den 4 entsprechenden Listen verwendet. Experiment-Dendrogramme stellen eine Form des hierarchischen Clusters dar (Eisen et al. 1998), um zu überprüfen, ob eine Expressionssignatur (Microarray-Daten der Transkripte aus den erstellten Listen) für die Gruppierung verschiedener Konditionen (Healthy, Low Risk und High Risk) geeignet ist. Die Erstellung der Dendrogramme erfolgte unter Zugrundelegung der Spearman-Korrelation (nichtparametrischer Test).

2.2.3 Validierung der Microarray-Resultate mittels quantitativer Real-Time PCR

2.2.3.1 Gewebeaufarbeitung

Kryostatschnitte (10 μm) wurden in 350 μL β -Mercaptoethanol-haltigem RLT-Puffer lysiert und durch rigoroses Vortexen grob homogenisiert. Der erste und letzte Gewebeschnitt (5 μm) wurden auf einen Objektträger aufgezogen und nach Hämatoxylin-Färbung von einem Pathologen befundet. Tumorproben, die nicht ausreichend Tumorgewebe enthielten sowie Normalgewebeproben mit Tumorarealen wurden verworfen.

2.2.3.2 RNA-Isolation

Die RNA-Extraktion erfolgte mithilfe des RNeasy Mini Kits und QIAshredder-Säulen nach Vorgabe des Herstellers. Das Funktionsprinzip des RNeasy Kits beruht darauf, dass RNA-Moleküle der aufgeschlossenen Zellen an eine Silicagel-Membran binden, von der sie nach mehreren Waschrufen mit Wasser wieder eluiert werden. Dabei erfolgt ein Ausschluss von RNA-Molekülen < 200 bp und damit von stark fragmentierter RNA. Zwecks Eliminierung jeglicher genomischer DNA (gDNA) wurde in die Extraktionsprozedur ein DNase-Verdau nach Herstellerangaben integriert. Anschließend wurde die RNA-Konzentration spektral-photometrisch bestimmt und die RNA-Integrität durch eine Reverse Transkription mit anschließender β -Aktin-PCR (RT-PCR) überprüft. Bei der durchgeführten OneStep RT-PCR (Tab. 2 und Tab. 3) finden das Umschreiben der RNA in cDNA und die anschließende PCR ohne zwischenzeitliche Zugabe von weiteren Reagenzien statt. Das verwendete Primersset (De Smet et al. 1994) umspannte 2 Introns, sodass beim Vorhandensein unerwünschter gDNA neben dem erwarteten PCR-Produkt (613 bp) ein weiteres, größeres DNA-Fragment (820 bp) generiert wurde.

Tab. 2: Pipettierschema zur Durchführung der β -Aktin OneStep RT PCR.

Bestandteil	Volumen [μL]
DEPC- H_2O	13,2
5 \times RT-PCR Puffer	4,0
50 μM Primer CHO-15	0,1
50 μM Primer CHO-16	0,1
10 μM dNTP-Mix	0,8
RT-PCR Enzym-Mix	0,8
RNA	1,0
Summe	20,0

Tab. 3: Ablaufschema der β -Aktin OneStep RT PCR.

Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zeit	Zyklen
50	30 min	1
95	15 min	1
94	90 s	
68	60 s	30
72	120 s	
72	10 min	1

2.2.3.3 cDNA-Synthese

1 – 3 μg RNA wurden mit 2 μL 50 μM Random Hexamer-Primern in einem Volumen von 25 μL für 10 min bei 70 °C und anschließend für 10 min auf Eis gehalten. Nach Zusatz von 25 μL cDNA-Synthese-Mix (Tab. 4) erfolgte Inkubation bei 37 °C für 1 h. Zwecks Präzipitation der cDNA wurde mit 100 μL Ethanol versetzt und 30 min bei -40 °C deponiert. Danach wurde für 20 min mit 15.000 rpm (Rotor HFA28.1) und bei 4 °C zentrifugiert, das Pellet mit 70 % eiskaltem Ethanol gewaschen, getrocknet, in 50 μL DEPC-H₂O aufgenommen und bei -20 °C weggefroren. Zur Überprüfung einer erfolgreichen cDNA-Synthese wurde eine β -Aktin PCR nach Angaben in Tab. 5 und Tab. 6 durchgeführt. Zur Detektion etwaiger gDNA waren die eingesetzten Primer (De Smet et al. 1994) Intron flankierend.

Tab. 4: Pipettierschema zur Durchführung der Reversen Transkription.

Bestandteil	Volumen [μL]
DEPC-H ₂ O	4,5
5 \times M-MLV RT Buffer	10,0
1 mg/mL BSA	5,0
25 mM dNTP-Mix	2,5
40 U/ μL RNasin	1,0
200 U/ μL M-MLV	2,0
RNA + Random Hexamer-Primer	25,0
Summe	50,0

Tab. 5: Pipettierschema zur Durchführung der β -Aktin.

Bestandteil	Volumen [μL]
DEPC-H ₂ O	11,65
10 \times Buffer	2,00
5 μM Primer CHO-15	0,40
5 μM Primer CHO-16	0,40
2 mM dNTP 2 mM	2,00
5 U/ μL AmpliTaq	0,25
cDNA	3,30
Summe	20,00

Tab. 6: Ablaufschema der β -Aktin PCR.

Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
94	30 s	
59	30 s	30
72	60 s	
72	10 min	1

2.2.3.4 Quantitative Real-Time PCR

Die qPCR wurde entweder mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green I oder als Taqman Assay mit fluorogener Sonde durchgeführt. Am Vortag der qPCR wurde eine 96-Well Mikrotiterplatte mit 100 ng cDNA/Well belegt und die cDNA über Nacht unter dem Abzug getrocknet. Unmittelbar vor dem Start der qPCR wurde jedes Well mit 20 μL Reaktionsmix (Tab. 7) beschickt. Alle Reaktionen wurden, wenn nicht anderes beschrieben, als Triplikate ausgeführt. Für SYBR-Green PCRs wurden die optimalen Primerkonzentrationen in Vorversuchen ermittelt. Die optimalen Konzentrationen sind aus Tab. 8 ersichtlich. Für Taqman PCRs wurden kommerzielle Primer-Sonden-Gemische (Assays-on-Demand) verwendet, die

keiner weiteren Optimierung bedürfen. Die Sequenzen der in den Assays-on-Demand enthaltenen Primer und Sonden werden vom Hersteller nicht bekannt gegeben, sind aber so gewählt, dass die Sonde über eine Exon-Exon-Grenze hybridisiert und damit wegen der in gDNA vorhandenen Introns ausschließlich an cDNA bindet. Alle qPCRs liefen im ABI Prism 7000 Sequence Detection System und nach dem gleichen Thermocyclerprogramm ab (Tab. 9). Zum Ausschluss einer Koamplifikation unerwünschter DNA-Fragmente schloss sich an alle SYBR-Green PCRs eine Schmelzkurvenanalyse an.

Tab. 7: Pipettierschemata zur Durchführung von SYBR-Green PCRs und Taqman Assays.

Bestandteil	SYBR-Green PCR Volumen [μL]	Taqman Assay Volumen [μL]
2 \times SYBR-Green PCR Master Mix	10	-
5 μM Forward Primer	entsprechend optimaler Konz. (Tab. 8)	-
5 μM Reverse Primer		-
2 \times Taqman Universal PCR Master Mix	-	10
20 \times Assay-on-Demand Gene Expression Assay Mix	-	1
DEPC-H ₂ O Mix	ad 20	9
Summe	20	20

Tab. 8: Optimale Primerkonzentrationen für die SYBR-Green PCR in Abhängigkeit vom untersuchten Transkript.

Gensymbol	Primerset	Optimale Konz. [nM]
<i>ACTB</i>	QAC	100
<i>CCL28</i>	MEC	250
<i>EXTL3</i>	EXT	100
<i>ITGA6</i>	784	150
<i>AI247408</i>	804	100
<i>AI870708</i>	814	150
<i>RAB27B</i>	RAB	300
<i>REG1A</i>	REG	150
<i>SERPINE2</i>	SER	200
<i>SMARCA3</i>	SMA	150
<i>TMEPAI</i>	910	150

Tab. 9: Ablaufschema der qPCRs (SYBR-Green + Taqman).

Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zeit	Zyklen
95	10 min	1
95	15 s	40
60	60 s	

2.2.3.5 Auswertung der quantitativen Real-Time PCR

Die Auswertung der qPCRs erfolgte über die $\Delta\Delta C_T$ -Methode (Livak und Schmittgen 2001). Hierzu wurden die ermittelten Fluoreszenz-Schwellenwerte (C_T -Werte) nach Microsoft Excel exportiert. Der C_T -Wert bezeichnet jenen PCR-Zyklus, bei dem die gemessene Fluoreszenz erstmals das Hintergrundsignal signifikant übersteigt. Bei der $\Delta\Delta C_T$ -Analyse dienten die C_T -Werte einer ständig mitgeführten cDNA-Stammlösung aus kolorektalen LS 174T-Zellen als Kallibrator. Dadurch wurde die Genexpression in allen Proben als Vielfaches der Zellkulturexpression („Relative Amount“) ausgedrückt. Der $\Delta\Delta C_T$ -Methode liegt die

Gleichung (2) zugrunde. Dabei steht ΔC_T für die Differenz der C_T -Werte des untersuchten Transkripts („Gene of Interest“) und des Housekeeping-Gens β -Aktin (*ACTB*).

$$Relative\ Amount = 2^{-\left(\Delta C_{T_{Probe}} - \Delta C_{T_{Kallibrator}}\right)} \quad (2)$$

2.2.4 Tissue Microarray-basierte *in situ*-Hybridisierung

2.2.4.1 Herstellung von Tissue Microarrays

Bis zu 60 zylindrische Gewebestücke („Cores“) aus Paraffinpräparaten wurden mithilfe eines Tissue Microarrayers an definierten Koordinaten eines Paraffinblocks (Medim-Plast 58) eingelassen. Von diesem Tissue Microarray (TMA) wurden anschließend per Kryotom 1 μ m Dicke Querschnitte auf Objektträger aufgezogen und als Ganzes einer *in situ*-Hybridisierung unterzogen. Die Konstruktion der TMAs erfolgte im Fall der Serien „Kolon M0/1“ und „Magen M0/1“ durch Dr. Wolfgang Haensch, im Fall von „G2A/G2B“ durch Yiyang Dai. Tab. 10 gibt eine Übersicht aller verwendeten TMAs. Die TMA-Serie „Kolon M0/1“ beinhaltete u.a. Gewebestücke von 55 Patienten aus dem Stammkollektiv für die qPCR-Analysen.

Tab. 10: Charakterisierung der benutzten TMA-Serien bzgl. Herkunft und Fernmetastasierungsstatus der enthaltenen Gewebeproben.

Serie	Organ	Array-Nr.	Gewebe		Metastasierung ¹	
			Tumor	Normal	M0	M1
Kolon M0/1 ²	Kolorektum	1		×	×	×
		2	×		×	×
G2A/G2B	Kolorektum	1 + 2	×	×	×	
		1 + 2		×	×	
Magen M0/1 ³	Magen	3 + 4	×		×	
		5		×		×
		6	×			×

Erklärung:

¹ bei Normalgewebe bezieht sich M0/1 auf den korrespondierenden Tumor

² mehrheitlich Patienten aus dem für die qPCRs benutzten Stammkollektiv

³ von insgesamt 26 metastasierten Patienten wiesen 25 Individuen Peritonealmetastasen (M1 PER) auf

2.2.4.2 Durchführung der TMA-basierten *in situ*-Hybridisierung

Die *in situ*-Hybridisierung erfolgte nach Angaben von Gretschel et al. (2003) an 1 μ m dicken TMA-Präparaten. Abweichend wurden die Paraffinpräparate zur Fixierung zweimal für 2 min in Xylol gehalten, nach absteigender Ethanolreihe zweimal für 10 min in PBT gewaschen, für 15 min mit Proteinase K inkubiert, in 0,2 % Glycin/PBS getaucht sowie nach aufsteigender Alkoholreihe 1 h bei Raumtemperatur getrocknet. Des Weiteren enthielt die Hybridisierungslösung nur 25 % Formamid. Zur Sondengenerierung wurden die in Tab. 11 aufgelisteten Primer und Restriktionsenzyme verwendet. Die optimalen Hybridisierungstemperaturen sind

ebenfalls aus Tab. 11 zu entnehmen. Das Nachweisprinzip beruht auf der spezifischen Hybridisierung einer Digoxigenin-markierten RNA-Sonde mit der zu detektierenden mRNA-Spezies. Nach der Hybridisierung bindet ein Enzym-gekoppelter anti-Digoxigenin-Antikörper an die Sonde, wodurch farbloses NBT/BCIP-Substrat (Nitroblau Tetrazolium/Bromochloroindolyl-Phosphat) in einen lichtmikroskopisch nachweisbaren Farbstoff umgesetzt wird. Zur Kontrolle auf unspezifische Hybridisierung wurden neben den Antisense-Sonden (für die eigentliche Reaktion) stets auch Sense-Sonden an separaten Schnitten hybridisiert. Bei der mikroskopischen Auswertung wurden die Färbeintensität (0, 1, 2 oder 3) und der prozentuale Anteil des gefärbten Areal bestimmt. Für die statistische Analyse wurden neben diesen beiden Größen zwei weitere berechnete Parameter berücksichtigt. Dabei handelte es sich um das als Score bezeichnete Produkt von Färbeintensität und prozentualer Fläche sowie das Merkmal IntensitätPlus. Dieses erhielt immer dann den Wert 0 wenn auch die Farbintensität 0 war, ansonsten besaß es den Wert 1.

Tab. 11: Primer und Restriktionsenzyme für die Herstellung von *in situ*-Sonden sowie deren optimale Hybridisierungstemperaturen.

Gensymbol	Primerset	Restriktionsenzyme für Linearisierung	Hybridisierungstemperatur [°C]
<i>CLDN8</i>	ICLD-1	Xho I + Kpn I	57
<i>CLDN8</i>	ICLD-2	Xho I + Hind III	54
<i>REGIA</i>	IREG-1	Xho I + Kpn I	Kolon = 54; Magen = 50

2.2.5 Statistische Analyse der qPCRs und *in situ*-Hybridisierungen

Korrelationen zwischen der Genexpression und klinischen Größen wurden mit dem Kruskal-Wallis Test (Tabellen) oder beim Vergleich von lediglich zwei Parameterwerten mit dem Mann-Whitney Test (Diagramme und Text) überprüft. Expressionsunterschiede zwischen verschiedenen Gewebetypen wurden bei verbundenen Stichproben mit dem ebenfalls nichtparametrischen Wilcoxon Test, ansonsten mit dem Mann-Whitney Test analysiert. Alle Überlebensanalysen wurden nach Kaplan-Meier unter Verwendung des Log-Rank Tests durchgeführt. Dabei fungierte bei den qPCR-Daten der mediane Relative Amount als Trennwert („Cutoff“). Für die *in situ*-Hybridisierungen wurde hingegen die Variable IntensitätPlus (0 oder 1) für die Zuordnung in eine von zwei möglichen Patientengruppen herangezogen. Die Durchführung aller statistischen Analysen erfolgte mit SPSS 12.0. Unterschiede mit einem p-Wert < 0,05 wurden als statistisch signifikant erachtet. In den Abbildungen bedeuten *, ** und *** p < 0,05, p < 0,01 bzw. p < 0,001.

2.2.6 Tests zur Abklärung der Genfunktion

2.2.6.1 Expressionsvektorgenerierung und Transfektion

Zur Insertklonierung wurden die Open Reading Frames (ORFs) der Gene *CLDN8* und *REGIA* mit den Primersets CLDC (814 bp-Amplikon) bzw. RCL (557 bp-Amplikon) amplifiziert. Dabei entsprach die Thermocyclerprogrammierung den Angaben von Higham et al. (1999) mit den folgenden Abweichungen: Für *REGIA* betrug die Extensionstemperatur 60 °C, für *CLDN8* bei einer Gesamtdauer von 45 Zyklen 62 °C. Zur Erzeugung eines Desoxyadenosin-Überhangs an den 3'-Enden wurde AmpliTaq Gold in der PCR verwendet. Durch Einsatz von TOPO-Plasmiden, welche sich in linearisierter Form u.a. durch einen Desoxythymidin-Überhang an ihren 3'-Enden auszeichnen, lassen sich PCR-Produkte mit Desoxyadenosin-Überhang ohne vorhergehenden Restriktionsverdau in den Vektor hineinligieren. Die Ligation in das Plasmid pcDNA3.1/V5-His-TOPO, die Transformation chemisch kompetenter *E. coli* und die Klonierung in Ampizillin-haltigem LB-Medium erfolgten nach Herstellerangaben, die sich anschließende Minipräparation mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit. Die Insert-Orientierung wurde durch PCR mit T7 oder BGH-Primern in Kombination mit dem Reverse- bzw. Forward-Primer der Primersets CLDC und RCL überprüft. Als Mockplasmid (Kontrollplasmid) wurde ein mit dem Primerset RAB erzeugtes Fragment des Gens *RAB27B* in antisense-Orientierung in pcDNA3.1/V5-His-TOPO hineinligiert. Nach Sequenzierung der ORFs erfolgte eine Plasmidklonierung mit dem Plasmid Maxi Kit nach Vorschrift von Qiagen. Die Transfektion der Expressionsplasmide erfolgte mithilfe von TransFectin Lipid-Reagenz nach Gebrauchsanweisung des Herstellers in 70 – 80 % konfluent gewachsene Zellen. Zur Produktion von stabilen Transfektanten wurden die Zellen bis zum Erhalt von Einzelklonen in G418-haltigem DMEM selektiert. Danach wurde die Expression des Transgens mittels qPCR verifiziert.

2.2.6.2 Test auf DNA-Methylierung

SW480- bzw. MDA-MB 435-Zellen wurden in 6-Well Platten eingesäht und nach Erreichen von ca. 50 % Konfluenz verschiedenen Konzentrationen von 5'-Azacytidin (5-AzaC) für 5 d exponiert. Dabei wurden die 5-AzaC-Lösungen am 3. Tag einmal erneuert. Nach RNA-Extraktion und cDNA-Synthese wurde die Expression von *CLDN8*, *ACTB* sowie *SMARCA3* (in SW480) bzw. *CLDN7* (in MDA-MB 435) per qPCR in Duplikatansätzen quantifiziert. Bei *SMARCA3* (*SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator of Chromatin, Subfamily A, Member 3*) und *CLDN7* (*Claudin 7*) handelt es sich um

Expressionsmarker, von denen eine Transkription durch 5-AzaC-Behandlung in SW480 (Moinova et al. 2002) bzw. MDA-MB 435 (Kominsky et al. 2003) bereits beschrieben ist.

2.2.6.3 Adhäsionstest (Zell-Matrix-Adhäsion)

2×10^6 SW480-Transfektanten wurden mit 1:100 in HBSS verdünnter Calcein-AM-Stammlösung für 15 min bei 37 °C markiert und anschließend für 1,5 h in Kollagen- bzw. Fibronectin-beschichteten 96-Well Mikrotiterplatten bei 37 °C inkubiert. Nach Bestimmung der Gesamtzell im Spectra Fluor ($\lambda_{\text{Exzitation}} = 485 \text{ nm}/\lambda_{\text{Emission}} = 530 \text{ nm}$) wurden nicht anhaftende Zellen durch Zentrifugation entfernt und die Fluoreszenzmessung wiederholt. Nachfolgend wurde die Anzahl adhärenter Zellen auf die totale Zellzahl bezogen. Jeder Ansatz wurde als 20-fach Bestimmung durchgeführt.

2.2.6.4 Aggregationstest (Zell-Zell-Adhäsion)

$5 \times 10^5 - 7,5 \times 10^5$ SW480-Transfektanten wurden in 1 mL farblosem DMEM resuspendiert, in eine 3mL-Tropfpipette aufgenommen und 2 h unter permanentem Schütteln (90 rpm) bei Raumtemperatur gehalten. Die Durchführung erfolgte in Duplikatansätzen. Anschließend wurden größere und kleinere Zellaggregate von Einzelzellen über Nylonfilter mit Porendurchmessern von 40 μm bzw. 10 μm in einer speziellen Saugapparatur separiert. Durch ihre Eigenschaft sich zu verformen können Einzelzellen noch den 10 μm -Filter passieren (Kemmner et al. 1987). Die Filter wurden nach Zugabe von 100 μL 0,1 M HCl unter ständigem Schütteln für 1 h bei 95 °C inkubiert (Thermomixer). Danach wurde der Proteingehalt im Filtrat und beiden Retentatfraktionen bei einer Wellenlänge von $\lambda = 592 \text{ nm}$ nach Bradford bestimmt. Zur Beurteilung des Aggregationspotenzials wurde der Aggregationsfaktor (AF) herangezogen, dessen Berechnung durch Beziehung (3) wiedergegeben wird.

$$AF = \frac{4 \times \text{Proteingehalt}_{40 \mu\text{m-Fraktion}} + 2 \times \text{Proteingehalt}_{10 \mu\text{m-Fraktion}}}{\text{Proteingehalt}_{\text{Filtrat}}} \quad (3)$$

2.2.6.5 Wound-Healing Assay

Zur Durchführung des Wound-Healing Assays wurden SW480-Transfektanten in 96-Well Mikrotiterplatten eingesät. Bei vollständiger Konfluenz wurde der Zellrasen mittels einer 200 μL -Pipettenspitze einmal pro Well in horizontaler Richtung verletzt. Anschließend wurde der prozentuale Wundverschluss durch Ausmessen der zellfreien Fläche in 6 verschiedenen Wells in Intervallen von 6 h über 2 d protokolliert. Hierzu wurden das Mikroskop des Laser Capture Microdissection-Geräts SL μCut und die zugehörige Software benutzt.

2.2.6.6 Caspase-Assay und Lebendzellzahl-Bestimmung

COS-7 Zellen wurden mit *REG1A*-pcDNA3.1/V5-His-TOPO transfiziert und der Überstand nach 48 h Stunden geerntet. Die Transgenexpression wurde per qPCR verifiziert. Anschließend wurden subkonfluente HT-29 Zellen mit Paclitaxel (PTX) in *REG1A*-haltigem COS-7-Überstand inkubiert und nach 48 h einem kommerziellen Caspase-Assay zugeführt. Bei den Caspasen (Cystein-Aspartat-spezifische Proteasen) 3 und 7 handelt es sich um Schlüsseffektor-Moleküle der Apoptose (Fernandes-Alnemri et al. 1996). Sie liegen zunächst als Zymogene vor und werden erst durch proteolytische Spaltung in ihre aktivierte Form überführt. Das Messprinzip des verwendeten Caspase 3/7 Assays beruht in der Nutzung eines profluorogenen Caspase 3/7-Substrats, welches nur von aktivierter Caspase 3/7 in ein fluoreszierendes und damit detektierbares Molekül umgewandelt wird. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben in einer 96-Well Mikrotiterplatte. Parallel zum Caspase-Assay wurden vitale HT-29 Zellen in 96-Well Mikrotiterplatten nach 48 h mit Trypanblau markiert und einer mikroskopischen Zählung zugeführt.

2.2.7 Allgemeine Methoden

2.2.7.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Hämatoxylin färbt die Zellkerne blau. Eosin dient hingegen der Kontrastierung und färbt das Zytoplasma rot. Kryostatschnitte wurden für 3 min in Hämatoxylin gehalten. Nach Spülen in Leitungswasser („Bläuen“) für 30 s wurde für 1 min in Eosin inkubiert und die Präparate in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert, deren Aufbau in Tab. 12 dargestellt ist. Die Eindeckung erfolgte mit Euparal. Bei Kryostatschnitten im Rahmen der qPCR-Validierungen wurde von der Färbung mit Eosin abgesehen und teilweise mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckt, wodurch die Ethanolreihe entfallen konnte.

Tab. 12: Aufsteigende Ethanolreihen im Rahmen einer Hämatoxylin-(Eosin)-Färbung für LCM und qPCR.

Inkubationszeit [min]	Färbung für Laser Capture Microdissection Ethanol [%]	Färbung für qPCR-Validierung Ethanol [%]
1	70	70
1	95	70
1	95	100
1	100	100

2.2.7.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Nukleinsäurekonzentration lässt sich durch Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm ermitteln. Dabei entspricht eine OD_{260} von 1 bei einer Schichtdicke von 1 cm einer Konzentration von 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ einzelsträngiger RNA. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} sollte für in

H₂O gelöste RNA zwischen 1,6 und 1,8 liegen. Ist das Verhältnis kleiner so besteht eine Verunreinigung durch Proteine.

2.2.7.3 Agarose-Gelelektrophorese

PCR-Produkte wurden in horizontalen Agarose-Gelen (2 %) mit 1 µg/mL Ethidiumbromid bei konstanter Spannung in TBE-Puffer voneinander separiert. Dazu wurden die Nukleinsäuren vor dem Auftragen im Verhältnis 1:6 mit Probenpuffer verdünnt. Als Längenstandard diente DNA-Molekulargewichtsmarker Marker VIII. Die Auswertung der Gele erfolgte mittels UV-Transilluminator (312 nm).

2.2.7.4 Zellkultivierung

Für die kontinuierliche Kultur wurden die verwendeten Karzinomzelllinien bei 37 °C und 5 % CO₂ in Zellkulturflaschen mit einer Bodenfläche von 75 oder 175 cm² gehalten und nach 4 – 10 d in einem maximalen Verhältnis von 1:10 passagiert. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit Akkutase oder Trypsin abgelöst, in DMEM 10 % FCS resuspendiert und in neue Kulturgefäße überführt. Nach Ausbildung eines konfluenten Zellrasens wurde der Serumgehalt im Medium auf 1 % FCS reduziert.

3 Ergebnisse

Obwohl die Überlebensaussichten von kolorektalen Karzinompatienten mit niedrigem Staging (N0 M0) im Allgemeinen günstig sind, verstirbt dennoch ein Teil dieser Patienten tumorbedingt. Deshalb sollten in der vorliegenden Arbeit Gene identifiziert werden, deren Expressionsniveau bereits im frühen Krankheitsstadium eine Vorhersage des weiteren klinischen Verlaufs erlaubt. Hierzu wurden Tumorresektate von jeweils 5 früh diagnostizierten Kolonkarzinompatienten mit ungünstigem (High Risk) und günstigem klinischen Ausgang (Low Risk) sowie Kolonbiopsien von 5 Individuen ohne pathologischen Befund (Healthy) per GeneChip untersucht. Die High Risk-Patienten zeigten im Gegensatz zur Low Risk-Gruppe Rezidivierung oder metachrone Metastasierung mit Todesfolge. Anschließend wurden potenziell prognoserelevante Transkripte durch bioinformatischen Vergleich der aufgezeichneten Expressionsprofile identifiziert und *in silico* auf ihre Vorhersagekraft getestet. 10 mutmaßliche Markergene wurden per qPCR an einem neuen, bis zu 75 Patienten umfassenden, Kollektiv validiert. Zwei besonders vielversprechend erscheinende Gene, *Regenerating Islet-Derived 1 Alpha (REG1A)* und *Claudin 8 (CLDN8)*, wurden auch mittels Tissue Microarray basierter *in situ*-Hybridisierung sowie über funktionelle Assays eingehender untersucht.

3.1 Microarray-Expressionsanalysen an früh diagnostizierten Kolonkarzinompatienten und Kontrollindividuen

Die Genexpression in Kolonkarzinomen aus Patienten mit initial niedrigem Staging bzw. in gesunder kolorektaler Mukosa aus Kontrollindividuen wurde mithilfe von DNA-Chips der kompletten U95'er Serie (U95A, B, C, D und E) global erfasst. Das untersuchte Material war dabei über LCM gewebespezifisch angereichert. Die Analyse der gemessenen Signale erfolgte über das Programm GeneSpring.

3.1.1 Extraktion von Transkripten mit differenzieller Expression in verschiedenen Patientengruppen

Bei der bioinformatischen Auswertung der Microarray-Daten wurden Transkripte dann als potenziell prognoserelevant erachtet, wenn sich ihr Expressionsniveau in zwei verschiedenen Patientengruppen mindestens um einen Faktor von 4 unterschied, sich die Signalschwankung zwischen Replikatmessungen auf nicht mehr als 40 % belief sowie der Detection p-value im überexprimierten Zustand in 50 % der Fälle 0,04 oder weniger betrug. Diese Vorgehensweise

ist der Golub-Methode (Golub et al. 1999) angelehnt. Hiernach gelten Gene mit großen Expressionsdifferenzen zwischen verschiedenen Zuständen und kleinen Expressionschwankungen innerhalb einer Kondition als beste Diskriminatoren. Pro Microarray-Typ (U95A, B, C, D oder E) erfolgte eine Extraktion in 4 verschiedene Listen, sodass im Ganzen 20 Genlisten erstellt wurden. Dabei wurden hinsichtlich des Fold Change folgende 4 Bedingungen gestellt:

1. $\text{Fold Change}_{\text{High Risk/Low Risk}} \geq 4$ (Genliste „High Risk up“),
2. $\text{Fold Change}_{\text{High Risk/Low Risk}} \leq 0,25$ (Genliste „High Risk down“),
3. $\text{Fold Change}_{\text{Tumor/Healthy}} \geq 4$ (Genliste „Tumor up“) bzw.
4. $\text{Fold Change}_{\text{Tumor/Healthy}} \leq 0,25$ (Genliste „Tumor down“).

Diesen Kriterien genügten insgesamt 516 Transkripte bzw. 525 Probe Sets. Die im Vergleich zu den Probe Sets verminderte Anzahl von Transkripten hat zwei unterschiedliche Ursachen:

- (A) 6 Transkripte waren doppelt, d.h. durch 2 verschiedene Probe Sets repräsentiert.
- (B) 3 Transkripte waren Bestandteil von 2 verschiedenen Genlisten.

Der Umfang der einzelnen Listen ist aus Abb. 2 ersichtlich. Die Genlisten selbst befinden sich im Appendix (Appendix-Tab. 3, Appendix-Tab. 4, Appendix-Tab. 5 und Appendix-Tab. 6).

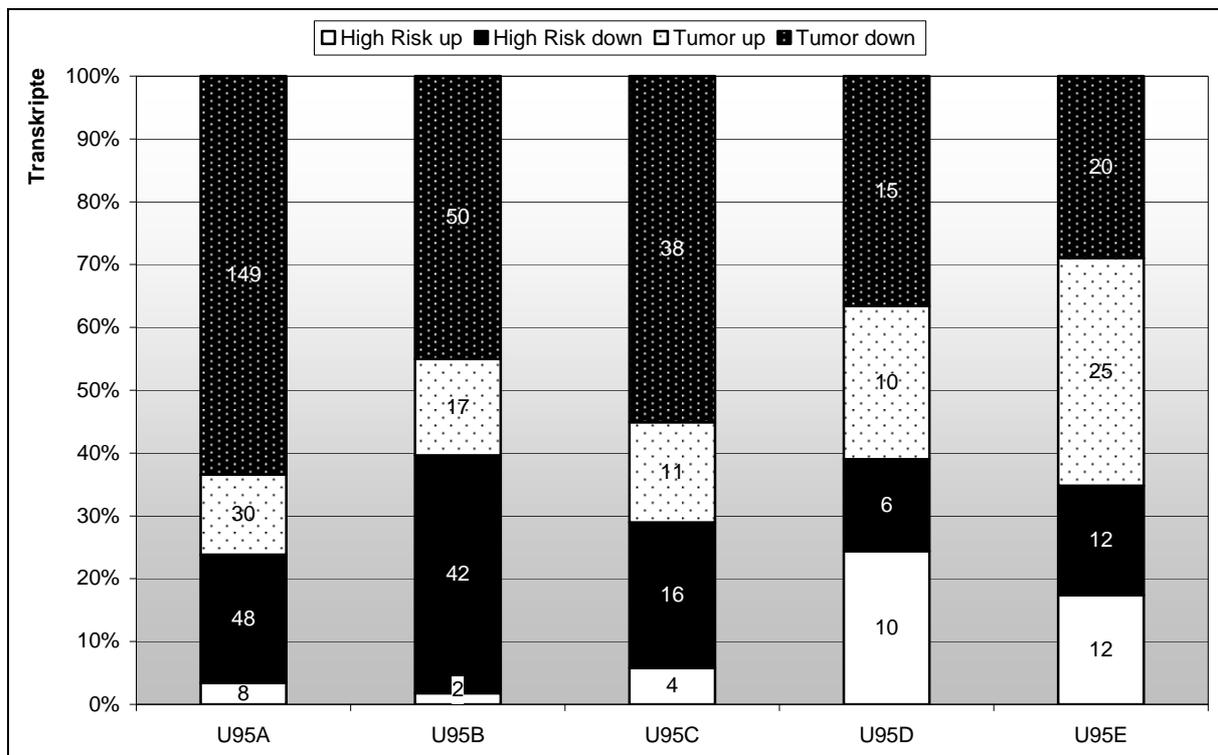


Abb. 2: Probe Set-Anzahl in den 20 erstellten Genlisten (Fold Change ≥ 4 zwischen zwei Patientengruppen).

Die Fold Change-Werte aller 10 in Abschnitt 3.2 per qPCR validierten Transkripte sind aus Tab. 13 zu entnehmen. Es handelt sich dabei um 4 Gene aus den 20 erstellten Listen sowie 6 außerhalb selektierte Transkripte. Unter letzteren befanden sich auch 2 Expressed Sequence

Tags (ESTs) mit einer fehlenden Zuordnung zu bekannten Genen. Da *CLDN8* doppelt auf dem GeneChip U95A repräsentiert ist (Probe Set IDs 33610_at/33611_g_at), ist dieses Gen zweimal in Tab. 13 vertreten. Tab. 14 gibt die Klassifizierung der 8 Gene aus Tab. 13 basierend auf Informationen des Gene Ontology-Projekts (Ashburner et al. 2000) wieder. Hierbei sind stets nur die untersten Hierarchieebenen aufgeführt.

Tab. 13: Expressionsänderungen Tumor/Healthy und High Risk/Low Risk der 10 im Weiteren per qPCR untersuchten Transkripte.

Gensymbol	GenBank	Liste ¹	Tumor/Healthy		High/Low		Genname
			Trend	FC ²	Trend	FC ²	
<i>AQP8</i>	AB013456	X	↓	0,02	↓	0,49	<i>Aquaporin 8</i>
<i>CCR3</i>	U28694	X	↑	1,73	↑	5,90	<i>Chemokine (C-C Motif) Receptor 3</i>
<i>CLDN8</i>	AL049977	X	↓	0,04	↓	0,98	<i>Claudin 8</i>
<i>CLDN8</i>	AL049977	X	↓	0,04	↓	0,55	<i>Claudin 8</i>
EST	AI247408		↑	10,53	↑	3,92	
EST	AI870708		↑	31,83	↑	3,45	
<i>ITGA6</i>	AI056776		↑	8,82	↑	1,78	<i>Integrin, Alpha 6</i>
<i>RAB27B</i>	U57093	X	↑	5,33	↑	10,45	<i>RAB27B, Member RAS Oncogene Family</i>
<i>REG1A</i>	C06075		↑	36,26	↑	3,26	<i>Regenerating Islet-Derived 1 Alpha</i>
<i>SERPINE2</i>	AI743134		↑	4,35	↑	2,30	<i>Serine (or Cysteine) Proteinase Inhibitor, Clade E, Member 2</i>
<i>TMEPAI</i>	AA535819		↑	4,20	↑	3,19	<i>Transmembrane, Prostate Androgen Induced RNA</i>

Erklärung:

¹ X = Gen ist in 20 Listen enthalten

² Fold Change

Tab. 14: Klassifikation der 8 per qPCR analysierten Gene nach Informationen aus der Gene Ontology-Datenbank.

Gensymbol	Biologischer Prozess	Molekulare Funktion	Zellulärer Bestandteil
<i>AQP8</i>	H ₂ O-Transport	H ₂ O-Kanal	membrandurchdringend
<i>CCR3</i>	Chemotaxis, zelluläre Abwehrreaktion, Zelladhäsion, G-protein Signaling, positive Regulation der zytoplasmatischen Ca ²⁺ -Ionen-Konz.	C-C Motiv-Chemokinrezeptor	membrandurchdringend
<i>CLDN8</i>	Ca ²⁺ -unabhängige Zell-Zell-adhäsion	Strukturmolekül, proteinbindend	membrandurchdringend, Tight Junction
<i>ITGA6</i>	Zell-Substrat-Junction Assembly, Zell-Matrix-Adhäsion, Integrin-vermittelter Signalweg	Rezeptor, proteinbindend	Integrin-Komplex

Gensymbol	Biologischer Prozess	Molekulare Funktion	Zellulärer Bestandteil
<i>RAB27B</i>	kleine GTPasen-vermittelte Signaltransduktion	GTP-bindend, GTPase	–
<i>REG1A</i>	positive Regulation der Zellproliferation	zuckerbindend	–
<i>SERPINE2</i>	Neurogenese, Zelldifferenzierung, Regulation von Proteo- und Peptidolyse, Regulation der Zellmigration	Endopeptidase-Inhibitor (Serin-Typ), heparinbindend	extrazellulär
<i>TMEPAI</i>	Androgen-Rezeptor-Signalweg	–	membrandurchdringend

3.1.2 Bioinformatische Validierung der extrahierten putativen Markergene über Experiment-Dendrogramme

Bei der Erstellung von Experiment-Dendrogrammen (Konditions-Baumdiagramme) erfolgt die Anordnung der gemessenen Proben (hier: Healthy, Low Risk und High Risk) anhand der Expression einer Auswahl von Transkripten (Genlisten) zu einer baumartigen Struktur. Hierbei werden die Proben nach der Ähnlichkeit ihrer Expressionssignaturen zueinander gruppiert („geclustert“). Dabei sollten Messungen des gleichen Zustands näher zusammen fallen als jene unterschiedlicher Proben.

Zur *in silico*-Validierung der in Abschnitt 3.1.1 erstellten Listen wurde für jeden Microarray-Typ (U95A, B, C, D und E) anhand der 4 zugehörigen Genlisten jeweils ein Konditions-Baumdiagramm erzeugt. Dabei zeigt die horizontale Entfernung zu einem grünen Knotenpunkt an, wie stark die über diesen Knoten verbundenen Messungen miteinander korrelieren. Je kleiner die Distanz, desto größer die Korrelation. Jede Spalte der vertikal angeordneten farbigen Balken stellt die Expression eines Transkripts über alle durchgeführten Messungen hinweg dar. Rot steht für starke, gelb für intermediäre und blau für schwache Genexpression. Aus Abb. 3 ist ersichtlich, dass anhand der 4 für U95A erstellten Listen eine richtige Zuordnung der verschiedenen Replikate erfolgt. Während der obere Hauptast nur Healthy-Proben beinhaltet, führt der untere ausschließlich zu Tumorproben. Außerdem ist innerhalb der Tumorproben eine ordnungsgemäße Diskriminierung zwischen Low Risk und High Risk gegeben. Analoge Zuordnungen waren auch mithilfe der für U95B (Abb. 4), C (Abb. 5), D (Abb. 6) und E (Abb. 7) extrahierten Transkripte möglich.

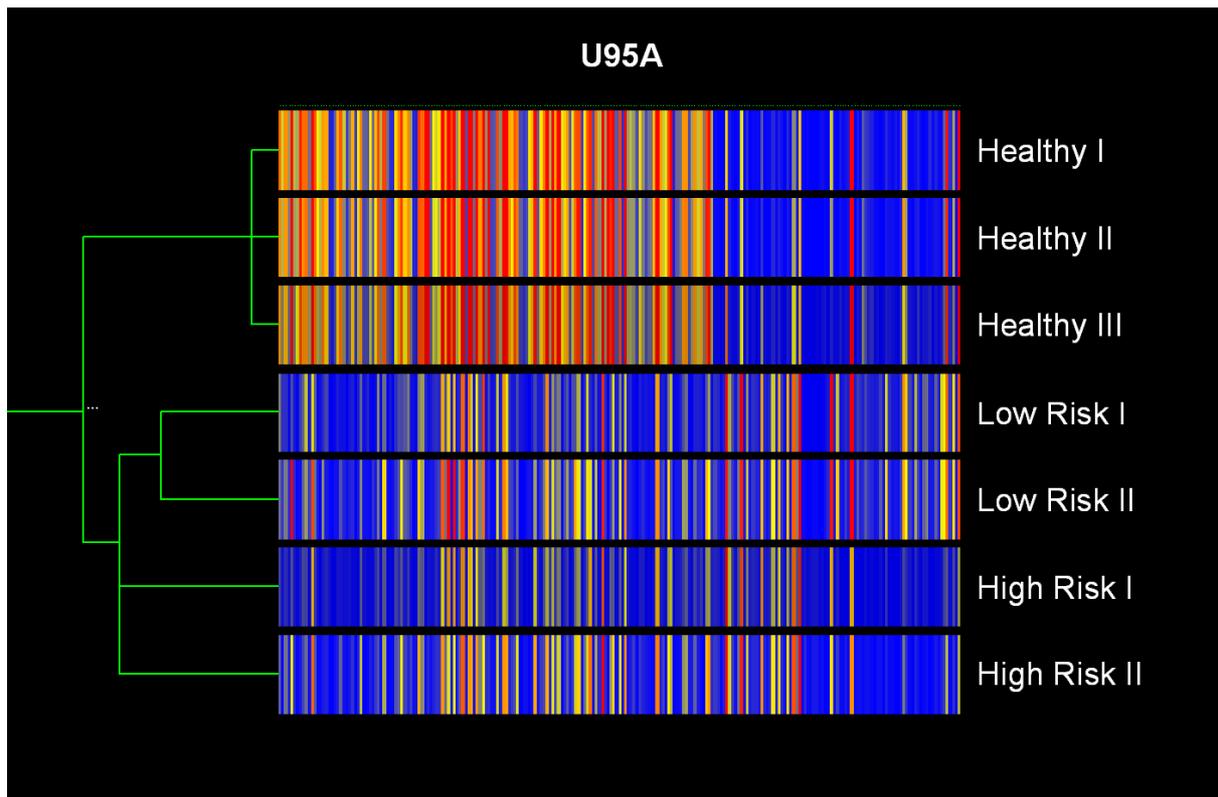


Abb. 3: Konditions-Baumdiagramm basierend auf den 4 für den GeneChip U95A erstellten Genlisten.

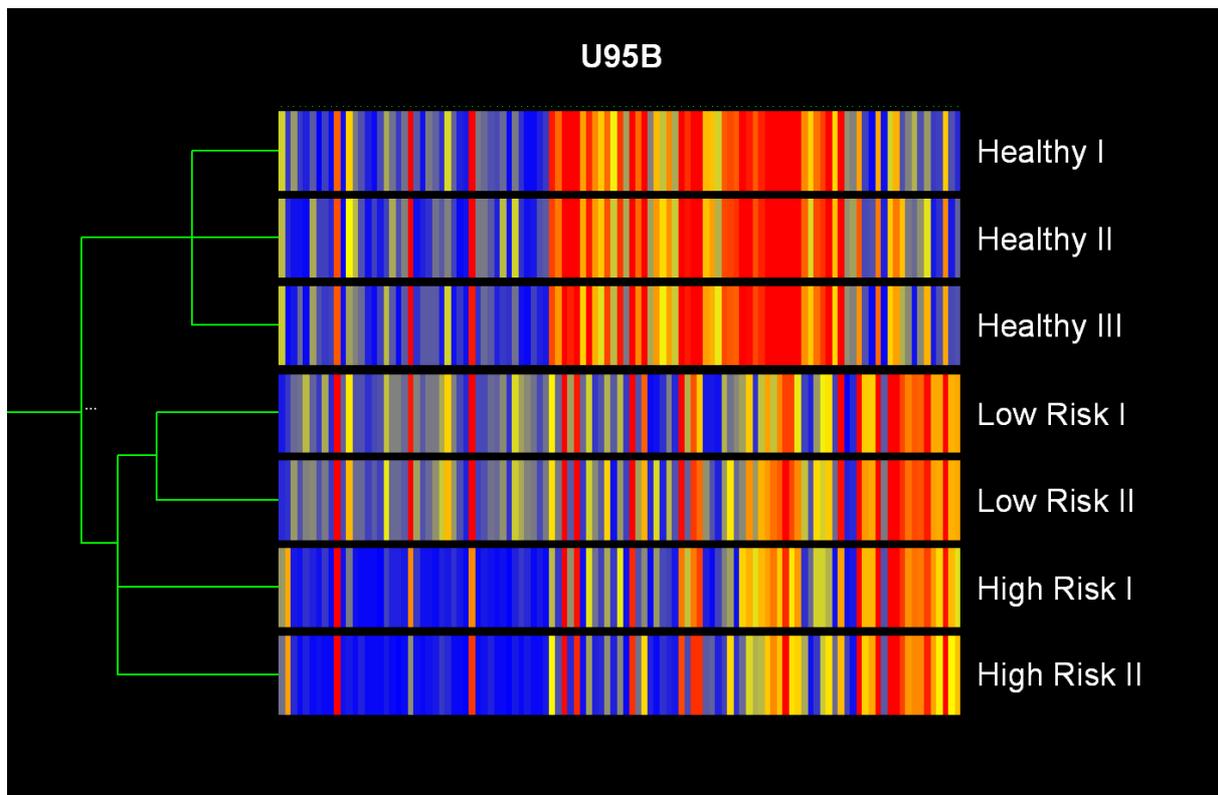


Abb. 4: Konditions-Baumdiagramm basierend auf den 4 für den GeneChip U95B erstellten Genlisten.

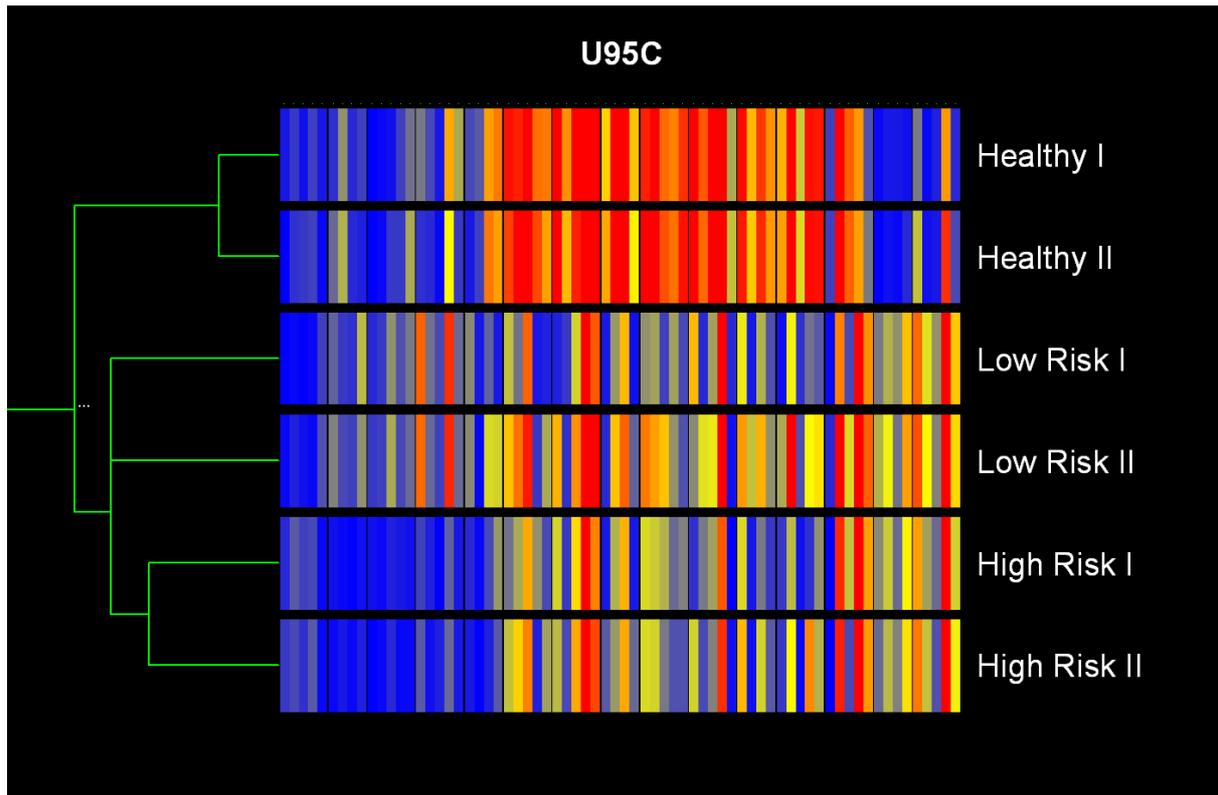


Abb. 5: Konditions-Baumdiagramm basierend auf den 4 für den GeneChip U95C erstellten Genlisten.

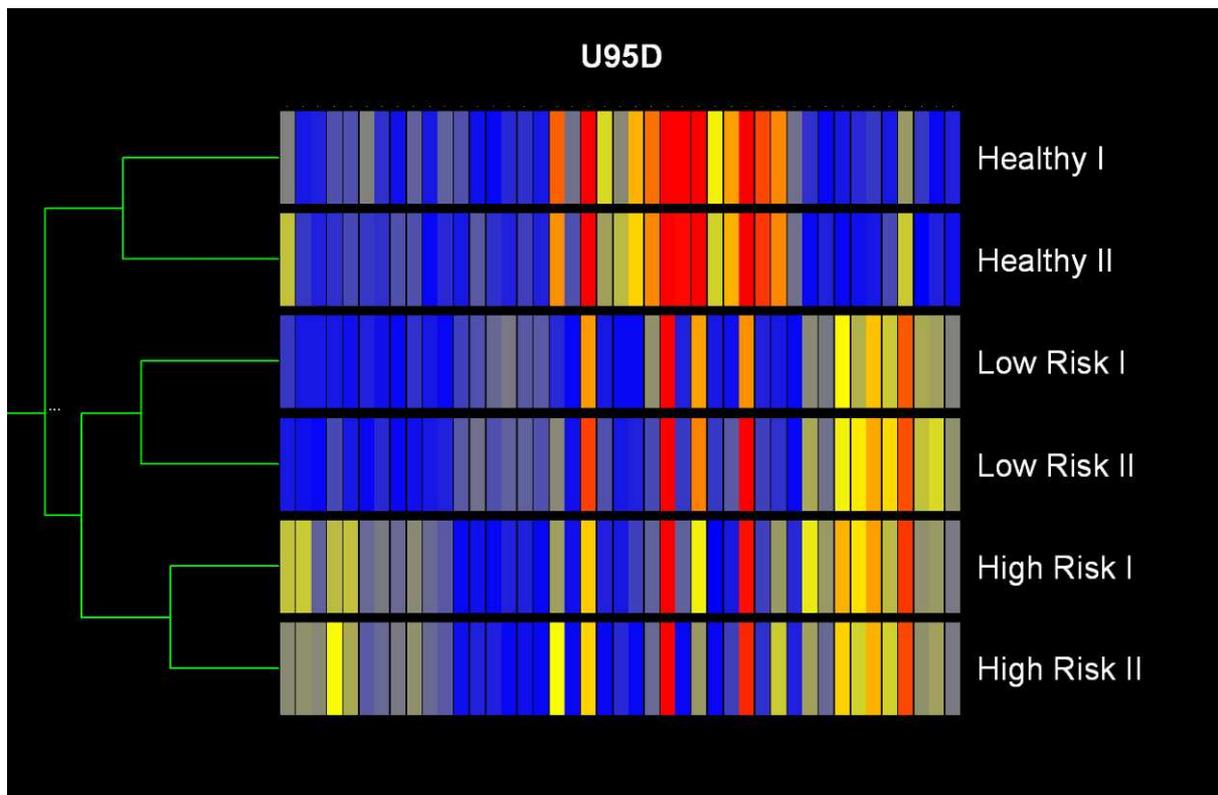


Abb. 6: Konditions-Baumdiagramm basierend auf den 4 für den GeneChip U95D erstellten Genlisten.

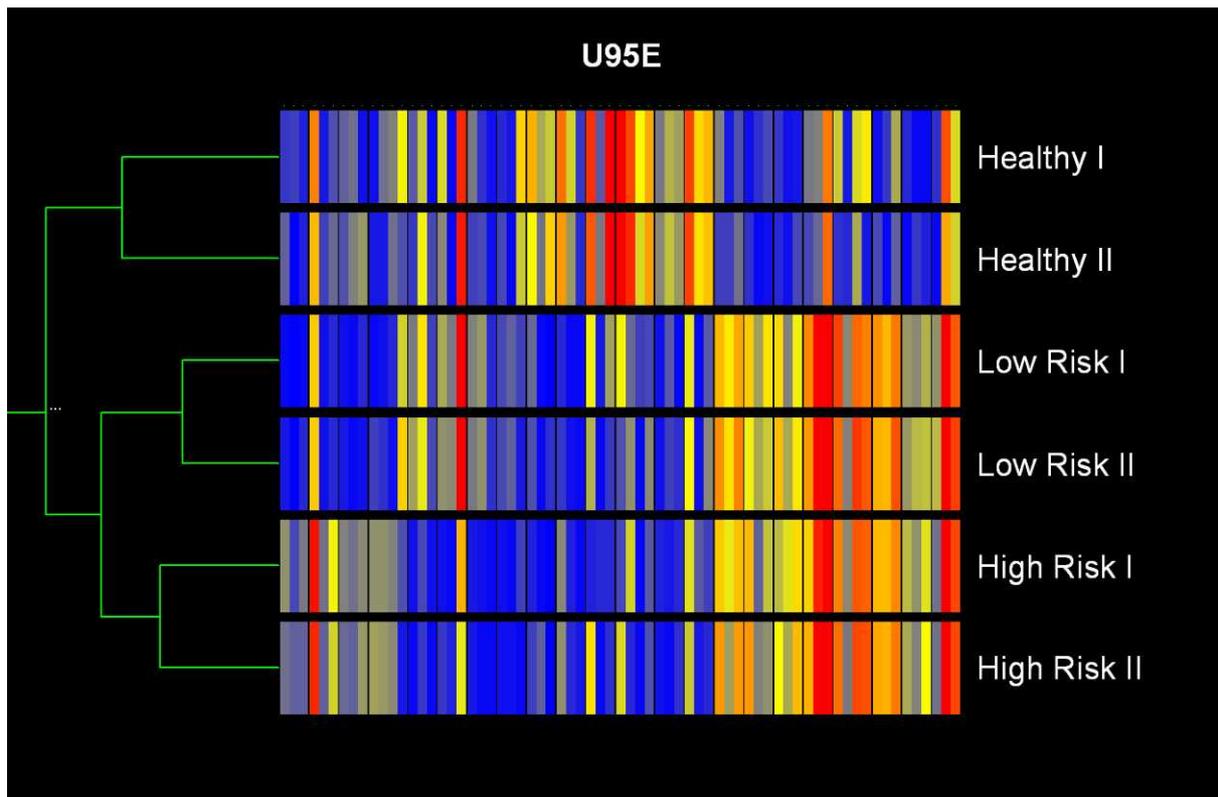


Abb. 7: Konditions-Baumdiagramm basierend auf den 4 für den GeneChip U95E erstellten Genlisten.

3.1.3 Expression allgemein bekannter im Kolonkarzinom deregulierter Gene

Neben den 20 Genlisten wurde eine Liste von 39 allgemeinen Faktoren, deren Deregulation im Kolonkarzinom bereits in der Literatur beschrieben ist, zusammengestellt (Appendix-Tab. 7). Es handelt sich hierbei um Gene, wie z.B. *p53* oder *DCC*, deren prognostische Relevanz nicht abschließend geklärt ist (Graziano und Cascinu 2003).

Durch Bestimmung der Schnittmengen dieser allgemeinen Faktoren mit den 20 Genlisten, sollte zunächst überprüft werden, wie viele der putativen Markergene bereits allgemein bekannte im Kolonkarzinom deregulierte Moleküle darstellen. Wie im Venn-Diagramm in Abb. 8 gezeigt, war dies lediglich für 4 Transkripte der Fall. Die Fold Change-Werte für diese 4 Gene sind in Tab. 15 gezeigt.

Im Weiteren wurden Experiment-Dendrogramme beruhend auf den Expressionsprofilen der 39 allgemeinen Faktoren erstellt. Im Gegensatz zu den 20 Genlisten aus Abschnitt 3.1.1 ermöglichte dies für keinen der 5 GeneChip-Typen eine vollständige Diskriminierung zwischen den verschiedenen Replikaten (Healthy, Low Risk und High Risk) oder führte sogar zu falschen Anordnungen. Die entsprechenden Baumdiagramme befinden sich im Appendix (Appendix-Abb. 1, Appendix-Abb. 2, Appendix-Abb. 3, Appendix-Abb. 4 und Appendix-Abb. 5).

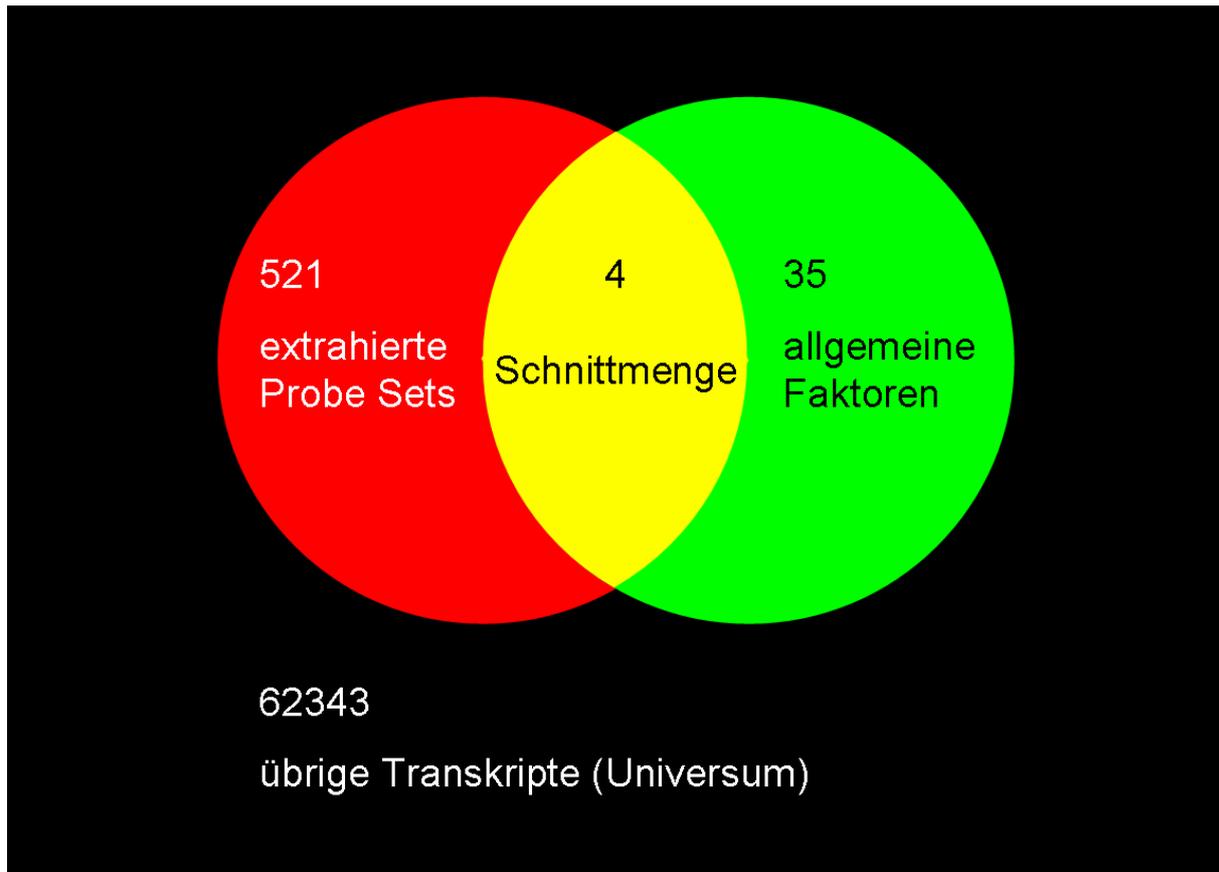


Abb. 8: Schnittmengendarstellung zwischen den in dieser Arbeit generierten Listen putativer Markergene (525 Probe Sets) und 39 allgemein bekannten im Kolonkarzinom deregulierten Faktoren.

Tab. 15: Expressionsänderungen extrahierter putativer Markergene mit allgemein bekannter Deregulation im Kolonkarzinom.

Gen	GenBank	Tumor/Healthy		High/Low		Genname
		Trend	FC ¹	Trend	FC ¹	
<i>CDH1</i>	L08599	↓	0,17	↑	1,66	<i>Cadherin 1</i>
<i>MATN2</i>	U69263	↑	1,10	↑	7,01	<i>Matrilin 2</i>
<i>MKI67</i>	X65550	↑	4,39	↓	0,80	<i>Antigen Ki-67</i>
<i>CEACAM1</i>	X16354	↓	0,17	↑	1,58	<i>Carcinoembryonic-related Cell Adhesion Molecule 1</i>

Erklärung:

¹ Fold Change

3.2 Validierung der Microarray-Daten durch quantitative Real-Time PCR

Es wurden 4 putative Markergene aus den 20 erstellten Listen und 6 weitere, nach modifizierten Kriterien ausgewählte, Transkripte per qPCR validiert. Dabei wurde die Expression der besonders interessant erscheinenden Gene *CLDN8*, *REGIA* sowie *CCR3* besonders umfassend untersucht. Die den folgenden Berechnungen und Diagrammen

zugrunde liegenden Werte aus der qPCR befinden sich in Appendix-Tab. 8, Appendix-Tab. 9 und Appendix-Tab. 10).

3.2.1 *Claudin 8 (CLDN8)*

3.2.1.1 Primärtumoren und Normalgewebe

Wie aus Abb. 9 zu ersehen, bestätigte die qPCR die in den DNA-Chip-Experimenten detektierte prominente Unterexpression von *CLDN8* im Tumorgewebe ($p = 1,75 \times 10^{-13}$, Mann-Whitney Test). Dies galt auch für den Vergleich von ausschließlich korrespondierenden Karzinom- und Normalgewebeproben ($p < 0,001$, Wilcoxon Test). Daneben zeigte sich die *CLDN8*-Expression signifikant abhängig vom Anteil maligner Zellen im Tumorpräparat ($p < 0,01$, Mann-Whitney Test). Eine besonders niedrige Expression von *CLDN8* ging mit einem besonders hohen Tumorzellanteil im Karzinompräparat einher (Abb. 10). Des Weiteren wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem *CLDN8*-Niveau im (das Karzinom umgebenden) Normalgewebe und der Tumorlokalisation detektiert (Abb. 11). Dabei zeigte sich *CLDN8* im Kolon bezogen auf sigmoidale ($p < 0,001$, Mann-Whitney Test) und rektale Gewebeproben ($p < 0,01$, Mann-Whitney Test) signifikant schwächer exprimiert. Im Tumormaterial selbst manifestierte sich hingegen lediglich ein nicht signifikanter Trend mit maximaler *CLDN8*-Expression im Rektum. Durch Erhöhung des bei der statistischen Analyse akzeptierten Mindestanteils epithelialer Zellen konnten im Fall von Normalgewebe die Überlappungsbereiche der Whisker in Abb. 11 stark reduziert werden. Infolge stellte sich auch der Expressionsunterschied zwischen Sigmoideum und Rektum signifikant dar (Mindestanteil epithelialer Zellen = 60 %). Für Tumormaterial ließen sich auch bei dieser Vorgehensweise keine Signifikanzen errechnen. Korrelationen mit dem Patientenüberleben und klinischen Parametern ergaben sich mit Ausnahme der Lymphgefäßinvasion L nicht. Im Normalgewebe (nicht jedoch im Tumor) stellte sich *CLDN8* in Patienten mit Tumorbefall der Lymphbahnen (L1) signifikant niedriger exprimiert dar ($p < 0,05$, Mann-Whitney Test) als in Individuen ohne Lymphgefäßinvasion (L0). Eine Abhängigkeit der *CLDN8*-Expression vom Anteil eingewanderter Leukozyten in die Gewebeproben konnte nicht attestiert werden.

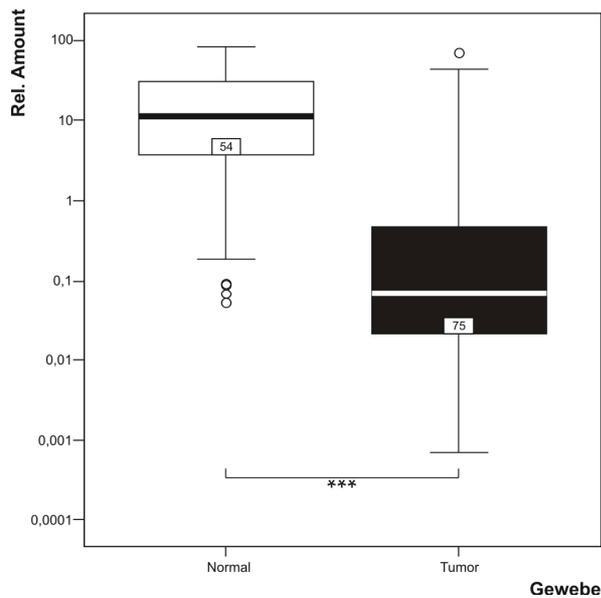


Abb. 9: *CLDN8*-Expression in Normalgewebe und Tumorproben im Taqman Assay. Die Patientenzahl ist am unteren Rand der Boxen angegeben.

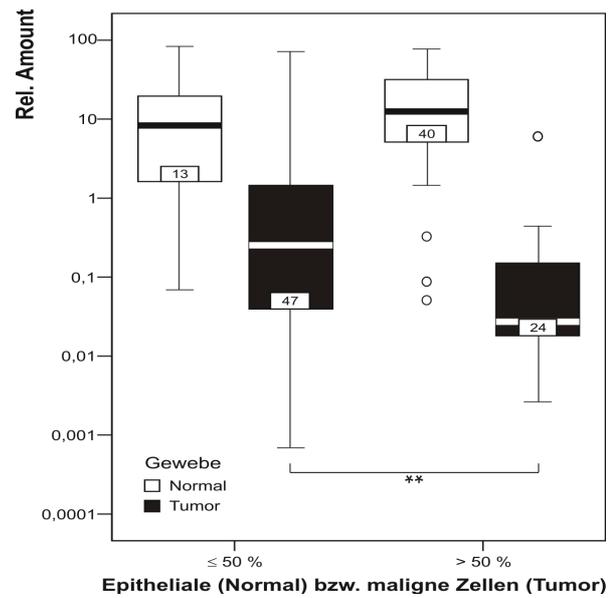


Abb. 10: *CLDN8*-Expression in Abhängigkeit vom prozentualen Anteil epithelialer (Normalgewebe) bzw. maligner Zellen (Tumorproben) am Gesamtpräparat. Die Probenzahl ist am unteren Rand der Boxen angegeben.

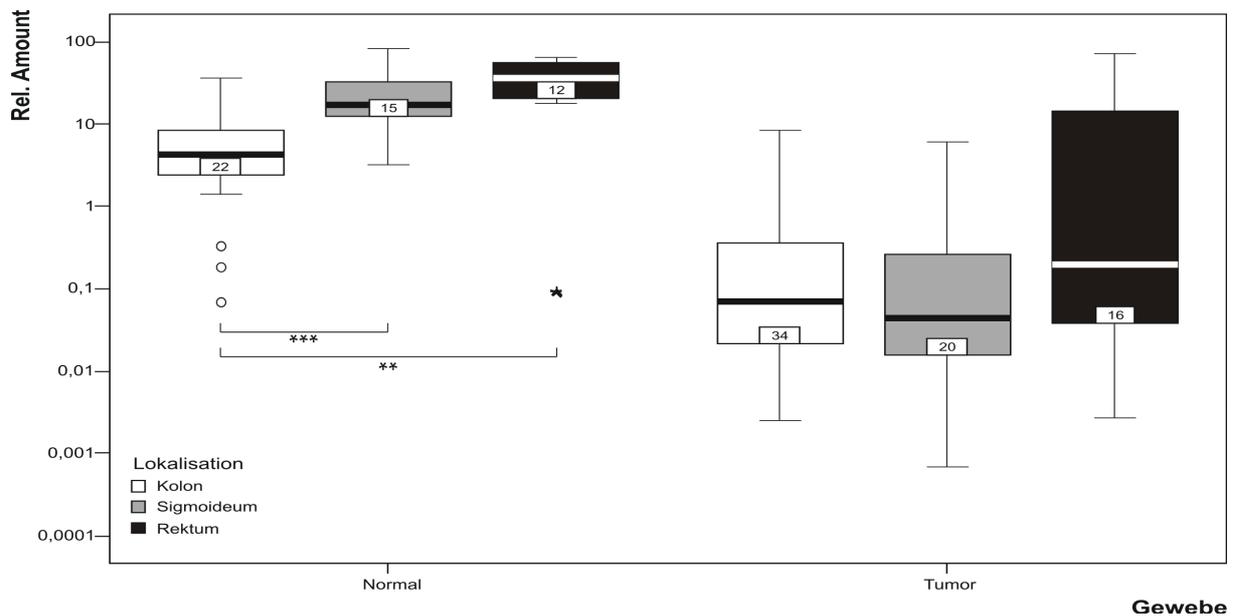


Abb. 11: *CLDN8*-Expression in Abhängigkeit von der Tumorlokalisation im Taqman Assay (ohne Fälle mit uneindeutiger Lokalisation). Die Patientenzahl ist am unteren Rand der Boxen angegeben.

3.2.1.2 Biopsiematerial

Neben der Untersuchung von chirurgisch gewonnenen Resektaten erfolgte auch die Analyse von endoskopisch abgetragenem Tumormaterial sowie gesunden kolorektalen Gewebe ohne CED (entspricht Healthy bei den GeneChip-Experimenten). Wie in Abb. 12 dargestellt,

konnte bereits in Normalgewebe (chirurgische Resektate) eine signifikante Unterexpression von *CLDN8* bezüglich gesunder Kolonmukosa (Biopsiematerial) demonstriert werden ($p < 0,001$, Mann-Whitney Test). Daneben zeigten operativ resezierte Karzinomproben ein signifikant geringeres *CLDN8*-Niveau als Tumorbiopate ($p < 0,01$, Mann-Whitney Test). Der signifikante Expressionsunterschied zwischen gesundem Darmepithel und karzinomatösen Biopsieproben blieb selbst bei Beschränkung auf frühe Tumorstadien ohne Lymphknoten- und Fernmetastasierung (N0 M0) bestehen ($p < 0,001$, Mann-Whitney Test, (Abb. 13)).

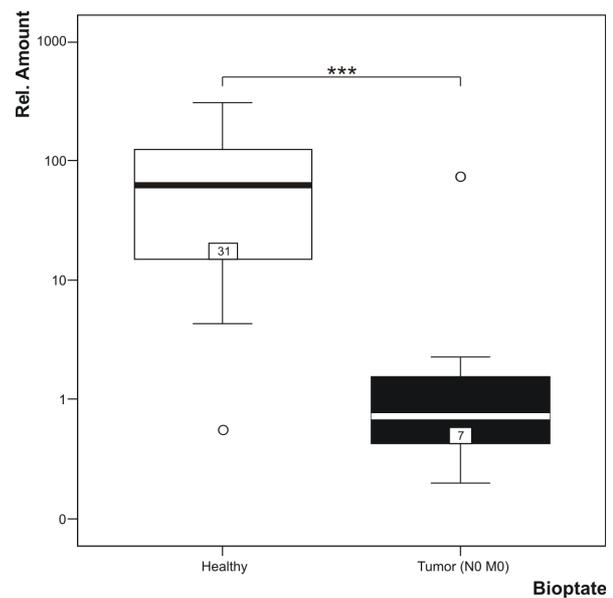
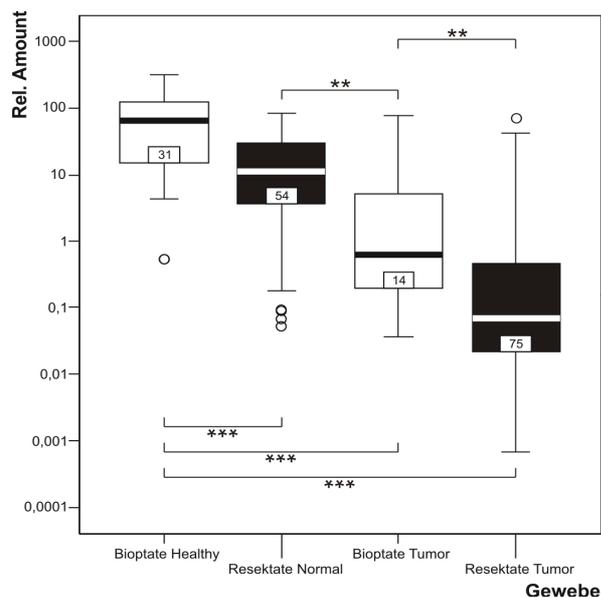


Abb. 12: *CLDN8*-Expression in Biopsieproben von gesundem kolorektalem Gewebe (entspr. Healthy) und Tumoren sowie in chirurgischen Resektaten kolorektaler Karzinome und umgebendem Normalgewebe im Taqman Assay. Die Patientenzahl ist am unteren Rand der Boxen angegeben.

Abb. 13: *CLDN8*-Expression in Biopsieproben von gesunder Darmmukosa (Healthy) sowie Karzinomen ohne Lymphknoten- und Fernmetastasierung (N0 M0) im Taqman Assay. Die Patientenzahl ist am unteren Rand der Boxen angegeben.

3.2.2 Regenerating Islet-Derived 1 Alpha (REG1A)

3.2.2.1 Primärtumoren

Es zeigte sich eine signifikante Beziehung zwischen der Expression von *REG1A* und dem Auftreten von Peritonealmetastasen sowie der Tumorlokalisation (Tab. 16). Patienten mit Peritonealmetastasen zeigten eine signifikant gesteigerte Expression von *REG1A* im Primärtumor, wie exemplarisch in Abb. 14 für den 1. Taqman-Lauf dargestellt ist ($p < 0,01$, Mann-Whitney Test). Bei allgemeiner Fernmetastasierung (mit nicht näher spezifiziertem Ort) offenbarte sich eine Tendenz der Überexpression, welche lediglich in der SYBR-Green PCR

signifikant war (Tab. 16). Wie exemplarisch für den 1. Taqman-Lauf in Abb. 15 wiedergegeben, wurde *REGIA* im Sigmoideum signifikant schwächer exprimiert als in Kolon ($p < 0,01$, Mann-Whitney Test) und Rektum ($p < 0,05$, Mann-Whitney Test). Darüber hinaus ergab sich ein signifikanter Einfluss der *REGIA*-Expression auf das Patientenüberleben (Tab. 16). Für die Kaplan-Meier Analyse wurde die Patientenkohorte anhand der Expressionsstärke in zwei verschiedene Gruppen unterteilt. Individuen mit starker Expression von *REGIA* besaßen eine signifikant geringere Wahrscheinlichkeit für ein progressionsfreies Überleben als Patienten mit schwacher Genexpression. Für das Gesamtüberleben erwies sich die *REGIA*-Expresion lediglich innerhalb der SYBR-Green PCR, für das Tumor-abhängige und progressionsfreie Überleben jedoch auch in beiden Taqman-Läufen als signifikanter Prädiktor. Die Kaplan-Meier Kurven für das Tumor-abhängige ($p < 0,05$, Log-Rank Test) und progressionsfreie Überleben ($p < 0,05$, Log-Rank Test) sind exemplarisch für den 1. Taqman-Lauf in Abb. 16 bzw. Abb. 17 dargestellt. Beim Tumor-abhängigen Überleben ist im Gegensatz zum Gesamtüberleben für jeden verstorbenen Patienten Krebs als Todesursache gesichert. Die Menge an Tumorzellen im Gewebepräparat und die Quantität eingewanderter Leukozyten beeinflussten die *REGIA*-Expression nicht wesentlich.

Tab. 16: Korrelation der *REGIA*-Tumorexpression mit wichtigen klinischen Statusgrößen (Kruskal-Wallis Test) und dem Patientenüberleben (Log-Rank Test). p-Werte < 0,05 sind grau unterlegt.

Klinischer Parameter	n ¹	%	SYBR ²		Taqman 1 ³		Taqman 2 ⁴	
			medianer Rel. Amount	p-Wert	medianer Rel. Amount	p-Wert	medianer Rel. Amount	p-Wert
Lokalisation				0,1149		0,0070		0,0388
Kolon	25	43,1	6,0489		5,4014		5,3774	
Sigmoideum	18	31,0	0,7470		0,1098		0,1111	
Rektum	15	25,9	1,2894		3,4263		0,3231	
UICC-Stadium				0,0784		0,5824		0,7311
I+II	31	49,2	0,7006		0,3276		0,3695	
III+IV	32	50,8	6,5802		3,4422		2,6961	
Tumorgröße				0,9374		0,4674		0,5557
pT1–2	9	14,3	1,2894		11,3924		9,9652	
pT3–4	54	85,7	3,6484		2,6249		0,5821	
Nodalstatus				0,0615		0,3864		0,6110
pN0	32	50,8	0,7039		0,2818		0,3540	
pN1–2	31	49,2	7,0128		3,4581		2,8486	
Fernmetastasierung				0,0320		0,4551		0,6088
M0	35	55,6	0,8253		0,4920		0,4006	
M1	28	44,4	7,9994		3,6924		3,3923	
Lebermetastasen				0,0128		0,4252		0,2714
M0 HEP	32	50,8	0,6574		0,4966		0,3695	
M1 HEP	31	49,2	7,6387		3,4581		3,5724	
Peritonealmetastasen ⁵				0,0041		0,0039		0,0060
M0 PER	54	85,7	1,2924		0,9352		0,3850	
M1 PER	9	14,3	10,4800		10,3627		9,2550	
Lungenmetastasen				0,7603		0,2421		0,2632
M0 PUL	58	92,1	3,6484		3,1295		0,9585	
M1 PUL	5	7,9	1,7573		0,1473		0,1878	
Histopathologisches Grading				0,2995		0,1007		0,2853
G1–2	46	73,0	1,5233		1,7738		0,4471	
G3	17	27,0	5,1934		5,0982		3,5724	
Lymphgefäßinvasion				0,2072		0,1425		0,3556
L0	36	59,0	1,2124		0,4966		0,4053	
L1	25	41,0	7,0128		4,0840		3,9730	
Veneninvasion				0,6641		0,3602		0,1173
V0	44	71,0	2,5636		2,8127		2,8779	
V1	18	29,0	3,0401		2,5959		0,3619	
Gesamtüberleben ⁶				0,0072		0,0780		0,1514
lebend	30	55,6	0,5183		0,4966		0,3369	
†	24	44,4	7,9994		3,6765		3,2105	
Tumor-abhängiges Überleben ⁶				0,0136		0,0100		0,0109
lebend	33	80,5	0,6142		0,4920		0,3384	
†	8	19,5	11,8150		8,7895		7,5181	
Progressionsfreies Überleben ⁶				0,0377		0,0254		0,0294
progressionsfrei	27	69,2	0,6142		0,4920		0,3384	
progredient	12	30,8	9,0418		7,3769		7,5181	

Erklärung:

¹ Fallzahl

² SYBR-Green PCR

³ 1. Taqman-Lauf

⁴ 2. Taqman-Lauf

⁵ Für den zweiten Taqman-Lauf („Taqman 2“) wurden noch 6 weitere Individuen mit peritonealer Metastasierung sowie 6 Patienten ohne Bauchfellmetastasen in die Untersuchung mit eingeschlossen (n = 75). Die asymptotische Signifikanz belief sich in diesem Fall auf **0,0309**.

⁶ alle Patienten R0-reseziert

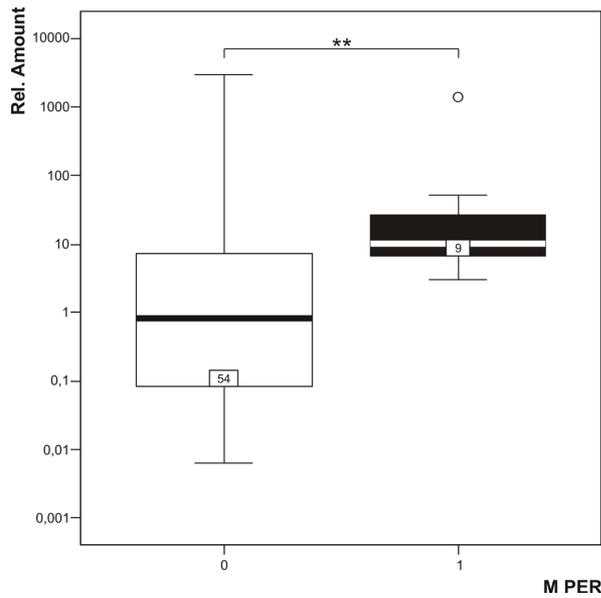


Abb. 14: *REGIA*-Expression in Primärtumoren in Abhängigkeit von der peritonealen Metastasierung (M0/1 PER) im 1. Taqman-Lauf. Die Patientenzahl ist am unteren Rand der Boxen angegeben.

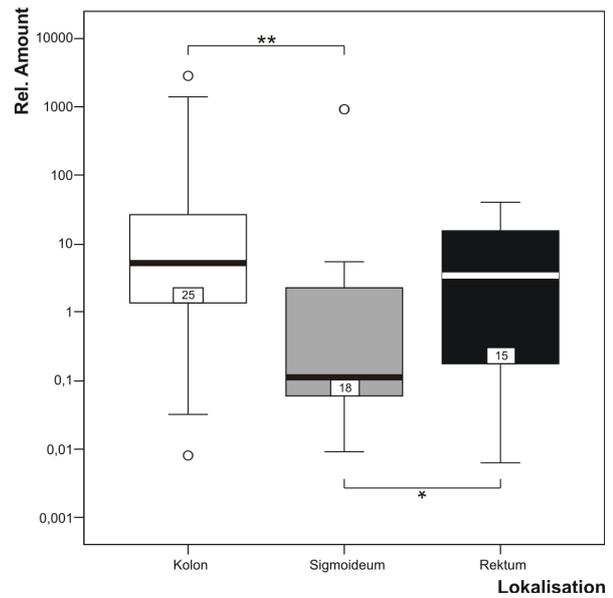


Abb. 15: *REGIA*-Expression in Abhängigkeit von der Tumorlokalisierung im 1. Taqman-Lauf (ohne Fälle mit uneindeutiger Lokalisation). Die Patientenzahl ist am unteren Rand der Boxen angegeben.

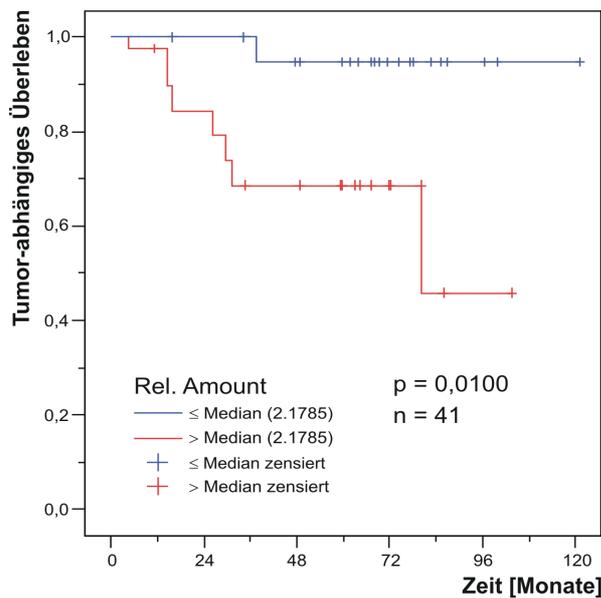


Abb. 16: Tumor-abhängiges Überleben von kolorektalen Karzinompatienten (R0) mit schwacher und starker *REGIA*-Expression im 1. Taqman-Lauf.

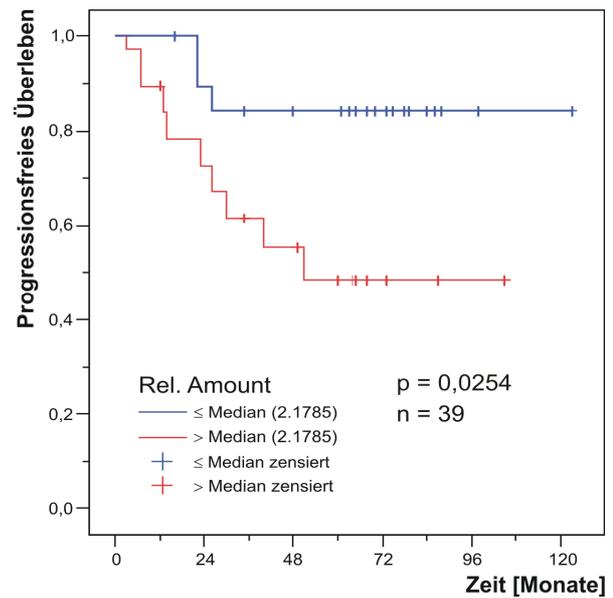


Abb. 17: Progressionsfreies Überleben von kolorektalen Karzinompatienten (R0) mit schwacher und starker *REGIA*-Expression im 1. Taqman-Lauf.

3.2.2.2 Metastasenmaterial

Wegen der signifikanten Beziehung zwischen Expression im Primärtumor und Auftreten von synchronen Peritonealmetastasen (Tab. 16, Abb. 14) wurde die Expression von *REGIA* auch in peritonealem Metastasenmaterial mittels Taqman Assay bestimmt. Da sich in der SYBR-Green PCR auch ein signifikanter Zusammenhang zwischen Genexpression und Tumorstreue in die Leber ergeben hatte (Tab. 16), wurden Lebermetastasen in die Analyse mit eingeschlossen. Überdies erfolgte die Untersuchung von Lungenmetastasen, obschon sich die *REGIA*-Expression in Primärtumoren mit pulmonaler Absiedlung nicht signifikant erhöht oder erniedrigt dargestellt hatte.

Wie aus Abb. 18 zu ersehen, lag die *REGIA*-Expression in Metastasen – unabhängig von der Lokalisation – tendenziell unter der im Primärtumor. Für Lebermetastasen war dieser Expressionsunterschied sogar signifikant ($p < 0,05$, Wilcoxon Test).

3.2.2.3 Adenome und Normalgewebe

Neben Tumormaterial wurden auch Adenom- sowie Normalgewebeproben hinsichtlich der Expression von *REGIA* via Taqman PCR untersucht. Wie aus Abb. 19 zu ersehen, ergab sich in der qPCR ein signifikanter Expressionsunterschied zwischen Tumor- und Normalgewebe ($p < 0,001$, Mann-Whitney Test), nicht jedoch zwischen Tumor- und Adenomproben. Im Vergleich zu Normalgewebe stellte sich die Expression in Adenomen jedoch ebenfalls signifikant erhöht dar ($p < 0,01$, Mann-Whitney Test). Der Trend einer erhöhten *REGIA*-Expression in metastasierten Primärtumoren (Tab. 16) im Vergleich zu nicht-metastasierten Tumorproben zeigte sich auch im den Tumor umgebenden Normalgewebe (Abb. 20).

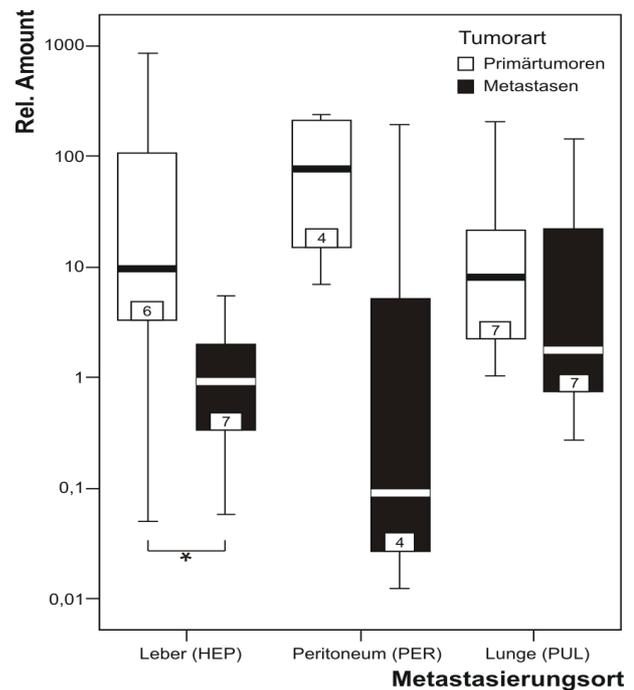


Abb. 18: *REGIA*-Expression in Primärtumoren mit hepatischer, peritonealer oder pulmonaler Aussaat sowie in den zugehörigen Metastasen im Taqman Assay. Die Probenzahl ist am unteren Rand der Boxen angegeben.

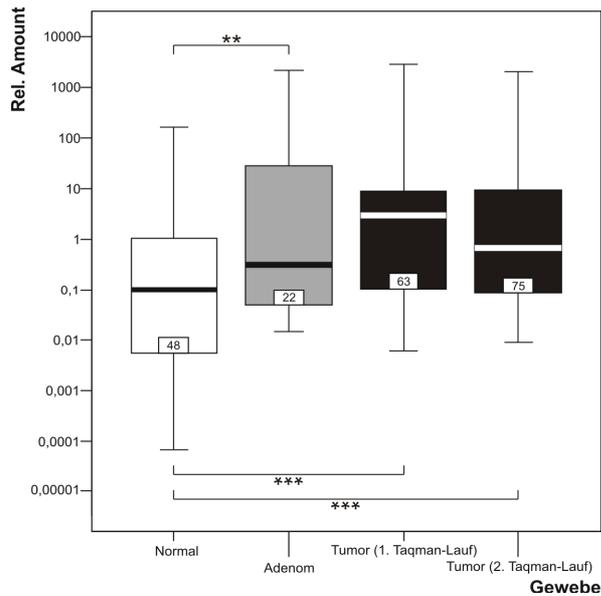


Abb. 19: Vergleich der *REGIA*-Expression in Normal-, Adenom-, und Tumorgewebe im Taqman Assay. Die Patientenzahl ist am unteren Rand der Boxen angegeben.

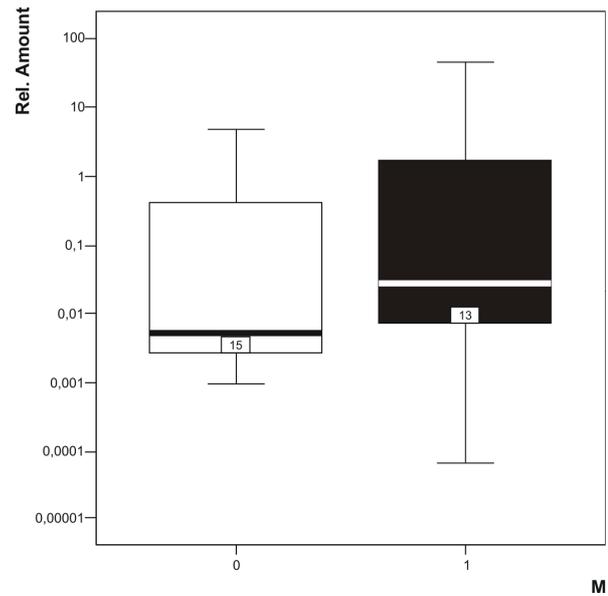


Abb. 20: *REGIA*-Expression in Normalgewebeproben in Abhängigkeit vom Metastasierungsstatus des angrenzenden Primärtumors im Taqman Assay. In 22 Fällen war keine Zuordnung (M0/1) möglich, da die entsprechenden Normalgewebe aus der Nachbarschaft von Adenomen und nicht Karzinomen stammten.

3.2.2.4 Biopate von kolorektalen Karzinomen und gesundem kolorektalen Gewebe

Neben operativ resezierten Präparaten erfolgte auch eine Untersuchung von endoskopisch gewonnenen Proben von gesundem (entspricht Healthy bei den DNA-Chip-Versuchen) und karzinomatösem kolorektalen Gewebe. Hierbei war das gesunde Darmepithel von besonderem Interesse, da für eine umfassende Validierung der Microarray-Daten idealerweise kein den Tumor umgebendes Normalgewebe verwendet werden sollte. Die Proben gesunder Darmmukosa stammten ausnahmslos von Patienten ohne CED. Wie aus Abb. 21 ersichtlich, konnte die im Vergleich zu Tumorproben sehr schwache *REGIA*-Expression in gesundem Darmepithel im

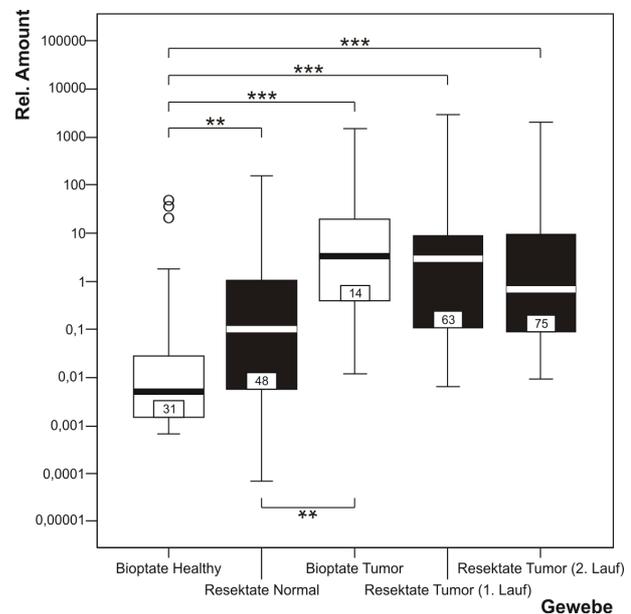


Abb. 21: *REGIA*-Expression in Biopaten von gesundem (entspr. Healthy) und karzinomatösem kolorektalen Gewebe sowie in chirurgischen Tumor-Resektaten sowie umgebendem Normalgewebe im Taqman Assay. Die Patientenzahl ist am unteren Rand der Boxen angegeben.

Taqman Assay reproduziert werden ($p < 0,001$, Mann-Whitney Test). Darüber hinaus stellte sich die *REGIA*-Expression von chirurgisch gewonnenem Normalgewebe bereits signifikant erhöht dar ($p < 0,01$, Mann-Whitney Test). Hingegen unterschieden sich die Tumor-Bioptate und -Resektate kaum hinsichtlich ihrer Expression (Abb. 21). Selbst nach Ausschluss aller Tumor-Bioptate mit Lymphknoten- und/oder Fernmetastasen blieb der in der qPCR gemessene Unterschied zwischen Karzinomproben (N0 M0) und gesundem Gewebe signifikant (Diagramm nicht gezeigt).

3.2.2.5 Expression des REG1A-Rezeptors *Exostoses (Multiple)-Like 3 (EXTL3)* in Tumor- und Normalgewebe

Da *EXTL3* als Rezeptor von *REG1A* beschrieben ist (Kobayashi et al. 2000), wurde auch die Expression von *EXTL3* via qPCR analysiert, obschon sich in den Microarray-Experimenten lediglich moderate Expressionsunterschiede gezeigt hatten. In der qPCR ergab sich eine Überexpression von *EXTL3* im Tumor, welche allerdings nicht signifikant war. Das *EXTL3*-Expressionsniveau lag in Tumoren signifikant unter dem von *REGIA* ($p < 0,001$, Wilcoxon Test). Eine Koregulation von *EXTL3* und *REGIA* war nicht ersichtlich (Abb. 22). Räumlich wurde jedoch analog zu *REGIA* die schwächste Expression von *EXTL3* im Sigmoideum detektiert. Sowohl in Tumorproben (Abb. 23, $p = 0,2695$, Mann-Whitney Test) als auch Normalgewebe offenbarte sich ein Trend einer erhöhten *EXTL3*-Expression bei Vorhandensein von Peritonealmetastasen. Bezüglich des Patientenüberlebens erwies sich *EXTL3* in Karzinomproben als signifikanter Prädiktor für das Tumor-abhängige Überleben ($p < 0,05$, Log-Rank Test). Wie aus Abb. 24 ersichtlich, hatten Individuen mit niedrigem *EXTL3*-Level eine günstigere Prognose als Patienten mit hohen Expressionswerten. Darüber hinaus ergab die Analyse der kombinierten Expression von *EXTL3* und *REGIA* eine sinnvolle Stratifizierung in 3 Patientengruppen mit verschieden günstigem Ausgang (Abb. 25). Dabei hatten Individuen mit starker Expression beider Gene eine besonders schlechte Prognose, wohingegen gleichzeitig schwache Expression von *EXTL3* und *REGIA* mit einem sehr günstigen klinischen Verlauf einherging ($p = 0,0214$, Log-Rank Test).

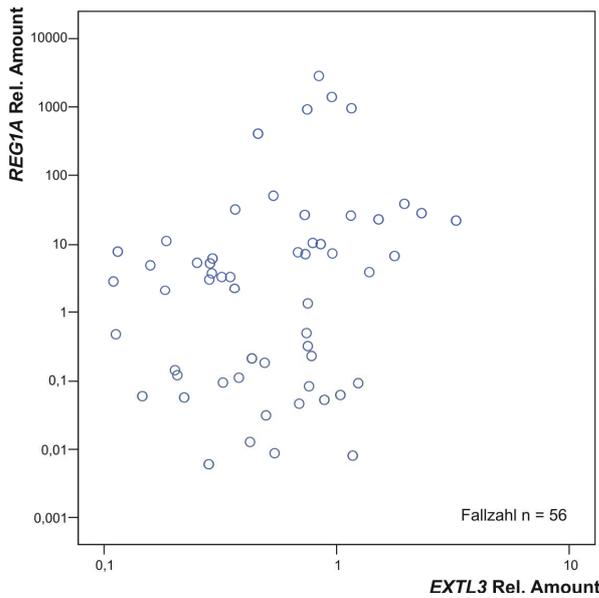


Abb. 22: Expressionsniveaus von *EXTL3* sowie von *REG1A* im 1. Taqman-Lauf in Tumoren von Patienten mit kolorektalem Karzinom.

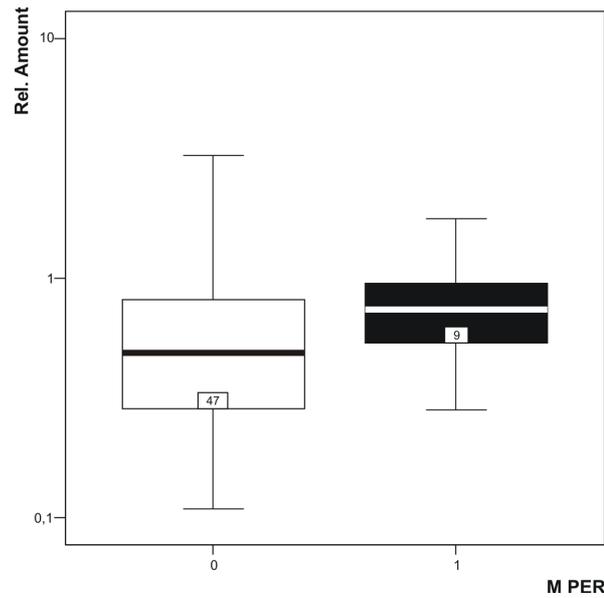


Abb. 23: Expression von *EXTL3* in kolorektalen Primärtumoren in Abhängigkeit von der peritonealen Metastasierung (M0/1 PER). Die Patientenzahl ist am unteren Rand der Boxen angegeben.

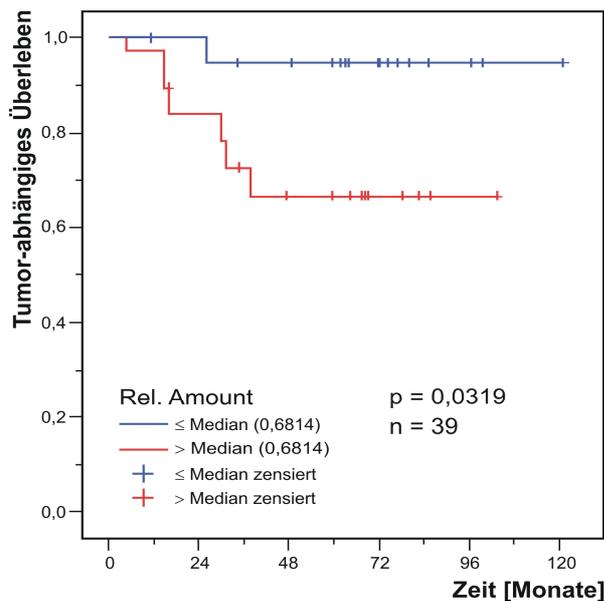


Abb. 24: Tumor-abhängiges Überleben von Patienten mit kolorektalem Karzinom (R0) mit schwacher und starker *EXTL3*-Expression in der qPCR.

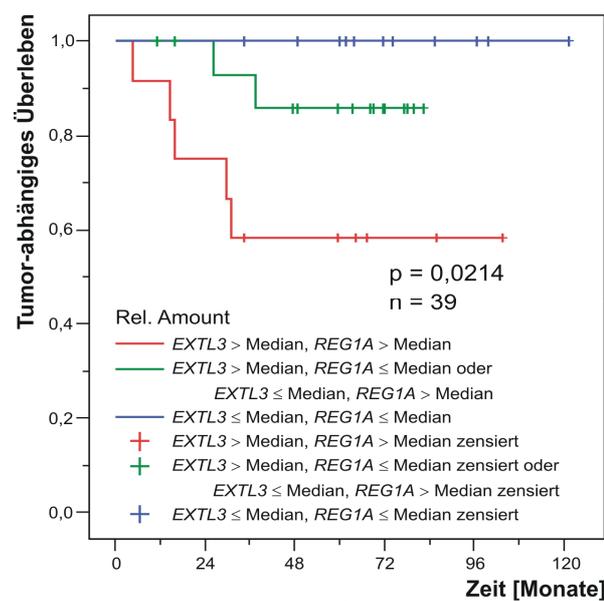


Abb. 25: Tumor-abhängiges Überleben von Patienten mit kolorektalem Karzinom (R0) mit unterschiedlich starker Expression von *EXTL3* und *REG1A* in der qPCR.

3.2.3 Chemokine (C-C Motif) Receptor 3 (CCR3)

3.2.3.1 Primärtumoren und Normalgewebe

Die Analyse von 45 kolorektalen Karzinomen sowie 7 Normalgewebeproben ergab im Gegensatz zu den Microarray-Resultaten eine tendenzielle Unterexpression von *CCR3* im Tumor (Abb. 26, $p = 0,0765$, Mann-Whitney Test). Die *CCR3*-Expression zeigte sich weder vom Tumorzell- oder Leukozytenanteil im Präparat noch von irgendeiner klinischen Größe abhängig. Dennoch resultierten nach Ausschluss aller Proben mit einem Tumorzellanteil von unter 50 % signifikante Korrelationen zwischen der Genexpression und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen, der generellen Fernmetastasierung (Abb. 27, beide Parameter $p < 0,05$, Mann-Whitney Test) sowie dem UICC-Stadium ($p < 0,05$, Mann-Whitney). Dabei gingen Metastasierung und ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium mit einer erniedrigten *CCR3*-Expression einher. Dies war auch nach Ausschluss aller rektalen Karzinome der Fall (in den DNA-Chip-Experimenten waren nur Kolonkarzinome analysiert worden) Damit widersprachen die qPCR-Befunde den GeneChip-Resultaten, wonach *CCR3* in der High Risk-Gruppe im Vergleich zu Low Risk-Patienten stärker exprimiert vorlag.

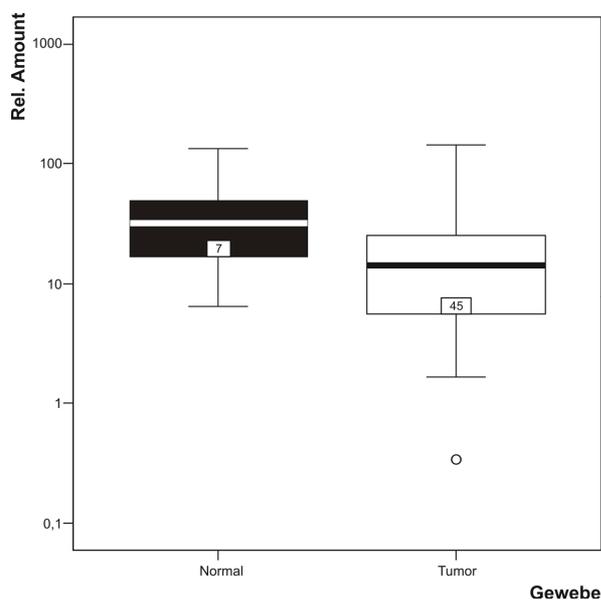


Abb. 26: *CCR3*-Expression in Normal- und Tumorgewebe im Taqman Assay. Die Patientenzahl ist am unteren Rand der Boxen angegeben.

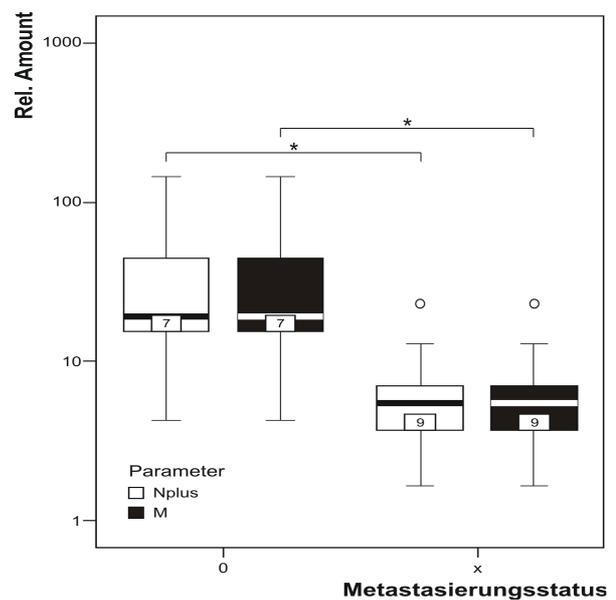


Abb. 27: *CCR3*-Expression in Tumoren (Anteil maligner Zellen $\geq 50\%$) in Abhängigkeit vom nodalen und Fernmetastasierungsverhalten im Taqman Assay. x bedeutet Parameter > 0 , also z.B. N1–2. Die Patientenzahl ist am unteren Rand der Boxen angegeben.

3.2.3.2 Expression des CCR3-Liganden *Chemokine (C-C Motif) Ligand 28 (CCL28)* in Tumor- und Normalgewebe

Da eine Expression des CCR3-Liganden CCL28 in Kolonmukosa beschrieben ist (Pan et al. 2000), erfolgte auch eine Untersuchung der *CCL28*-Expression per qPCR. Der Vergleich von korrespondierenden Karzinom- und Normalgewebeprobe ergab eine signifikante Minderexpression von *CCL28* im Tumorgewebe (Abb. 28, $p < 0,01$, Wilcoxon Test). Darüber hinaus stellte sich das *CCL28*-Expressionsniveau in den Tumorgeweben bezogen auf *CCR3* signifikant erniedrigt dar ($p < 0,05$, Wilcoxon Test). Wie aus Abb. 29 zu entnehmen, korrelierten *CCL28*-Level und *CCR3*-Niveau nicht miteinander. Dieser Befund spricht zunächst gegen eine Ko- oder Antiregulation der beiden Gene. Ein Zusammenhang der *CCL28*-Expression mit klinischen Parametern oder dem Patientenüberleben konnte nicht demonstriert werden.

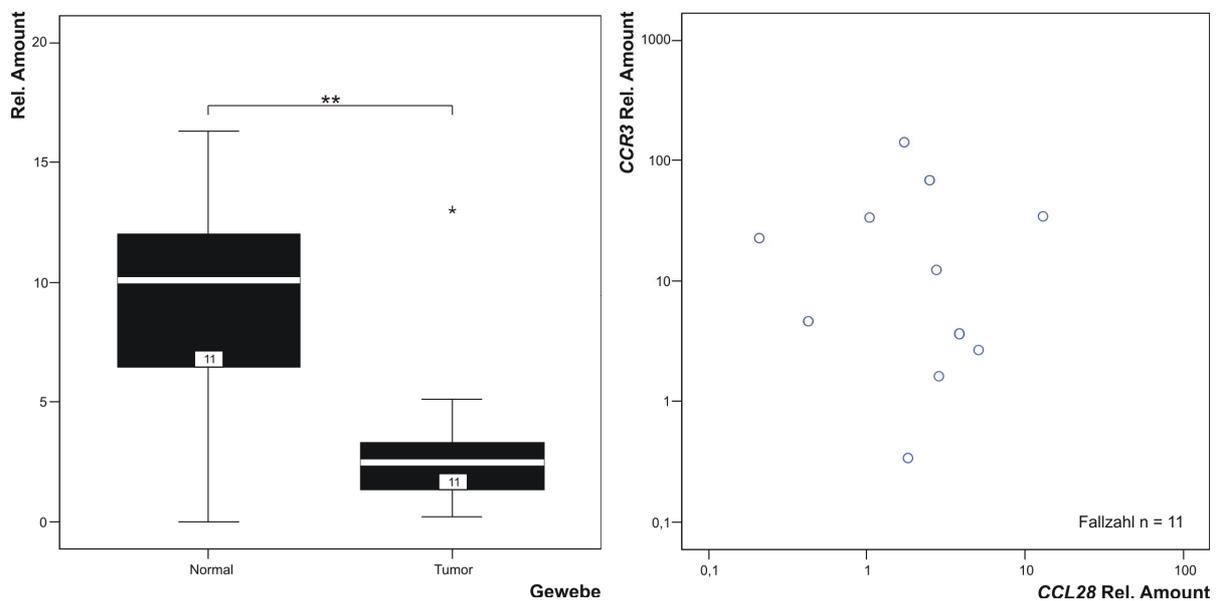


Abb. 28: *CCL28*-Expression in Normal- und Tumorgewebe in der qPCR. Die Patientenzahl ist am unteren Rand der Boxen angegeben.

Abb. 29: Expressionsniveaus von *CCL28* sowie *CCR3* in Tumoren von Patienten mit kolorektalem Karzinom in der qPCR.

3.2.4 Sieben weitere ausgewählte Transkripte

Neben *CLDN8*, *REG1A* und *CCR3* wurde die Expression von sieben weiteren Transkripten an Teilen des Stammkollektivs untersucht. Dabei handelte es sich um die beiden ESTs mit den GenBank IDs AI247408 und AI870708 sowie die fünf Gene *AQP8*, *ITGA6*, *RAB27B*, *SERPINE2* und *TMEPAI*. Wie aus Tab. 17 zu entnehmen, ergab sich mit Ausnahme von *ITGA6* für keines dieser Transkripte ein signifikanter Zusammenhang zwischen Expression und dem Patientenüberleben. Für *ITGA6* ergab die graphische Analyse des Kaplan-Meier

Diagramms (nicht gezeigt) jedoch bei der gegebenen Patientenzahl ebenfalls keine sinnvolle Korrelation zwischen Expressionsstärke und dem progressionsfreien Überleben. In Abb. 30, Abb. 31, Abb. 32, Abb. 33, Abb. 34, Abb. 35 und Abb. 36 ist die Expression der sieben weiteren Transkripte in den UICC-Stadien I+II und III+IV graphisch veranschaulicht. Eine Gegenüberstellung der Fold Change-Werte für High Risk versus Low Risk (Microarray) und der Ratios der mittleren Expressionsniveaus der beiden Gruppen UICC III+IV und UICC I+II (qPCR) findet sich in Tab. 18. Lediglich für *ITGA6* und *RAB27B* resultierten Signifikanzen für die Lymphgefäßinvasion bzw. die Lokalisation des Tumors innerhalb des Dickdarms. Dabei zeigten Patienten mit Befall der Lymphgefäße eine Unterexpression von *ITGA6* ($p < 0,05$, Mann-Whitney Test). Die *RAB27B*-Expression stellte sich im Sigmoideum verglichen mit Kolon ($p < 0,001$, Mann-Whitney Test) und Rektum ($p < 0,05$, Mann-Whitney Test) stark erniedrigt dar (Abb. 37). Die Wiederholung der statistischen Analysen unter Auslassung aller rektalen Proben ergab keine neuen Signifikanzen.

Tab. 17: Korrelation der Tumorexpression sieben weiterer ausgewählter Transkripte mit wichtigen klinischen Statusgrößen (Kruskal-Wallis Test) und dem Patientenüberleben (Log-Rank Test). p-Werte < 0,05 sind grau unterlegt.

Klinischer Parameter	AI247408	AI870708	AQP8	ITGA6	RAB27B	SERPINE2	TMEPAI
Fallzahl n	14	10	16	10	27	14	10
Lokalisation ¹	0,1525	0,7919	0,7075	0,3588	0,0031	0,2540	0,0639
UICC-Stadium ²	0,7773	0,9168	0,2936	0,4647	0,5604	0,5716	0,9168
pT ³	0,4652	0,1172	0,5449	0,7940	0,7550	0,4652	1,0000
pN ⁴	0,7773	0,9168	0,2936	0,4647	0,5604	0,5716	0,9168
M	0,4822	0,9168	0,2936	0,4647	0,5604	0,6547	0,9168
M HEP	0,7963	0,7324	0,5152	0,2100	0,6930	1,0000	0,3938
M PER	0,7150	0,2963	0,6338	0,1917	0,8774	0,1003	0,1917
M PUL	0,1724	0,6015	0,7508	0,6015	0,9262	0,1724	0,2963
G ⁵	0,9468	0,1385	0,3290	0,7324	0,0797	0,3861	0,5688
L	0,4233	0,7324	0,1037	0,0167	0,9611	0,7488	0,6698
V	0,5677	0,2963	0,7770	0,1172	0,5067	0,1161	1,0000
Gesamtüberleben ⁶	0,6061	0,4936	0,6731	0,4331	0,6729	0,9272	0,9449
Tumor-abhängiges Überleben ⁶	0,5059	0,3826	0,3507	0,7297	0,5153	0,7222	0,8473
Progressionsfreies Überleben ⁶	0,6071	0,0623	0,9714	0,0140	0,9060	0,5203	0,5186

Erklärung:

¹ Kolon/Sigmoideum/Rektum

⁴ pN0/+

² UICC I+II/III+IV

⁵ G1–2/3

³ pT1–2/3–4

⁶ alle Patienten R0-reseziert

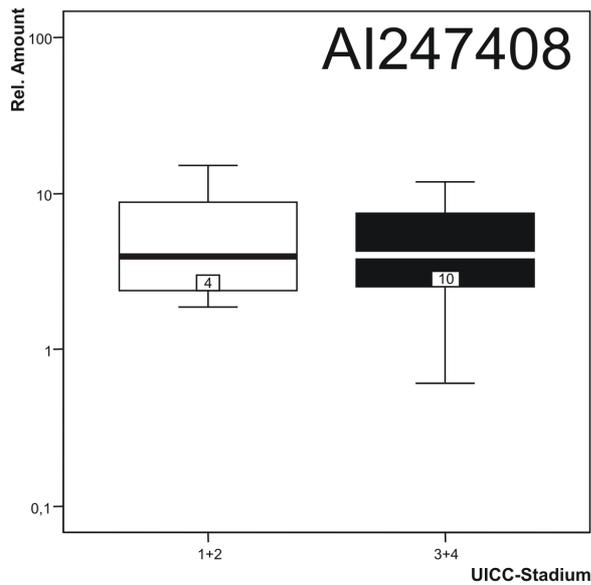


Abb. 30: Expression von EST AI247408 in frühen und späten Stadien des kolorektalen Karzinoms in der qPCR. Die Patientenzahl ist am unteren Rand der Boxen angegeben.

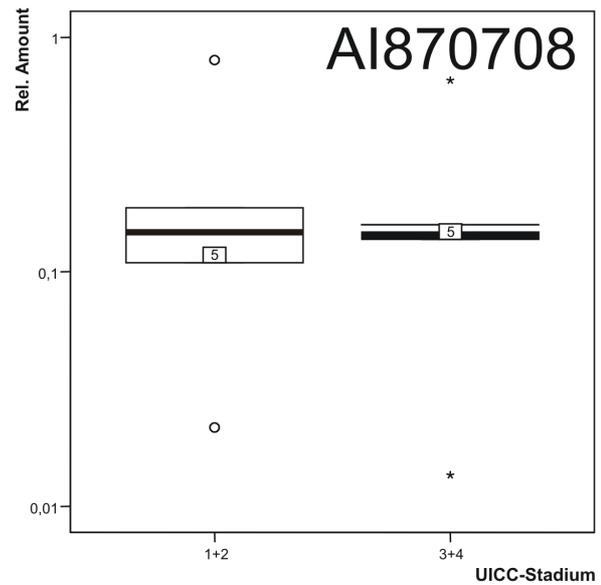


Abb. 31: Expression von EST AI870708 in frühen und späten Stadien des kolorektalen Karzinoms in der qPCR. Die Patientenzahl ist am unteren Rand der Boxen angegeben.

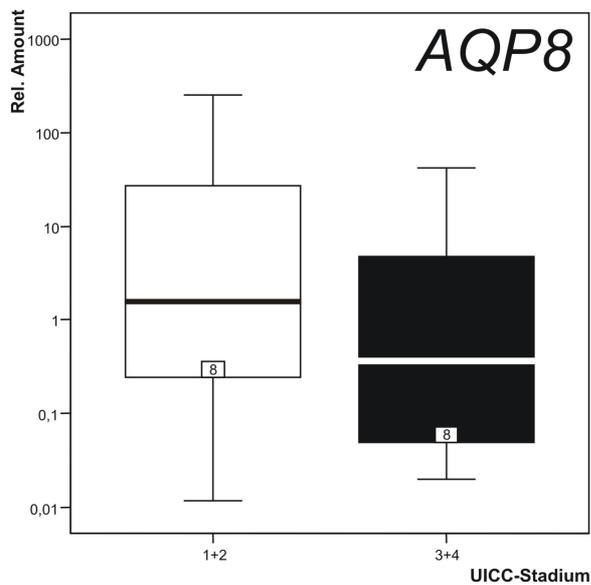


Abb. 32: AQP8-Expression in frühen und späten Stadien des kolorektalen Karzinoms in der qPCR. Die Patientenzahl ist am unteren Rand der Boxen angegeben.

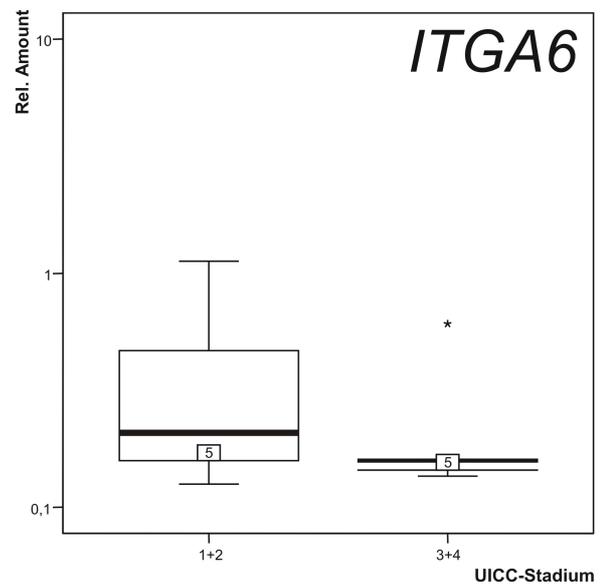


Abb. 33: ITGA6-Expression in frühen und späten Stadien des kolorektalen Karzinoms in der qPCR. Die Patientenzahl ist am unteren Rand der Boxen angegeben.

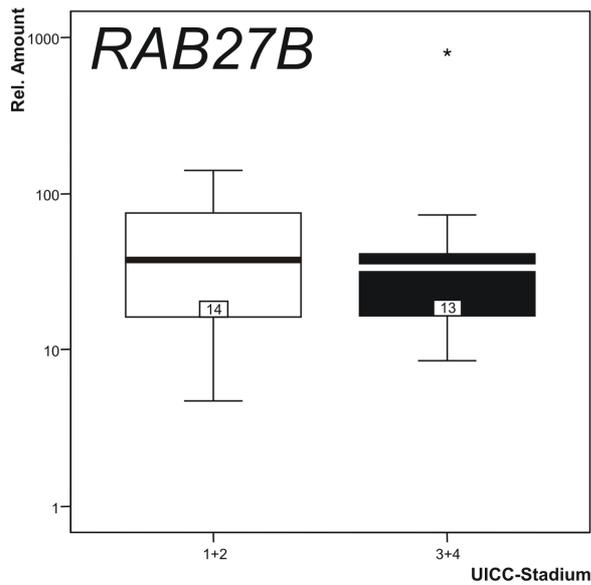


Abb. 34: *RAB27B*-Expression in frühen und späten Stadien des kolorektalen Karzinoms in der qPCR. Die Patientenzahl ist am unteren Rand der Boxen angegeben.

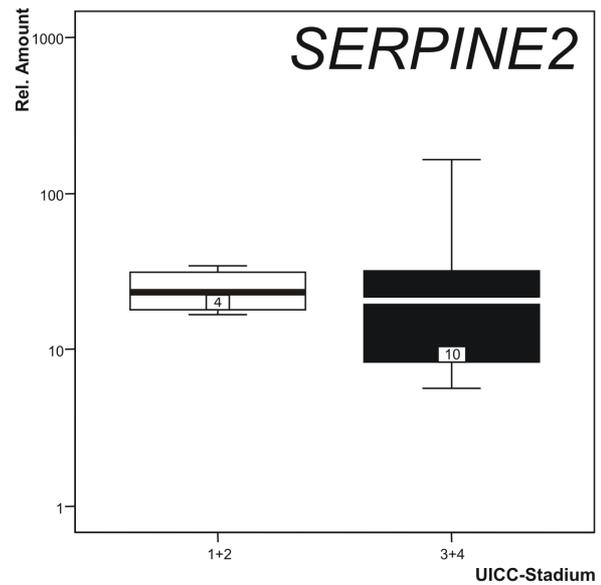


Abb. 35: *SERPINE2*-Expression in frühen und späten Stadien des kolorektalen Karzinoms in der qPCR. Die Patientenzahl ist am unteren Rand der Boxen angegeben.

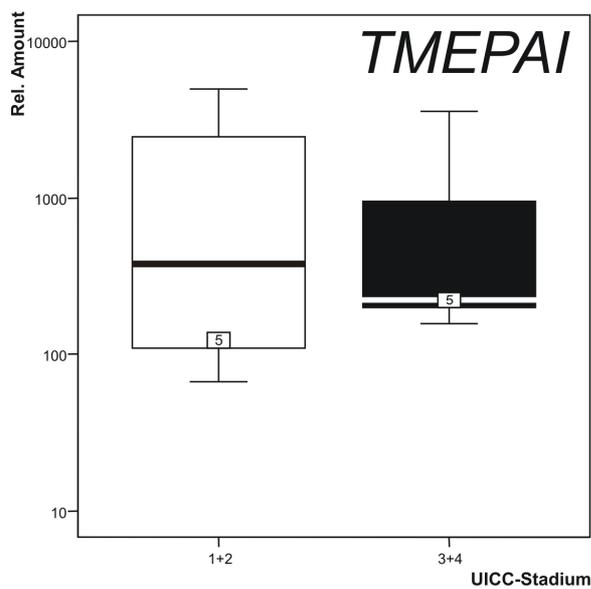


Abb. 36: *TMEPAI*-Expression in frühen und späten Stadien des kolorektalen Karzinoms in der qPCR. Die Patientenzahl ist am unteren Rand der Boxen angegeben.

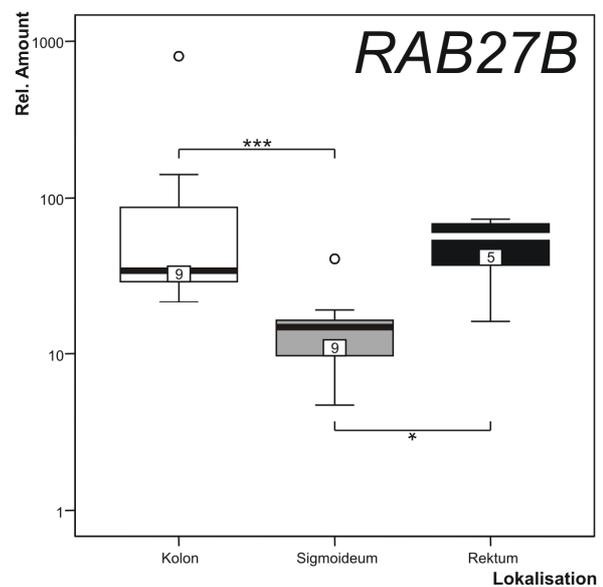


Abb. 37: *RAB27B*-Expression in Abhängigkeit von der Tumorlokalisation in der qPCR (ohne Fälle mit uneindeutiger Lokalisation). Die Patientenzahl ist am unteren Rand der Boxen angegeben.

Tab. 18: Vergleich der Expressionsratios von Patienten mit infauster und günstiger Prognose aus GeneChip- und qPCR-Experimenten für sieben weitere ausgewählte Transkripte.

Transkript	GeneChip FC High/Low ¹	qPCR UICC Ratio III+IV/I+II ²	Trend gleichnamig ³
EST AI247408	3,92	0,79	–
EST AI870708	3,45	0,88	–
<i>AQP8</i>	0,49	0,18	X
<i>ITGA6</i>	1,78	0,57	–
<i>RAB27B</i>	10,45	1,92	X
<i>SERPINE2</i>	2,30	1,38	X
<i>TMEPAI</i>	3,19	0,64	–

Erklärung:

¹ Fold Change High Risk/Low Risk

² Ratio mittlerer Rel. Amount (UICC-Stadien III+IV)/mittlerer Rel. Amount (UICC-Stadien I+II)

³ X = Regulation in Microarray und qPCR gleichnamig

3.3 Tissue Microarray basierte *in situ*-Hybridisierung

Die Lokalisation der Expression der beiden Gene *CLDN8* und *REGIA* wurde via *in situ*-Hybridisierung untersucht. Durch Verwendung von TMAs war dabei die simultane Analyse multipler Gewebeproben unter genau den gleichen chemischen Bedingungen möglich.

3.3.1 *Claudin 8*-Expression im Kolorektum

3.3.1.1 TMA-Serie „Kolon M0/1“

Die *in situ*-Hybridisierung wurde mit zwei verschiedenen Sonden, ICLD-1 und ICLD-2, durchgeführt. ICLD-1 bindet in der 3'-NTR (nicht-translatierte Region) der *CLDN8*-mRNA, ICLD-2 hingegen im *CLDN8*-ORF. Nach Hybridisierung mit ICLD-1 konnten insgesamt 68 Gewebestanden ausgewertet werden. Von 23 Normalgewebe-Cores waren 20 Fälle färbungsnegativ (87,0 %), von 45 Tumorstanzen 14 (31,1 %). In der *in situ*-Hybridisierung mit ICLD-2 konnten total 98 Stanzen befundet werden. Keine Farb-reaktion zeigten von 41 Normalgewebe-Cores 27 Fälle (65,9 %) und von 57

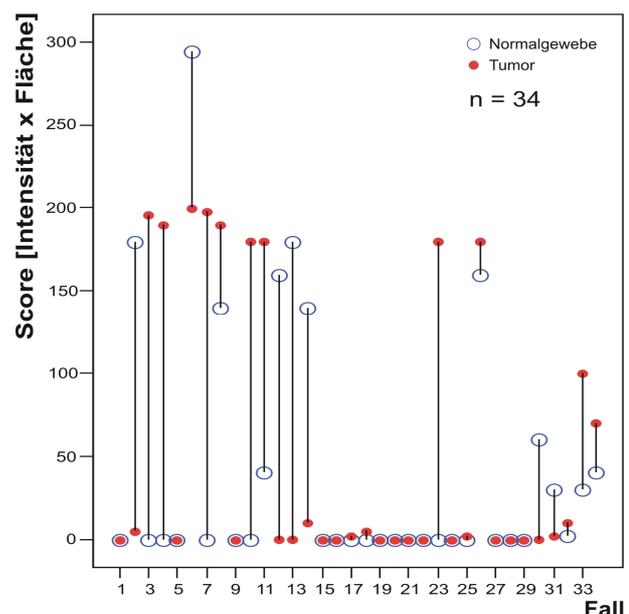


Abb. 38: Scores verbundener Normalgewebe- und Tumorproben nach Hybridisierung mit ICLD-2 an der TMA-Serie „Kolon M0/1“.

Tumorproben 25 Stenzen (43,9 %). Eine Expression von *CLDN8* wurde in den Normalgewebe-Cores ausschließlich in Epithelzellen sowie in karzinomatösen Proben nur im Tumorparenchym und nie im Stroma detektiert. Die Hybridisierungen mit beiden Sonden ergaben – im Gegensatz zur qPCR – eine stärkere *CLDN8*-Expression im Tumor als im Normalgewebe. Dieser Expressionsunterschied war für ICLD-1 hinsichtlich aller 4 Färbeparameter ($p < 0,001$, Mann-Whitney Test), für ICLD-2 lediglich bezüglich IntensitätPlus ($p < 0,05$, Mann-Whitney Test) signifikant. Bei ausschließlicher Betrachtung verbundener Normal- und Tumorproben zeigte sich allerdings für ICLD-2, dass in einigen Gewebepaaren die Tumorexpression (Score) unter der im Normalgewebe lag (Abb. 38). Für korrespondierende Normal- und Tumorstanzen ergab sich infolge kein signifikanter Expressionsunterschied mehr. Ein Vergleich mit den Resultaten aus dem Taqman Assay, ergab dass hohe und niedrige Relative Amount-Werte zwischen färbungsnegativen und positiven Cores ungefähr gleich verteilt waren. Abb. 39 und Abb. 40 zeigen einen typischen Detailbereich eines Normalgewebe- bzw. Tumor-Cores nach Hybridisierung mit der Sonde ICLD-2.

Hinsichtlich der Korrelation der *CLDN8*-Expression mit klinischen Statusgrößen ergab sich ein positiver Zusammenhang mit dem Auftreten von Lungenmetastasen. Diese Abhängigkeit war in normalem Gewebe nur bei Hybridisierung mit ICLD-1 (alle 4 Färbeparameter, $p < 0,05$, Mann-Whitney Test), im Tumor jedoch für beide Sonden signifikant (Fläche und Score, $p < 0,05$; Intensität nur für ICLD-2, $p < 0,05$, Mann-Whitney Test). Jedoch ist dieser Befund vor dem Hintergrund der kleinen Anzahl pulmonal metastasierter Patienten ($n = 3/4$ für ICLD-1/ICLD-2) mit Vorsicht zu bewerten. In der Kaplan-Meier Analyse konnte kein signifikanter Einfluss der Genexpression auf das Patientenüberleben demonstriert werden.

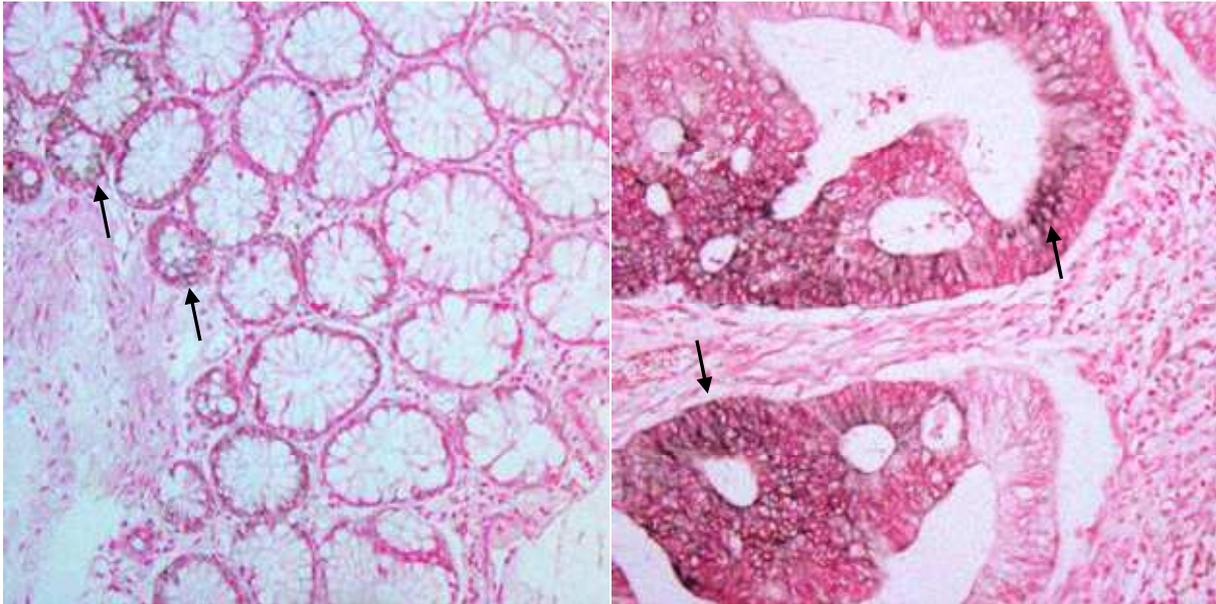


Abb. 39: Partielle Farbreaktion (Pfeile) nach TMA-basierter *in situ*-Hybridisierung gegen *CLDN8*-mRNA an einer repräsentativen kolorektalen Normalgewebestanze (100 ×).

Abb. 40: Färbung von karzinomatösen Resorptivzellen (Pfeile) nach TMA-basierter *in situ*-Hybridisierung gegen *CLDN8*-mRNA an einer repräsentativen kolorektalen Tumorstanze (100 ×).

3.3.1.2 TMA-Serie „G2A/G2B“

Die *in situ*-Hybridisierung an der TMA-Serie „G2A/G2B“ wurde ausschließlich mit der Sonde ICLD-2 durchgeführt. Es konnten insgesamt 90 Gewebestanden analysiert werden. Diese im Vergleich zur *in situ*-Hybridisierung gegen *REGIA* reduzierte Probenanzahl (Abschnitt 3.3.2.2) ist durch das Ablösen von Stanzen während des Hybridisierungsprozesses verursacht worden. Von 47 Normalgewebe-Cores zeigten 26 Fälle (55,3 %) und von 43 Karzinomproben 15 (34,9 %) keine Farbreaktion. In färbungspositiven Stanzen wurde *CLDN8*-mRNA exklusiv in epithelialen Zellen bzw. karzinomatösen Arealen detektiert. Entgegen den qPCR-Resultaten stellte sich die Expression von *CLDN8* in Tumorproben signifikant erhöht dar ($p < 0,05$, Mann-Whitney Test). Lediglich für den Parameter IntensitätPlus erreichte sich ein nur knapp nicht signifikanter Expressionsunterschied ($p = 0,0532$, Mann-Whitney Test) zwischen Tumor- und Normalgewebe. Sowohl für Tumor- als auch Normalgewebe-Cores ergab sich hinsichtlich mehrerer Färbeparameter eine signifikante Korrelation mit der Lymphgefäßinvasion ($p < 0,05$, Mann-Whitney Test) und der Veneninvasion ($p < 0,05$, Mann-Whitney Test). Dabei ging eine vorhandene Gefäßinvasion mit einem umfangreicheren Farbsignal einher. Dieser Befund ist jedoch vor dem Hintergrund einer geringen Anzahl Gefäßinvasions-positiver Fälle ($n = 4/3$ für L1/V1) einzustufen. Die Durchführung einer Kaplan-Meier Analyse war bei total 3 verstorbenen Patienten nicht indiziert.

3.3.2 *REG1A*-Expression im Kolorektum und Magen

3.3.2.1 TMA-Serie „Kolon M0/1“

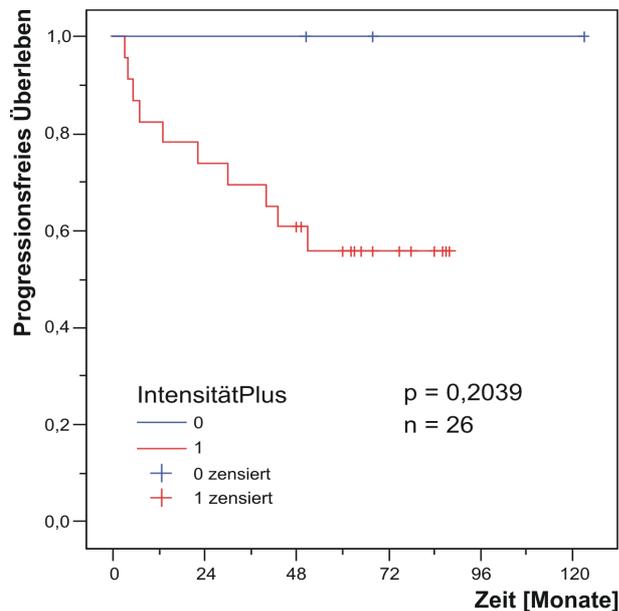


Abb. 41: Progressionsfreies Überleben von kolorektalen Karzinompatienten in Abhängigkeit vom *REG1A*-Signal (IntensitätPlus 0/1) in der TMA-basierten *in situ*-Hybridisierung.

Die *in situ*-Hybridisierung ergab eine Beschränkung der Expression von *REG1A* auf das Epithelgewebe bzw. Tumorzellen. Insgesamt konnten mit 62 Cores weniger Biopsiestanzen beurteilt werden als für *CLDN8* (Abschnitt 3.3.1.1), da es im Zuge der Hybridisierungsprozedur zum Ablösen von mehreren Gewebearealen gekommen ist. In Abb. 42 und Abb. 43 ist exemplarisch der Detailbereich einer repräsentativen Normalgewebe- bzw. Tumorprobe dargestellt. 40,0 % (8 von 20 Fällen) der Normalgewebe-Cores und 4,8 % (2 von 42 Fällen) der Tumorstanzen zeigten keinerlei Färbung. Darüber hinaus ergab sich – in

Übereinstimmung mit der qPCR – eine signifikant stärkere Expression von *REG1A* im Tumor verglichen mit Normalgewebe. Dies galt für alle vier untersuchten Färbeparameter: Intensität, prozentuale Fläche, Score sowie IntensitätPlus ($p < 0,05$, Mann-Whitney Test). Für Normalgewebe konnte eine positive signifikante Korrelation zwischen Färbung und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen nachgewiesen werden ($p < 0,05$, Mann-Whitney Test). Des Weiteren erlaubte die Färbung der Tumorstanzen graphisch eine deutliche Diskriminierung zwischen Patienten mit günstigem und infaustem klinischen Verlauf (Abb. 41). Wegen der geringen Anzahl von Cores ohne Farbreaktion war dieser Effekt jedoch statistisch nicht signifikant ($p = 0,2039$, Log-Rank Test).

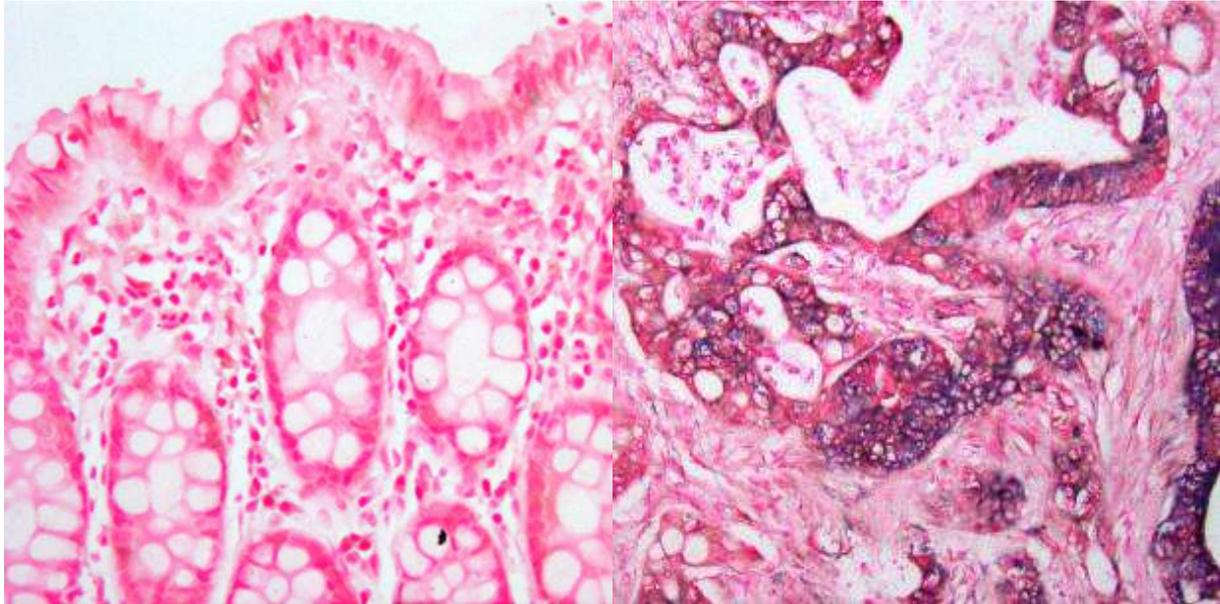


Abb. 42: Fotografie einer repräsentativen kolorektalen Normalgewebestanze nach TMA-basierter *in situ*-Hybridisierung gegen *REGIA*-mRNA (200 ×).

Abb. 43: Nachweis von *REGIA*-mRNA in Resorptivzellen nach TMA-basierter *in situ*-Hybridisierung an einer repräsentativen kolorektalen Tumorstanze (200 ×).

3.3.2.2 TMA-Serie „G2A/G2B“

In insgesamt 120 kolorektalen Gewebestanzen konnte *REGIA* – analog zur TMA-Serie „Kolon M0/1“ – lediglich in Epithelzellen bzw. Karzinomzellen detektiert werden. In 50,8 % (31 von 61 Fällen) der Normalgewebe-Cores und 45,8 % (27 von 59 Fällen) der Tumorstanzen konnte gar keine Färbereaktion nachgewiesen werden. Generell zeigte sich *REGIA* im Tumor stärker exprimiert als in normalem Gewebe. Sowohl für Tumorproben als auch Stanzen von peritumoralem Normalgewebe errechnete sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen allen vier Färbeparametern und den Tumorstadien T1 und T2 ($p < 0,05$, Mann-Whitney Test). Dabei ging T2 mit einer umfangreicheren Färbung als T1 einher. Korrelationen mit dem Patientenüberleben und dem Metastasierungsstatus konnten bei insgesamt 3 verstorbenen Individuen und kompletter Abwesenheit von Lymphknoten- und Fernmetastasen in der zugrunde liegenden Patientenkohorte nicht überprüft werden.

3.3.2.3 TMA-Serie „Magen M0/1“

Eine Expression von *REGIA* zeigte sich in 185 insgesamt ausgewerteten Magengewebecores ausschließlich im Epithel bzw. in Karzinomzellen und niemals im Bindegewebe. In 27,3 % (24 von 88 Fällen) der Normalgewebeproben und 34,0 % aller Tumor-Cores (33 von 97 Fällen) kam es zu keinerlei Farbreaktion. In Abb. 45 und Abb. 46 ist beispielhaft das Detailareal einer typischen Normalgewebe- bzw. Tumorstanze dokumentiert. Das Ausmaß der

Genexpression stellte sich zwischen Tumor- und Normalgewebe nicht signifikant verschieden dar. Für die Normalgewebe-Cores ergaben sich positive signifikante Korrelationen zwischen den beiden Färbeparametern Intensität und Score ($p < 0,05$, Mann-Whitney Test) und dem Auftreten peritonealer Metastasen. Darüber hinaus erlaubte die Färbung der Normalgewebestanzungen – im Gegensatz zu den Karzinomproben – eine graphisch deutliche Diskriminierung im progressionsfreien Überleben (Abb. 44, $p = 0,1459$, Log-Rank Test).

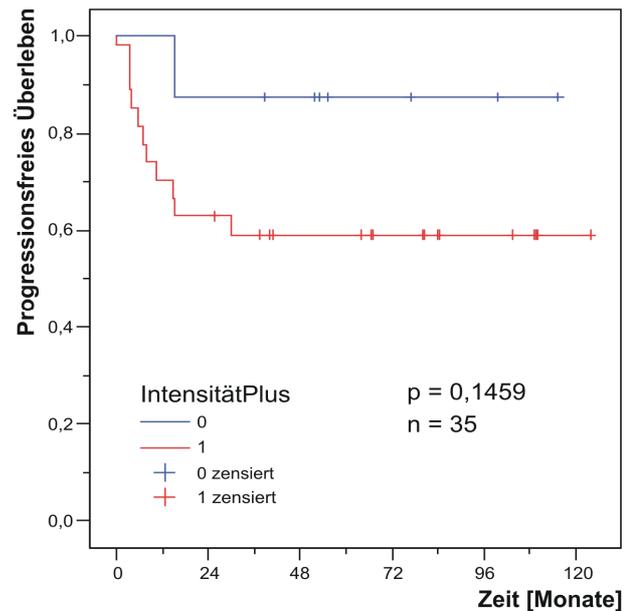


Abb. 44: Progressionsfreies Überleben von Magenkarzinompatienten in Abhängigkeit vom *REGIA*-Signal (IntensitätPlus 0/1) in Normalgewebe-Cores nach TMA-basierter *in situ*-Hybridisierung.

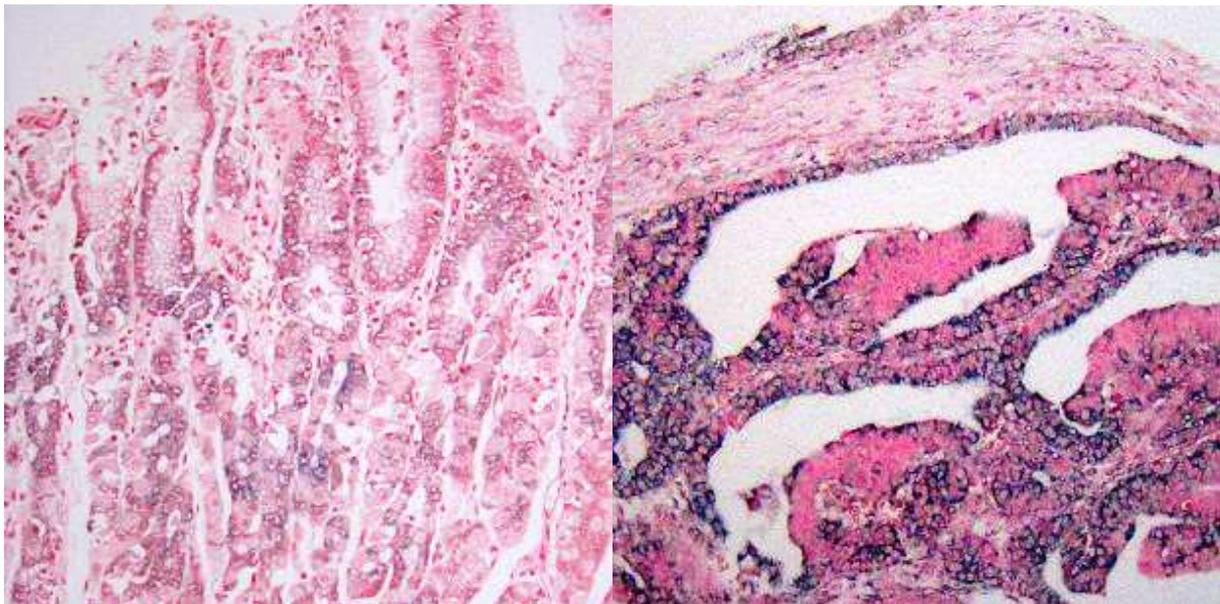


Abb. 45: Leichte Farbreaktion in einer repräsentativen Magen-Normalgewebestanze nach TMA-basierter *in situ*-Hybridisierung gegen *REGIA*-mRNA (100 \times).

Abb. 46: Nachweis von *REGIA*-mRNA in Karzinomzellen nach TMA-basierter *in situ*-Hybridisierung an einer repräsentativen Magen-Tumorstanze (100 \times).

3.4 Tests zur funktionellen Abklärung

3.4.1 *Claudin 8*

3.4.1.1 Test auf DNA-Methylierung

DNA-Demethylierung führte in SW480-Zellen im Vergleich zum Markergen *SMARCA3* zu keiner nennenswerten Zunahme der Expression von *CLDN8*. Wie in Abb. 47 gezeigt, bewirkten 10 μM 5-AzaC für *SMARCA3* einen maximalen Expressionsanstieg um den Faktor 6144, wohingegen *CLDN8* lediglich um das 12,6-fache stärker exprimiert wurde.

Auch in MDA-MB 435 resultierte nach 5-AzaC-Behandlung keine deutlich erhöhte Expression von *CLDN8* im Vergleich zum Kontrollgen *CLDN7*. Wie aus Abb. 48 zu entnehmen wurde für *CLDN7* bei 10 μM 5-AzaC die stärkste Genexpression (Faktor 40,4) erzielt, wohingegen diese Konzentration für *CLDN8* nur einen Expressionsanstieg um den Faktor 3,2 bewirkte.

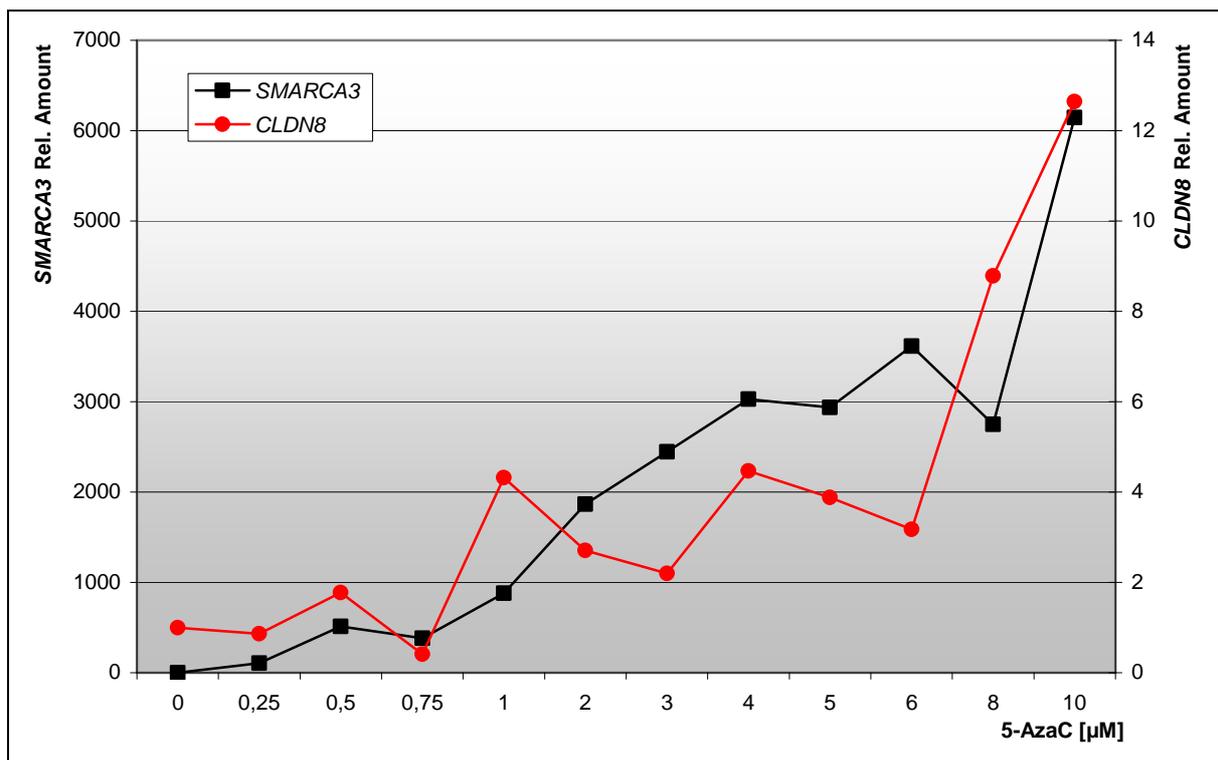


Abb. 47: Expression von *CLDN8* und *SMARCA3* (Kontrollmarker) in SW480-Zellen in Abhängigkeit von der 5-AzaC-Konzentration.

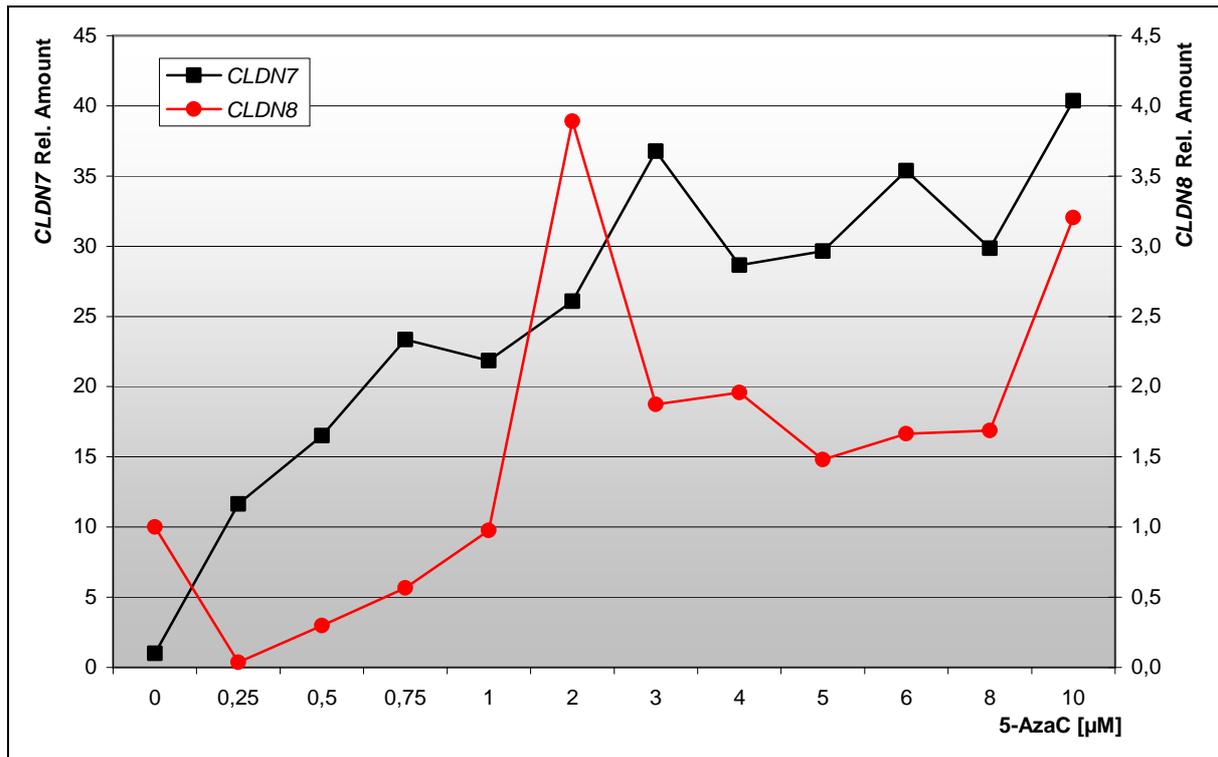


Abb. 48: Expression von *CLDN8* und *CLDN7* (Markergen) in MDA-MB 435-Zellen in Abhängigkeit von der 5-AzaC-Konzentration.

3.4.1.2 Adhäsionstest (Zell-Matrix-Adhäsion)

Drei unabhängig durchgeführte Versuche ergaben keinen Unterschied in der Kollagen- und Fibronectin-Adhäsion von SW480-Mocktransfektanten und den beiden *CLDN8*-überexprimierenden Klonen B8 und B11* (Daten nicht gezeigt).

3.4.1.3 Aggregationstest (Zell-Zell-Adhäsion)

In drei unabhängig durchgeführten Experimenten zeigten die *CLDN8* überexprimierenden Klone B8 und B11* kein wesentlich anderes Aggregationsverhalten als Mocktransfektanten (Abb. 49). Zwar errechnete sich für B8 und B11* innerhalb der ersten Messreihe ein größerer Aggregationsfaktor als für mocktransfizierte SW480-Zellen, jedoch ließ sich dieser Effekt in den beiden nachfolgenden Versuchen nicht reproduzieren.

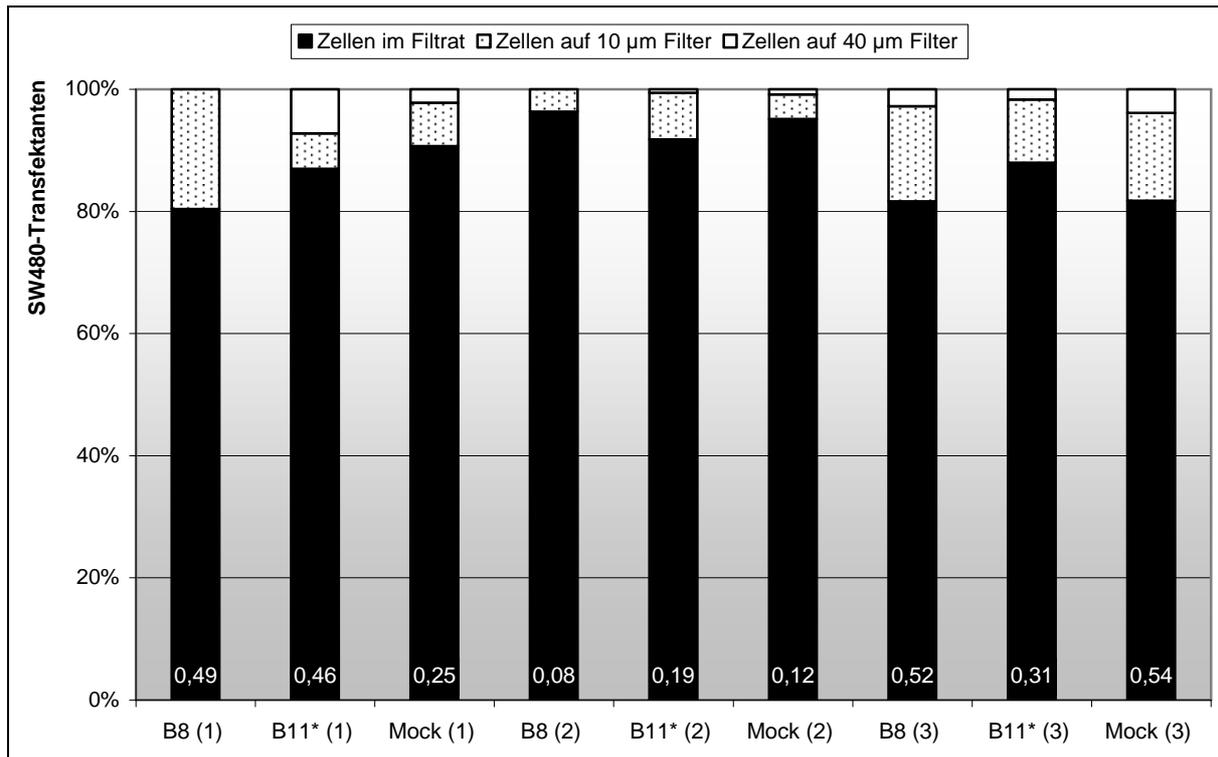


Abb. 49: Aggregationsverhalten der SW480-*CLDN8*-Transfektanten B8 und B11* im Vergleich zu Mockklonen. Gezeigt sind 3 verschiedene Experimente: (1), (2) und (3). Die Zahlen am unteren Ende der Balken geben den Aggregationsfaktor für das jeweilige Experiment an.

3.4.1.4 Wound-Healing Assay

Wie auch beim Adhäsions- und Aggregationstest wurden für den Wound-Healing Assay SW480-Mocktransfektanten sowie die beiden *CLDN8*-Klone B8 und B11* verwendet. In drei unabhängigen Experimenten ergab sich kein eindeutiger Unterschied in der Wundverschlusszeit von SW480-Zelllayern mit schwacher und starker *CLDN8*-Expression (Daten nicht gezeigt). Das bedeutet, dass das Migrationsverhalten nicht von der *CLDN8*-Expression beeinflusst wird.

3.4.2 Überprüfung der antiapoptotischen Eigenschaften von *REG1A*

Wie in Abb. 50 gezeigt, bewirkte *REG1A* im Vergleich zum Überstand mocktransfizierter Zellen in zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten keine Reduktion der PTX-induzierten Caspase-Aktivität von HT-29 Zellen. Eher schien *REG1A* die Apoptose sogar positiv zu beeinflussen. Eine Wiederholung mit SW480 anstatt von HT-29 Zellen ergab ebenfalls keine Apoptose-inhibierende Wirkung von *REG1A* (Daten nicht gezeigt). Die Resultate aus dem Caspase-Assay wurden durch eine parallel durchgeführte Zellzählung mit Trypanblau untermauert. Abb. 51 dokumentiert, dass *REG1A* im Vergleich zu Mock-Überstand keine Hemmung des PTX-induzierten Zelltods zur Folge hatte.

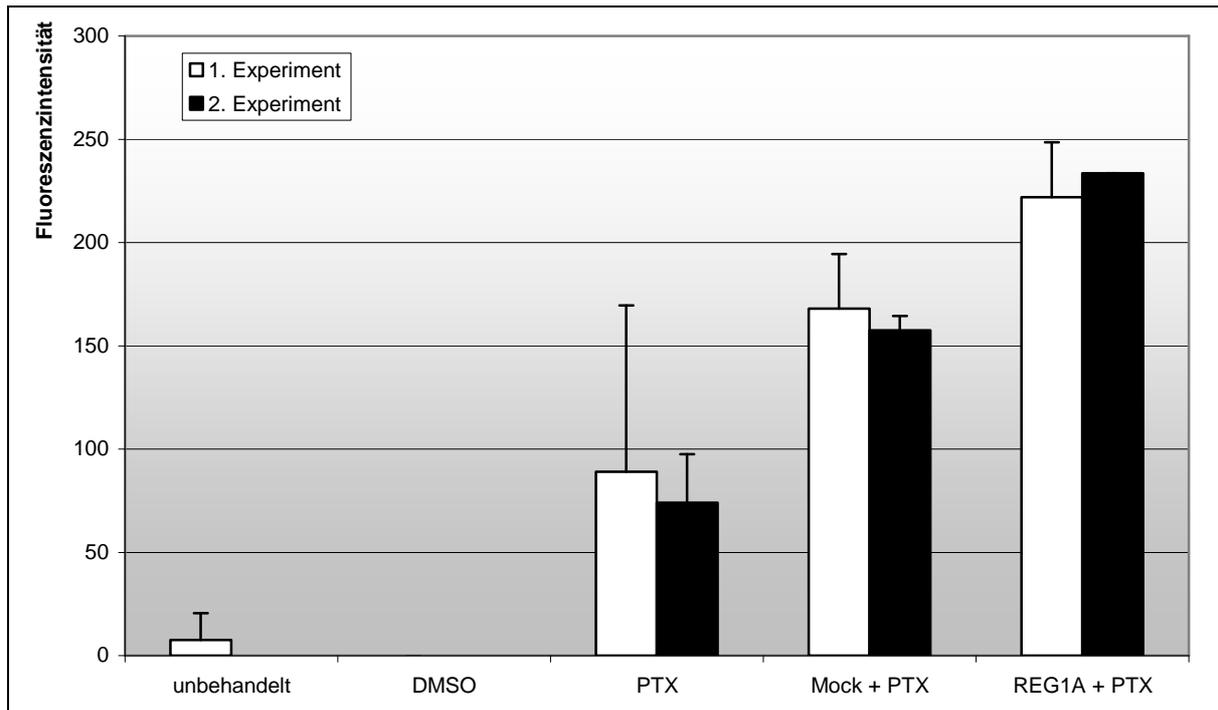


Abb. 50: Caspase-Aktivität von HT-29 Zellen nach 48-stündiger Exposition mit PTX in Mock- oder REG1A-haltigem Überstand 3 h nach Substratzusatz. Es sind die Mittelwerte von Doppelbestimmungen gezeigt. Fehlerbalken markieren Maximalwerte. Nomenklatur: unbehandelt = unbehandelte HT-29 Zellen, DMSO = Behandlung mit DMSO (PTX-Lösungsmittel), PTX = PTX in DMSO, Mock + PTX = PTX in Mock-Überstand, REG1A + PTX = PTX in REG1A-Überstand.

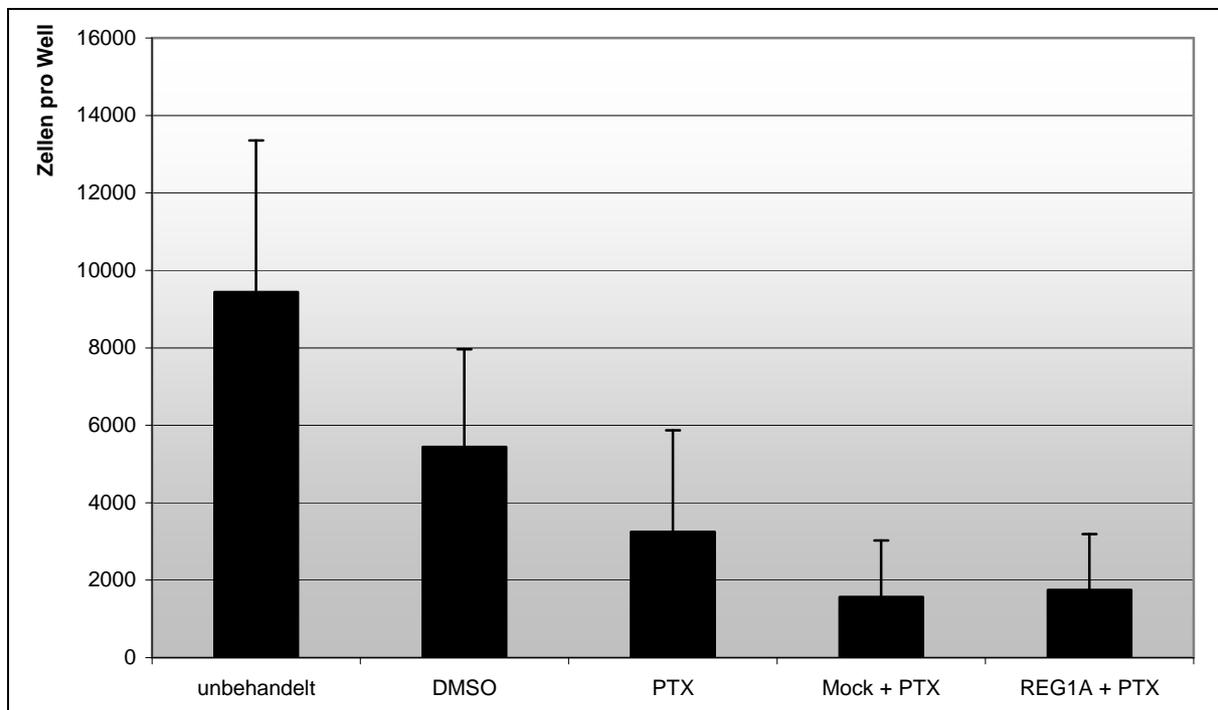


Abb. 51: HT-29-Lebendzellzahlen nach 48-stündiger PTX-Behandlung in Mock- oder REG1A-Überstand. Es sind Mittelwerte von 16-fach Bestimmungen dargestellt. Fehlerbalken markieren die Standardabweichung. Nomenklatur: unbehandelt = unbehandelte HT-29 Zellen, DMSO = Behandlung mit DMSO (PTX-Lösungsmittel), PTX = PTX in DMSO, Mock + PTX = PTX in Mock-Überstand, REG1A + PTX = PTX in REG1A-Überstand.

4 Diskussion

Bislang erlauben histopathologische Parameter die sicherste Prognose für Krebspatienten (Bustin und Dorudi 2004). Dennoch ist ihre Vorhersagekraft limitiert. Beispielsweise werden Kolonkarzinompatienten ohne Lymphknoten- und Fernmetastasen (N0 M0) nach erfolgreicher Resektion (R0) als geheilt erachtet und daher keiner Chemotherapie zugeführt. Bis zu 30 % dieser Patienten versterben allerdings innerhalb von 5 Jahren nach der Operation (Ratto et al. 1998; O'Connell et al. 2004). Zur Vermeidung von Unterbehandlungen ist deshalb eine Ergänzung der aktuellen histopathologischen Staging-Methoden sehr erstrebenswert. Es existieren bereits vielversprechende Forschungsbefunde, wonach ein molekulares Staging für kolorektale Karzinompatienten durchaus möglich zu sein scheint. So konnten die UICC-Stadien II und III anhand definierter Expressionssignaturen voneinander unterschieden werden (Zou et al. 2002; Frederiksen et al. 2003; Kwon et al. 2004). Eine weitere Microarray-Studie konnte anhand der Genexpression zwischen lokal begrenzten und fernmetastasierten kolorektalen Karzinomen diskriminieren (Bertucci et al. 2004). Des Weiteren ermöglichte eine lediglich 23 Transkripte umfassende Signatur die Voraussage des Rezidivierungsverhaltens von ursprünglich Lymphknoten-negativen Patienten (UICC II) über den Einsatz von GeneChips (Wang et al. 2004b).

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels DNA-Chip-Technologie nach differenziell exprimierten Transkripten in Kolonkarzinompatienten mit initial niedrigem Staging (N0 M0), später aber variierendem klinischen Verlauf (Low Risk/High Risk) gesucht. Des Weiteren sollten Sequenzen mit stark unterschiedlicher Expression zwischen Dickdarntumoren und gesunder Kolonmukosa (Healthy) identifiziert werden. Basierend auf den GeneChip-Ergebnissen wurden Genlisten mit insgesamt 516 Transkripten erstellt und *in silico* erfolgreich auf ihre prognostische Tauglichkeit getestet. 10 Sequenzen wurden über qPCR an einem neuen Patientenkollektiv validiert. Dieses beinhaltete neben Kolonkarzinomen zwecks Analysen-Erweiterung nun auch rektale Karzinome. Die Expression der Gene *CLDN8*, *REGIA* und *CCR3* wurde besonders eingehend per qPCR untersucht. Weiterführend wurde die Lokalisation von *CLDN8*- und *REGIA*-mRNA über TMA-basierte *in situ*-Hybridisierung analysiert. Abschließend wurde versucht, die Funktion beider Gene näher einzugrenzen.

Trotz der erfolgversprechenden Befunde zur Nutzbarkeit von Expressionssignaturen für eine Prognosenstellung, bleiben die Schnittmengen prädiktiver Transkripte aus verschiedenen Microarray-Studien über das kolorektale Karzinom bislang klein (Shih et al. 2005). Neben Unterschieden in der Gewebepräparation, der benutzten Microarray-Plattform und

Datenanalyse ist dieses Phänomen sicherlich auch durch nicht völlig identische Fragestellungen bedingt. Ein Vergleich der in dieser Arbeit gefundenen 516 putativen Markergene mit den von Bertucci et al. (2004) und Wang et al. (2004b) benutzten Expressionssignaturen ergab 12 bzw. gar keine gemeinsamen Sequenzen (Daten nicht gezeigt). Auch die Schnittmengenbildung zwischen den 516 putativen Markergenen und 39 allgemeinen Faktoren, wie z.B. *p53* oder *DCC*, deren genauer prognostischer Wert derzeit noch nicht abschließend beurteilt ist (Abschnitt 3.1.3), führte lediglich zu 4 gemeinsamen Transkripten (Tab. 15). Damit sind die allgemeinen Faktoren quasi kein Bestandteil der in dieser Arbeit ermittelten prognostischen Signatur. Die zur Testung dieser 39 Transkripte erstellten Konditions-Baumdiagramme mit falschen bzw. nicht vollständig auflösenden Gruppenzuordnungen zeigen jedoch klar, dass die allgemeinen Faktoren keine alternative prognostische Signatur innerhalb der verwendeten Patientenkohorte darstellen. Sie werden hinsichtlich der Einordnung der 3 Gruppen Healthy, Low Risk and High Risk eindeutig von den hier gefundenen 516 Sequenzen übertroffen.

Die Verifizierung von Expressionssignaturen zur Diskriminierung verschiedener Konditionen (wie z.B. Tumor- und Normalgewebe) mithilfe eines zweiten Verfahrens (wie z.B. hierarchischem Clustern) am ursprünglichen Patientenkollektiv stellt eine verbreitete Vorgehensweise dar. Daran anschließen sollte sich aber eine zusätzliche Validierung an einem neuen Patientenkollektiv – idealerweise mittels alternativer Methoden, wie in dieser Arbeit durch qPCR und *in situ*-Hybridisierung realisiert. Die Überprüfung einer identifizierten Expressionssignatur an einer unabhängigen Kohorte fehlt allerdings teilweise in Veröffentlichungen, wie z.B. bei Frederiksen et al. (2003).

Die Microarray-Befunde dieser Arbeit konnten mit *REG1A*, *CLDN8* sowie *AQP8*, *RAB27B* und *SERPINE2* (Tab. 18) in 5 von 10 Fällen (Transkripten) via qPCR bestätigt werden. Hinsichtlich der Validierung von Microarray-Daten per qPCR finden sich in der Literatur unterschiedliche Angaben. Rajeevan et al. (2001) konnten in Keratinozytenmaterial von 24 überprüften Genen 17 (71 %) in der qPCR verifizieren. In einer anderen Studie, welche anstatt gespotteter Microarrays GeneChips von Affymetrix verwendete, ergab die Analyse von pädiatrischen Hirntumor- und Knochenmarkproben sowie von sechs Zelllinien eine Übereinstimmung von 67 % (32 Gene aus 48) (Dallas et al. 2005). Hingegen konnten Chiu et al. (2005) lediglich 40 % (8 Gene aus 20) der in cDNA-Chip-Experimenten überexprimierten Transkripte via qPCR bestätigen. In der letztgenannten Arbeit wurden jedoch anstelle von Kulturzellen ausschließlich Gewebeproben von Patienten verwendet und für die Validierung weitere Individuen mit eingeschlossen. Bei Verwendung von Patientenmaterial erscheint eine

reduzierte Übereinstimmung von Microarray- und qPCR-Daten wegen interindividueller Unterschiede durchaus plausibel.

Der Befund, dass die Expressionsprofile der hier per GeneChip untersuchten Kolontumoren Aufschluss über eine später stattfindende bzw. unterbleibende Metastasierung (High Risk/Low Risk) geben konnten, stützt die Hypothese, wonach das Metastasierungspotenzial schon sehr früh während der Tumorigenese determiniert wird (Bernards und Weinberg 2002). Der vorherrschenden Lehrmeinung zufolge sind hingegen nur wenige Zellen eines Primärtumors durch klonale Selektion zur Metastasierung befähigt. Das erklärt allerdings nicht befriedigend, weshalb es überhaupt zu einer Filialisierung kommt. Denn die Erfolgsquote individueller Tumorzellen Tochtergeschwülste auszubilden ist, z.B. infolge hämodynamischer Kräfte (Weiss et al. 1992), gering (Tarin et al. 1984). Darüber hinaus könnten wohl kaum Aussagen über das Metastasierungsverhalten eines Tumors getroffen werden, wenn lediglich ein kleiner Bruchteil der Zellen zur erfolgreichen Absiedlung in fremde Organe befähigt wäre. In diesem Fall würde ein metastasierungsspezifisches Expressionsprofil durch die Genexpression der Mehrheit der Tumorzellen überdeckt. Microarray-Analysen haben aber bereits die expressionsmäßige Ähnlichkeit von metastasierten Primärtumoren und den korrespondierenden Fernmetastasen gezeigt (Ramaswamy et al. 2003; Weigelt et al. 2003). Diese Befunde legen nahe, dass die Fähigkeit zur Metastasierung eine von vornherein vorhandene Eigenschaft eines Tumors darstellt und weniger durch klonale Selektion bestimmt wird. Damit scheint eine Expressionsprofilierung in frühen Krebsstadien durchaus für eine klinische Prognosenstellung geeignet.

Im Folgenden werden die Validierungsbefunde für die Gene *CLDN8*, *REGIA* und *CCR3* eingehender bewertet. Hierbei sollen auch bereits bekannte Details der jeweiligen Genfunktion Berücksichtigung finden.

Die aus den DNA-Chip-Experimenten evidente Unterexpression von *CLDN8* im Tumor konnte in der qPCR vollends bestätigt werden. Claudine (*lat.* claudere = verschließen) sind ein essenzieller Bestandteil der Tight Junctions (*lat.* Zonula occludens), welche eine Form der Zell-Zell-Adhäsion vermitteln. Während Adherens Junctions und Desmosomen eine mechanische Verbindung benachbarter Epi- und Endothelzellen bewirken, dienen die Tight Junctions der Versiegelung („Sealing“) des interzellulären Raums (Schneeberger und Lynch 1992; Gumbiner 1993). Sie fungieren dabei nach Tsukita et al. (2001) und Chiba et al. (2003) als:

1. Barriere zur Beschränkung eines parazellulären Stofftransports (gelöste Substanzen können entweder durch Transportermoleküle in der Zytoplasmamembran

(transzellulär) oder durch Passage der Zellzwischenräume (parazellulär) von einem Körperkompartiment in das nächste gelangen (Spring 1998)).

2. Schranke zur Hemmung der Entmischung apikaler (beim Kolorektum: lumenseitiger) und basolateraler (der Basalmembran zugewandter) Membranproteine und Lipide durch laterale Diffusion, wodurch die Zellpolarität mit aufrechterhalten wird.
3. Andockstelle für zytoskeletale Moleküle und Signalproteine.

Die Tight Junctions besitzen eine Dicke von etwa 10 nm und bestehen aus folgenden Proteinen:

1. Claudine mit einer Masse von 22 – 27 kDa, welche stets 4 Transmembrandomänen und 2 extrazelluläre schleifenförmige Domänen aufweisen (Morita et al. 1999).
2. Occludin (Furuse et al. 1993).
3. Junctional Adhesion Molecule (Martin-Padura et al. 1998).

Die genaue stöchiometrische Zusammensetzung der Tight Junctions ist bislang unbekannt, die Claudine werden jedoch als Rückgrat („Backbone“) der Tight Junctions erachtet (Furuse et al. 1998), da diese auch ohne Occludin konstituiert werden können (Saitou et al. 1998). Zur Ausbildung der Tight Junctions interagieren die Claudine zweier benachbarter Zellen in homo- oder heterotypischer Weise (Furuse et al. 1999; Tsukita und Furuse 2000). Darüber hinaus scheinen sie auch für die Bildung von Poren innerhalb der Tight Junctions verantwortlich zu sein (Simon et al. 1999), indem bestimmte Claudine keine Verbindung mit Claudinen in der gegenüberliegenden Zellmembran eingehen (Tsukita und Furuse 2000). Diese Poren sind ladungs- und molekularmassenselektiv (Gumbiner 1993; Turner et al. 1997), erlauben also den parazellulären Flux bestimmter Substanzen. Derzeit sind für den Menschen 23 verschiedene Claudine beschrieben (Katoh und Katoh 2003). Die Multigenfamilie ist auf verschiedenen Chromosomen kodiert und wird gewebespezifisch exprimiert (Morita et al. 1999). Oft werden mehr als 2 Claudine pro Zelltyp gebildet (Furuse et al. 1999). Dabei scheint die Festigkeit der Tight Junctions durch den Claudin-Typ und das Mischungsverhältnis verschiedener Claudine beeinflusst zu werden (Tsukita und Furuse 2000). Die Proteine ZO-1, ZO-2 und ZO-3 (Zonula occludens 1/2/3) interagieren von der zytoplasmatischen Seite mit den Carboxy-Termini der Claudine (Itoh et al. 1999) und stellen durch gleichzeitige Wechselwirkung mit Aktin eine Verbindung zum Zytoskelett her (Itoh et al. 1997; Fanning et al. 1998). Darüber hinaus können sich viele weitere Proteine, wie z.B. das Tumorsuppressorprotein PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog) (Wu et al. 2000), an den Tight Junction-Komplex anlagern.

Im Zusammenhang mit dem Auftreten von Tumoren wird eine Deregulation von Claudinen erst seit fünf Jahren beschrieben. Anfang 2006 (21. Januar) waren in der Literaturodatenbank des NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed) lediglich 44 Publikationen mit tumorbiologischem Inhalt (MeSH-Term „Neoplasms“) und dem Wort „Claudin“ im Titel registriert. Besonders oft wurden CLDN1, CLDN3, CLDN4 und CLDN7 mit Krebserkrankungen wie Brust-, Eierstock-, Pankreas-, Magen-, und kolorektalen Karzinomen assoziiert. Paradoxe Weise wird dabei sowohl Unter- als auch Überexpression der Claudine berichtet. So wurde für das Mammakarzinom eine Mindereexpression von CLDN1 und CLDN7 gefunden (Kramer et al. 2000; Kominsky et al. 2003), wohingegen für das Pankreaskarzinom eine Überexpression von CLDN4 (Michl et al. 2001) und für das kolorektale Karzinom mehrheitlich eine erhöhte Expression von CLDN1, CLDN3 und CLDN4 dokumentiert ist (Miwa et al. 2000; de Oliveira et al. 2005). Zunächst ist eine *Claudin*-Unterepression im Tumor eingängiger, da sich Karzinomzellen durch einen Polaritätsverlust auszeichnen und eine herabgesetzte Zell-Zell-Adhäsion eine Prämisse der Metastasierung darstellt. Auch dürfte eine erhöhte Permeabilität des interzellularen Raums die Diffusion von Nährstoffmolekülen zum Tumor erleichtern (Morin 2005). Jedoch könnten die Tight Junctions auch bei einer erhöhten Bildung von *Claudin*-mRNA durch posttranslationale Ereignisse in ihrer Funktion beeinträchtigt werden. So ist beispielsweise die Lockerung der Tight Junctions nach Phosphorylierung von CLDN3 (D'Souza et al. 2005) und CLDN5 (Soma et al. 2004) beschrieben.

CLDN10 wurde bereits als Marker für das progressionsfreie Überleben von Patienten mit Leberzellkarzinom vorgeschlagen (Cheung et al. 2005).

CLDN8 (21q22.11) besitzt eine Länge von 225 Aminosäuren und wurde bisher überhaupt nicht mit Neoplasien in Verbindung gebracht. Im Menschen ist nur eine Expression in der Epidermis beschrieben (Brandner et al. 2002). In der Maus wurde CLDN8 hingegen auch in Teilen des Innenohrs (Kitajiri et al. 2004) sowie in den Henle-Schleifen, distalen Tubuli und den nachgeschalteten Harnsammelrohren (Niere) via Immunfluoreszenz (Kiuchi-Saishin et al. 2002; Li et al. 2004) detektiert. Da der aufsteigende dicke Schenkel der Henle-Schleife als vollständig wasserimpermeabel gilt, müssen hier die Tight Junctions zur Verhinderung einer parazellulären H₂O-Passage besonders fest ausgeprägt sein. Im Zellkultursystem konnte nach Induktion der Expression von *CLDN8* eine reduzierte parazelluläre Permeabilität für Protonen (H⁺), ein- und zweiwertige Kationen, Ammonium (NH₄⁺) und Bikarbonat (HCO₃⁻) gezeigt werden (Yu et al. 2003; Angelow et al. 2006). Physiologischerweise ist auch eine Abdichtung des interzellulären Raums des Dickdarmepithels unabdingbar, da es zu keinem Rückfluss der

resorbierten Elektrolyte kommen darf. Die in dieser Arbeit gefundene prominente Unterexpression von *CLDN8* im kolorektalen Karzinom passt zur generell beobachtbaren Entdifferenzierung von Krebszellen sowie zur Tatsache, dass für die Invasion fremder Gewebe die Zelladhäsion herabgesetzt werden muss. So zeigten Patienten mit besonders geringer *CLDN8*-Expression im (den Tumor umgebenden) Normalgewebe eine signifikant häufigere Invasion der Lymphgefäße (L1). Überdies könnte eine Lockerung der Tight Junctions das Eindringen von Darmbakterien in die Blutbahn erleichtern und somit die bei einem Teil der Patienten auftretende Sepsis erklären. Allerdings ist – wie bereits oben besprochen – für eine Reihe von Claudinen auch eine Überexpression im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen beschrieben.

Eine Korrelation mit dem Patientenüberleben oder klinischen Parametern und der Expression von *CLDN8* konnte hier mit Ausnahme der Lymphgefäßinvasion nicht demonstriert werden. Dies könnte in der Richtung der *CLDN8*-Regulation begründet sein. Möglicherweise ist *CLDN8* in Patienten mit besonders infaustem Verlauf (N+ M1) in Wirklichkeit schon stärker unterexprimiert als in Individuen mit günstigem Krankheitsausgang, jedoch wegen des ohnehin schon geringen Expressionsniveaus nicht zu einer Diskriminierung geeignet. Generell dürften sich überexprimierte Gene, wie z.B. *REGIA*, wegen der leichteren Detektierbarkeit besser als prognostische Marker eignen als unterexprimierte Transkripte, wie *CLDN8* oder *AQP8*. Nicht umsonst zeigen alle in der klinischen Diagnostik gängigen Tumormarker, wie z.B. CEA oder CA-19-9, bei einem Anstieg (Lamerz et al. 2001) und nicht bei einem Abfall eine Tumorerkrankung oder -progression an. Dies bedeutet nicht, dass *CLDN8* keine tumorbiologische Relevanz besitzt, sondern zeigt lediglich die Limitation unterexprimierter Moleküle hinsichtlich einer prognostischen Verwertbarkeit auf. Da sich das *CLDN8*-Niveau bezogen auf gesunde kolorektale Mukosa bereits in Normalgewebe von Tumorpatienten signifikant erniedrigt darstellte, könnte *CLDN8* aber ein Marker von prämaligmem Risikoepithel sein (s. hierzu auch Diskussionsabschnitt für das Gen *REGIA*).

Eine in verschiedenen Darmbereichen differenzielle Expression ist bislang für kein Mitglied der Claudine dokumentiert, stellt aber für Gene im Allgemeinen ein bekanntes Phänomen dar. Der hier demonstrierte Anstieg der *CLDN8*-Expression vom Kolon hin zum Rektum war nur in Normalgewebe signifikant. Für Tumorproben manifestierte sich lediglich eine Tendenz; eventuell wegen des in kolorektalen Karzinomen insgesamt sehr niedrigen *CLDN8*-Niveaus bei dem geringe Expressionsveränderungen schwer nachzuweisen sind.

Die TMA-basierten *in situ*-Hybridisierungen für *CLDN8* ergaben zwar eine ausschließliche Färbung von normalen Epithelzellen bzw. Tumorparenchym, jedoch zeigten Tumorstanzen

im Allgemeinen ein intensiveres Signal als Normalgewebe-Cores. Dies galt sowohl für beide *in situ*-Sonden (ICLD-1 und ICLD-2) als auch für die beiden benutzten TMA-Serien („Kolon M0/1“ und „G2A/G2B“) und steht im Widerspruch zu den Ergebnissen des Taqman Assays, wonach *CLDN8* einem äußerst prominenten Expressionsrückgang im Karzinomstadium unterliegt. Die Methode der *in situ*-Hybridisierung ist primär zur Lokalisation von Transkripten konzipiert; allerdings sollten die Färbungen wenigstens tendenziell den Resultaten der qPCR entsprechen.

Da für den Menschen insgesamt 23 verschiedene Claudine bekannt sind und oft auch eine Überexpression von Claudinen in Tumoren berichtet wird, könnte man eine Kreuzreaktion der verwendeten *in situ*-Sonden mit einer weiteren *CLDN*-mRNA neben *CLDN8* vermuten. Jedoch ergab die Analyse der Sondensequenzen über das Basic Local Alignment Search Tool (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) keine Homologien zu anderen humanen Claudinen. Das nächsthomologe Protein ist *CLDN17* (Katoh und Katoh 2003), zu welchem auf Nukleinsäureebene 65 % Sequenzhomologie bestehen. Eine etwaige Kreuzreaktivität der *in situ*-Sonden würde überdies nicht den geringen Anteil färbungspositiver Normalgewebe-Cores erklären. Möglicherweise ist es zu einer partiellen RNA-Degradierung in den Gewebestanden gekommen. Ein durch den Paraffinierungsprozess bedingter Abbau von RNA-Molekülen in TMAs wurde bereits vermutet (Hoos und Cordon-Cardo 2001). Dem widerspricht allerdings, dass die *in situ*-Hybridisierungen für *REGIA* an den gleichen TMA-Serien plausible Ergebnisse erbrachten, eine Paraffin-assoziierte Degradation aber sequenzspezifisch ablaufen müsste. Außerdem zeigten auch Gefrierpräparationen von Mock- und *CLDN8*-Transfektanten keinen deutlichen Intensitätsunterschied in der *in situ*-Hybridisierung (Daten im Ergebnisteil nicht gezeigt). Die Integrität der *in situ*-Sonden wurde wiederum durch Positivkontrollen und die z.T. gefärbten Gewebestanden belegt.

Die beobachtete Minderexpression von *CLDN8* in kolorektalen Karzinomzellen ist nicht durch Hypermethylierung bedingt, wie die hier durchgeführten Zellkulturversuche mit der demethylierenden Substanz 5-AzaC ergaben. Bislang ist unter den Claudinen nur für *CLDN7* eine Repression durch einen Methylierungsmechanismus analysiert und nachgewiesen (Kominsky et al. 2003). Die Hypermethylierung von CpG-reichen Promoterregionen (DNA-Abschnitte mit häufigem Vorkommen von Cytidin-Guanosin-Dinukleotiden) stellt eine häufige Ursache für die Reprimierung von Genen in Tumoren dar. Allerdings spielt bei der epigenetischen Repression auch die Deazetylierung von Histonen eine Rolle (Baylin 2005). Inwiefern die Reduktion der *CLDN8*-Expression auf letzterem Mechanismus, Mutationen in der DNA oder einem veränderten Spektrum an Transkriptionsfaktoren beruht, bleibt an dieser

Stelle unklar. Für *CLDN16* ist eine Punktmutation in Patienten mit Hypomagnesiämie beschrieben. Da diese jedoch innerhalb des ORFs lokalisiert ist, bewirkt sie keine Hemmung der Genexpression, sondern ein in seiner Funktion beeinträchtigtes *CLDN16* (Müller et al. 2003). Hingegen ist für *CLDN1*, *CLDN2*, *CLDN3* und *CLDN4* eine Regulation durch EGF (Epidermal Growth Factor) im Zellkultursystem (Singh und Harris 2004) sowie für *CLDN18* durch den Transkriptionsfaktor T/EBP/NKX2.1 in Mausembryonen beschrieben (Niimi et al. 2001).

Der im Adhäsionstest demonstrierte nicht vorhandene Einfluss der *CLDN8*-Expression auf die zelluläre Haftung an Kollagen und Fibronectin erscheint plausibel, da den Claudinen im Allgemeinen eine Rolle in der Zell-Zell-, nicht aber Zell-Matrix-Adhäsion zugeschrieben wird. Eine Abklärung für *CLDN8* erschien aber insofern sinnvoll, dass bislang keinerlei Veröffentlichungen zum tatsächlichen Einfluss von Claudinen auf die Zell-Matrix-Adhäsion existieren.

Der Aggregationstest ergab auch keinen Zusammenhang zwischen der *CLDN8*-Expression und dem homotypischen Adhäsionsverhalten kolorektaler Karzinomzellen. Möglicherweise ist für eine Metastasierung die Unterexpression von *CLDN8* schon ein notwendiges, bloß nicht hinreichendes Kriterium, da die Zell-Zell-Adhäsion neben den Tight Junctions ebenso von Adherens Junctions und Desmosomen bestimmt wird. So konnte für *Cldn1*, *Cldn2* und *Cldn3* zwar eine aggregationsfördernde Wirkung in murinen Kulturzellen gezeigt werden, jedoch war diese schwächer ausgeprägt als jene von E-Cadherin (Kubota et al. 1999). Dies passt zu der Annahme, wonach die Hauptfunktion der Tight Junctions in einer Abdichtung des interzellulären Raums besteht.

Im Wound-Healing Assay konnte kein Einfluss der *CLDN8*-Expression auf die Zellmigration festgestellt werden. Man hätte vermuten können, dass eine Mindereexpression von *CLDN8* wegen der Funktion der Claudine, benachbarte Zellen miteinander zu verbinden, einen positiven Effekt auf die Zellmotilität besitzt. Ein solches Resultat wäre auch deshalb plausibel, weil Krebszellen zur Absiedlung in entfernte Körperregionen ein gesteigertes Migrationsverhalten aufweisen müssen und sich *CLDN8* gerade im Tumor schwächer exprimiert darstellte. Für *CLDN4* konnte bereits eine negative Korrelation der Genexpression mit der Migration von humanen Magenkarzinomzellen demonstriert werden (Mima et al. 2005). In humanen Eierstockkrebszellen bewirkte allerdings eine Überexpression von *CLDN4* (und *CLDN3*) eine verstärkte und nicht reduzierte Zellmigration (Agarwal et al. 2005). Diese konträren Befunde könnten daher rühren, dass in Magen- und Ovarzellen neben *CLDN4* unterschiedliche Typen von Claudinen exprimiert werden. Claudine können zwar eine

interzelluläre Versiegelung bewirken, andererseits aber auch die Ausbildung von Poren verursachen, indem bestimmte Claudine, wie z.B. CLDN1 und CLDN2 (Tsukita und Furuse 2000), nicht miteinander interagieren. Deshalb könnte eine Überexpression von *CLDN4* in Eierstockzellen über eine massive Porenbildung einer gesteigerten Migration zuträglich sein. In Übereinstimmung mit den Microarray-Resultaten fungierte das Gen *REGIA* in den qPCR-Analysen als signifikanter prognostischer Marker. Humanes *REGIA* (2p12) ist ein sezerniertes Protein von 166 Aminosäuren Länge und gehört zur Superfamilie der Kalzium-abhängigen (C-Typ) Lektine. Im Menschen sind bislang 4 verschiedene *REG*-Gene bekannt: *REGIA*, *REG1B*, *REG3A* und *REG4* (Hartupee et al. 2001). *REGIA* wurde durch Screenen einer cDNA-Bibliothek von regenerierenden Inselzellen aus dem Pankreas der Ratte identifiziert (Terazono et al. 1988). Es wurde zunächst mit der Regeneration von β -Zellen des Pankreas und der Remission von Diabetes mellitus in Verbindung gebracht (Watanabe et al. 1994; Gross et al. 1998). Nachfolgend wurde *REGIA* auch mit Magenkrebs (Kadowaki et al. 2002) assoziiert und zeigte sich in kolorektalen Karzinomen überexprimiert (Zenilman et al. 1997; Rechreche et al. 1999).

In der vorliegenden Arbeit konnte ein schrittweiser Konzentrationsanstieg der *REGIA*-mRNA von normalem kolorektalem Gewebe über das Adenomstadium hin zu Tumoren kolorektaler Karzinompatienten demonstriert werden. Dies stimmt mit zuvor in der Literatur beschriebenen Ergebnissen aus Northern Blot (Rechreche et al. 1999) und Gel-basierter PCR (Macadam et al. 2000) überein, wonach *REGIA* im kolorektalen Karzinom überexprimiert vorliegt. Im Gegensatz dazu, waren Violette et al. (2003) nicht im Stande eine Überexpression von *REGIA* in 22 Tumorproben aus unvorbehandelten Patienten mit kolorektalem Karzinom in der qPCR zu reproduzieren. Bemerkenswerterweise konnten Violette et al. (2003) ebenfalls kaum *REG3A*-mRNA detektieren, welche sich in der Studie von Macadam et al. (2000) zusammen mit *REGIA* als prognostischer Marker verwerten ließ.

In Adenomgewebe ist die Expression von *REGIA* bereits per Immunhistochemie visualisiert worden (Zenilman et al. 1997). Bislang war jedoch die *REGIA*-Expression in Adenomen nicht mit derjenigen in Normalgewebe verglichen worden. Da Adenome als benigne Präkursoren des kolorektalen Karzinoms gelten (Muto et al. 1975), ist ein Anstieg der *REGIA*-Expression bereits im Adenomstadium eingängig.

Die Zunahme der Expression setzte sich aber selbst im Karzinomstadium in Patienten mit infaustem Verlauf fort, indem Individuen mit starker *REGIA*-Expression eine signifikant reduzierte Wahrscheinlichkeit für ein Tumor-abhängiges sowie progressionsfreies Überleben besaßen. Für das Gesamtüberleben manifestierte sich lediglich ein Trend. Dieser Überlebens-

typ schließt auch Individuen mit fehlender Information über die genaue Todesursache (eventuell nicht immer Krebs) mit ein. Daher ist es nicht erstaunlich, dass für das Gesamtüberleben eine Signifikanz nicht vollständig erreicht wurde. Bezüglich des progressionsfreien Überlebens fungierte *REGIA* bereits in einer anderen, auf konventioneller PCR beruhenden Studie, als Prädiktor für Patienten der UICC-Stadien I und II (Macadam et al. 2000). Im Gegensatz dazu, basiert die hier präsentierte Analyse auf allen vier UICC-Stadien und ein Ausschluss der Stadien III und IV führte zum Signifikanzverlust. Dieser Effekt ist möglicherweise in der Größe des Patientenkollektivs begründet und würde nach Fallzahlerweiterung verschwinden. Während ein verbessertes Staging für nicht-metastasierte Patienten (UICC I+II) zur Verhinderung einer Unterbehandlung von großem Interesse ist, können die eigenen Befunde auch so interpretiert werden, dass *REGIA* selbst in späten Stadien (UICC III+IV) zur Risikostratifizierung herangezogen werden kann.

Da *REGIA* nicht nur in Adenomen, sondern bereits im (den Tumor umgebenden) Normalgewebe relativ zu gesunder kolorektaler Mukosa ohne CED erhöht war, könnte *REGIA* nicht nur für die Prognosenstellung nützlich sein, sondern gleichzeitig einen Marker von prä-malignem Epithel darstellen. Ein solcher Risikomarker könnte bei der Untersuchung von endoskopisch abgetragenen Gewebematerial immer dann von Interesse sein, wenn laut konventioneller Mikroskopie kein pathologischer Befund vorliegt.

Es muss herausgestellt werden, dass jegliches Normalgewebe mit neoplastischen Anteilen von der qPCR-Analyse eliminiert worden ist. Deshalb kann der Anstieg der *REGIA*-Expression in den Normalgewebeproben nur durch

(A) Einwanderung von Leukozyten oder

(B) mikroskopisch nicht erfassbare molekulare Alterationen verursacht worden sein.

Möglichkeit (A) kann ausgeschlossen werden, da in der *in situ*-Hybridisierung keine *REGIA*-Expression in immunologischen Zellen und in der qPCR keine Korrelation von Normalgewebeexpression und Leukozytenanteil nachgewiesen werden konnte. Auch die *in situ*-Hybridisierungsdaten von Macadam et al. (2000) ohne größere Färbung von immunologischen Zellen sprechen gegen eine entzündliche Reaktion als Ursache der *REGIA*-Expression. Was (B) anbelangt, so ist eine veränderte Genexpression von peritumoralem Normalgewebe kein unbekanntes Phänomen (Chen et al. 2004). Deshalb könnte die *REGIA*-Expression zur molekularen Diagnose sehr früher Tumorstadien dienen, welche sich den konventionellen histopathologischen Nachweismethoden entziehen. Für eine Ableitbarkeit von Tumoreigenschaften aus der peritumoralen Genexpression spricht auch, dass bereits das Normalgewebe von fernmetastasierten Patienten tendenziell erhöhte *REGIA*-Level aufwies.

Außerdem verdeutlicht die Überexpression von *REG1A* in mikroskopisch normaler Mukosa die Wichtigkeit der richtigen Kontrollgewebeauswahl für Expressionsanalysen an Tumoren. Es sollte stets beachtet werden, dass Gewebeproben aus der unmittelbaren Nähe von Neoplasien – obwohl mikroskopisch unauffällig – auf molekularer Ebene bereits verändert sein könnten.

Aufgrund der Überexpression von *REG1A* im Karzinomstadium hätte man in Fernmetastasen eine noch höhere Expression erwarten können. Umgekehrtes ist allerdings laut qPCR der Fall. *REG1A* ist möglicherweise lediglich für den Metastasierungsprozess bedeutsam, aber nicht für das sich anschließende Metastasenwachstum. D.h. nach der erfolgreichen Ausbildung von Tochtergeschwülsten vermittelt *REG1A* womöglich keinen selektiven Vorteil mehr, da die externen Bedingungen anderer Körperregionen sich von denen am Entstehungsort des Primärtumors unterscheiden dürfen. Eventuell stellt *REG1A* in Metastasen sogar einen Wachstumsnachteil dar, sodass sich letztendlich Tumorzellen mit schwacher *REG1A*-Expression entsprechend dem darwinistischen Selektionsprinzip zahlenmäßig durchsetzen.

Eine in verschiedenen Darmabschnitten differenzielle Genexpression wurde bereits für normales und maligne entartetes Kolongewebe berichtet. Beispielsweise liegt das Tumorprotein p53 in Rektumkarzinomen im Vergleich zu Neoplasien des Kolons erhöht vor (Kapiteijn et al. 2001). EGRF (Epidermal Growth Factor Receptor) und PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) stellten sich hingegen in rechtsseitigen Kolonkarzinomen (Zäkum, Colon ascendens, proximale $\frac{2}{3}$ des Colon transversum) bezogen auf linksseitige (distales $\frac{1}{3}$ des Colon transversum, Colon descendens, Sigmoideum und Rektum) stärker exprimiert dar (Fric et al. 2000). *REG1A* und *REG3A* scheinen in rektalen Tumoren häufiger als in Kolonkarzinomen exprimiert zu sein (Macadam et al. 2000). Das dürfte die in dieser Arbeit gefundene schwächere Expression von *REG1A* im Sigmoideum im Vergleich zu rektalen Tumoren widerspiegeln.

Die hier präsentierten *in situ*-Hybridisierungen auf TMA-Basis ergaben eine ausschließliche Expression von *REG1A* in den Karzinomzellen von Tumorproben und z.T. auch in Epithelzellen von Normalgewebe. Dies stimmt vollkommen mit bereits publizierten *in situ*-Befunden überein (Zenilman et al. 1997; Rechreche et al. 1999). Da *REG1A*-mRNA weder im Bindegewebe noch in immunologischen Zellen, welche das karzinomatöse Gewebe teilweise infiltrieren, detektiert wurde handelt, es sich sehr wahrscheinlich um einen exklusiv epithelialen Marker. In beiden kolorektalen TMA-Serien („Kolon M0/1“ und „G2A/G2B“) konnte die in den GeneChip-Experimenten und der qPCR gefundene erhöhte Expression von *REG1A* im Tumor reproduziert werden. Darüber hinaus zeigten sich auch signifikant positive

Korrelationen zwischen *REGIA*-Färbung und dem Vorhandensein von Lymphknoten-Metastasen sowie dem Tumorstadium, welche in der qPCR nicht evident gewesen waren.

Die *in situ*-Hybridisierung ist primär ein Verfahren zur Visualisierung der räumlichen Verteilung der Genexpression und hinsichtlich einer mRNA-Quantifizierung der qPCR unterlegen. Jedoch passt die in der *in situ*-Hybridisierung gefundene gesteigerte Expression von *REGIA* zum Auftreten von Lymphknotenmetastasen und ausgedehnteren Primärtumoren, da die *REGIA*-Abundanz gemäß Taqman Assay mit zunehmender Malignität ansteigt. Auch konnte anhand der TMA-Daten eine graphisch den Taqman-Ergebnissen entsprechende Kaplan-Meier Analyse für das progressionsfreie Überleben erstellt werden. Ein Zusammenhang mit Peritonealmetastasen ergab sich hingegen nur innerhalb der Magen-TMA-Serie („Magen M0/1“). Dies lässt vermuten, dass *REGIA* auch von prognostischer Bedeutung für das Magenkarzinom sein könnte. Eine Überexpression von *REGIA* in infiltrierend wachsenden Magentumoren im Vergleich zu lokal begrenzten Primärtumoren ist bereits demonstriert worden (Yonemura et al. 2003). Außerdem gingen in der vorliegenden Arbeit gesteigerte *REGIA*-Level im (den Tumor umgebenden) normalen Magengewebe mit einem graphisch deutlichen (wenn auch statistisch nicht signifikanten) reduzierten progressionsfreien Überleben einher. Dies ist wiederum eine Bestätigung dafür, dass *REGIA* bereits in peritumorale Mukosa überexprimiert vorliegt. Insgesamt spiegelten die *in situ*-Hybridisierungen die Ergebnisse der qPCR wider, waren jedoch als prognostisches Werkzeug dem Taqman Assay deutlich unterlegen.

Eine antiapoptotische Wirkung von *REG1A* könnte den Überlebensnachteil von Patienten mit starker *REGIA*-Expression erklären. In solchen Individuen wären die Tumorzellen besonders vor Apoptose geschützt und könnten sich möglicherweise deshalb besser im Körper ausbreiten. So korrelierten in dieser Arbeit erhöhte *REGIA*-Level signifikant mit dem Auftreten von Peritonealmetastasen (welche die Überlebenszeit i.d.R. besonders stark verkürzen). Jedoch war sowohl im Caspase-Assay als auch bei der mikroskopischen Lebendzellzahl-Bestimmung kein negativer Effekt von *REG1A* auf die PTX-induzierte Apoptose zu erkennen. Im fluorimetrischen Test schien *REG1A* die Apoptose sogar tendenziell zu verstärken. Damit widersprechen die eigenen Befunde zuvor generierten Ergebnissen, wonach rekombinantes *REG1A*-Protein einen signifikanten Apoptose-inhibierenden Effekt auf kolorektale Karzinomzellen besitzt (Dieckgraefe et al. 2002).

EXTL3 (8p21) wurde als Rezeptor von *REG1A* nach Durchmustern einer cDNA-Bibliothek mit *Reg1*-Protein identifiziert (Kobayashi et al. 2000). Humanes *EXTL3* ist ein 919 Aminosäuren umfassendes Transmembranprotein. Neben *EXTL3* sind derzeit noch 4 weitere

EXT-Proteine bekannt. Neben Tendenzen einer Überexpression in Tumoren im Vergleich zu Normalgewebe und in Primärtumoren mit peritonealer Filialisierung sowie einer schwächeren Expression in sigmoidalen Karzinomen als in den übrigen Abschnitten des Dickdarms, erwies sich die *EXTL3* Expression in der vorliegenden Arbeit als signifikanter Schätzer des Tumor-abhängigen Überlebens. In der Kaplan-Meier Analyse für das progressionsfreie Überleben wurde zwar keine Signifikanz erreicht (Diagramm im Ergebnisteil nicht gezeigt), jedoch verliefen die Graphen für Patienten mit hoher und niedriger *EXTL3*-Expression in deutlichem Abstand zueinander.

Im Allgemeinen werden Proteine der EXT-Genfamilie als Tumorsuppressoren erachtet (Hecht et al. 1995; Raskind et al. 1995). Allerdings fehlen für *EXTL3* bislang Befunde auf Protein- und Transkriptionsebene für eine Tumor-unterdrückende Wirkung. Obwohl die chromosomale Position von *EXTL3* im kolorektalen Karzinom oft von LOH (Loss of Heterozygosity) betroffen ist (Vogelstein et al. 1989; Arai et al. 1999), konnten Arai et al. (1999) lediglich in 1 von insgesamt 12 untersuchten kolorektalen Zelllinien eine erniedrigte *EXTL3*-Expression demonstrieren. Es existieren hingegen funktionelle Hinweise, wonach *EXTL3* die Zellproliferation in einem definierten *REG1A*-Konzentrationsbereich fördert (Kobayashi et al. 2000). In diesen Versuchen zeigten Transfektanten mit Überexpression des Ratten-Homologen von *EXTL3* ein vermehrtes Wachstum nach Behandlung mit *Reg1*-Protein. Darüber hinaus fungierte *EXTL3* als Mediator der durch $\text{TNF-}\alpha$ (Tumor Necrosis Factor- α) induzierten Aktivierung von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ (Nuclear Factor Kappa-B), der wiederum als antiapoptotischer Faktor gilt (KEGG pathway hsa04210) (Mizuno et al. 2001). Die Hypothese einer Tumorsuppressor-Funktion von *EXTL3* wird durch die hier präsentierten Daten, welche eine Überexpression von *EXTL3* in kolorektalen Karzinompatienten mit infaustem Verlauf zeigen, weiter in Frage gestellt.

Zusammen mit *REG1A* ermöglichte *EXTL3* eine sinnvolle Risikostratifizierung kolorektaler Karzinompatienten (Kaplan-Meier Analyse mit kombinierter Expression von *REG1A* und *EXTL3*). Dies suggeriert einen additiven Effekt der beiden Gene auf die Überlebensreduktion. Generell wird der klinische Verlauf stark negativ vom Auftreten von Metastasen, insbesondere Peritonealmetastasen, beeinflusst. Nach Sadeghi et al. (2000) beläuft sich die mediane Überlebenszeit kolorektaler Karzinompatienten mit Peritonealkarzinose auf lediglich 5,2 Monate. Das Auftreten von Peritonealmetastasen korrelierte wiederum positiv mit der Expression von *REG1A* und *EXTL3*. Deshalb könnte der negative Einfluss von *REG1A* und *EXTL3* auf das Patientenüberleben zumindest partiell über eine Peritonealmetastasen-

fördernde Wirkung erklärt werden. Bisher sind weder *REGIA* noch *EXTL3* mit der Bildung von Peritonealmetastasen assoziiert worden.

In jüngster Zeit wurde den Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren (HBGFs) eine Rolle bei der peritonealen Metastasierung zugeschrieben (Jayne et al. 2000; Sako et al. 2003). Das Binden der HBGFs an einen zellulären Rezeptor erfordert zusätzlichen Kontakt mit einem Heparansulfat-Proteoglykan-Korezeptor. Fehlt letzterer, ist die Bindung des HBGF lediglich von geringer Affinität (Pantoliano et al. 1994). *REGIA* und *EXTL3* könnten den Effekt der HBGFs modulieren, da *EXTL3* α 1,4-N-Azetylglykosaminyltransferase-Aktivität besitzt (Kim et al. 2001) und mit der Synthese von Heparansulfat in Verbindung gebracht wird (KEGG pathway hsa00534).

Für *CCR3* konnten die GeneChip-Daten im Gegensatz zu *REGIA* und *CLDN8* nicht via qPCR verifiziert werden. Chemokinrezeptoren (CCRs) bestehen aus sieben Transmembrandomänen und gehören in die Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (Murphy et al. 2000). Chemokine regulieren die Migration von Leukozyten und sind in entzündliche Prozesse, Infektionen und Tumorerkrankungen involviert (Luster 1998). Die Bindung eines (extra-zellulären) Chemokins an einen entsprechenden Rezeptor löst eine Signaltransduktionskaskade aus, welche zur Produktion von Inositoltriphosphat, zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumionenkonzentration (Ca^{2+}) sowie zur Aktivierung von Proteinkinasen führt. Daneben kommt es zu einer Aktivierung von kleinen (zytosolischen) G-Proteinen aus der RAS- und RHO-Familie. Die Chemotaxis der Chemokinrezeptor-tragenden Zellen resultiert letztendlich aus einer Modulierung Aktin-abhängiger Prozesse, in welche die RHO-Proteine involviert sind (Luster 1998; Horuk 2001).

CCR3 (3p21.3) besteht aus 355 Aminosäuren und bindet lediglich Chemokine, deren erstes und zweites Cystein direkt aufeinander folgen (C-C Typ). Beschriebene *CCR3*-Liganden sind RANTES (*CCL5* (Daugherty et al. 1996)), MCP-3 (*CCL7* (Ponath et al. 1996)), Eotaxin (*CCL11* (Kitaura et al. 1996)), MCP-4 (*CCL13* (Elsner et al. 1998)), Eotaxin-2 (*CCL24* (Garcia-Zepeda et al. 1996)), Eotaxin-3 (*CCL26* (Shinkai et al. 1999)) und MEC (*CCL28* (Pan et al. 2000)). Daneben kann *CCR3* als Korezeptor beim Eindringen des humanen Immundefizienz Virus Typ 1 (HIV-1) in T-Lymphozyten dienen (Choe et al. 1996). Eine Expression von *CCR3* ist vornehmlich für eosinophile und basophile Granulozyten (Combadiere et al. 1995; Ugucioni et al. 1997), Monozyten (Ghorpade et al. 1998), dendritische Zellen (Rubbert et al. 1998) sowie $\text{T}_\text{H}2$ -Lymphozyten (Sallusto et al. 1997), aber auch für Epithelzellen des Respirationstraktes (Stellato et al. 2001) gezeigt. *CCR3* ist bislang mit folgenden neoplastischen Prozessen assoziiert worden: Kutane T-Zell Lymphome

(Kleinhans et al. 2003), Morbus Hodgkin (Buri et al. 2001), Glioblastome (Kouno et al. 2004) und Nierenzellkarzinome (Johrer et al. 2005).

Nach Müller et al. (2001) könnten Chemokinrezeptoren und ihre Liganden eine bedeutende Rolle bei der organspezifischen Metastasierung spielen. Dabei wird postuliert, dass Tumorzellen bei Expression geeigneter Chemokinrezeptoren wie Leukozyten einer Chemotaxis durch Chemokine unterliegen. Beispielsweise liegt der Rezeptor CXCR4 in Mammakarzinomzellen im Vergleich zu normalem Brustgewebe überexprimiert vor. Das einzig bekannte korrespondierende Chemokin CXCL12 wird in den Lungen und im Knochenmark (Orte häufiger Metastasierung bei Brustkrebs) stark, in den Nieren (hierhin kaum Absiedlung von Brustkrebszellen) jedoch nur schwach exprimiert. Disseminierte Mammakarzinomzellen könnten also durch einen chemotaktischen Mechanismus zu Körperstellen hoher Chemokin-konzentrationen „gelockt“ werden und dort Tochtergeschwülste ausbilden. Wenngleich der Selektionsvorteil einer Chemokinrezeptor-Überexpression des Primärtumors zunächst nicht evident ist (Liotta 2001), repräsentiert das von Müller et al. (2001) vorgeschlagene Modell eventuell einen nicht allein auf Brustkrebs beschränkten Metastasierungsmechanismus. Zumindest führte die intravenöse Injektion von CXCR4-überexprimierenden Pankreas- und Melanomzellen (Murakami et al. 2002; Saur et al. 2005) zu einer signifikanten Zunahme von Lungenmetastasen im Mausmodell. Des Weiteren korrelierte in Neuroblastompatienten die CXCR4-Expression im Primärtumor signifikant mit dem Auftreten von Knochenmarkmetastasen (Russell et al. 2004). Das Chemokin/Chemokinrezeptor-Paar CCL21/CCR7 scheint hingegen die Lymphknotenmetastasierung zu fördern, wie Überexpression von CCR7 in Melanomzellen bzw. Neutralisierung von CCL21 im Mausversuch ergaben (Wiley et al. 2001). Für CCL11/CCR3 wurde ein Einfluss auf die Rekrutierung von malignen T-Zellen in die Haut vermutet (Kleinhans et al. 2003).

In der qPCR zeigte sich ein tendenzieller Rückgang der *CCR3*-Expression vom Normal- hin zum Tumorgewebe. In den Microarray-Experimenten hatte sich zwar eine milde Überexpression im Tumor angedeutet, jedoch lag der entsprechende Fold Change unter 2. Im Gegensatz dazu belief sich der Fold Change von High Risk versus Low Risk auf 5,90 (Tab. 13). Auch diese Tendenz konnte im Taqman Assay nicht bestätigt werden, da ein positiver Lymphknotenbefund und eine vorhandene Fernmetastasierung signifikant negativ mit der Expression von *CCR3* korrelierten. Für die GeneChip-Experimente wurde zwar nur Kolongewebe (Healthy/Low Risk/High Risk) und für die qPCR zusätzlich auch rektales Gewebe verwendet. Jedoch blieben die negativen Korrelationen zwischen *CCR3*-Expression

und Nodalstatus bzw. Metastasierung auch nach Ausschluss aller Rektumkarzinome signifikant.

In bisher veröffentlichten Untersuchungen zur *CCR3*-Expression in Morbus Hodgkin, Glioblastomen und Nierenzellkarzinomen ist stets eine erhöhte Expression im Tumor bzw. eine Expressionszunahme mit zunehmender Undifferenziertheit der Krebszellen beschrieben worden (Buri et al. 2001; Kouno et al. 2004; Johrer et al. 2005). Auch für alle anderen Chemokinrezeptoren wurde in Zusammenhang mit Tumoren bislang nur eine Überexpression gefunden. Lediglich für *CCR6* ist eine Unterexpression bei gleichzeitiger Überexpression von *CCR7* in Tochtergeschwülsten von Plattenepithelkarzinomen der Hals- und Kopfregion dokumentiert (Wang et al. 2004a).

Nach Kleinhan et al. (2003) dient die *CCR3*-Expression auf in die Haut migrierten malignen T-Lymphozyten möglicherweise der Retention am Einwanderungsort. Analog könnte eine starke *CCR3*-Expression von kolorektalen Karzinomzellen ein Verbleiben im Verband des Primärtumors begünstigen. Somit wären Patienten mit einer geringeren Expression von *CCR3* metastasierungsanfälliger, was den qPCR-Daten entspräche. Für einen Eintrag der *CCR3*-Expression durch Leukozyten in die untersuchten Gewebepreparationen spricht zunächst, dass der Nachweis eines T-Zell-Infiltrates mit einer verbesserten Patientenprognose einher geht (Petty et al. 2002; Funada et al. 2003; Pages et al. 2005). In diesem Fall würde eine gesteigerte *CCR3*-Expression eine erhöhte Anzahl eingewanderter Leukozyten und infolge einen protrahierten Krankheitsverlauf oder sogar eine Tumorremission anzeigen. Jedoch ergab die *in situ*-Hybridisierung an einer singulären Tumorprobe keinen *CCR3*-Nachweis in immunologischen Zellen (Daten im Ergebnisteil nicht gezeigt). Außerdem veränderte der Ausschluss von Präparaten mit größerem Leukozytenanteil die Ergebnisse der statistischen Auswertung nicht.

Da eine Expression des *CCR3*-Liganden *CCL28* in Kolongewebe beschrieben ist (Pan et al. 2000), wurde für einen Teil der Patienten auch die *CCL28*-Expression via qPCR bestimmt. Ko- oder Antiregulation mit *CCR3* könnte auf einen autokrinen Stimulationsmechanismus hinweisen. Jedoch ergab sich weder eine gleichnamige noch eine deutlich gegenläufige Regulation der beiden Gene. In Übereinstimmung mit bereits veröffentlichten Befunden (Mickanin et al. 2001; Dimberg et al. 2006) konnte eine signifikante Unterexpression von *CCL28* im Tumor nachgewiesen werden, welche sich aber nicht mit klinischen Statusgrößen korrelieren ließ.

Abschließend sollen die Microarray- und qPCR-Ergebnisse für die sieben weiteren ausgewählten Transkripte im Hinblick auf bereits veröffentlichte Befunde bewertet werden.

Jedoch waren für die beiden ESTs AI247408 und AI870708 keine Forschungsergebnisse publiziert. Für Informationen zur Genfunktion sei im Gegensatz zu *CLDN8*, *REGIA* und *CCR3* lediglich auf Tab. 14 verwiesen.

Für *AQP8* wurde bereits per *in situ*-Hybridisierung gezeigt, dass es sich um einen epithelialen Marker handelt. Des Weiteren ist eine Unterexpression von *AQP8* in kolorektalen Tumoren dokumentiert (Fischer et al. 2001). Dieser Trend zeigte sich auch in den eigenen GeneChip-Experimenten. Obwohl der Taqman Assay eine stärkere Unterexpression in späten UICC-Stadien im Vergleich zu frühen ergab, konnte die *AQP8*-Expression nicht mit klinischen Statusgrößen, wie z.B. dem Tumorstadium, korreliert werden. Allerdings war der Expressionsunterschied zwischen den Stadien UICC I+II und III+IV auch nicht signifikant. Eine weitergehende Assoziation von *AQP8* mit Krebserkrankungen existiert bislang nicht.

Für *ITGA6* haben Begum et al. (1995) bei Überexpression im Leberzellkarzinom einen tendenziell ungünstigeren klinischen Verlauf beschrieben. Auch für Mammakarzinompatienten konnten Friedrichs et al. (1995) bei *ITGA6*-Überexpression ein reduziertes Überleben beobachten. Diese Befunde stehen allerdings im Widerspruch zu Untersuchungen an Brustkrebsmaterial von Sager et al. (1993), wonach *ITGA6* bei Krankheitsprogression unterexprimiert vorliegt. Letzteres entspricht den Ergebnissen aus der eigenen qPCR, in welcher sich die *ITGA6*-Expression in kolorektalen Karzinomproben von Patienten der UICC-Stadien III+IV bzw. mit Lymphgefäßinvasion (L1) erniedrigt darstellte.

Das Gen *RAB27B* wurde – obwohl Mitglied der RAS-Onkogenfamilie (Untergruppe der kleinen GTPasen) – bisher überhaupt nicht mit neoplastischen Prozessen in Verbindung gebracht. Allerdings konnte für das Protein RAB27A, zu welchem 71 % Homologie bestehen (Chen et al. 1997), ein positiver Einfluss auf die PSA-Sekretion (Prostata-spezifisches Antigen) in Prostatakarzinomzellen demonstriert werden (Johnson et al. 2005). Die PSA-Konzentration im Serum wird in der klinischen Routine als prognostischer Marker beim Prostatakarzinom verwendet (Lieberman 2004), wobei erhöhte PSA-Level einen ungünstigen Krankheitsverlauf anzeigen (Lange et al. 1989).

SERPINE2 fand man im Pankreaskarzinom ausschließlich auf Tumorzellen beschränkt. Immunhistochemisch korrelierte die *SERPINE2*-Expression in Pankreastumoren jedoch nicht mit dem TNM-Status (Buchholz et al. 2003). Gleiches gilt für die in dieser Arbeit via qPCR untersuchten kolorektalen Karzinomproben. Nach Buchholz et al. (2003) führen subkutan applizierte *SERPINE2*-Transfektanten zu einer erhöhten lokalen Invasivität bei unverändertem Metastasierungsverhalten im Mausmodell. Dies deutet an, dass *SERPINE2* möglicherweise mehr die lokale als systemische Ausdehnung der Tumorerkrankung beeinflusst. Für den

Krankheitsverlauf und die UICC-Stadiengruppierung sind aber letztendlich die Metastasierungseigenschaften ausschlaggebend. Deshalb handelt es sich bei *SERPINE2* eventuell um keinen geeigneten prognostischen Tumormarker.

Für *TMEPAI* konnte im Prostatakarzinom eine signifikante Unterexpression bei Tumorprogression gezeigt werden (Xu et al. 2003). So ging eine erniedrigte Genexpression mit höheren T-Stadien und PSA-Serumtitern einher. Im Kolonkarzinom wiesen Brunschwig et al. (2003) hingegen über GeneChip-Messungen eine Überexpression von *TMEPAI* in Tumorproben und Metastasen nach. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit generierten Microarray-Ergebnissen. Zwar konnten Brunschwig et al. (2003) die Microarray-Daten im Northern Blot teilweise bestätigen, jedoch war eine Korrelation mit dem Tumorstadium oder Zelldifferenzierungsgrad nicht gegeben. Dies entspricht wiederum den eigenen qPCR-Daten für *TMEPAI*. Von Brunschwig et al. (2003) durchgeführte *in situ*-Hybridisierungen ergaben, dass die *TMEPAI*-Expression im Kolonkarzinom auf das Epithelgewebe beschränkt und somit Tumorzell-spezifisch ist.

Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass eine geeignete Expressionssignatur von 516 Transkripten zwischen Kolonkarzinompatienten mit unterschiedlichem klinischen Ausgang bereits zu einem Zeitpunkt diskriminieren kann, wenn laut konventioneller histopathologischer Methoden kein prognostischer Unterschied besteht. Darüber hinaus war die eigene Signatur hinsichtlich der Vorhersage des klinischen Verlaufs deutlich 39 mutmaßlichen prognostischen Faktoren aus der Literatur überlegen.

Mit *REGIA* und *EXTL3* sowie *CLDN8* und *AQP8* wurden prognostische Biomarker für das kolorektale Karzinom bzw. im Tumorstadium stark unterexprimierte Gene identifiziert. Gleichzeitig verdeutlichen die präsentierten Befunde die Wichtigkeit der Validierung von GeneChip-Ergebnissen durch alternative Methoden wie qPCR und *in situ*-Hybridisierung.

Offensichtlich eignet sich die Microarray-Technologie gut zum globalen Screenen nach prognostisch bedeutsamen Sequenzen. Für die klinische Routine der Zukunft jedoch, wenn lediglich ein ausgewählter Satz zuvor in der Forschung identifizierter Gene bestimmt werden soll, ist die qPCR wegen ihrer größeren Genauigkeit der Microarray-Technik möglicherweise überlegen (Bustin und Dorudi 2004). Bevor *REGIA* und *EXTL3* zu einem solchen Einsatz gelangen, sollte ihre Funktion und Wechselwirkung eingehender abgeklärt werden. Überdies wäre zu überprüfen, ob sich *REGIA*- und *EXTL3*-mRNA aus Patientenblut ebenfalls als prognostische Marker eignen. Ein solcher Schnelltest wäre von besonderem klinischen Interesse und mRNA aus Blut ist bereits als nutzbarer Tumormarker beschrieben (Sugita et al. 2002).

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob sich der klinische Verlauf von Dickdarmkrebspatienten anhand der Genexpression genauer prognostizieren lässt als dies über die konventionellen histopathologischen Methoden derzeit möglich ist.

In Microarray-Experimenten wurden insgesamt 516 prognostisch relevante Transkripte identifiziert. Sie erlaubten *in silico* die ordnungsgemäße Diskriminierung von histopathologisch ähnlichen Kolonkarzinompatienten mit divergierendem klinischen Verlauf.

10 ausgewählte Transkripte wurden über quantitative Real-Time PCR an bis zu 75 kolorektalen Karzinompatienten validiert. In der Hälfte der Fälle konnten die GeneChip-Befunde bestätigt werden. Die beiden Gene *Claudin 8* und *REGIA* wurden per Tissue Microarray-basierter *in situ*-Hybridisierung und über funktionelle Assays eingehender untersucht.

Claudin 8, dem eine Rolle bei der Abdichtung des interzellulären Raumes zugeschrieben wird, zeigte eine äußerst prominente Minderexpression in kolorektalen Karzinomen. Selbst im den Tumor umgebenden Normalgewebe lag *Claudin 8* im Vergleich zu gesunder Mukosa signifikant erniedrigt vor. Während die genaue Lokalisation der *Claudin 8*-Expression nicht abschließend geklärt werden konnte, konnte gezeigt werden, dass *Claudin 8* im Tumor nicht durch DNA-Methylierung reprimiert wird und keinen wesentlichen Einfluss auf die Zell-Adhäsion sowie das Migrationsverhalten besitzt.

REGIA lag in kolorektalen Karzinomen stark überexprimiert vor, zeigte aber bereits signifikant erhöhte Expressionslevel in Adenomen sowie im peritumoralen Normalgewebe verglichen mit gesundem Darmepithel. Deshalb handelt es sich bei *REGIA* möglicherweise sogar um einen Marker von prämaligmem Risikoepithel. *REGIA*-mRNA wurde ausschließlich in Epithel- bzw. Tumorzellen und nie im Stroma detektiert. *REGIA* fungierte als signifikanter Prädiktor für das Tumor-abhängige sowie progressionsfreie Patientenüberleben. Überdies zeigte *REGIA* zusammen mit seinem Rezeptor *EXTL3* eine positive Korrelation mit dem Auftreten von Peritonealmetastasen, welche das Überleben in besonderem Maß verkürzen.

Diese Arbeit hat ergeben, dass sich bereits frühe Tumorstadien über Expressionsmarker nachweisen lassen und liefert mit den Befunden über das Gen *REGIA* eventuell die Grundlage zur Entwicklung eines prognostischen Tests für Patienten mit kolorektalem Karzinom.

6 Literatur

Affymetrix (2001) Microarray Suite 5.0 user guide. Affymetrix, Santa Clara.

Agarwal R, D'Souza T, Morin PJ (2005) Claudin-3 and claudin-4 expression in ovarian epithelial cells enhances invasion and is associated with increased matrix metalloproteinase-2 activity. Cancer Res 65(16): 7378-7385.

Ahlquist DA, Skoletsy JE, Boynton KA, Harrington JJ, Mahoney DW, Pierceall WE, Thibodeau SN, Shuber AP (2000) Colorectal cancer screening by detection of altered human DNA in stool: feasibility of a multitarget assay panel. Gastroenterology 119(5): 1219-1227.

Angelow S, Kim KJ, Yu AS (2006) Claudin-8 modulates paracellular permeability to acidic and basic ions in MDCK II cells. J Physiol 571(1): 15-26.

Arai T, Akiyama Y, Nagasaki H, Murase N, Okabe S, Ikeuchi T, Saito K, Iwai T, Yuasa Y (1999) EXTL3/EXTR1 alterations in colorectal cancer cell lines. Int J Oncol 15(5): 915-919.

Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. Nat Genet 25(1): 25-29.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Morre DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1987) Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, New York.

Baugh LR, Hill AA, Brown EL, Hunter CP (2001) Quantitative analysis of mRNA amplification by in vitro transcription. Nucleic Acids Res 29(5): 1-9.

Baylin SB (2005) DNA methylation and gene silencing in cancer. Nat Clin Pract Oncol 2 Suppl 1: S4-S11.

Begum NA, Mori M, Matsumata T, Takenaka K, Sugimachi K, Barnard GF (1995) Differential display and integrin alpha 6 messenger RNA overexpression in hepatocellular carcinoma. Hepatology 22(5): 1447-1455.

Bernards R, Weinberg RA (2002) A progression puzzle. Nature 418(6900): 823.

Bertucci F, Salas S, Eysteris S, Nasser V, Finetti P, Ginestier C, Charafe-Jauffret E, Loriod B, Bachelart L, Montfort J, Victorero G, Viret F, Ollendorff V, Fert V, Giovaninni M, Delpero JR, Nguyen C, Viens P, Monges G, Birnbaum D, Houlgatte R (2004) Gene expression profiling of colon cancer by DNA microarrays and correlation with histoclinical parameters. Oncogene 23(7): 1377-1391.

Bertz J, Giersiepen K, Haberland J, Hentschel S, Kaatsch P, Katalinic A, Stabenow R, Stegmaier C, Ziegler H (2006) Krebs in Deutschland. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das RKI, Saarbrücken.

Brandner JM, Kief S, Grund C, Rendl M, Houdek P, Kuhn C, Tschachler E, Franke WW, Moll I (2002) Organization and formation of the tight junction system in human epidermis and cultured keratinocytes. Eur J Cell Biol 81(5): 253-263.

Brennan MF (2004) Safety in numbers. Br J Surg 91(6): 653-654.

- Brunschwig EB, Wilson K, Mack D, Dawson D, Lawrence E, Willson JK, Lu S, Nosrati A, Rerko RM, Swinler S, Beard L, Lutterbaugh JD, Willis J, Platzer P, Markowitz S** (2003) PMEPA1, a transforming growth factor-beta-induced marker of terminal colonocyte differentiation whose expression is maintained in primary and metastatic colon cancer. Cancer Res 63(7): 1568-1575.
- Buchholz M, Biebl A, Neebete A, Wagner M, Iwamura T, Leder G, Adler G, Gress TM** (2003) SERPINE2 (protease nexin I) promotes extracellular matrix production and local invasion of pancreatic tumors in vivo. Cancer Res 63(16): 4945-4951.
- Buri C, Korner M, Scharli P, Cefai D, Ugucioni M, Mueller C, Laissue JA, Mazzucchelli L** (2001) CC chemokines and the receptors CCR3 and CCR5 are differentially expressed in the nonneoplastic leukocytic infiltrates of Hodgkin disease. Blood 97(6): 1543-1548.
- Bustin SA, Dorudi S** (2004) Gene expression profiling for molecular staging and prognosis prediction in colorectal cancer. Expert Rev Mol Diagn 4(5): 599-607.
- Calvert PM, Frucht H** (2002) The genetics of colorectal cancer. Ann Intern Med 137(7): 603-612.
- Chen D, Guo J, Miki T, Tachibana M, Gahl WA** (1997) Molecular cloning and characterization of RAB27A and RAB27B, novel human RAB proteins shared by melanocytes and platelets. Biochem Mol Med 60(1): 27-37.
- Chen LC, Hao CY, Chiu YS, Wong P, Melnick JS, Brotman M, Moretto J, Mendes F, Smith AP, Bennington JL, Moore D, Lee NM** (2004) Alteration of gene expression in normal-appearing colon mucosa of APC(min) mice and human cancer patients. Cancer Res 64(10): 3694-3700.
- Cheung ST, Leung KL, Ip YC, Chen X, Fong DY, Ng IO, Fan ST, So S** (2005) Claudin-10 expression level is associated with recurrence of primary hepatocellular carcinoma. Clin Cancer Res 11(2): 551-556.
- Chiba H, Gotoh T, Kojima T, Satohisa S, Kikuchi K, Osanai M, Sawada N** (2003) Hepatocyte nuclear factor (HNF)-4alpha triggers formation of functional tight junctions and establishment of polarized epithelial morphology in F9 embryonal carcinoma cells. Exp Cell Res 286(2): 288-297.
- Chiu ST, Hsieh FJ, Chen SW, Chen CL, Shu HF, Li H** (2005) Clinicopathologic correlation of up-regulated genes identified using cDNA microarray and real-time reverse transcription-PCR in human colorectal cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 14(2): 437-443.
- Choe H, Farzan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, Wu L, Mackay CR, LaRosa G, Newman W, Gerard N, Gerard C, Sodroski J** (1996) The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. Cell 85(7): 1135-1148.
- Chung GG, Kielhorn EP, Rimm DL** (2002) Subjective differences in outcome are seen as a function of the immunohistochemical method used on a colorectal cancer tissue microarray. Clin Colorectal Cancer 1(4): 237-242.
- Combadiere C, Ahuja SK, Murphy PM** (1995) Cloning and functional expression of a human eosinophil CC chemokine receptor. J Biol Chem 270(28): 16491-16494.
- Compton CC** (2003) Colorectal carcinoma: diagnostic, prognostic, and molecular features. Mod Pathol 16(4): 376-388.
- Cruz-Correa M, Cui H, Giardiello FM, Powe NR, Hyland L, Robinson A, Hutcheon DF, Kafonek DR, Brandenburg S, Wu Y, He X, Feinberg AP** (2004) Loss of imprinting of insulin growth factor II gene: a potential heritable biomarker for colon neoplasia predisposition. Gastroenterology 126(4): 964-970.
- Dallas PB, Gottardo NG, Firth MJ, Beesley AH, Hoffmann K, Terry PA, Freitas JR, Boag JM, Cummings AJ, Kees UR** (2005) Gene expression levels assessed by oligonucleotide microarray analysis and quantitative real-time RT-PCR - how well do they correlate? BMC Genomics 6(1): 1-10.

- Daugherty BL, Siciliano SJ, DeMartino JA, Malkowitz L, Sirotna A, Springer MS** (1996) Cloning, expression, and characterization of the human eosinophil eotaxin receptor. J Exp Med 183(5): 2349-2354.
- de Oliveira SS, de Oliveira IM, De Souza W, Morgado-Diaz JA** (2005) Claudins upregulation in human colorectal cancer. FEBS Lett 579(27): 6179-6185.
- De Smet C, Lurquin C, van der Bruggen P, De Plaen E, Brasseur F, Boon T** (1994) Sequence and expression pattern of the human MAGE2 gene. Immunogenetics 39(2): 121-129.
- Dieckgraefe BK, Crimmins DL, Landt V, Houchen C, Anant S, Porche-Sorbet R, Ladenson JH** (2002) Expression of the regenerating gene family in inflammatory bowel disease mucosa: REG Ialpha upregulation, processing, and antiapoptotic activity. J Investig Med 50(6): 421-434.
- Dimberg J, Hugander A, Wagsater D** (2006) Protein expression of the chemokine, CCL28, in human colorectal cancer. Int J Oncol 28(2): 315-319.
- D'Souza T, Agarwal R, Morin PJ** (2005) Phosphorylation of claudin-3 at threonine 192 by cAMP-dependent protein kinase regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells. J Biol Chem 280(28): 26233-26240.
- Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D** (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. Proc Natl Acad Sci USA 95(25): 14863-14868.
- Elsner J, Petering H, Kluthe C, Kimmig D, Smolarski R, Ponath P, Kapp A** (1998) Eotaxin-2 activates chemotaxis-related events and release of reactive oxygen species via pertussis toxin-sensitive G proteins in human eosinophils. Eur J Immunol 28(7): 2152-2158.
- Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, Chuaqui RF, Zhuang Z, Goldstein SR, Weiss RA, Liotta LA** (1996) Laser capture microdissection. Science 274(5289): 998-1001.
- Enserink M** (2002) The vanishing promises of hormone replacement. Science 297(5580): 325-326.
- Fanning AS, Jameson BJ, Jesaitis LA, Anderson JM** (1998) The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. J Biol Chem 273(45): 29745-29753.
- Fearon ER, Vogelstein B** (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 61(5): 759-767.
- Fernandes-Alnemri T, Armstrong RC, Krebs J, Srinivasula SM, Wang L, Bullrich F, Fritz LC, Trapani JA, Tomaselli KJ, Litwack G, Alnemri ES** (1996) In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. Proc Natl Acad Sci USA 93(15): 7464-7469.
- Figueredo A, Rumble RB, Maroun J, Earle CC, Cummings B, McLeod R, Zuraw L, Zwaal C** (2003) Follow-up of patients with curatively resected colorectal cancer: a practice guideline. BMC Cancer 3(1): 1-13.
- Fischer H, Stenling R, Rubio C, Lindblom A** (2001) Differential expression of aquaporin 8 in human colonic epithelial cells and colorectal tumors. BMC Physiol 1: 1-5.
- Fodde R, Smits R, Clevers H** (2001) APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. Nat Rev Cancer 1(1): 55-67.
- Förster VT** (1948) Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. Annalen der Physik 437(1-2): 55-75.
- Frederiksen CM, Knudsen S, Laurberg S, Orntoft TF** (2003) Classification of Dukes' B and C colorectal cancers using expression arrays. J Cancer Res Clin Oncol 129(5): 263-271.

- Fric P, Sovova V, Sloncova E, Lojda Z, Jirasek A, Cermak J** (2000) Different expression of some molecular markers in sporadic cancer of the left and right colon. Eur J Cancer Prev 9(4): 265-268.
- Friedrichs K, Ruiz P, Franke F, Gille I, Terpe HJ, Imhof BA** (1995) High expression level of alpha 6 integrin in human breast carcinoma is correlated with reduced survival. Cancer Res 55(4): 901-906.
- Funada Y, Noguchi T, Kikuchi R, Takeno S, Uchida Y, Gabbert HE** (2003) Prognostic significance of CD8+ T cell and macrophage peritumoral infiltration in colorectal cancer. Oncol Rep 10(2): 309-313.
- Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S** (1993) Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. J Cell Biol 123(6): 1777-1788.
- Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K, Tsukita S** (1998) A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. J Cell Biol 143(2): 391-401.
- Furuse M, Sasaki H, Tsukita S** (1999) Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. J Cell Biol 147(4): 891-903.
- Galizia G, Lieto E, Ferraraccio F, Orditura M, De Vita F, Castellano P, Imperatore V, Romano C, Ciardiello F, Agostini B, Pignatelli C** (2004) Determination of molecular marker expression can predict clinical outcome in colon carcinomas. Clin Cancer Res 10(10): 3490-3499.
- Garcia-Zepeda EA, Combadiere C, Rothenberg ME, Sarafi MN, Lavigne F, Hamid Q, Murphy PM, Luster AD** (1996) Human monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 is a novel CC chemokine with activities on monocytes, eosinophils, and basophils induced in allergic and nonallergic inflammation that signals through the CC chemokine receptors (CCR)-2 and -3. J Immunol 157(12): 5613-5626.
- Ghorpade A, Xia MQ, Hyman BT, Persidsky Y, Nukuna A, Bock P, Che M, Limoges J, Gendelman HE, Mackay CR** (1998) Role of the beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 in human immunodeficiency virus type 1 infection of monocytes and microglia. J Virol 72(4): 3351-3361.
- Giltane JM, Rimm DL** (2004) Technology insight: Identification of biomarkers with tissue microarray technology. Nat Clin Pract Oncol 1(2): 104-111.
- Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Lander ES** (1999) Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. Science 286(5439): 531-537.
- Graziano F, Cascinu S** (2003) Prognostic molecular markers for planning adjuvant chemotherapy trials in Dukes' B colorectal cancer patients: how much evidence is enough? Ann Oncol 14(7): 1026-1038.
- Gretschel S, Haensch W, Schlag PM, Kimmner W** (2003) Clinical relevance of sialyltransferases ST6GAL-I and ST3GAL-III in gastric cancer. Oncology 65(2): 139-145.
- Gross DJ, Weiss L, Reibstein I, van den Brand J, Okamoto H, Clark A, Slavin S** (1998) Amelioration of diabetes in nonobese diabetic mice with advanced disease by linomide-induced immunoregulation combined with Reg protein treatment. Endocrinology 139(5): 2369-2374.
- Gumbiner BM** (1993) Breaking through the tight junction barrier. J Cell Biol 123(6): 1631-1633.
- Hartupee JC, Zhang H, Bonaldo MF, Soares MB, Dieckgraefe BK** (2001) Isolation and characterization of a cDNA encoding a novel member of the human regenerating protein family: REG IV. Biochim Biophys Acta 1518(3): 287-293.
- Hecht JT, Hogue D, Strong LC, Hansen MF, Blanton SH, Wagner M** (1995) Hereditary multiple exostosis and chondrosarcoma: linkage to chromosome II and loss of heterozygosity for EXT-linked markers on chromosomes II and 8. Am J Hum Genet 56(5): 1125-1131.

- Higham AD, Bishop LA, Dimaline R, Blackmore CG, Dobbins AC, Varro A, Thompson DG, Dockray GJ** (1999) Mutations of REG Ialpha are associated with enterochromaffin-like cell tumor development in patients with hypergastrinemia. Gastroenterology 116(6): 1310-1318.
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R** (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Biotechnology (N Y) 10(4): 413-417.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R** (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology (N Y) 11(9): 1026-1030.
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH** (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of thermus aquaticus DNA polymerase. Proc Natl Acad Sci USA 88(16): 7276-7280.
- Hoos A, Cordon-Cardo C** (2001) Tissue microarray profiling of cancer specimens and cell lines: opportunities and limitations. Lab Invest 81(10): 1331-1338.
- Horuk R** (2001) Chemokine receptors. Cytokine Growth Factor Rev 12(4): 313-335.
- Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M** (1993) Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. Nature 363(6429): 558-561.
- Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M, Tsukita S** (1999) Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. J Cell Biol 147(6): 1351-1363.
- Itoh M, Nagafuchi A, Moroi S, Tsukita S** (1997) Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. J Cell Biol 138(1): 181-192.
- Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ, Schnitt SJ** (1999) Specificity of HercepTest in determining HER-2/neu status of breast cancers using the United States Food and Drug Administration-approved scoring system. J Clin Oncol 17(7): 1983-1987.
- Jayne DG, Perry SL, Morrison E, Farmery SM, Guillou PJ** (2000) Activated mesothelial cells produce heparin-binding growth factors: implications for tumour metastases. Br J Cancer 82(6): 1233-1238.
- Johnson JL, Ellis BA, Noack D, Seabra MC, Catz SD** (2005) The RAB27A-binding protein, JFC1, regulates androgen-dependent secretion of prostate-specific antigen and prostatic-specific acid phosphatase. Biochem J 391(3): 699-710.
- Johrer K, Zelle-Rieser C, Perathoner A, Moser P, Hager M, Ramoner R, Gander H, Holdt L, Bartsch G, Greil R, Thurnher M** (2005) Up-regulation of functional chemokine receptor CCR3 in human renal cell carcinoma. Clin Cancer Res 11(7): 2459-2465.
- Jung R, Soondrum K, Neumaier M** (2000) Quantitative PCR. Clin Chem Lab Med 38(9): 833-836.
- Kadowaki Y, Ishihara S, Miyaoka Y, Rumi MA, Sato H, Kazumori H, Adachi K, Takasawa S, Okamoto H, Chiba T, Kinoshita Y** (2002) REG protein is overexpressed in gastric cancer cells, where it activates a signal transduction pathway that converges on ERK1/2 to stimulate growth. FEBS Lett 530(1-3): 59-64.
- Kahlenberg MS, Sullivan JM, Witmer DD, Petrelli NJ** (2003) Molecular prognostics in colorectal cancer. Surg Oncol 12(3): 173-186.
- Kapiteijn E, Liefers GJ, Los LC, Kranenbarg EK, Hermans J, Tollenaar RA, Moriya Y, van de Velde CJ, van Krieken JH** (2001) Mechanisms of oncogenesis in colon versus rectal cancer. J Pathol 195(2): 171-178.
- Katoh M, Katoh M** (2003) CLDN23 gene, frequently down-regulated in intestinal-type gastric cancer, is a novel member of claudin gene family. Int J Mol Med 11(6): 683-689.

Kemmner W, Schlag P, Brossmer R (1987) A rapid and simple procedure for dissociation of tumor tissue from the human colon. J Cancer Res Clin Oncol 113(4): 400-401.

Kim BT, Kitagawa H, Tamura J, Saito T, Kusche-Gullberg M, Lindahl U, Sugahara K (2001) Human tumor suppressor EXT gene family members EXTL1 and EXTL3 encode alpha 1,4-N-acetylglucosaminyltransferases that likely are involved in heparan sulfate/ heparin biosynthesis. Proc Natl Acad Sci USA 98(13): 7176-7181.

Kinzler KW, Vogelstein B (1997) Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. Nature 386(6627): 761-763.

Kinzler KW, Vogelstein B (1998) Landscaping the cancer terrain. Science 280(5366): 1036-1037.

Kitajiri SI, Furuse M, Morita K, Saishin-Kiuchi Y, Kido H, Ito J, Tsukita S (2004) Expression patterns of claudins, tight junction adhesion molecules, in the inner ear. Hear Res 187(1-2): 25-34.

Kitaura M, Nakajima T, Imai T, Harada S, Combadiere C, Tiffany HL, Murphy PM, Yoshie O (1996) Molecular cloning of human eotaxin, an eosinophil-selective CC chemokine, and identification of a specific eosinophil eotaxin receptor, CC chemokine receptor 3. J Biol Chem 271(13): 7725-7730.

Kiuchi-Saishin Y, Gotoh S, Furuse M, Takasuga A, Tano Y, Tsukita S (2002) Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. J Am Soc Nephrol 13(4): 875-886.

Kleinhans M, Tun-Kyi A, Gilliet M, Kadin ME, Dummer R, Burg G, Nestle FO (2003) Functional expression of the eotaxin receptor CCR3 in CD30+ cutaneous T-cell lymphoma. Blood 101(4): 1487-1493.

Kobayashi S, Akiyama T, Nata K, Abe M, Tajima M, Shervani NJ, Unno M, Matsuno S, Sasaki H, Takasawa S, Okamoto H (2000) Identification of a receptor for Reg (regenerating gene) protein, a pancreatic beta-cell regeneration factor. J Biol Chem 275(15): 10723-10726.

Kominsky SL, Argani P, Korz D, Evron E, Raman V, Garrett E, Rein A, Sauter G, Kallioniemi OP, Sukumar S (2003) Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. Oncogene 22(13): 2021-2033.

Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP (1998) Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. Nat Med 4(7): 844-847.

Kouno J, Nagai H, Nagahata T, Onda M, Yamaguchi H, Adachi K, Takahashi H, Teramoto A, Emi M (2004) Up-regulation of CC chemokine, CCL3L1, and receptors, CCR3, CCR5 in human glioblastoma that promotes cell growth. J Neurooncol 70(3): 301-307.

Kramer F, White K, Kubbies M, Swisshelm K, Weber BH (2000) Genomic organization of claudin-1 and its assessment in hereditary and sporadic breast cancer. Hum Genet 107(3): 249-256.

Kubota K, Furuse M, Sasaki H, Sonoda N, Fujita K, Nagafuchi A, Tsukita S (1999) Ca²⁺-independent cell-adhesion activity of claudins, a family of integral membrane proteins localized at tight junctions. Curr Biol 9(18): 1035-1038.

Kwon HC, Kim SH, Roh MS, Kim JS, Lee HS, Choi HJ, Jeong JS, Kim HJ, Hwang TH (2004) Gene expression profiling in lymph node-positive and lymph node-negative colorectal cancer. Dis Colon Rectum 47(2): 141-152.

Lamerz R, Stieber P, Borlinghaus P, Schmid L: Tumormarker. In: Heiss MM (2001) Manual Gastrointestinale Tumoren. Zuckschwerdt, München.

- Lange PH, Ercole CJ, Lightner DJ, Fraley EE, Vessella R** (1989) The value of serum prostate specific antigen determinations before and after radical prostatectomy. J Urol 141(4): 873-879.
- Lee LG, Connell CR, Bloch W** (1993) Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. Nucleic Acids Res 21(16): 3761-3766.
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B** (1998) Genetic instabilities in human cancers. Nature 396(6712): 643-649.
- Li WY, Huey CL, Yu AS** (2004) Expression of claudin-7 and -8 along the mouse nephron. Am J Physiol Renal Physiol 286(6): F1063-F1071.
- Lieberman R** (2004) Evidence-based medical perspectives: the evolving role of PSA for early detection, monitoring of treatment response, and as a surrogate end point of efficacy for interventions in men with different clinical risk states for the prevention and progression of prostate cancer. Am J Ther 11(6): 501-506.
- Liotta LA** (2001) An attractive force in metastasis. Nature 410(6824): 24-25.
- Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K** (1995) Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. PCR Methods Appl 4(6): 357-362.
- Livak KJ, Schmittgen TD** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method. Methods 25(4): 402-408.
- Luster AD** (1998) Chemokines - chemotactic cytokines that mediate inflammation. N Engl J Med 338(7): 436-445.
- Macadam RC, Sarela AI, Farmery SM, Robinson PA, Markham AF, Guillou PJ** (2000) Death from early colorectal cancer is predicted by the presence of transcripts of the REG gene family. Br J Cancer 83(2): 188-195.
- Mandel JS, Church TR, Ederer F, Bond JH** (1999) Colorectal cancer mortality: effectiveness of biennial screening for fecal occult blood. J Natl Cancer Inst 91(5): 434-437.
- Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, Dejana E** (1998) Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. J Cell Biol 142(1): 117-127.
- Mello-Coelho V, Hess KL** (2005) A conceptual and practical overview of cDNA microarray technology: implications for basic and clinical sciences. Braz J Med Biol Res 38(10): 1543-1552.
- Michl P, Buchholz M, Rolke M, Kunsch S, Lohr M, McClane B, Tsukita S, Leder G, Adler G, Gress TM** (2001) Claudin-4: a new target for pancreatic cancer treatment using clostridium perfringens enterotoxin. Gastroenterology 121(3): 678-684.
- Mickanin CS, Bhatia U, Labow M** (2001) Identification of a novel beta-chemokine, MEC, down-regulated in primary breast tumors. Int J Oncol 18(5): 939-944.
- Mima S, Tsutsumi S, Ushijima H, Takeda M, Fukuda I, Yokomizo K, Suzuki K, Sano K, Nakanishi T, Tomisato W, Tsuchiya T, Mizushima T** (2005) Induction of claudin-4 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs and its contribution to their chemopreventive effect. Cancer Res 65(5): 1868-1876.
- Miwa N, Furuse M, Tsukita S, Niikawa N, Nakamura Y, Furukawa Y** (2000) Involvement of claudin-1 in the beta-catenin/Tcf signaling pathway and its frequent upregulation in human colorectal cancers. Oncol Res 12(11-12): 469-476.

- Mizuno K, Irie S, Sato TA** (2001) Overexpression of EXTL3/EXTR1 enhances NF-kappaB activity induced by TNF-alpha. Cell Signal 13(2): 125-130.
- Moinova HR, Chen WD, Shen L, Smiraglia D, Olechnowicz J, Ravi L, Kasturi L, Myeroff L, Plass C, Parsons R, Minna J, Willson JK, Green SB, Issa JP, Markowitz SD** (2002) HLTF gene silencing in human colon cancer. Proc Natl Acad Sci USA 99(7): 4562-4567.
- Momparler RL** (2003) Cancer epigenetics. Oncogene 22(42): 6479-6483.
- Morin PJ** (2005) Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. Cancer Res 65(21): 9603-9606.
- Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S** (1999) Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. Proc Natl Acad Sci USA 96(2): 511-516.
- Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verastegui E, Zlotnik A** (2001) Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. Nature 410(6824): 50-56.
- Müller D, Kausalya PJ, Claverie-Martin F, Meij IC, Eggert P, Garcia-Nieto V, Hunziker W** (2003) A novel claudin 16 mutation associated with childhood hypercalciuria abolishes binding to ZO-1 and results in lysosomal mistargeting. Am J Hum Genet 73(6): 1293-1301.
- Mullis KB, Faloona FA** (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol 155: 335-350.
- Murakami T, Maki W, Cardones AR, Fang H, Tun Kyi A, Nestle FO, Hwang ST** (2002) Expression of CXC chemokine receptor-4 enhances the pulmonary metastatic potential of murine B16 melanoma cells. Cancer Res 62(24): 7328-7334.
- Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power CA** (2000) International Union of Pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. Pharmacol Rev 52(1): 145-176.
- Muto T, Bussey HJ, Morson BC** (1975) The evolution of cancer of the colon and rectum. Cancer 36(6): 2251-2270.
- Niimi T, Nagashima K, Ward JM, Minoo P, Zimonjic DB, Popescu NC, Kimura S** (2001) Claudin-18, a novel downstream target gene for the T/EBP/NKX2.1 homeodomain transcription factor, encodes lung- and stomach-specific isoforms through alternative splicing. Mol Cell Biol 21(21): 7380-7390.
- Nowell PC** (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. Science 194(4260): 23-28.
- Obrand DI, Gordon PH** (1998) Continued change in the distribution of colorectal carcinoma. Br J Surg 85(2): 246-248.
- O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY** (2004) Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. J Natl Cancer Inst 96(19): 1420-1425.
- Pages F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molidor R, Mlecnik B, Kirilovsky A, Nilsson M, Damotte D, Meatchi T, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Galon J** (2005) Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. N Engl J Med 353(25): 2654-2666.
- Pan J, Kunkel EJ, Gossler U, Lazarus N, Langdon P, Broadwell K, Vierra MA, Genovese MC, Butcher EC, Soler D** (2000) A novel chemokine ligand for CCR10 and CCR3 expressed by epithelial cells in mucosal tissues. J Immunol 165(6): 2943-2949.

- Pantoliano MW, Horlick RA, Springer BA, Van Dyk DE, Tobery T, Wetmore DR, Lear JD, Nahapetian AT, Bradley JD, Sisk WP** (1994) Multivalent ligand-receptor binding interactions in the fibroblast growth factor system produce a cooperative growth factor and heparin mechanism for receptor dimerization. Biochemistry 33(34): 10229-10248.
- Peleg, II, Maibach HT, Brown SH, Wilcox CM** (1994) Aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drug use and the risk of subsequent colorectal cancer. Arch Intern Med 154(4): 394-399.
- Perucho M** (1996) Microsatellite instability: the mutator that mutates the other mutator. Nat Med 2(6): 630-631.
- Petty JK, He K, Corless CL, Vetto JT, Weinberg AD** (2002) Survival in human colorectal cancer correlates with expression of the T-cell costimulatory molecule OX-40 (CD134). Am J Surg 183(5): 512-518.
- Ponath PD, Qin S, Ringler DJ, Clark-Lewis I, Wang J, Kassam N, Smith H, Shi X, Gonzalo JA, Newman W, Gutierrez-Ramos JC, Mackay CR** (1996) Cloning of the human eosinophil chemoattractant, eotaxin. Expression, receptor binding, and functional properties suggest a mechanism for the selective recruitment of eosinophils. J Clin Invest 97(3): 604-612.
- Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B, Kinzler KW** (1992) APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. Nature 359(6392): 235-237.
- Pral F, Ostwald C, Nizze H, Barten M** (2004) Expression profiling of colorectal carcinomas using tissue microarrays: cell cycle regulatory proteins p21, p27, and p53 as immunohistochemical prognostic markers in univariate and multivariate analysis. Appl Immunohistochem Mol Morphol 12(2): 111-121.
- Rajeevan MS, Vernon SD, Taysavang N, Unger ER** (2001) Validation of array-based gene expression profiles by real-time (kinetic) RT-PCR. J Mol Diagn 3(1): 26-31.
- Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, Golub TR** (2003) A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. Nat Genet 33(1): 49-54.
- Raskind WH, Conrad EU, Chansky H, Matsushita M** (1995) Loss of heterozygosity in chondrosarcomas for markers linked to hereditary multiple exostoses loci on chromosomes 8 and 11. Am J Hum Genet 56(5): 1132-1139.
- Rasmussen R, Morrison T, Herrmann M, Wittwer C** (1998) Quantitative PCR by continuous fluorescence monitoring of a double strand DNA specific binding dye. Biochemica 2: 8-11.
- Ratto C, Sofo L, Ippoliti M, Merico M, Doglietto GB, Crucitti F** (1998) Prognostic factors in colorectal cancer. Literature review for clinical application. Dis Colon Rectum 41(8): 1033-1049.
- Rechreche H, Montalto G, Mallo GV, Vasseur S, Marasa L, Soubeyran P, Dagorn JC, Iovanna JL** (1999) PAP, REG Ialpha and REG Ibeta mRNAs are concomitantly up-regulated during human colorectal carcinogenesis. Int J Cancer 81(5): 688-694.
- Renehan AG, Egger M, Saunders MP, O'Dwyer ST** (2002) Impact on survival of intensive follow up after curative resection for colorectal cancer: systematic review and meta-analysis of randomised trials. BMJ 324(7341): 1-8.
- Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT** (1997) Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. Anal Biochem 245(2): 154-160.
- Rubbert A, Combadiere C, Ostrowski M, Arthos J, Dybul M, Machado E, Cohn MA, Hoxie JA, Murphy PM, Fauci AS, Weissman D** (1998) Dendritic cells express multiple chemokine receptors used as coreceptors for HIV entry. J Immunol 160(8): 3933-3941.
- Russell HV, Hicks J, Okcu MF, Nuchtern JG** (2004) CXCR4 expression in neuroblastoma primary tumors is associated with clinical presentation of bone and bone marrow metastases. J Pediatr Surg 39(10): 1506-1511.

- Sadeghi B, Arvieux C, Glehen O, Beaujard AC, Rivoire M, Baulieux J, Fontaumard E, Brachet A, Caillot JL, Faure JL, Porcheron J, Peix JL, Francois Y, Vignal J, Gilly FN** (2000) Peritoneal carcinomatosis from non-gynecologic malignancies: results of the EVOCAPE 1 multicentric prospective study. Cancer 88(2): 358-363.
- Sager R, Anisowicz A, Neveu M, Liang P, Sotiropoulou G** (1993) Identification by differential display of alpha 6 integrin as a candidate tumor suppressor gene. FASEB J 7(10): 964-970.
- Saitou M, Fujimoto K, Doi Y, Itoh M, Fujimoto T, Furuse M, Takano H, Noda T, Tsukita S** (1998) Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. J Cell Biol 141(2): 397-408.
- Sako A, Kitayama J, Yamaguchi H, Kaisaki S, Suzuki H, Fukatsu K, Fujii S, Nagawa H** (2003) Vascular endothelial growth factor synthesis by human omental mesothelial cells is augmented by fibroblast growth factor-2: possible role of mesothelial cell on the development of peritoneal metastasis. J Surg Res 115(1): 113-120.
- Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A** (1997) Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. Science 277(5334): 2005-2007.
- Saur D, Seidler B, Schneider G, Algul H, Beck R, Senekowitsch-Schmidtke R, Schwaiger M, Schmid RM** (2005) CXCR4 expression increases liver and lung metastasis in a mouse model of pancreatic cancer. Gastroenterology 129(4): 1237-1250.
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO** (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science 270(5235): 467-470.
- Schlag PM, Kretschmar A** (2006) Kolorektale Karzinome. Tumor Zentrum Berlin, Berlin.
- Schneeberger EE, Lynch RD** (1992) Structure, function, and regulation of cellular tight junctions. Am J Physiol 262(6): L647-L661.
- Shih W, Chetty R, Tsao MS** (2005) Expression profiling by microarrays in colorectal cancer. Oncol Rep 13(3): 517-524.
- Shinkai A, Yoshisue H, Koike M, Shoji E, Nakagawa S, Saito A, Takeda T, Imabeppu S, Kato Y, Hanai N, Anazawa H, Kuga T, Nishi T** (1999) A novel human CC chemokine, eotaxin-3, which is expressed in IL-4-stimulated vascular endothelial cells, exhibits potent activity toward eosinophils. J Immunol 163(3): 1602-1610.
- Simon DB, Lu Y, Choate KA, Velazquez H, Al-Sabban E, Praga M, Casari G, Bettinelli A, Colussi G, Rodriguez-Soriano J, McCredie D, Milford D, Sanjad S, Lifton RP** (1999) Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption. Science 285(5424): 103-106.
- Singer RH, Ward DC** (1982) Actin gene expression visualized in chicken muscle tissue culture by using in situ hybridization with a biotinylated nucleotide analog. Proc Natl Acad Sci USA 79(23): 7331-7335.
- Singh AB, Harris RC** (2004) Epidermal growth factor receptor activation differentially regulates claudin expression and enhances transepithelial resistance in madin-darby canine kidney cells. J Biol Chem 279(5): 3543-3552.
- Sobin LH, Wittekind C** (2002) UICC: TNM classification of malignant tumors. John Wiley & Sons, London.
- Soma T, Chiba H, Kato-Mori Y, Wada T, Yamashita T, Kojima T, Sawada N** (2004) Thr(207) of claudin-5 is involved in size-selective loosening of the endothelial barrier by cyclic AMP. Exp Cell Res 300(1): 202-212.
- Southern EM** (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol 98(3): 503-517.

- Spring KR** (1998) Routes and mechanism of fluid transport by epithelia. *Annu Rev Physiol* 60: 105-119.
- Stein CJ, Colditz GA** (2004) Modifiable risk factors for cancer. *Br J Cancer* 90(2): 299-303.
- Stellato C, Brummet ME, Plitt JR, Shahabuddin S, Baroody FM, Liu MC, Ponath PD, Beck LA** (2001) Expression of the C-C chemokine receptor CCR3 in human airway epithelial cells. *J Immunol* 166(3): 1457-1461.
- Sugita Y, Fujiwara Y, Hoon DS, Miyamoto A, Sakon M, Kuo CT, Monden M** (2002) Overexpression of beta 1,4-N-acetylgalactosaminyl-transferase mRNA as a molecular marker for various types of cancers. *Oncology* 62(2): 149-156.
- Tarin D, Price JE, Kettlewell MG, Souter RG, Vass AC, Crossley B** (1984) Mechanisms of human tumor metastasis studied in patients with peritoneovenous shunts. *Cancer Res* 44(8): 3584-3592.
- Terazono K, Yamamoto H, Takasawa S, Shiga K, Yonemura Y, Tochino Y, Okamoto H** (1988) A novel gene activated in regenerating islets. *J Biol Chem* 263(5): 2111-2114.
- Torhorst J, Bucher C, Kononen J, Haas P, Zuber M, Kochli OR, Mross F, Dieterich H, Moch H, Mihatsch M, Kallioniemi OP, Sauter G** (2001) Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *Am J Pathol* 159(6): 2249-2256.
- Towler B, Irwig L, Glasziou P, Kewenter J, Weller D, Silagy C** (1998) A systematic review of the effects of screening for colorectal cancer using the faecal occult blood test, hemoccult. *BMJ* 317(7158): 559-565.
- Tsukita S, Furuse M** (2000) Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. *J Cell Biol* 149(1): 13-16.
- Tsukita S, Furuse M, Itoh M** (2001) Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(4): 285-293.
- Tubbs RR, Pettay JD, Roche PC, Stoler MH, Jenkins RB, Grogan TM** (2001) Discrepancies in clinical laboratory testing of eligibility for trastuzumab therapy: apparent immunohistochemical false-positives do not get the message. *J Clin Oncol* 19(10): 2714-2721.
- Turner JR, Rill BK, Carlson SL, Carnes D, Kerner R, Mrsny RJ, Madara JL** (1997) Physiological regulation of epithelial tight junctions is associated with myosin light-chain phosphorylation. *Am J Physiol* 273(4): C1378-C1385.
- Uguccioni M, Mackay CR, Ochensberger B, Loetscher P, Rhis S, LaRosa GJ, Rao P, Ponath PD, Baggolini M, Dahinden CA** (1997) High expression of the chemokine receptor CCR3 in human blood basophils. Role in activation by eotaxin, MCP-4, and other chemokines. *J Clin Invest* 100(5): 1137-1143.
- Violette S, Festor E, Pandrea-Vasile I, Mitchell V, Adida C, Dussaulx E, Lacorte JM, Chambaz J, Lacasa M, Lesuffleur T** (2003) REG IV, a new member of the regenerating gene family, is overexpressed in colorectal carcinomas. *Int J Cancer* 103(2): 185-193.
- Vogel T, Driemel C, Hauser A, Hansmann A, Lange S, Jonas M, Moslein G** (2005) Comparison of different stool tests for the detection of cancer of the colon. *Dtsch Med Wochenschr* 130(14): 872-877.
- Vogelstein B, Fearon ER, Kern SE, Hamilton SR, Preisinger AC, Nakamura Y, White R** (1989) Allelotype of colorectal carcinomas. *Science* 244(4901): 207-211.
- Wang J, Xi L, Hunt JL, Gooding W, Whiteside TL, Chen Z, Godfrey TE, Ferris RL** (2004a) Expression pattern of chemokine receptor 6 (CCR6) and CCR7 in squamous cell carcinoma of the head and neck identifies a novel metastatic phenotype. *Cancer Res* 64(5): 1861-1866.

- Wang Y, Jatkoe T, Zhang Y, Mutch MG, Talantov D, Jiang J, McLeod HL, Atkins D** (2004b) Gene expression profiles and molecular markers to predict recurrence of Dukes' B colon cancer. *J Clin Oncol* 22(9): 1564-1571.
- Watanabe T, Yonemura Y, Yonekura H, Suzuki Y, Miyashita H, Sugiyama K, Moriizumi S, Unno M, Tanaka O, Kondo H, et al.** (1994) Pancreatic beta-cell replication and amelioration of surgical diabetes by Reg protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(9): 3589-3592.
- Weigelt B, Glas AM, Wessels LF, Witteveen AT, Peterse JL, van't Veer LJ** (2003) Gene expression profiles of primary breast tumors maintained in distant metastases. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(26): 15901-15905.
- Weiss L, Nannmark U, Johansson BR, Bagge U** (1992) Lethal deformation of cancer cells in the microcirculation: a potential rate regulator of hematogenous metastasis. *Int J Cancer* 50(1): 103-107.
- Wiley HE, Gonzalez EB, Maki W, Wu MT, Hwang ST** (2001) Expression of CC chemokine receptor-7 and regional lymph node metastasis of B16 murine melanoma. *J Natl Cancer Inst* 93(21): 1638-1643.
- Wu TD** (2001) Analysing gene expression data from DNA microarrays to identify candidate genes. *J Pathol* 195(1): 53-65.
- Wu X, Hepner K, Castelino-Prabhu S, Do D, Kaye MB, Yuan XJ, Wood J, Ross C, Sawyers CL, Whang YE** (2000) Evidence for regulation of the PTEN tumor suppressor by a membrane-localized multi-PDZ domain containing scaffold protein MAGI-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(8): 4233-4238.
- Xu LL, Shi Y, Petrovics G, Sun C, Makarem M, Zhang W, Sesterhenn IA, McLeod DG, Sun L, Moul JW, Srivastava S** (2003) PMEPA1, an androgen-regulated NEDD4-binding protein, exhibits cell growth inhibitory function and decreased expression during prostate cancer progression. *Cancer Res* 63(15): 4299-4304.
- Yonemura Y, Sakurai S, Yamamoto H, Endou Y, Kawamura T, Bandou E, Elnemr A, Sugiyama K, Sasaki T, Akiyama T, Takasawa S, Okamoto H** (2003) REG gene expression is associated with the infiltrating growth of gastric carcinoma. *Cancer* 98(7): 1394-1400.
- Yu AS, Enck AH, Lencer WI, Schneeberger EE** (2003) Claudin-8 expression in madin-darby canine kidney cells augments the paracellular barrier to cation permeation. *J Biol Chem* 278(19): 17350-17359.
- Zenilman ME, Kim S, Levine BA, Lee C, Steinberg JJ** (1997) Ectopic expression of REG protein: a marker of colorectal mucosa at risk for neoplasia. *J Gastrointest Surg* 1(2): 194-202.
- Zou TT, Selaru FM, Xu Y, Shustova V, Yin J, Mori Y, Shibata D, Sato F, Wang S, Oлару A, Deacu E, Liu TC, Abraham JM, Meltzer SJ** (2002) Application of cDNA microarrays to generate a molecular taxonomy capable of distinguishing between colon cancer and normal colon. *Oncogene* 21(31): 4855-4862.

7 Appendix

7.1 Patientendaten

Appendix-Tab. 1: Klinische Daten der 10 in den GeneChip-Experimenten untersuchten Kolonkarzinompatienten (Low Risk und High Risk).

Fall	Alter [Jahre]	pT	pN	M	G	R	Rezidiv	M _{metachron} ¹	tumorbed. verstorben ²	Gruppe	
1	63	2	0	0	2	0	0	0	0	Low Risk	
2	73	1	0	0	2	0	0	0	0		
3	77	2	0	0	2	0	0	0	0		
4	58	1	0	0	2	0	0	0	0		
5	68	3	0	0	1	0	0	0	0		
6	73	1	0	0	1	0	0	1	1	High Risk	
7	84	3	0	0	3	0	1	0	0		
8	79	2	0	0	2	0	0	1	1		
9	66	1	0	0	2	0	0	0	0		
10	64	2	0	0	1	0	0	1	1		
zum Zeitpunkt der Operation							postoperativer Verlauf				

Erklärung:

¹ bei postoperativ aufgetretenen Fernmetastasen = 1

² bei Tod = 1

Appendix-Tab. 2: Klinische Daten des Stammkollektivs (63 Patienten) für die qPCR-Validierung der Microarray-Resultate.

Fall	Alter ¹ [Jahre]	Lokalisation ²	pT	pN	M	G	R ³	Überleben ³		
								Gesamt	Tumor-abhängig	Progressionsfrei
1	65,7	2	3	0	0	2	0	0	0	
2	80,0	2	3	1	1	2	0			
3	75,3	3	3	3	1	3	2	1		
4	56,6	1	4	3	1	3	2	1		
5	74,3	3	3	2	1	3	0	1		
6	60,6	3	3	3	1	3	0	1		
7	78,4	3	2	0	0	2	0	1	0	
8	83,8	1	3	0	0	3	0	1	1	
9	60,6	3	3	3	1	2	0	1	1	
10	71,6	3	2	3	1	3	0	1	1	
11	69,1		3	2	1	3		1		
12	72,9	1	3	3	1	3	2	1		
13	59,8	2	4	1	1	2	0	1		
14	60,8	1	3	0	0	2	0	0	0	
15	74,4	1	3	2	1	2	2	1		
16	61,3	1	4	1	1	3	0	1	1	
17	59,0	2	2	1	1	2	0	0	1	
18	78,8	1	3	3	1	2	1	1		
19	47,9	2	4	0	0	2		0	1	
20	41,5	1	3	1	1	2	0	0	0	
21	54,0	3	3	0	1	2	0	1		

Fall	Alter ¹ [Jahre]	Lokalisation ²	pT	pN	M	G	R ³	Gesamt	Überleben ³	
									Tumor-abhängig	Progressionsfrei
22	74,6	2	3	3	1	2	0	1		
23	63,4	1	3	3	1	2	0	1		
24	73,6	2	4	1	1	2	0	1		
25	47,7	2	3	3	1	2	2	1	1	1
26	37,9	3	2	0	0	2	0	0	0	0
27	53,7	1	3	1	1	2	0	1	1	1
28	74,8	2	4	2	1	2	0	1		
29	91,9	3	3	0	0	2	0	1		
30	70,3	2	3	0	0	2	0	0	0	0
31	57,6	1	3	0	0	2	0	0	0	0
32	60,0		4	0	0	2	0	0	0	1
33	72,9	1	4	1	1	2	0	1		
34	64,4	1	4	0	0	2	0	0	0	0
35	75,6	3	3	0	0	2	0	0	0	0
36	46,2	2	3	0	0	2	0	0	0	0
37	67,5	1	3	1	1	2	0	0	0	
38	71,1	2	3	2	1	2	0	0	0	0
39	63,4	3	1	0	0	1	0	0	0	0
40	62,8		4	0	0	2	0	0	0	1
41	62,2	3	3	1	1	2	0	1		
42	60,6	1	3	0	0	2	0	1	0	0
43	60,9		2	0	0	2	0	0	0	0
44	65,3	1	3	0	0	2	0	0	0	0
45	63,5	2	4	1	1	3	0	1		
46	69,1		3	0	0	2	0	1	1	1
47	71,5	2	4	1	0	2	0	0	0	0
48	51,3	1	3	2	1	3	0	1	1	1
49	64,4	2	4	0	0	2	0	0	0	0
50	78,1	3	4	2	0	2	0	1		
51	71,0	1	3	0	0	2	0	0	0	0
52	79,0	1	2	0	0	2	0	1	1	1
53	73,7	1	3	0	0	2	0	0	0	0
54	77,3	2	3	0	0	3	0	0	0	
55	57,8	2	1	0	0	2	0	0	0	0
56	68,6	3	2	0	0	2	0	0	0	0
57	64,2	1	3	0	0	3	0	0	0	0
58	76,6	2	3	0	0	3	0	0	0	0
59	52,2	1	4	2	0	3	0	0	0	0
60	76,2	1	3	1	0	3	0	0	0	0
61	73,6	1	3	0	0	3	0	1	0	0
62	62,4	1	3	0	0	2	0	0	0	0
63	77,3	3	3	0	0	2	0	0	0	1

Erklärung:¹ Patientenalter zum Zeitpunkt der Operation² 1/2/3 = Kolon/Sigmoideum/Rektum; bei leeren Feldern keine eindeutige Lokalisationsangabe möglich³ bei leeren Feldern keine Information für entsprechenden Überlebensstyp verfügbar

7.2 Zahlenergebnisse und zusätzliche Abbildungen

Appendix-Tab. 3: Transkripte aus den Genlisten „High Risk up“ für die GeneChips U95A, B, C, D und E (36 Sequenzen).

Gensymbol	Tumor/Healthy		High/Low		Genbank	Probe Set ID
	Trend	FC ¹	Trend	FC ¹		
<i>KCNAB1</i>	↑	1,35	↑	4,07	X83127	32711_g_at
<i>GRM8</i>	↑	9,17	↑	6,72	AJ236922	34007_at
<i>CCR3</i>	↑	1,73	↑	5,9	U28694	33098_at
<i>RAB27B</i>	↑	5,33	↑	10,45	U57093	808_at
<i>NHLH2</i>	↑	11,09	↑	7,15	M96740	36326_at
<i>PLCB4</i>	↑	4,12	↑	6,01	AL031652	35654_at
<i>LOC388574</i>	↑	1,83	↑	7,14	X92108	37859_r_at
<i>MATN2</i>	↑	1,1	↑	7,01	U69263	32239_at
<i>C6orf89</i>	↓	0,41	↑	4,31	AA007295	54692_at
<i>nicht annotiert</i>	↑	6,36	↑	7,26	AI057233	51525_at
<i>nicht annotiert</i>	↑	2,04	↑	6,41	AI240789	53522_at
<i>IXL</i>	↓	0,88	↑	4,67	AI245462	62258_r_at
<i>TMOD2</i>	↓	0,94	↑	5,45	AI802079	62180_r_at
<i>nicht annotiert</i>	↓	0,66	↑	11,63	AA628511	56681_at
<i>nicht annotiert</i>	↓	0,62	↑	4,17	AI654185	68499_at
<i>nicht annotiert</i>	↑	2,59	↑	7,64	AI935000	71569_at
<i>ACRC</i>	↑	2,10	↑	4,55	AI091533	78786_at
<i>AMOTL1</i>	↑	1,30	↑	9,09	AI962269	73290_at
<i>nicht annotiert</i>	↓	0,62	↑	5,30	AW005199	74282_at
<i>RAPH1</i>	↑	1,43	↑	4,53	AA554028	87581_at
<i>SESTD1</i>	↑	1,28	↑	15,84	AI336792	77347_at
<i>DKFZp434H2226</i>	↓	0,97	↑	4,44	AA447678	88399_at
<i>nicht annotiert</i>	↑	4,83	↑	4,33	AI423505	77760_at
<i>nicht annotiert</i>	↓	0,76	↑	4,38	N53657	85683_at
<i>CIB4</i>	↓	0,96	↑	7,20	AW004028	72747_at
<i>nicht annotiert</i>	↑	1,34	↑	28,83	AA493291	70276_r_at
<i>DSTN</i>	↑	2,10	↑	4,52	AI478711	67156_at
<i>OIT3</i>	↑	1,80	↑	4,17	T90064	89381_r_at
<i>nicht annotiert</i>	↑	1,43	↑	6,00	AI743616	70323_f_at
<i>nicht annotiert</i>	↑	1,39	↑	6,06	AA603367	87355_at
<i>GOT1</i>	↓	0,78	↑	5,14	AA393289	71220_at
<i>nicht annotiert</i>	↓	0,49	↑	13,35	AI381545	81736_at
<i>CENPC1</i>	↑	1,05	↑	5,16	AI651329	75703_at
<i>nicht annotiert</i>	↑	5,28	↑	4,33	AI078225	89397_at
<i>nicht annotiert</i>	↑	1,30	↑	4,77	AA534873	67478_at
<i>SLC2A8</i>	↓	0,66	↑	4,49	AA812746	67060_at

Erklärung:

¹ FC = Fold Change

Appendix-Tab. 4: Transkripte aus den Genlisten „High Risk down“ für die GeneChips U95A, B, C, D und E (124 Sequenzen).

Gensymbol	Tumor/Healthy		High/Low		Genbank	Probe Set ID
	Trend	FC ¹	Trend	FC ¹		
<i>ZNF267</i>	↓	0,5	↓	0,18	X78925	34544_at
<i>NR4A2</i>	↑	7,11	↓	0,14	S77154	547_s_at
<i>HIST1H4C</i>	↑	7,97	↓	0,17	AA255502	39969_at
<i>MT1H</i>	↓	0,25	↓	0,2	R93527	39594_f_at
<i>CPS1</i>	↑	3,05	↓	0,12	D90282	34884_at
<i>MAGEA6</i>	↑	29,53	↓	0,17	U10691	31599_f_at
<i>RC74</i>	↓	0,58	↓	0,13	U96629	32061_at
<i>P53CSV</i>	↑	1,55	↓	0,18	AL021546	32955_at
<i>MAGEA1</i>	↑	2,27	↓	0,24	M77481	32426_f_at
<i>IFRD1</i>	↓	0,86	↓	0,22	AC005192	32901_s_at
<i>MT1E</i>	↓	0,36	↓	0,19	R92331	36130_f_at
<i>LRP8</i>	↑	6,1	↓	0,11	D86407	40012_at
<i>HLA-DQB1</i>	↑	1,74	↓	0,12	M16276	36108_at
<i>GOS2</i>	↑	2,43	↓	0,22	M69199	38326_at
<i>LOC254531</i>	↓	0,17	↓	0,1	AF007155	40472_at
<i>RGS2</i>	↓	0,81	↓	0,2	L13463	37701_at
<i>H41</i>	↓	0,76	↓	0,2	H15872	40618_at
<i>SIPA1</i>	↓	0,59	↓	0,2	AB005666	36843_at
<i>MRE11A</i>	↑	1,21	↓	0,12	AF073362	32869_at
<i>EIF2S3</i>	↑	1,54	↓	0,23	L19161	1272_at
<i>MAGEA12</i>	↑	18,88	↓	0,24	L18877	31480_f_at
<i>MEF2C</i>	↑	1,69	↓	0,19	L08895	37710_at
<i>TRIB2</i>	↑	4,33	↓	0,18	D87119	40113_at
<i>DMD</i>	↑	1,39	↓	0,16	M18533	40488_at
<i>RPA1</i>	↓	0,86	↓	0,21	M63488	1382_at
<i>CXCL9</i>	↓	0,97	↓	0,08	X72755	37219_at
<i>C4orf15</i>	↑	1,41	↓	0,17	AF040964	34482_at
<i>DOCK2</i>	↓	0,9	↓	0,24	D86964	32704_at
<i>MT1X</i>	↓	0,74	↓	0,23	AA224832	39120_at
<i>PI3</i>	↓	0,99	↓	0,18	L10343	41469_at
<i>EPPB9</i>	↑	3,25	↓	0,23	AB030506	37511_at
<i>SIP1</i>	↑	2,18	↓	0,07	AF027150	41363_at
<i>MMP12</i>	↑	6,2	↓	0,21	L23808	1481_at
<i>GPNMB</i>	↓	0,98	↓	0,23	X76534	38379_at
<i>MINA</i>	↑	2,01	↓	0,19	W27666	34662_at
<i>TKTL1</i>	↑	6,71	↓	0,15	X91817	37120_at
<i>TRIB2</i>	↑	4,69	↓	0,17	D87119	717_at
<i>PTEN</i>	↓	0,56	↓	0,1	AF019083	31675_s_at
<i>PITPNB</i>	↑	1,67	↓	0,23	D30037	353_at
<i>PYGL</i>	↑	2,08	↓	0,19	AF046798	37215_at
<i>CCL4</i>	↑	1,98	↓	0,15	J04130	36674_at
<i>MAGEA5</i>	↑	12,52	↓	0,11	U10689	34575_f_at
<i>HLA-DMA</i>	↑	1,48	↓	0,24	X62744	37344_at
<i>MT1A</i>	↓	0,31	↓	0,21	K01383	31623_f_at
<i>RBM15B</i>	↓	0,92	↓	0,19	L13434	38476_at
<i>HLA-DRB1</i>	↑	1,05	↓	0,24	M32578	41723_s_at
<i>PROX1</i>	↓	0,94	↓	0,12	U44060	31918_at
<i>MT1G</i>	↓	0,3	↓	0,2	J03910	926_at

Gensymbol	Tumor/Healthy		High/Low		Genbank	Probe Set ID
	Trend	FC ¹	Trend	FC ¹		
<i>WDSAM1</i>	↑	1,23	↓	0,24	AI536124	46386_at
<i>nicht annotiert</i>	↓	0,91	↓	0,16	AI758408	42999_at
<i>nicht annotiert</i>	↑	6,11	↓	0,24	W69924	54409_r_at
<i>C1orf24</i>	↓	0,50	↓	0,20	AI560064	52186_at
<i>S100PBPR</i>	↓	0,84	↓	0,22	AL042503	51102_at
<i>BTBD15</i>	↑	1,45	↓	0,23	AA521091	47997_at
<i>CEP1</i>	↓	0,72	↓	0,10	AI989413	44276_at
<i>LOC200916</i>	↑	7,33	↓	0,16	W31195	53075_at
<i>ESD</i>	↑	3,60	↓	0,19	AA193515	44604_at
<i>RBM9</i>	↓	0,81	↓	0,23	AL047415	45793_at
<i>nicht annotiert</i>	↓	0,36	↓	0,15	AI991416	53285_s_at
<i>MGC70863</i>	↓	0,65	↓	0,23	W46143	56303_f_at
<i>IRAK1BP1</i>	↑	1,15	↓	0,14	AA074612	46034_r_at
<i>SOS1</i>	↑	1,70	↓	0,11	AI635551	50604_at
<i>MGC12458</i>	↓	0,70	↓	0,09	AI911515	53591_at
<i>PLCXD1</i>	↓	0,91	↓	0,20	AA669327	43947_at
<i>TBC1D12</i>	↓	0,56	↓	0,15	C75682	48015_at
<i>FLJ14281</i>	↑	1,38	↓	0,17	AI630208	50209_at
<i>KCTD1</i>	↓	0,52	↓	0,19	AA199881	47324_at
<i>SLC26A2</i>	↓	0,09	↓	0,23	W95021	53999_at
<i>HSPA14</i>	↑	1,80	↓	0,25	AI820056	48008_at
<i>LOC284611</i>	↑	1,02	↓	0,13	R59908	48295_at
<i>CD109</i>	↓	0,76	↓	0,15	W55956	46700_at
<i>SLC25A28</i>	↓	0,75	↓	0,10	AI208913	46266_at
<i>DLG1</i>	↑	2,11	↓	0,22	H97361	44436_at
<i>MGC45386</i>	↓	0,96	↓	0,11	AI393309	55738_at
<i>KIAA1458</i>	↑	1,45	↓	0,20	AI701478	51154_at
<i>nicht annotiert</i>	↑	1,47	↓	0,24	AA252168	43721_at
<i>PEX3</i>	↑	1,06	↓	0,12	AA195517	48234_r_at
<i>nicht annotiert</i>	↑	2,02	↓	0,12	AA167449	45324_at
<i>LOC51136</i>	↓	0,37	↓	0,11	AW021187	44544_at
<i>NAPE-PLD</i>	↓	0,45	↓	0,24	AI310139	43067_at
<i>nicht annotiert</i>	↓	0,78	↓	0,22	AA977175	46387_at
<i>ZFP90</i>	↑	1,14	↓	0,07	AI694329	46904_at
<i>LOC440872</i>	↓	0,67	↓	0,09	AL043168	44800_at
<i>nicht annotiert</i>	↑	1,06	↓	0,06	AI798644	49405_r_at
<i>nicht annotiert</i>	↓	0,81	↓	0,13	N31716	44669_at
<i>KIAA1393</i>	↑	2,51	↓	0,17	AI458450	53466_at
<i>USP31</i>	↑	7,00	↓	0,24	R53069	59611_at
<i>MORF4L2</i>	↑	2,00	↓	0,07	AA261852	43580_at
<i>TULP4</i>	↓	0,94	↓	0,22	AA187679	46496_at
<i>NEDD1</i>	↑	1,16	↓	0,13	R71348	58222_at
<i>PRRX1</i>	↑	2,11	↓	0,11	AA775472	65573_at
<i>MSI2</i>	↓	0,83	↓	0,11	AA648498	49725_g_at
<i>nicht annotiert</i>	↓	0,25	↓	0,21	AA401302	53810_f_at
<i>nicht annotiert</i>	↓	0,82	↓	0,09	AA939061	52923_at
<i>LOC283352</i>	↑	2,09	↓	0,15	AA813205	51503_at
<i>SFPQ</i>	↑	10,6	↓	0,2	AI291037	54981_r_at
<i>nicht annotiert</i>	↑	4,03	↓	0,11	AI221974	62378_at
<i>FLJ20647</i>	↑	2,65	↓	0,23	AI478759	64278_f_at
<i>MRCL3</i>	↓	0,73	↓	0,2	H98113	63104_at

Gensymbol	Tumor/Healthy		High/Low		Genbank	Probe Set ID
	Trend	FC ¹	Trend	FC ¹		
<i>YME1L1</i>	↓	0,45	↓	0,11	AI982808	51843_f_at
<i>nicht annotiert</i>	↑	4,66	↓	0,11	AA214086	64429_at
<i>FLJ13611</i>	↑	1,16	↓	0,21	R61558	49769_at
<i>HERC4</i>	↑	2,53	↓	0,24	N35046	59079_at
<i>nicht annotiert</i>	↑	1,83	↓	0,09	AW007800	56608_at
<i>MGC23909</i>	↓	0,59	↓	0,23	AA879080	64505_at
<i>KCTD3</i>	↑	1,7	↓	0,24	AL048814	64451_at
<i>nicht annotiert</i>	↓	0,88	↓	0,15	AA179146	68172_at
<i>IRAK3</i>	↑	1,16	↓	0,24	AI652770	88468_at
<i>TATDN1</i>	↑	1,94	↓	0,22	AI475227	85277_r_at
<i>PRDM8</i>	↑	1,72	↓	0,17	H41107	92130_r_at
<i>FRBZ1</i>	↓	0,99	↓	0,25	AI275435	87859_at
<i>KIAA1432</i>	↑	1,50	↓	0,09	AI732658	75715_at
<i>PLA2G2D</i>	↓	0,96	↓	0,21	AI692943	85571_at
<i>nicht annotiert</i>	↑	1,09	↓	0,11	AI141067	75658_f_at
<i>USP47</i>	↓	0,72	↓	0,25	AI826801	70055_at
<i>UHMK1</i>	↓	0,93	↓	0,18	AI630528	71762_at
<i>NDUFC2</i>	↓	0,54	↓	0,22	AA975096	89456_at
<i>nicht annotiert</i>	↑	6,99	↓	0,14	AI749893	75331_at
<i>HLA-DPA1</i>	↓	0,94	↓	0,15	AI979193	91041_at
<i>nicht annotiert</i>	↓	0,82	↓	0,20	AI142714	67135_at
<i>DR1</i>	↑	1,32	↓	0,07	AI220213	75478_at
<i>MFTC</i>	↑	1,44	↓	0,13	AI821794	75422_at
<i>CDK6</i>	↓	0,82	↓	0,22	AW025512	83673_at
<i>AMSH-LP</i>	↑	3,33	↓	0,12	AW016508	87708_at

Erklärung:

¹ FC = Fold Change

Appendix-Tab. 5: Transkripte aus den Genlisten „Tumor up“ für die GeneChips U95A, B, C, D und E (93 Sequenzen).

Gensymbol	Tumor/Healthy		High/Low		Genbank	Probe Set ID
	Trend	FC ¹	Trend	FC ¹		
<i>KNTC2</i>	↑	8,11	↓	0,76	AF017790	40041_at
<i>EEF1E1</i>	↑	6,09	↑	1,09	AF054186	40588_r_at
<i>PTPN2</i>	↑	5,16	↓	0,74	M25393	1265_g_at
<i>FAP</i>	↑	5,79	↑	1,12	U09278	39945_at
<i>ZNF146</i>	↑	4,01	↑	1,09	X70394	36928_at
<i>TOMM34</i>	↑	7,18	↑	1,36	AI130910	37050_r_at
<i>HSA9761</i>	↑	10	↓	0,89	AF091078	39884_g_at
<i>SPBC25</i>	↑	8,03	↓	0,77	N58115	38940_at
<i>PODXL</i>	↑	5,73	↓	0,94	U97519	40434_at
<i>SNRPG</i>	↑	5,87	↓	0,74	AI803447	37337_at
<i>SLC16A4</i>	↑	4,83	↓	0,69	U59185	39260_at
<i>HOXA9</i>	↑	4,26	↑	1,01	U41813	37809_at
<i>THBS2</i>	↑	11,61	↑	1,38	L12350	658_at
<i>BLM</i>	↑	4,06	↓	0,79	U39817	1544_at
<i>CDC25C</i>	↑	4,3	↑	1,02	M34065	1584_at
<i>RAD1</i>	↑	4,21	↓	0,81	AF084513	36857_at
<i>MYO1B</i>	↑	4,18	↑	1,34	AJ001381	41439_at
<i>KIAA0286</i>	↑	6,21	↓	0,86	AB006624	31832_at

Gensymbol	Tumor/Healthy		High/Low		Genbank	Probe Set ID
	Trend	FC ¹	Trend	FC ¹		
<i>KIAA0507</i>	↑	4,02	↓	0,92	AB007976	36360_at
<i>MKI67</i>	↑	4,39	↓	0,8	X65550	418_at
<i>BHLHB2</i>	↑	6	↓	0,98	AB004066	40790_at
<i>FLJ20259</i>	↑	4,52	↑	1,1	W27545	38362_at
<i>KIAA0101</i>	↑	8,96	↓	0,71	D14657	38116_at
<i>KIFC1</i>	↑	4,19	↓	0,75	AL021366	38933_at
<i>RPL5</i>	↑	6,73	↓	0,78	U66589	33661_at
<i>STK6</i>	↑	8,59	↓	0,68	AF011468	34852_g_at
<i>ZNF185</i>	↑	4,18	↑	1,24	Y09538	32139_at
<i>TCEB1</i>	↑	4,26	↑	1,04	L34587	1399_at
<i>WDR43</i>	↑	4,48	↓	0,72	D26488	38250_at
<i>HNRPA1</i>	↑	4,9	↓	0,83	X12671	40211_at
<i>EBPL</i>	↑	7,04	↓	0,80	AI858023	51267_at
<i>DACH1</i>	↑	4,68	↓	0,81	AI650353	44543_at
<i>HS6ST2</i>	↑	10,70	↑	1,09	AI767756	52742_at
<i>NOP5/NOP58</i>	↑	4,45	↓	0,81	AI983332	53711_at
<i>HSPC065</i>	↑	4,87	↓	0,81	AI334040	58850_at
<i>CDCA7</i>	↑	11,36	↓	0,86	AA749314	44835_s_at
<i>LAPTM4B</i>	↑	4,24	↑	1,04	T15777	44847_at
<i>LRP11</i>	↑	5,13	↓	0,97	AA187854	58630_at
<i>LOC203411</i>	↑	4,14	↓	0,77	AI650305	44012_at
<i>SHCBP1</i>	↑	7,28	↓	0,69	AA744496	47921_at
<i>GNL3</i>	↑	5,75	↓	0,71	AL040968	45778_at
<i>TPX2</i>	↑	4,84	↓	0,80	AA534688	45574_g_at
<i>CLDN1</i>	↑	11,74	↑	1,06	AI452474	46260_at
<i>C19orf2</i>	↑	5,07	↓	0,68	AI431618	47477_at
<i>nicht annotiert</i>	↑	4,04	↓	0,81	AF169958	45284_at
<i>CDCA3</i>	↑	5,55	↓	0,82	AI934517	44649_at
<i>C20orf172</i>	↑	4,67	↓	0,68	AA534892	46983_at
<i>DENR</i>	↑	5,01	↓	0,68	AA149864	49015_at
<i>NCOA6IP</i>	↑	5,22	↓	0,7	D20046	62765_r_at
<i>C13orf23</i>	↑	23,58	↓	0,8	AI760318	64462_at
<i>ZAK</i>	↑	8,9	↓	0,93	AI799498	60464_at
<i>ZBTB2</i>	↑	7,94	↓	0,89	AA541560	61339_r_at
<i>C20orf20</i>	↑	11,62	↓	0,71	W68834	65437_at
<i>DNAJC10</i>	↑	4,04	↓	0,67	AI805739	48849_i_at
<i>nicht annotiert</i>	↑	24,56	↓	0,76	AI815028	62196_at
<i>XPOT</i>	↑	4,34	↓	0,69	AI743953	60502_at
<i>LOC401466</i>	↑	7	↑	1,03	AA551303	58595_f_at
<i>PNPT1</i>	↑	4,44	↓	0,77	AA535914	63984_f_at
<i>C1orf16</i>	↑	6,81	↑	1,32	AI202206	74411_at
<i>HBP1</i>	↑	6,23	↑	1,11	AI922183	71293_at
<i>ATP6V1E2</i>	↑	16,14	↑	1,33	AA053116	89901_s_at
<i>RPL31</i>	↑	7,51	↑	1,08	AA147981	82260_at
<i>nicht annotiert</i>	↑	9,39	↑	1,11	AI973225	74593_at
<i>SMARCC1</i>	↑	4,57	↓	0,80	AA579871	68305_at
<i>NME1</i>	↑	5,01	↑	1,18	AA564822	71854_at
<i>SLC28A3</i>	↑	5,72	↓	0,81	AI091154	75585_at
<i>GAJ</i>	↑	8,91	↓	0,84	AA542845	77429_at
<i>FLJ12903</i>	↑	5,78	↓	0,88	R82650	88193_at
<i>LOC148203</i>	↑	4,11	↓	0,90	AI365003	83830_at

Gensymbol	Tumor/Healthy		High/Low		Genbank	Probe Set ID
	Trend	FC ¹	Trend	FC ¹		
<i>HELLS</i>	↑	5,15	↓	0,75	AA209375	72750_at
<i>HCAP-G</i>	↑	4,43	↓	0,86	AI761782	88814_at
<i>nicht annotiert</i>	↑	9,97	↑	1,48	AI190289	82889_at
<i>DHX15</i>	↑	5,07	↓	0,67	AI073873	71582_at
<i>nicht annotiert</i>	↑	4,46	↓	0,72	AL036662	82688_at
<i>CSNK2A1</i>	↑	5,35	↓	0,71	AA657457	74832_at
<i>HOXB8</i>	↑	10,52	↑	1,35	AI803254	90729_at
<i>LRCH1</i>	↑	6,07	↑	1,27	AA229808	87317_at
<i>FLJ11712</i>	↑	4,17	↓	0,70	AA910914	90528_at
<i>nicht annotiert</i>	↑	14,07	↓	0,75	AI431778	68652_at
<i>NPM1</i>	↑	7,85	↓	0,69	AA857840	88066_s_at
<i>HSPC121</i>	↑	5,73	↓	0,75	AI984229	92111_g_at
<i>HSPC129</i>	↑	4,03	↓	0,99	W74196	74875_at
<i>PDCD11</i>	↑	4,46	↓	0,96	AW026194	91519_at
<i>nicht annotiert</i>	↑	5,11	↑	1,15	AI972511	89080_at
<i>nicht annotiert</i>	↑	9,19	↓	0,88	AW043782	81091_at
<i>NFXL1</i>	↑	10,80	↑	1,04	AI829702	90277_at
<i>SLCO4A1</i>	↑	4,75	↓	0,77	AW016409	87860_s_at
<i>CASP2</i>	↑	6,25	↑	1,17	AI308202	67372_at
<i>DHX9</i>	↑	4,59	↓	0,84	AI540121	79227_at
<i>HLCS</i>	↑	10,96	↑	1,29	T77624	87429_at
<i>POGK</i>	↑	4,66	↓	0,70	AI983896	85748_at
<i>SFRS1</i>	↑	4,59	↓	0,78	AW026512	91177_s_at
<i>IQGAP3</i>	↑	4,21	↑	1,05	AI690773	91873_s_at

Erklärung:

¹ FC = Fold Change

Appendix-Tab. 6: Transkripte aus den Genlisten „Tumor down“ für die GeneChips U95A, B, C, D und E (272 Sequenzen).

Gensymbol	Tumor/Healthy		High/Low		Genbank	Probe Set ID
	Trend	FC ¹	Trend	FC ¹		
<i>CA12</i>	↓	0,16	↓	0,67	AF037335	36454_at
<i>CYP4F12</i>	↓	0,18	↓	0,27	AC004523	35492_at
<i>SCNN1A</i>	↓	0,18	↓	0,99	X76180	35207_at
<i>STXBP2</i>	↓	0,16	↓	0,77	AB002559	38259_at
<i>IGHA1</i>	↓	0,12	↓	0,1	AF067420	33499_s_at
<i>PINK1</i>	↓	0,21	↑	1,1	W28299	35361_at
<i>MYL9</i>	↓	0,03	↑	1,33	J02854	39145_at
<i>ANPEP</i>	↓	0,03	↓	0,7	M22324	39385_at
<i>PRDX6</i>	↓	0,14	↓	0,73	D14662	39354_at
<i>CIB1</i>	↓	0,2	↓	0,49	U85611	1020_s_at
<i>MGC27165</i>	↓	0,2	↓	0,22	AA806239	33613_at
<i>SELENBP1</i>	↓	0,17	↓	0,86	U29091	37405_at
<i>TEGT</i>	↓	0,11	↓	0,71	W28869	33989_f_at
<i>ABCG2</i>	↓	0,06	↓	0,75	AF093771	33733_at
<i>SCNN1B</i>	↓	0,03	↓	0,31	X87159	39682_at
<i>ADH1C</i>	↓	0,1	↓	0,29	M12272	36247_f_at
<i>TNIP1</i>	↓	0,12	↓	0,69	AJ011896	38971_r_at
<i>C21orf33</i>	↓	0,21	↑	1,68	D86062	31927_s_at
<i>FGFR2</i>	↓	0,07	↑	1,15	M80634	34354_at

Gensymbol	Tumor/Healthy		High/Low		Genbank	Probe Set ID
	Trend	FC ¹	Trend	FC ¹		
<i>DUSP1</i>	↓	0,13	↓	0,72	X68277	1005_at
<i>HPGD</i>	↓	0,07	↑	1,26	L76465	32570_at
<i>FCGRT</i>	↓	0,07	↑	1,19	U12255	31431_at
<i>BTNL3</i>	↓	0,12	↓	0,51	AB020625	31645_at
<i>STAT6</i>	↓	0,19	↑	1,02	U16031	845_at
<i>KLF4</i>	↓	0,22	↓	0,77	U70663	36214_at
<i>GSN</i>	↓	0,08	↓	0,75	X04412	32612_at
<i>EPHX1</i>	↓	0,06	↑	2,13	L25879	38790_at
<i>SLC22A1LS</i>	↓	0,11	↓	0,66	AF037066	37414_at
<i>PRSS8</i>	↓	0,23	↑	1,22	L41351	634_at
<i>F2RL1</i>	↓	0,13	↓	0,51	U34038	36345_g_at
<i>TPM2</i>	↓	0,22	↓	0,26	M12125	32314_g_at
<i>ASAH1</i>	↓	0,07	↑	2	M92449	33382_at
<i>IGLC2</i>	↓	0,21	↓	0,53	D84143	31315_at
<i>SMPD1</i>	↓	0,11	↑	2,7	X59960	32574_at
<i>PRSS3</i>	↓	0,12	↓	0,59	X71345	40043_at
<i>TPSAB1</i>	↓	0,06	↓	0,46	M30038	32905_s_at
<i>CAPNS1</i>	↓	0,17	↓	0,7	X04106	36138_at
<i>ITPKA</i>	↓	0,07	↓	0,27	X54938	118_at
<i>SLC1A1</i>	↓	0,2	↓	0,68	AI928365	38267_at
<i>ACVRL1</i>	↓	0,16	↓	0,46	U77713	1927_s_at
<i>P2RX4</i>	↓	0,25	↑	1,52	U83993	38332_at
<i>GNA11</i>	↓	0,15	↓	0,87	N36926	41476_at
<i>HSD11B2</i>	↓	0,15	↑	1,1	U26726	39697_at
<i>PRSS2</i>	↓	0,23	↓	0,46	U66061	32796_f_at
<i>HBB</i>	↓	0,13	↓	0,5	M25079	31687_f_at
<i>PTPRH</i>	↓	0,22	↑	1,22	D15049	1811_at
<i>HSD3B2</i>	↓	0,17	↓	0,98	M77144	34002_at
<i>SLC22A4</i>	↓	0,2	↑	2,12	AB007448	40391_at
<i>JUP</i>	↓	0,23	↑	1,2	M23410	2047_s_at
<i>SLC9A3R1</i>	↓	0,17	↓	0,71	AF015926	32174_at
<i>ZG16</i>	↓	0	↓	0,31	AI732905	38848_at
<i>CA4</i>	↓	0,01	↑	1,73	M83670	40739_at
<i>RAB8A</i>	↓	0,24	↓	0,64	AI743606	35339_at
<i>AKR1B10</i>	↓	0,11	↓	0,72	U37100	37482_at
<i>TRIM31</i>	↓	0,23	↓	0,97	X81006	35064_at
<i>TJP3</i>	↓	0,2	↓	0,7	AC005954	35148_at
<i>CLDN7</i>	↓	0,2	↓	0,64	AJ011497	38482_at
<i>SLC25A1</i>	↓	0,19	↓	0,75	X96924	38998_g_at
<i>IGL@</i>	↓	0,23	↓	0,23	M18645	33274_f_at
<i>CA2</i>	↓	0,02	↓	0,77	J03037	40095_at
<i>IGL@</i>	↓	0,23	↓	0,22	X57809	33273_f_at
<i>AKRIC1</i>	↓	0,16	↓	0,75	U05861	32805_at
<i>TNFSF10</i>	↓	0,25	↓	0,76	U37518	1715_at
<i>CKB</i>	↓	0,17	↓	0,68	X15334	40862_i_at
<i>GENX-3414</i>	↓	0,15	↑	3,93	AF062534	38975_at
<i>KRT19</i>	↓	0,19	↓	0,68	Y00503	40899_at
<i>GPA33</i>	↓	0,17	↑	1,21	U79725	37875_at
<i>ARSA</i>	↓	0,13	↓	0,7	X52151	37963_at
<i>FCGBP</i>	↓	0,13	↑	1,07	D84239	39014_at
<i>CDKN1A</i>	↓	0,2	↑	1,11	U03106	2031_s_at

Gensymbol	Tumor/Healthy		High/Low		Genbank	Probe Set ID
	Trend	FC ¹	Trend	FC ¹		
<i>MT1H</i>	↓	0,25	↓	0,2	R93527	39594_f_at
<i>ENTPD5</i>	↓	0,18	↑	3,16	AF039918	40666_at
<i>AQP8</i>	↓	0,02	↓	0,49	AB013456	33651_at
<i>VDR</i>	↓	0,21	↑	1,52	J03258	1410_at
<i>DCTN1</i>	↓	0,17	↓	0,78	AF086947	36158_at
<i>CA12</i>	↓	0,18	↓	0,71	AL050025	35275_at
<i>RARRES2</i>	↓	0,2	↓	0,86	U77594	34407_at
<i>ETHE1</i>	↓	0,12	↓	0,68	D83198	36170_at
<i>IL32</i>	↓	0,17	↑	1,1	AA631972	39119_s_at
<i>HBA1</i>	↓	0,09	↓	0,45	J00153	31525_s_at
<i>AES</i>	↓	0,14	↑	1,02	AF072902	41337_at
<i>PCK1</i>	↓	0,04	↑	2,49	L12760	33703_f_at
<i>MYO1A</i>	↓	0,22	↑	2,05	AF105424	34595_at
<i>TRIM31</i>	↓	0,13	↓	0,66	Y07828	35029_at
<i>MEP1B</i>	↓	0,15	↓	0,93	X81333	31976_at
<i>FKBP1B</i>	↓	0,13	↓	0,87	D38037	355_s_at
<i>LGALS2</i>	↓	0,04	↓	0,2	AL022315	37456_at
<i>CLDN8</i>	↓	0,04	↓	0,55	AL049977	33611_g_at
<i>SEPP1</i>	↓	0,14	↑	2,89	Z11793	34363_at
<i>SPINK5</i>	↓	0,25	↑	1,07	AJ228139	40315_at
<i>HIST1H2BD</i>	↓	0,13	↓	0,97	AJ223353	38576_at
<i>TAGLN</i>	↓	0,16	↓	0,8	M95787	36931_at
<i>LBA1</i>	↓	0,25	↑	1,17	AB002340	32660_at
<i>TST</i>	↓	0,11	↑	1,12	D87292	36123_at
<i>SLC6A8</i>	↓	0,16	↓	0,72	U36341	40926_at
<i>BENE</i>	↓	0,08	↑	1,3	U17077	33331_at
<i>CLDN8</i>	↓	0,04	↓	0,98	AL049977	33610_at
<i>LOC90355</i>	↓	0,18	↓	0,51	AF038182	33466_at
<i>DKFZP586A0522</i>	↓	0,23	↓	0,62	AL050159	38717_at
<i>nicht annotiert</i>	↓	0,23	↓	0,62	AL109702	33751_at
<i>TPM2</i>	↓	0,24	↓	0,41	M12125	32313_at
<i>FCGRT</i>	↓	0,24	↓	0,62	U12255	31432_g_at
<i>RHOC</i>	↓	0,18	↑	1,13	L25081	1395_at
<i>BAK1</i>	↓	0,19	↓	0,71	U16811	846_s_at
<i>ATP2A3</i>	↓	0,23	↑	1,23	Y15724	36482_s_at
<i>MXII</i>	↓	0,24	↓	0,63	L07648	39072_at
<i>MEP1A</i>	↓	0,25	↑	4,03	M82962	35489_at
<i>FABP2</i>	↓	0,09	↓	0,28	M18079	38587_at
<i>POLD4</i>	↓	0,19	↓	0,9	U09196	38397_at
<i>MICAL2</i>	↓	0,1	↑	1,73	AB018293	40847_at
<i>LGALS4</i>	↓	0,18	↑	1,03	AB006781	765_s_at
<i>STAB1</i>	↓	0,24	↓	0,53	D87433	38487_at
<i>GUCA2A</i>	↓	0	↑	1,7	M97496	33995_at
<i>PCK1</i>	↓	0,07	↑	2,31	L05144	33702_f_at
<i>BSG</i>	↓	0,09	↑	1,02	X64364	36162_at
<i>PAPSS2</i>	↓	0,16	↓	0,43	AF091242	36233_at
<i>SULT1A1</i>	↓	0,18	↓	0,86	X78283	31804_f_at
<i>PGCP</i>	↓	0,25	↓	0,67	W28330	32765_f_at
<i>ABPI</i>	↓	0,13	↑	1,02	U11863	37186_s_at
<i>SRI</i>	↓	0,17	↓	0,66	M32886	39055_at
<i>PPAP2A</i>	↓	0,16	↓	0,43	AF014402	34797_at

Gensymbol	Tumor/Healthy		High/Low		Genbank	Probe Set ID
	Trend	FC ¹	Trend	FC ¹		
<i>MYOM1</i>	↓	0,16	↑	2,7	X69090	35137_at
<i>CHGA</i>	↓	0,06	↑	3,17	U03749	40808_at
<i>UGT1A10</i>	↓	0,13	↑	1,61	M57951	32392_s_at
<i>VIPR1</i>	↓	0,22	↑	1,27	X77777	33766_at
<i>ACOX1</i>	↓	0,2	↓	0,74	X71440	40460_s_at
<i>EDN3</i>	↓	0,12	↓	0,87	J05081	37865_at
<i>CD14</i>	↓	0,1	↓	0,42	X06882	36661_s_at
<i>MYH11</i>	↓	0,03	↑	1,03	AF001548	767_at
<i>TSPAN1</i>	↓	0,1	↑	1,03	AF065388	34775_at
<i>SECTM1</i>	↓	0,07	↓	0,75	U77643	41045_at
<i>COL17A1</i>	↓	0,24	↓	0,88	M91669	41618_at
<i>LOC63928</i>	↓	0,03	↓	0,85	AC002302	33007_at
<i>FUCA1</i>	↓	0,21	↑	1,05	M29877	41814_at
<i>SLC26A3</i>	↓	0,06	↑	1,36	L02785	928_at
<i>RSAD2</i>	↓	0,11	↓	0,53	AF026941	38549_at
<i>ERBB2</i>	↓	0,15	↓	0,81	X03363	1802_s_at
<i>BDKRB2</i>	↓	0,23	↓	0,97	X86163	39310_at
<i>MX11</i>	↓	0,22	↓	0,88	L07648	654_at
<i>ATP6V0D1</i>	↓	0,23	↓	0,95	X71490	38686_at
<i>CDH1</i>	↓	0,17	↑	1,66	L08599	2082_s_at
<i>FMO5</i>	↓	0,08	↑	2,57	Z47553	37874_at
<i>ACADS</i>	↓	0,15	↑	1,26	Z80345	39408_at
<i>TSPAN7</i>	↓	0,17	↓	0,83	L10373	38408_at
<i>MYH11</i>	↓	0,09	↑	1,08	AF013570	37407_s_at
<i>HPGD</i>	↓	0,04	↓	0,88	X82460	37322_s_at
<i>CTSD</i>	↓	0,21	↑	1,14	M63138	239_at
<i>CEACAM1</i>	↓	0,17	↑	1,58	X16354	988_at
<i>ABCB1</i>	↓	0,18	↑	1,31	M14758	1576_g_at
<i>LOC146439</i>	↓	0,23	↓	0,83	AI732810	47641_at
<i>MOBKL2A</i>	↓	0,15	↓	0,58	W68025	45242_at
<i>FTL</i>	↓	0,22	↓	0,39	AW026066	43423_s_at
<i>TMEM45B</i>	↓	0,07	↓	0,74	H87671	59820_at
<i>CaMKIINalpha</i>	↓	0,21	↓	0,83	AI536671	57777_at
<i>MS4A8B</i>	↓	0,13	↓	0,20	AI733116	50099_at
<i>DIP13B</i>	↓	0,15	↓	0,91	AI971695	44855_s_at
<i>FLJ10665</i>	↓	0,18	↓	0,74	AW001611	59353_at
<i>CDW92</i>	↓	0,24	↓	0,61	AI768065	43488_at
<i>CIDEC</i>	↓	0,24	↓	0,68	AI346596	48075_at
<i>nicht annotiert</i>	↓	0,23	↓	0,83	AA150501	45220_at
<i>FLJ43855</i>	↓	0,16	↑	1,10	AI889142	59419_f_at
<i>MGC45871</i>	↓	0,25	↓	0,23	N36764	59095_at
<i>NMES1</i>	↓	0,16	↓	0,47	AI625959	56999_at
<i>nicht annotiert</i>	↓	0,18	↓	0,81	AL041162	56035_at
<i>ITLN1</i>	↓	0,07	↓	0,37	AA573809	45694_at
<i>EGLN3</i>	↓	0,14	↓	0,97	AA028887	47388_at
<i>CECR1</i>	↓	0,24	↓	0,71	AI572068	58410_at
<i>PTPN21</i>	↓	0,22	↑	1,53	AA947123	55562_at
<i>GDPD3</i>	↓	0,21	↓	0,31	AI125673	52406_s_at
<i>CPM</i>	↓	0,22	↓	0,37	AA541736	45719_at
<i>nicht annotiert</i>	↓	0,10	↓	0,96	AI963605	46445_at
<i>C19orf21</i>	↓	0,21	↓	0,89	AI669065	54150_at

Gensymbol	Tumor/Healthy		High/Low		Genbank	Probe Set ID
	Trend	FC ¹	Trend	FC ¹		
<i>MAWBP</i>	↓	0,20	↑	2,08	AI765890	58322_at
<i>nicht annotiert</i>	↓	0,20	↓	0,76	N80935	49111_at
<i>SLC26A2</i>	↓	0,09	↓	0,23	W95021	53999_at
<i>CCL28</i>	↓	0,14	↑	1,03	N63913	44210_at
<i>FLJ25770</i>	↓	0,18	↑	1,74	AA639553	56683_i_at
<i>C10orf54</i>	↓	0,16	↓	0,59	W72919	49349_at
<i>ECE1</i>	↓	0,23	↑	1,19	AL039866	45721_at
<i>nicht annotiert</i>	↓	0,09	↓	0,27	W93928	54436_at
<i>ST6GALNAC6</i>	↓	0,10	↑	1,34	AA131632	48111_at
<i>FLJ14981</i>	↓	0,24	↓	0,72	AA496318	47056_at
<i>RAXLX</i>	↓	0,18	↑	2,05	AA005236	49674_at
<i>GBA</i>	↓	0,23	↓	0,95	AI971969	43836_s_at
<i>TMPIT</i>	↓	0,18	↓	0,84	W92109	48102_s_at
<i>MUC20</i>	↓	0,24	↑	1,34	AA633240	54085_at
<i>MGC4172</i>	↓	0,12	↓	0,46	W58459	55571_at
<i>ITM2C</i>	↓	0,12	↓	0,95	AA128019	56471_at
<i>CHP</i>	↓	0,12	↓	0,29	AI571830	49347_at
<i>VSIG2</i>	↓	0,12	↓	0,96	AI799005	57008_at
<i>FLJ14213</i>	↓	0,20	↓	0,85	AA527350	51656_at
<i>LIMS2</i>	↓	0,21	↑	1,08	AA522674	53785_at
<i>SHD</i>	↓	0,24	↓	0,63	AI672830	47873_at
<i>SPPL2A</i>	↓	0,21	↓	0,91	AI674647	44149_at
<i>LOC63928</i>	↓	0,07	↓	0,78	AA527435	58951_at
<i>SIAT8F</i>	↓	0,24	↓	0,69	AW015140	42635_at
<i>SLC26A2</i>	↓	0,13	↓	0,25	AI718385	53061_at
<i>FLJ23129</i>	↓	0,19	↑	2,23	AI989799	46866_at
<i>C14orf139</i>	↓	0,23	↓	0,46	AW006235	45187_at
<i>nicht annotiert</i>	↓	0,14	↓	0,41	AI822137	62182_at
<i>LOC201895</i>	↓	0,21	↓	0,34	AI824013	55847_at
<i>nicht annotiert</i>	↓	0,23	↑	1,03	N63957	63135_at
<i>TRAPPC1</i>	↓	0,18	↓	0,6	AI982695	65822_at
<i>SH3BGRL2</i>	↓	0,21	↓	0,59	AI972873	65975_at
<i>SLC9A3R1</i>	↓	0,2	↓	0,47	AA587236	63998_at
<i>LAMA1</i>	↓	0,08	↑	2,14	AI750156	62175_at
<i>ACVRL1</i>	↓	0,21	↑	1,15	T63524	48677_at
<i>AMN</i>	↓	0,08	↓	0,99	AI739257	52736_f_at
<i>GDPD3</i>	↓	0,14	↑	1,21	AA149860	58504_at
<i>CPNE2</i>	↓	0,24	↓	0,99	AI857649	63031_at
<i>PLAC8</i>	↓	0,16	↓	0,69	AA150254	63342_at
<i>SH3BGRL3</i>	↓	0,14	↓	0,58	AI091825	51769_at
<i>CLDN23</i>	↓	0,13	↑	1,7	AA393089	63774_at
<i>DIP13B</i>	↓	0,09	↓	0,68	AI972901	48820_at
<i>GNA11</i>	↓	0,24	↓	0,72	AI983784	57231_at
<i>LOC130617</i>	↓	0,21	↑	1,12	AI056075	63892_at
<i>C6orf105</i>	↓	0,21	↓	0,57	AA470369	64740_at
<i>nicht annotiert</i>	↓	0,25	↓	0,21	AA401302	53810_f_at
<i>MAX</i>	↓	0,23	↓	0,75	R42375	63606_at
<i>PAPSS2</i>	↓	0,21	↓	0,61	AA643513	60874_g_at
<i>nicht annotiert</i>	↓	0,07	↑	1,35	AA628600	56519_at
<i>DHRS9</i>	↓	0,06	↓	0,53	AI978918	62763_at
<i>EDIL3</i>	↓	0,15	↓	0,71	AL047586	63316_at

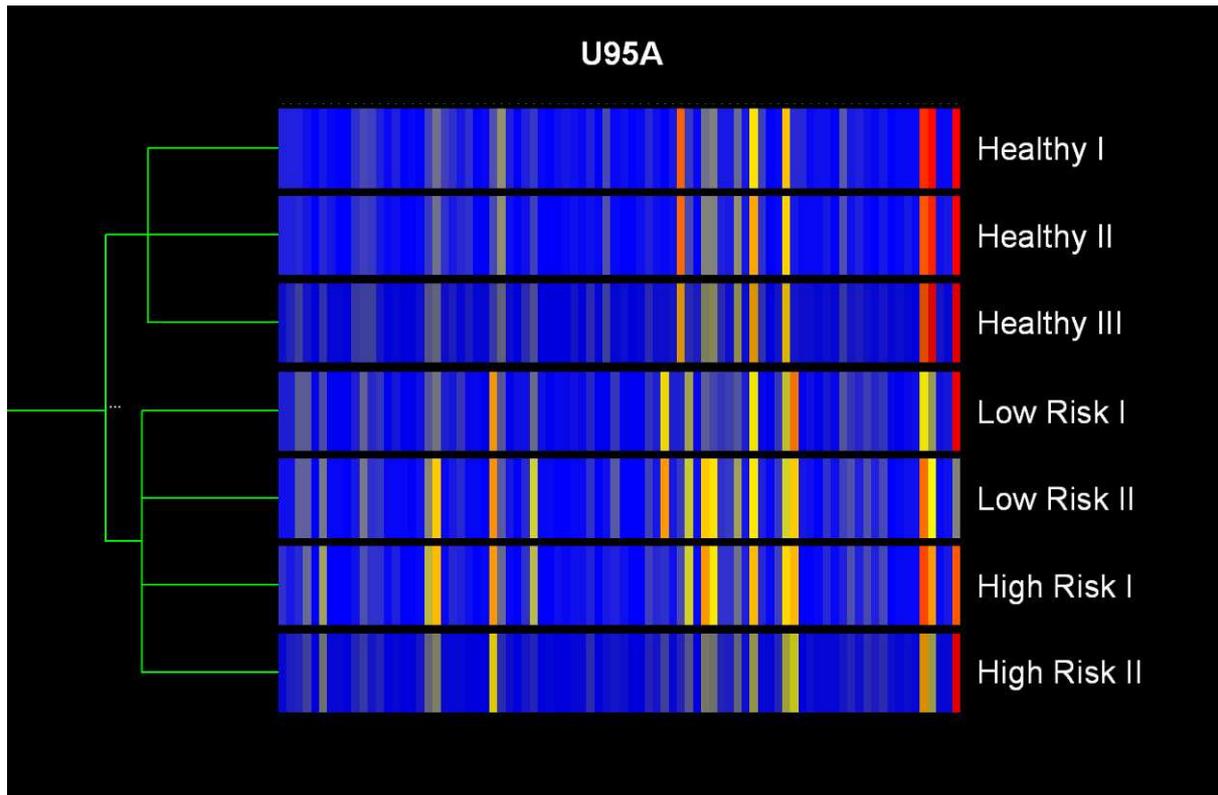
Gensymbol	Tumor/Healthy		High/Low		Genbank	Probe Set ID
	Trend	FC ¹	Trend	FC ¹		
<i>MGC13057</i>	↓	0,08	↓	0,74	D12309	62939_at
<i>FLJ21511</i>	↓	0,1	↓	0,34	AI962905	54320_at
<i>MGAT4B</i>	↓	0,23	↓	0,83	AW051741	65087_at
<i>MGC15875</i>	↓	0,2	↓	0,17	AI436552	64016_at
<i>MYO15B</i>	↓	0,2	↓	0,59	AI825877	59375_at
<i>nicht annotiert</i>	↓	0,2	↓	0,63	AI092832	50052_i_at
<i>SULT1A3</i>	↓	0,19	↓	0,6	AI805943	64454_at
<i>IGHA1</i>	↓	0,14	↓	0,06	AI991095	57235_s_at
<i>MGC45780</i>	↓	0,19	↓	0,2	AI799784	64694_at
<i>DKFZP564I1171</i>	↓	0,17	↑	1,56	AI799075	48818_s_at
<i>RetSat</i>	↓	0,13	↓	0,92	AA772122	64889_at
<i>nicht annotiert</i>	↓	0,22	↓	0,12	AA929047	49471_r_at
<i>TDE2L</i>	↓	0,23	↑	1,1	AI346658	65957_at
<i>RAB1B</i>	↓	0,19	↓	0,94	W30716	65903_at
<i>MDK</i>	↓	0,23	↑	2,31	AW001140	75242_f_at
<i>nicht annotiert</i>	↓	0,12	↓	0,88	R41372	75579_at
<i>A2M</i>	↓	0,15	↓	0,42	AI969632	74537_f_at
<i>nicht annotiert</i>	↓	0,19	↓	0,35	AA682405	75945_at
<i>HPGD</i>	↓	0,15	↑	1,98	AI457588	76073_at
<i>nicht annotiert</i>	↓	0,08	↑	1,97	AI572177	67712_at
<i>nicht annotiert</i>	↓	0,18	↓	0,91	AA513406	80876_at
<i>PRV1</i>	↓	0,03	↑	1,21	AI870039	73133_at
<i>A2M</i>	↓	0,15	↓	0,42	R83372	75187_f_at
<i>nicht annotiert</i>	↓	0,10	↓	0,12	AI733281	77355_at
<i>A2M</i>	↓	0,12	↓	0,74	AI969632	74536_i_at
<i>ABP1</i>	↓	0,14	↑	1,22	AI984156	74904_at
<i>ENTPD8</i>	↓	0,05	↑	1,19	AA644044	88146_at
<i>UBE1</i>	↓	0,21	↑	4,60	AI660412	74862_at
<i>nicht annotiert</i>	↓	0,19	↑	6,45	AI631594	88445_at
<i>nicht annotiert</i>	↓	0,16	↓	0,86	AI686226	77570_at
<i>CDKN2B</i>	↓	0,23	↓	0,50	AI983437	75652_at
<i>SLC16A9</i>	↓	0,22	↑	4,71	AI480338	76444_at
<i>nicht annotiert</i>	↓	0,06	↓	0,09	T77543	89759_f_at
<i>BTNL8</i>	↓	0,17	↑	2,85	AA884903	68016_at
<i>nicht annotiert</i>	↓	0,13	↑	3,73	AI686890	79848_at
<i>PHACTR2</i>	↓	0,23	↑	2,21	AI653733	77851_at
<i>NAALADL1</i>	↓	0,19	↓	0,71	AI743674	89057_at
<i>CCNI</i>	↓	0,19	↑	1,55	AA161405	76056_at
<i>PRV1</i>	↓	0,03	↓	0,41	AA535187	72817_at
<i>PRV1</i>	↓	0,07	↓	0,91	AA541644	85323_at
<i>MMP28</i>	↓	0,12		1,00	AI973076	83070_r_at
<i>LOC134147</i>	↓	0,10	↓	0,20	AL036039	89643_at
<i>LOC375133</i>	↓	0,23	↓	0,81	AI888681	71214_f_at
<i>LEPREL1</i>	↓	0,16	↑	1,63	AI685410	69750_at
<i>MGC13057</i>	↓	0,24	↓	0,20	AA418669	85904_at
<i>COG3</i>	↓	0,23	↑	1,49	AA868189	86759_at
<i>MI-ERI</i>	↓	0,24	↓	0,87	AI492358	75834_at
<i>ASAH1</i>	↓	0,12	↑	4,82	AI581263	67241_at
<i>nicht annotiert</i>	↓	0,25	↓	0,47	AI810266	82094_i_at

Erklärung:

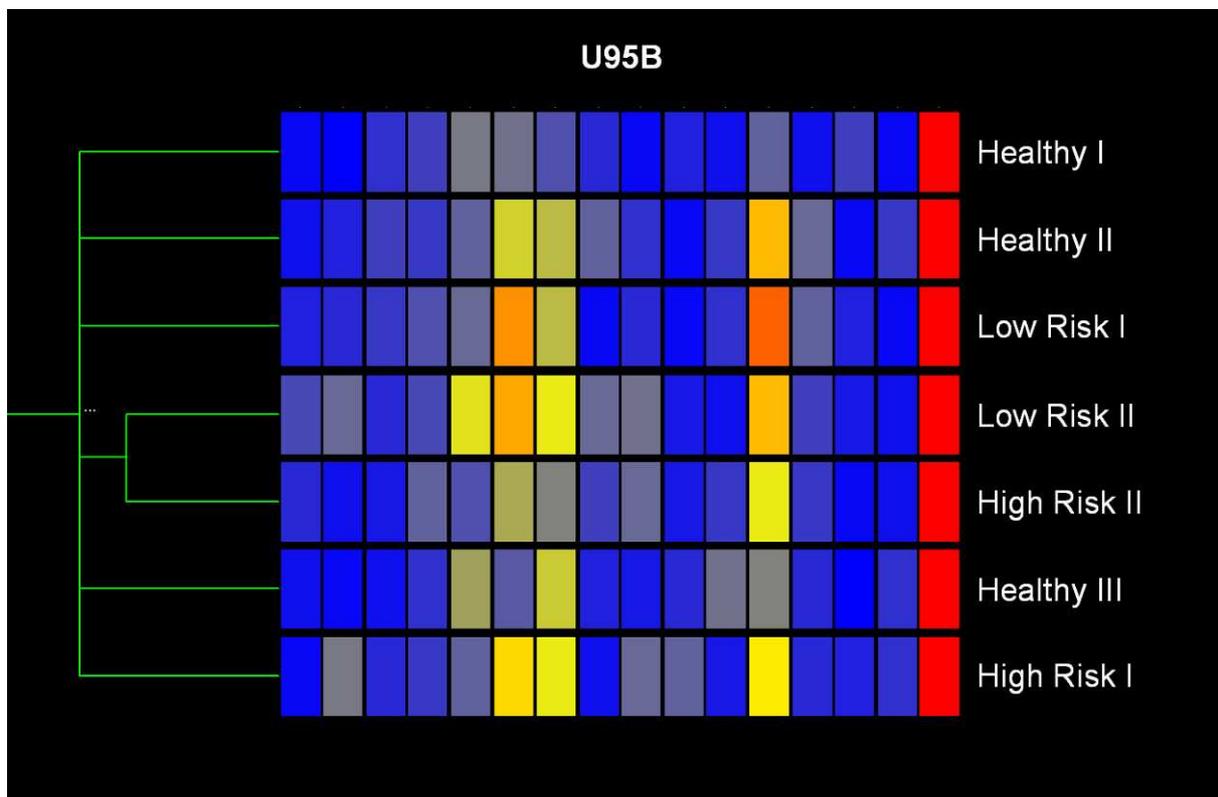
¹ FC = Fold Change

Appendix-Tab. 7: Liste von 39 Genen mit in der Literatur beschriebener Deregulation im Kolonkarzinom.**Genname**

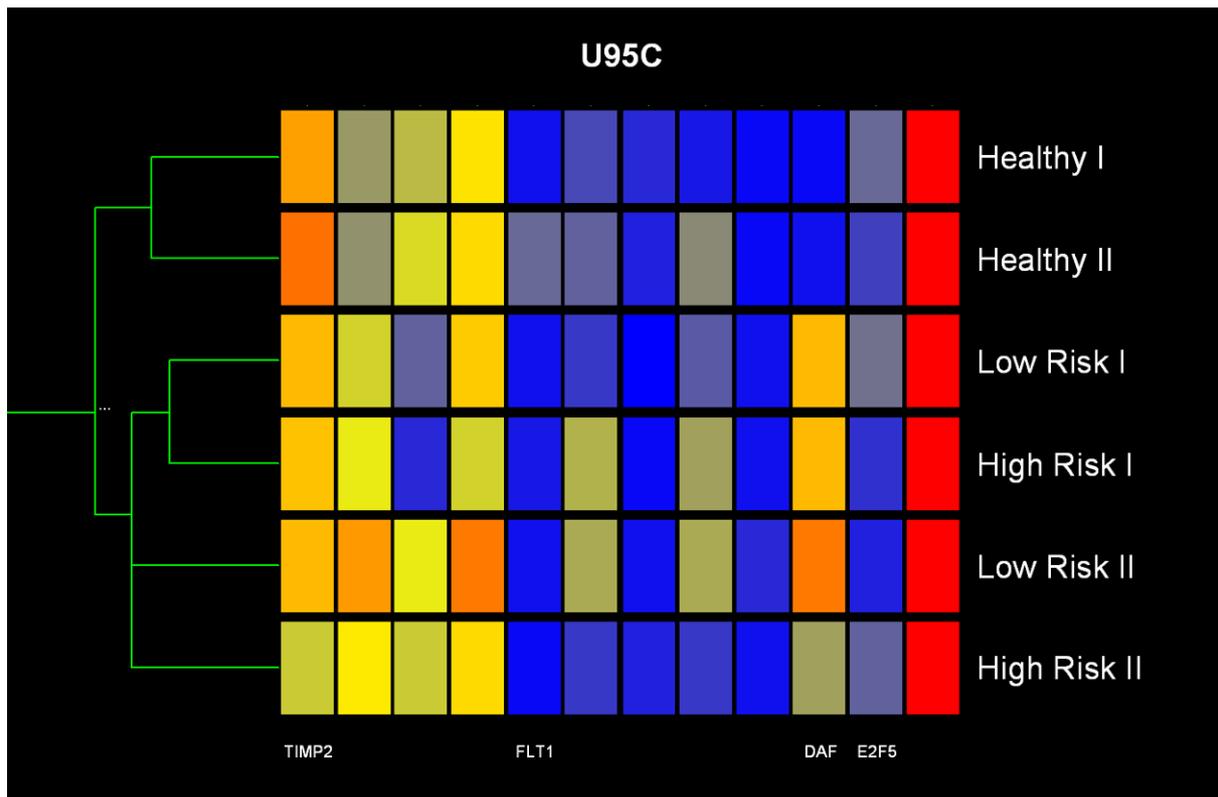
Antigen identified by monoclonal antibody Ki-67
Baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)
Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)
Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (biliary glycoprotein)
C-fos induced growth factor (vascular endothelial growth factor D)
Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)
Decay accelerating factor for complement (CD55, Cromer blood group system)
DCC (Deleted in colorectal carcinoma)
Deoxythymidylate kinase (thymidylate kinase)
E2F transcription factor 1
E2F transcription factor 3
E2F transcription factor 4, p107/p130-binding
E2F transcription factor 5, p130-binding
Fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor receptor)
Fms-related tyrosine kinase 4
Hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)
Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)
Matrilin 2
Mdm2, transformed 3T3 cell double minute 2, p53 binding protein (mouse)
Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p105)
Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100)
Plasminogen activator, urokinase
Plasminogen activator, urokinase receptor
Proliferating cell nuclear antigen
RAS p21 protein activator (GTPase activating protein) 1
S100 calcium binding protein A4 (calcium protein, calvasculin, metastasin, murine placental)
Secreted phosphoprotein 1 (osteopontin, bone sialoprotein I, early T-lymphocyte activation 1)
Tenascin XB
Thymidylate synthetase
Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (erythroid potentiating activity, collagenase inhibitor)
Tissue inhibitor of metalloproteinase 2
Tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (Sorsby fundus dystrophy, pseudoinflammatory)
Tissue inhibitor of metalloproteinase 4
Transforming growth factor, beta 1 (Camurati-Engelmann disease)
Transforming growth factor, beta receptor I (activin A receptor type II-like kinase, 53kDa)
Tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)
Vascular endothelial growth factor
Vascular endothelial growth factor B
Vascular endothelial growth factor C



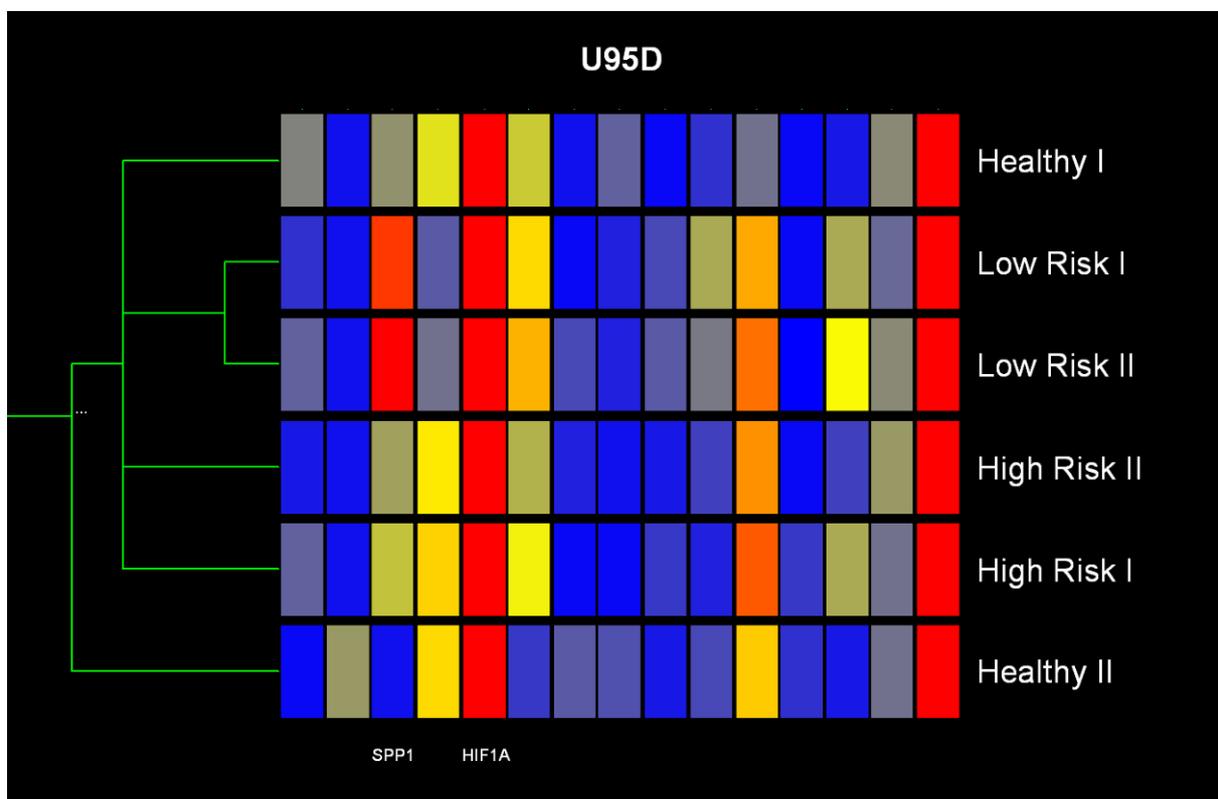
Appendix-Abb. 1: Konditions-Baumdiagramm für U95A beruhend auf allen repräsentierten Sequenzen einer Signatur von 39 allgemeinen potenziell prognoserelevanten Genen.



Appendix-Abb. 2: Konditions-Baumdiagramm für U95B beruhend auf allen repräsentierten Sequenzen einer Signatur von 39 allgemeinen potenziell prognoserelevanten Genen.



Appendix-Abb. 3: Konditions-Baumdiagramm für U95C beruhend auf allen repräsentierten Sequenzen einer Signatur von 39 allgemeinen potenziell prognoserelevanten Genen.



Appendix-Abb. 4: Konditions-Baumdiagramm für U95D beruhend auf allen repräsentierten Sequenzen einer Signatur von 39 allgemeinen potenziell prognoserelevanten Genen.

Appendix-Tab. 8: Relative Amount-Werte der per qPCR untersuchten Transkripte in verschiedenen Geweben (Teil I). Erklärung: Normal/Adenom/Tumor = Normalgewebe-/Adenom-/Tumorproben, M HEP/M PUL/M PER = hepatisches/pulmonales/peritoneales Metastasenmaterial, SYBR/Taqman = SYBR-Green/Taqman PCR, Taqman 1/ Taqman 2 = 1./2. Taqman-Lauf.

Fall	REGIA			REGIA			REGIA			EXT		CLDN8
	Normal	Adenom	Tumor	Tumor	Tumor	M HEP	M PUL	M PER	Normal	Tumor	Normal	
	Taqman	Taqman	SYBR	Taqman 1	Taqman 2	Taqman	Taqman	Taqman	SYBR	SYBR	Taqman	
1			0,3585	0,0954	0,0924							
2			0,1259	0,0742	0,1119							
3	1,6821		46,4200	27,2213	39,0406				0,3380	0,7270	64,5942	
4	2,9214		30,4844	1415,0788	240,5575			193,5959	1,0234	0,9526	0,1839	
5			0,4943	0,3337	0,3231						0,0939	
6	0,0073		9,8900	5,0982	0,0916				0,3523	0,1569	29,8571	
7			0,0634	0,1873	0,0449						55,0753	
8	0,7793		3075,6309	2896,3094	2072,1386				0,3918	0,8370	6,7272	
9	0,0195		41,4510	10,6787	7,6224				0,3407	0,7873	57,4141	
10			13,1500	23,5883	38,4143							
11			0,0187	0,0073	0,0091						0,0530	
12			5,1934	2,2501	0,4618						11,6049	
13			1,7573	0,0615	0,0583						10,8779	
14	0,0022	0,2390	39,9466	22,5231	59,5861						9,4044	
15	44,5361		194,9103	52,2249	31,8577	1,4306		0,0123	0,5141	0,5346	2,8945	
16	0,0288		10,4800	6,9003	7,4139				0,7864	1,7695	8,7543	
17			0,1443	0,0130	0,0290						82,7106	
18	0,0111		105,6635	26,9709	184,0012	5,4264		0,1349	0,6050	1,1460	3,3404	
19			1,1355	0,1241	0,6800				0,1932	0,2052	34,8560	
20			0,1797	0,0321	0,0429						1,5984	
21			0,7071	0,0534	0,1242						23,0495	
22	28,3165		7,6387	2,3080	2,5437				0,1418	0,3627	16,7180	
23	1,4442		9,9636	5,4014	6,9015			0,0598	0,2365	0,2839	1,4406	
24	0,0032		16,7567	5,5277	9,4714						12,2666	
25			0,1731	0,0090	0,0109				0,3776	0,5384	3,2868	
26	0,0052		1,2894	28,9736	37,7108						64,2964	
27	0,0047		5,8159	3,3173	5,3774				0,2449		3,7235	
28	0,0001		8,3600	3,1095	2,8486				0,3078	0,2829	27,9866	
29			0,5396	0,1688	0,2743							
30	0,0026		0,0011	0,0486	0,0832				0,0925		11,8762	
31	0,5633		0,1200	1,3692	0,0516					0,7474	4,4485	
32	0,0010		7,6035	10,3627	9,2550				0,8706	0,8507	8,3205	
33			11,4452	3,9267	0,0198	0,2661					4,2970	
34			0,2600	0,3276	0,3353						36,0851	
35	0,3071		0,2780	0,5012	0,0612				0,9593	0,7380	18,1261	
36			0,0621	0,0583	0,0526				0,3333	0,2204	12,9960	
37			6,1475	7,3615	3,2122					0,7337		

	REGIA	REGIA	REGIA	REGIA	REGIA	REGIA	REGIA	REGIA	REGIA	EXT	EXT	CLDN8
Fall	Normal	Adenom	Tumor	Tumor	Tumor	M HEP	M PUL	M PER	Normal	Tumor	Normal	
	Taqman	Taqman	SYBR	Taqman 1	Taqman 2	Taqman	Taqman	Taqman	SYBR	SYBR	Taqman	
38			12,0142	3,4581	3,9730	0,9266						
39			187,8365	39,9466	37,1916							0,0900
40	0,0939		25,2813	7,8535	33,2490	0,0574						11,0043
41			7,0128	8,0556	8,9398							49,5221
42			13,2385	0,1142	0,4100							6,1617
43			12,1500	11,3924	9,9652							19,2040
44	0,0026		0,0100	0,0082	0,0186							3,4581
45	0,1093		788,7000	925,0152	767,2598				0,3175	0,7448		16,9514
46			0,8253	0,0840	0,3695				0,8746	0,7570		76,1093
47			3,3700	2,1785	2,1839				0,3941	0,1826		30,0647
48			4,2500	2,9417	3,5724				0,1478	0,1094		8,3977
49	0,0050		0,1103	0,0470	0,0385				0,2784	0,6878		48,3910
50			3,9267	3,4263	0,4006				0,2412	0,3467		32,5218
51	1,8921		0,7006	0,4920	0,4842				0,3833	0,1119		0,3322
52	24,7080	294,7957	2413,0911	973,2500	1154,9154				0,9086	1,1567		6,8685
53	0,0117	761,9600	0,6142	6,3203	16,2260				0,5023	0,2908		7,4643
54			0,2900	0,0943	0,1104				0,2202	1,2397		16,5642
55			0,2535	0,2360	0,3384							34,4556
56	0,0051		0,1604	0,0062	0,0117				0,3807	0,2809		41,0696
57			6,0489	7,5336	6,2343							9,8492
58			2,1535	0,2171	0,0117				0,3905	0,4303		19,7211
59			0,0752	0,0635	0,1619							0,0693
60	0,2110	0,1564	1,9954	4,0840	1,2371							2,4766
61	0,0027		1,2953	32,8996	30,0697							
62	4,7899		253,6450	414,9135	313,0476				0,4057	0,4580		
63	0,1561	0,0152	0,4224	0,1473	0,1878				0,1856	0,2017		
64					2,4570							
65					11,2115							
66					0,0272							
67					0,7072							
68					0,0115							
69					14,4391							
70					0,3165							
71					0,0093							
72					501,5460							
73					0,4404							
74					0,8086							
75					0,0121							
76												
77												
78												
79												
80	0,0294	0,4303										

	<i>REGIA</i>	<i>EXT</i>	<i>EXT</i>	<i>CLDN8</i>							
Fall	Normal	Adenom	Tumor	Tumor	Tumor	M HEP	M PUL	M PER	Normal	Tumor	Normal
	Taqman	Taqman	SYBR	Taqman 1	Taqman 2	Taqman	Taqman	Taqman	SYBR	SYBR	Taqman
81	0,1154	0,2107									
82	0,1843	2105,9246									
83	15,3508	458,3285									
84	50,2217	27,8622									
85	159,4439	0,6301									
86	0,0059	0,2064									
87	0,0190	4,1036									
88	0,0130	0,0424									
89	0,0155	35,0232									
90	1,1278	20,3023									
91	0,9887	0,0500									
92	0,1081	0,1426									
93	0,0685	0,0166									
94	0,1073	0,0306									
95	0,0020	0,0351									
96	0,1187	6,8380									
97					8,1117		0,2736				
98					1,4439		0,4506				
99					15,3128		14,3535				
100					29,2426		143,0128				
101					206,0237		1,2198				
102					3,4224		1,7492				
103					1,0377		33,9812				
104					847,2634	0,4156					
105					107,1385	2,7511					
Σ	48	22	63	63	84	7	7	4	32	32	54

Appendix-Tab. 9: Relative Amount-Werte der per qPCR untersuchten Transkripte in verschiedenen Geweben (Teil II). Erklärung: Normal/Tumor = Normalgewebe-/Tumorproben, SYBR/Taqman = SYBR-Green/Taqman PCR.

	<i>CLDN8</i>	<i>CCR3</i>	<i>CCR3</i>	<i>MEC</i>	<i>MEC</i>	<i>ITGA6</i>	<i>AI247408</i>	<i>AI870708</i>	<i>TMEPAI</i>	<i>AQP8</i>	<i>RAB27B</i>	<i>SERPINE2</i>
Fall	Tumor	Normal	Tumor	Normal	Tumor	Tumor	Tumor	Tumor	Tumor	Tumor	Tumor	Tumor
	Taqman	Taqman	Taqman	SYBR	SYBR	SYBR	SYBR	SYBR	SYBR	Taqman	SYBR	SYBR
1	6,1211										14,7912	
2	0,0256		4,9933									
3	0,0415		5,5919									
4	0,1917	32,3718	21,4564			0,1355		0,1539	955,4258	0,0198		
5	6,1050		3,6638	6,5131	3,8371						37,2715	
6	10,0561		34,9366	11,3924	13,0261		1,2255				73,1778	5,6178
7	0,1575		10,0561									
8	0,2576	134,3637	18,9396			1,1277		0,1873	2452,4364	1,0943	87,0235	
9	0,0506	14,4200	13,6737			0,1601		0,1374	156,1368	0,1419		
10	21,8132		32,8996				3,1023				68,2773	16,9514
11	0,0223	6,3938	2,5374			0,1439		0,6552	198,0883	1,8234	41,2598	
12	2,9485						0,6057				34,3761	24,7610
13	0,1044										16,3362	
14	1,0116		7,2602								24,0284	
15	0,0368										33,6686	
16	0,0421		0,3463	11,1065	1,8108		2,5315					32,0740
17	0,0498		4,9588			0,6099		0,1550	219,7928	0,9181	12,6992	
18	1,8150	69,7119	49,5221			0,1500		0,0136	3565,7751	12,5824		
19	0,0175		18,6788								15,4550	
20	0,0702										799,7101	
21	0,0453		9,8719									
22	0,1330		4,6697	13,3614	0,4253						18,9834	
23	0,0076		1,6434	7,2938	2,8415						29,1751	
24	3,9358		69,5510	16,2985	2,5024							
25	1,1620										8,4561	
26	0,0030										57,0175	
27	0,0167									0,0985		
28	0,0069		2,6882	12,6699	5,0982		11,8762					39,0342
29	0,0336											
30	0,0094		17,7121			0,2073		0,1476	109,1373	0,0117	4,6913	
31	0,0024		11,5248				1,8575					28,6408
32	0,8950										35,0174	
33	4,5420	35,6707	25,4572							42,1268		
34	8,3590		16,3362			0,1579		0,0216	4950,4135	17,1088	40,8803	
35	70,8486											
36	0,3455		14,1559								40,8331	
37	0,3122											
38	0,0138		6,2046									
39	0,0078		55,0753								16,1113	

	<i>CLDN8</i>	<i>CCR3</i>	<i>CCR3</i>	<i>MEC</i>	<i>MEC</i>	<i>ITGA6</i>	<i>AI247408</i>	<i>AI870708</i>	<i>TMEPAI</i>	<i>AQP8</i>	<i>RAB27B</i>	<i>SERPINE2</i>
Fall	Tumor	Normal	Tumor	Normal	Tumor	Tumor	Tumor	Tumor	Tumor	Tumor	Tumor	Tumor
	Taqman	Taqman	Taqman	SYBR	SYBR	SYBR	SYBR	SYBR	SYBR	Taqman	SYBR	SYBR
40	12,9063										88,6470	
41	0,0026		7,0616									
42	0,1384											
43	16,6795		14,4200				3,0809				75,4091	16,5642
44	0,0061		4,2477				5,1219				21,5557	19,1597
45	0,0196		12,7286	10,1261	2,7574		4,6161				9,7136	8,2630
46	0,0219	20,2054	57,5469			0,4687		0,1091	66,5638	43,4113		
47	0,1934		34,2176	6,3790	1,0401		3,6301					27,9221
48	0,0193		23,1029	2,7895	0,2097		10,4590			0,0243		165,0394
49	0,0091		21,5557									
50	20,6776											
51	0,0179											
52	0,0063		34,2176			0,1256		0,7992		0,2045		
53	0,4730											
54	0,0007						15,1369					34,4556
55	0,0384		144,3406	0,0000	1,7171							
56	42,7149								380,0380	252,4756		
57	0,0293		15,2422							0,2865		
58	0,0261		15,3837							2,2501		
59	0,0212		6,6040				4,5106					14,5539
60	0,2550						7,4815					7,9081
61	0,3578										141,0439	
62	0,0351											
63	0,2489		24,0284									
64	0,1646											
65	0,0294											
66	0,4425											
67	0,0244											
68	0,0259											
69	0,4550											
70	0,2507											
71	0,7572											
72	0,0981											
73	0,3888											
74	0,0668											
75	0,0139											
76			52,3457									
77			5,4768									
78			118,6033									
79			1,8489									
Σ	75	7	45	11	11	10	14	10	10	16	27	14

Appendix-Tab. 10: Relative Amount-Werte von *CLDN8* und *REGIA* in kolorektalen Biopsieproben von gesundem Gewebe (entspr. Healthy) und Tumoren.

Healthy			Tumor			
Fall	CLDN8	REGIA	Fall	NOM0¹	CLDN8	REGIA
1	236,5984	0,0112	32	1	2,2862	6,9656
2	124,1806	0,0064	33	1	1,0616	1412,0461
3	81,1750	0,0052	34	1	75,2158	0,6051
4	34,9680	0,0007	35	0	11,1938	1,7535
5	48,3227	0,0083	36	0	0,0780	0,2922
6	73,2435	0,0009	37	0	5,2584	1527,4450
7	120,0892	0,0273	38	0	56,7401	71,6008
8	75,7389	0,0013	39	0	0,1991	0,3965
9	28,1741	0,3644	40	1	0,7168	8,0198
10	13,6544	0,0319	41	1	0,3204	1,7374
11	130,5052	0,0008	42	0	0,0463	9,1066
12	63,3218	0,0036	43	1	0,5670	0,0118
13	108,8574	0,0024	44	1	0,1988	0,0553
14	46,6767	0,0242	45	0	0,0360	19,6107
15	128,8572	0,0029	Σ		14	14
16	126,2054	0,0013				
17	73,1590	0,0023				
18	141,3338	0,2238				
19	4,2810	37,7108				
20	0,5630	51,2177				
21	8,6017	21,4599				
22	5,9503	1,8837				
23	185,4170	0,0008				
24	15,9774	0,0060				
25	308,9643	0,0013				
26	6,2389	0,0267				
27	14,2672	0,0039				
28	46,9471	0,0068				
29	22,1305	0,0017				
30	255,6388	0,0007				
31	7,2835	0,0018				
Σ	31	31				

Erklärung:
¹ 1 wenn NOM0 gesichert, ansonsten 0

7.3 Abkürzungsverzeichnis

ACTB	β-Aktin
5-AzaC	5'-Azacytidin
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CA 19-9	Kohlenhydrat-Antigen 19-9 (<i>engl.</i> Carbohydrate Antigen 19-9)
CCL28	Chemokine (C-C Motif) Ligand 28
CCR	Chemokinrezeptor
CCR3	Chemokine (C-C Motif) Receptor 3
cDNA	Copy DNA/komplementäre DNA (<i>engl.</i> complementary DNA)
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CIN	Chromosomale Instabilität
CLDN	Claudin
CLDN8	Claudin 8
CpG	Cytidin-Guanosin-Dinukleotid (innerhalb von gDNA)
cRNA	Copy RNA/komplementäre RNA (<i>engl.</i> complementary RNA)
C _T	Fluoreszenz-Schwellenwert (<i>engl.</i> threshold cycle)
d	Tag(e)
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
DEPC-H ₂ O	mit Diethylpyrocarbonat behandeltes Wasser
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTP	2'-Desoxyribonucleosid-5'-Triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
EST	kurze transkribierte DNA-Sequenz (<i>engl.</i> expressed sequence tag)
EXTL3	Exostoses (Multiple)-Like 3
FAP	Familiäre adenomatöse Polypose
FC	Fold Change
FCS	Fetales Kälberserum (<i>engl.</i> fetal calf serum)
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
G+Zahl	Umfang der Zellentdifferenzierung
gDNA	genomische DNA
h	Stunde
HBGF	Heparin-bindender Wachstumsfaktor (<i>engl.</i> heparin-binding growth factor)
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HNPCC	Hereditäres nicht-polypöses kolorektales Krebsyndrom (<i>engl.</i> Hereditary Non-Polyposis Colorectal Carcinoma)
Konz.	Konzentration
L	Liter
L+Zahl	Ausmaß der Lymphgefäßinvasion
LB	Luria-Bertani (Bakterienkulturmedium)
LCM	Laser Capture Microdissection
M+Zahl	Vorhandensein oder Abwesenheit von Fernmetastasen
min	Minute(n)
MSI	Mikrosatelliteninstabilität

N+Zahl	Ausmaß des Krebsbefalls lokaler Lymphknoten
NBT/BCIP	Nitroblau Tetrazolium/Bromochloroindolyl-Phosphat
NTR	Nicht-Translatierte Region
OD	Optische Dichte
ORF	Open Reading Frame
PBS	Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung (<i>engl.</i> Phosphate Buffered Saline)
PBT	PBS/Tween
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>engl.</i> Polymerase Chain Reaction)
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PTX	Paclitaxel (Taxol)
qPCR	quantitative Real-Time PCR
R+Zahl	Ausdehnung eines postoperativ verbleibenden Residualtumors
REG1A	Regenerating Islet-Derived 1 Alpha
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>engl.</i> revolutions per minute)
RT-PCR	Reverse Transkription mit anschließender Polymerase-Kettenreaktion
SAPE	Streptavidin-Phycoerythrin
SSC	NaCl-Natriumzitat (<i>engl.</i> Saline Sodium Citrate)
T+Zahl	Ausdehnung des Primärtumors
TMA	Tissue Microarray
TNM	Primärtumor, Lymphknoten und Fernmetastasen
U	Enzymeinheit (<i>engl.</i> unit)
UICC	Internationale Gesellschaft gegen Krebs (<i>franz.</i> Union Internationale Contre le Cancer)
V+Zahl	Ausmaß der Veneninvasion

Hinweis: SI-Einheiten und Präfixe zur Bezeichnung von Vielfachen von Maßeinheiten werden als bekannt vorausgesetzt und finden deshalb im Abkürzungsverzeichnis keine Erwähnung.

7.4 Posterpräsentationen

- „On the Way to a Prognostic Chip for Colorectal Carcinoma”, AEK/AIO Congress, Würzburg 2005
- „Expression Profiling of the Glycosylation Machinery – the Glycoprofiler”, GBM Annual Fall Meeting, Berlin 2005

7.5 Vorträge

- „Prognostic Marker Mining in Early Colon Cancer“, MDC PhD-Student-Symposium, Berlin 2004
- „Development of a Prognostic Chip for Colorectal Cancer”, Retreat der Robert-Rössle-Klinik, Berlin 2005
- „On the Way to a Prognostic Chip for Colorectal Carcinoma”, NGFN2 Cancernet Meeting, Berlin 2005

7.6 Danksagung

Herrn Prof. Dipl.-Ing. Dr. Ulf Stahl danke ich für die gute Betreuung und die Bereitschaft, eine externe Arbeit zu unterstützen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Wolfgang Kemmner, der es mir ermöglichte, meine Dissertation in der Abteilung Chirurgie/Chirurgische Onkologie am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin anzufertigen. Seine Unterstützung hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Peter Michael Schlag danke ich für sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Dr. Wolfgang Haensch für die Hilfe bei der Befundung von Gewebeproben und *in situ*-Hybridisierungen sowie für die Bereitstellung von Tissue Microarrays bedanken.

Sabine Grigull, Claudia Röefzaad und Gudrun Koch danke ich für die viele Hilfestellung im Labor, ohne welche diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Insbesondere möchte ich mich aber bei Sabine Schmidt sowie den drei Auszubildenden Andra Eisenmann, Josefine Russ und Anne Giese für ihre engagierte Unterstützung bedanken.

Ina Wendler danke ich für die professionelle Versorgung mit Gewebeproben und Patientendaten aus der Tumorbank der Robert-Rössle-Klinik, Frau Yiyang Dai für die freundliche Überlassung von Tissue Microarrays sowie Herrn Jörg Fischer für die geduldige Beantwortung von Statistik-Fragen.

Bei Dr. Jens Jakob und Herrn Dr. Thomas Benthler möchte ich mich für die freundliche Überlassung von kolorektalen Biopsieproben bedanken.

Ursula Klamm danke ich für die kulinarische Unterstützung in Form von Keksen und Obst.

Keinesfalls vergessen möchte ich meine Kollegen aus dem Doktorandenraum 007 – ganz im Speziellen: Annett Kramer, Michael Radke und Ka-Yiu Wan. Sie haben mich stets gehört und oft für gute Laune gesorgt.

Nicht zuletzt danke ich Markus Niederstrasser für seine Freundschaft sowie die erfolgreiche Lösung aller Hard- und Softwareprobleme. Seine Hilfsbereitschaft wird mir in sehr guter Erinnerung bleiben.

Allen Kolleginnen und Kollegen, die aus Platzgründen nicht aufgeführt werden konnten, danke ich für die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit.

Schließlich möchte ich meinen Eltern für ihre rückhaltlose Unterstützung während des Studiums und der Promotion ganz herzlich danken.