

**Biologische und funktionale Charakterisierung von
Tumoren im Gastrointestinaltrakt durch genomweite
Genexpressions-Analyse und Identifizierung von
potenziellen Tumormarkern**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

vorgelegt von

Diplom-Biologin Nicole Posorski

geboren am 24.11.1981 in Suhl

**Die Welt ist voller Leid
und genauso voller Überwindung des Leids.**

(Helen Keller)

Gutachter:

1.

2.

3.

Tag der mündlichen Prüfung:

1 Zusammenfassung

Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit umfassen mit dem Magenkarzinom, dem kolorektalen Karzinom und dem neuroendokrinen Tumor drei verschiedene Entitäten, die zwar alle im Gastrointestinaltrakt (GI-Trakt) lokalisiert sind, deren Genese und Progression aber unterschiedlich abläuft.

1. Etablierung und Evaluierung eines Serum-Protein-Biochips, der durch die quantitative Bestimmung von neun Proteinen (Biomarkern) im Serum von Patienten eine frühestmögliche Diagnose eines vorhandenen kolorektalen Karzinoms sowie von Kolonpolypen (Adenomen) ermöglicht. Dazu wurden insgesamt 474 Seren von gesunden Personen und Patienten mit fortgeschrittenen Adenomen oder kolorektalen Karzinomen mit der *Evidence Investigator*TM Biochip Technologie der Firma Randox getestet. Die Serumspiegel der Biomarker CEA, IL-8, VEGF, S100A11, C3a desArg, CD26 und CRP unterschieden sich signifikant zwischen Kontrollpersonen und Krebspatienten. Die beste Unterscheidung lieferte eine kombinierte Auswertung von CEA und IL-8 (47% Sensitivität bei 86% Spezifität) bzw. von CEA und CRP (39% Sensitivität bei 86% Spezifität). Bei Patienten mit fortgeschrittenem oder frühem Adenom erzielte die simultane Analyse dieser beiden Marker eine Sensitivität zwischen 15-33% bei gleichzeitiger Spezifität von 86%. Bei Gewährleistung optimaler Probenentnahme und -lagerung könnte dieser multianalyten Screeningtest eine optimale Methode bei der Früherkennung von Darmkrebs und dessen Vorstufen in der Bevölkerung darstellen.

2. Etablierung und Charakterisierung einer gewebebasierten Signatur zur Bestimmung der Lokalisation des Primärtumors bei neuroendokrinen Tumoren mit CUP-Syndrom (*cancer of unknown primary*). Neuroendokrine Tumore (NET) sind sehr selten vorkommende (1-4/100.000) und heterogene Neoplasien, die aus dem Neuroektoderm hervorgehen und bevorzugt im Gastrointestinaltrakt lokalisiert sind. Charakteristisch für diese Tumorentität ist ein sehr kleiner Primärtumor, der oft durch konventionelle Untersuchungsmethoden nicht aufgespürt werden kann (CUP-Syndrom). Meist wird die Erkrankung im fortgeschrittenen Stadium erkannt, wenn Metastasen symptomatisch werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei unabhängige Studien durchgeführt, wobei insgesamt 80 NETs auf DNA-Ebene (*array-CGH*) und RNA-Ebene (Genexpressions-Analyse) untersucht wurden. Anhand des Expressionslevels dreier Gene (*CD302*; *PPWD1* und *ABHD14B*) in

mikrodissezierten Tumorgewebe von Metastasen konnte der Entstehungsort des Primärtumors mit einer Spezifität von 67-98% bestimmt werden. Neben der Entdeckung und Patentierung dieses Drei-Gen-Klassifikators konnten 48 Gene identifiziert werden, die als potenzielle Marker für die Tumorprogression bei neuroendokrinen Tumoren in Frage kommen. Die Validierung der Daten erfolgte immunhistochemisch an Kryoschnitten einzelner Tumorproben aus der Studien-Kohorte sowie an *Tissue Microarrays* (TMA) mit jeweils 148 NET-Patienten-Proben. Die Weiterentwicklung des Drei-Gen-Klassifikators auf Proteinebene könnte in Zukunft über Immunhistochemie (IHC) am Metastase-Gewebe zur schnellen und sicheren Diagnose des Primärtumors bei NETs mit CUP-Syndrom dienen.

3. Erstellung und Auswertung von DNA Aberrations-Profilen sowie Darstellung der fehlregulierten Signalwege beim Magenkarzinom, und daraus abgeleitete, mögliche Unterschiede auf das Ansprechen der Tumore auf verschiedene Chemotherapeutika. In zwei unabhängigen Studien wurden 29 Magenkarzinome mit *array*-CGH bzw. Genexpressions-Analysen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass beim intestinalen Karzinom-Typ die Anzahl der individuellen DNA-Aberrationen mit der Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten korreliert. Die erstellten Genexpressions-Profile deuten auf Subgruppen beim Magenkarzinom hin, die unabhängig von der TNM- und der Laurén-Klassifikation auf die verschiedenen Chemotherapien ansprechen. Nach Verifizierung dieser Subgruppen an größeren Patienten-Kollektiven, könnte Magenkrebs-Patienten eine individuellere und effektivere Behandlung zuteilwerden, die eine bessere Prognose verspricht.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der drei untersuchten Tumorentitäten des Gastrointestinaltraktes, dass die Vernetzung von globalen, adaptierten Verfahren, wie der Genexpressions-Analyse mit funktionellen Untersuchungen einzelner Gene, es erlauben biologische und klinische Fragestellungen translational zu untersuchen, um so einerseits molekulargenetische Grundlagen der malignen Progression von Tumoren weiter aufzuklären und andererseits zur Optimierung von Diagnose und individualisierter Therapie beitragen zu können.

In allen drei Fällen müssen weitere Studien zeigen, ob die gewonnenen Ergebnisse auch in der Praxis für eine Diagnose oder eine Therapieplanung genutzt werden können.

2 Einleitung

Trotz intensivster Forschungsbemühungen und den gewonnenen molekularbiologischen Einblicken in das Gesamtkonstrukt „Krebs“, ist die maligne Zellentartung mit den daraus resultierenden Krebserkrankungen immer noch mit 21% die zweithäufigste Todesursache nach Herz-Kreislaufkrankungen (48%) weltweit. 2008 erkrankten 12,7 Millionen Menschen weltweit neu an Krebs, davon verstarben 7,2 Millionen an den Folgen. Für das Jahr 2030 werden 21,4 Millionen Neuerkrankungen prognostiziert, mit einer Mortalität von 13,2 Millionen.

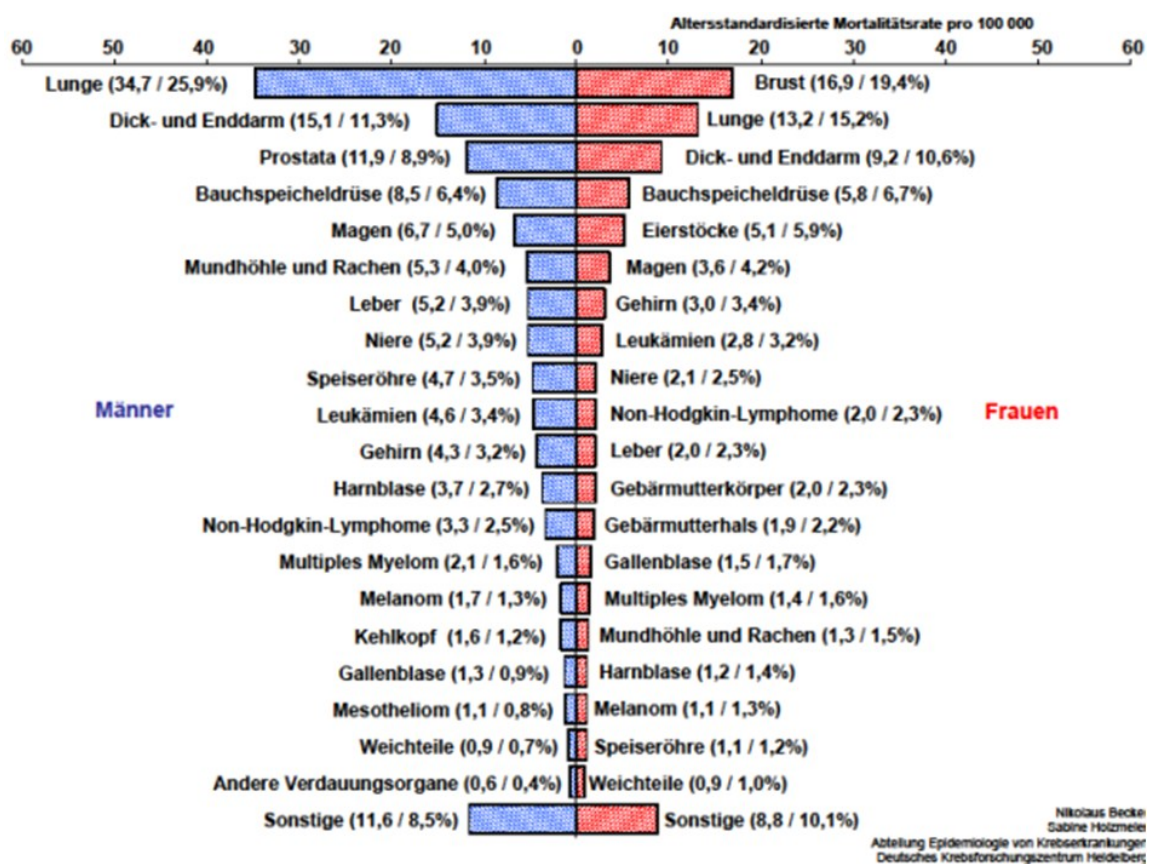


Abb. 1: Die 20 häufigsten Krebstodesursachen im Jahr 2008. <http://www.dkfz.de/de/krebsatlas/>

Die Entstehung eines malignen Tumors ist ein multifaktorielles, komplexes Geschehen, bei dem viele aufeinanderfolgende Einzelschritte erforderlich sind. An erster Stelle steht meist die Aktivierung eines Proto-Onkogens in einer somatischen Zelle, die durch äußere Einflüsse wie Chemikalien (Benzol, Asbest, Acrylamid, Tabak etc.), Strahlung (radioaktive Strahlung, Röntgenstrahlung, UV-Strahlung) oder Viren (Papilloma-Viren) ausgelöst wird. Durch weitere Gen-Mutationen können in der so entstandenen initiierten Zelle veränderte Proteine

entstehen, die in den Signalwegen eine entscheidende Rolle spielen, die die Zellproliferation, Zelldifferentiation, Migration, den programmierten Zelltod (Apoptose), die Zell-Zell-Kontakte, die Angioinvasion, sowie die Polarität der Zelle und den Stoffwechsel allgemein steuern. Durch die so veränderte Regulation und Kontrolle der Signalwege kann ein maligner Tumor entstehen, der durch unkontrollierte Proliferation, destruktives Wachstum und der Fähigkeit zur Metastasierung charakterisiert ist. In nahezu allen malignen Neoplasien lassen sich Fehlregulationen in der Signalkaskade der Apoptose finden, so dass immortalisierte Zellen entstehen. Auslöser dafür ist meist die Inaktivierung des Transkriptionsfaktors p53, aufgrund einer Mutation des ihn kodierenden Tumorsuppressorgens *Tp53*. P53 gilt als „guardian of the genome“, da es den Zellzyklus kontrolliert und dafür Sorge trägt, dass genetisch veränderte Zellen sich selbst als „krank“ erkennen, wodurch die entartete Zelle abstirbt und nicht in den nächsten Zellzyklus eintreten kann. Die Inaktivierung dieses Tumorsuppressors ist ein wichtiger Schritt zur Entstehung eines invasiven Karzinoms.

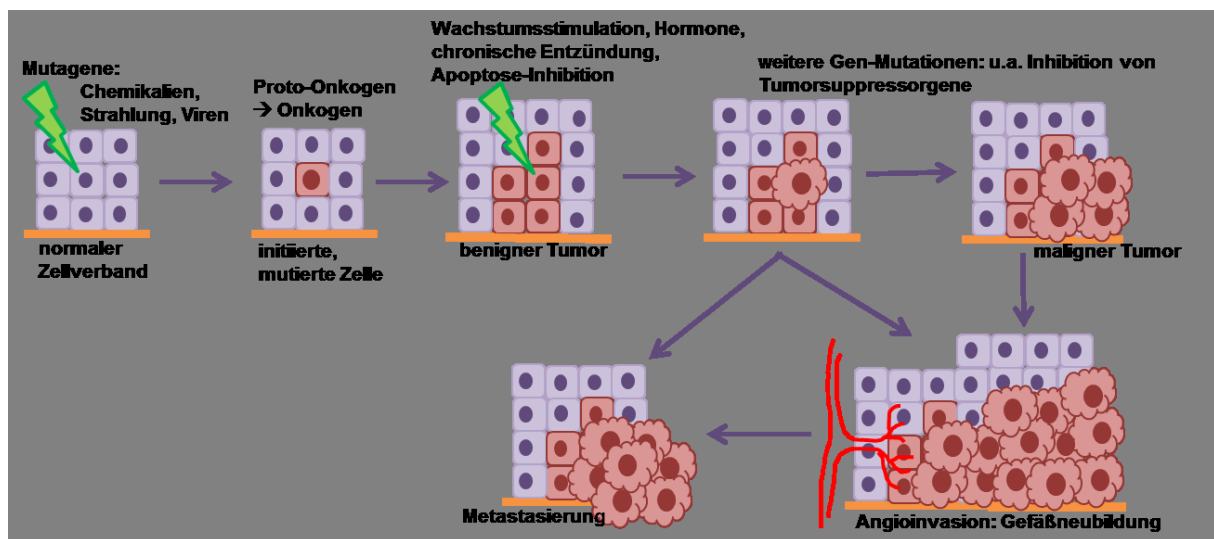


Abb. 2: Schematisch dargestellt ist die stufenweise Entstehung eines malignen Karzinoms aus einer normalen Zelle heraus über die Zwischenstufen: benigner Tumor, Dysplasie und *carcinoma in situ*. Auslösende Faktoren sind neben mutationsauslösenden Stoffen wie Chemikalien, Strahlung und Viren, die Aktivierung von Proto-Onkogenen zu Onkogenen und die Inhibition von Tumorsuppressorgenen, das mit dem Ausschalten von Apoptose einhergeht, was wiederum zu einer immortalisierten Zelle führt. Mutationen in Genen, die für Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren kodieren, den Zellzyklus kontrollieren, für die Blutversorgung und -gerinnung verantwortlich sind, sind für die Tumorentstehung und -progression mitverantwortlich.

Des Weiteren gehen mit aggressiver Tumorprogression meist hochregulierte Gene einher, die für Wachstumsfaktoren bzw. deren Rezeptoren kodieren. Mutationen im *EGF*-Rezeptor, dem *VEGF*-Rezeptor, dem *FGF*-Rezeptor, dem *TGF*-Rezeptor und dem *HGF*-Rezeptor sind die bekanntesten Vertreter. Für Gene vieler Signalwege, die in der Embryonalentwicklung eine entscheidende Rolle spielten, in adulten Zellen dann größtenteils abgeschaltet sind, konnte in

vielen Studien eine Reaktivierung und Überexprimierung in soliden Tumoren nachgewiesen werden. Zu den bekanntesten dieser Signaltransduktionswege gehört der WNT-Signalweg (*wg*: *wingless*-Gen in *Drosophila melanogaster* und *int-1*: *Int*-Gen in Mäusen), der SHH-Signalweg (*sonic hedgehog*) und der BMP-Signalweg (*bone morphogene protein*). Auch fehlregulierte Proteine die in der Immunabwehr eine wichtige Rolle spielen, können aufgrund von Genmutationen z.B. im JAK/STAT-Weg zur Krebsentstehung und -entartung beitragen. Neben den spontanen, somatischen Mutationen sind etwa 5% aller Tumorerkrankungen auf Keimbahnmutationen zurückzuführen und somit in ihrer Veranlagung hereditär.

In dieser Arbeit wurden drei Tumorentitäten untersucht, um Aussagen zur Tumor-Progression treffen zu können.

2.1 Das kolorektale Karzinom (KRK)

2.1.1 Definition, Epidemiologie, Diagnose und Prognose des kolorektalen Karzinoms

Unter der Bezeichnung „kolorektales Karzinom (KRK)“ werden maligne Tumoren des Dickdarms (Kolon) und des Enddarms (Rektum) zusammengefasst. Mit einer Inzidenz von 30-35 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner/Jahr ist das kolorektales Karzinom die zweithäufigste Tumorerkrankung bei Männern und Frauen in Deutschland und Mitteleuropa. Männer sind etwas häufiger betroffen als Frauen (etwa 60/40). Die Erstdiagnose erfolgt meist zwischen dem 50. und 80. Lebensjahr. Die Lokalisation und Häufigkeit des KRK sind in Abb. 3 zusammenfassend dargestellt.

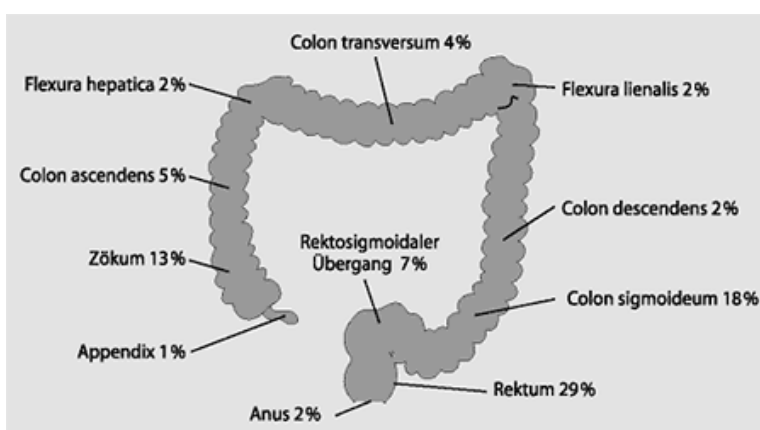


Abb. 3: Lokalisation und Häufigkeit des kolorektalen Karzinoms.
http://www.onkodin.de/zms/content/e2/e22972/e47994/e47995/e48000/Kolonkarzinom_CRC_Abb5.gif

Die malignen Neoplasien des Dickdarms werden histopathologisch unterschieden: 1. Adenokarzinom (85-90%), 2. Schleim produzierendes muzinöses Adenokarzinom (5-10%) und 3. Siegelringkarzinom (1%), das durch Sekretion und Speicherung von Schleim charakterisiert ist, was den Tumorzellen ein charakteristisches Aussehen verleiht.

Histologisch unterscheidet man des Weiteren zwischen Karzinoiden (siehe Kapitel 2.2), Lymphomen, Leiomyosarkomen, undifferenzierten Karzinomen, Plattenepithelkarzinomen, adenosquamösen Karzinomen, kleinzelligen Karzinomen, Kaposi-Sarkome, und den sehr seltenen gastrointestinalen Stromatumoren (GIST), die aus Zellen der glatten Muskulatur bzw. des Bindegewebes hervorgehen. Alle zusammen machen weniger als 2% der malignen Neoplasien des Dick- und Mastdarms aus. Die Unterscheidung in Kolon-Karzinom und rektales Karzinom ist aufgrund der unterschiedlichen Metastasierung-Wege erforderlich.

95% aller kolorektalen Karzinome entstehen durch spontane, sporadisch auftretende somatische Mutationen in der DNA-Sequenz der Drüsenzellen in der Darmschleimhaut.

Etwa 5% der Tumore entstehen aufgrund hereditärer Gendefekte [Möslein et al., 2008].

Das hereditäre non-polypöse kolorektale Karzinom (HNPCC) entsteht durch eine Mutation in den sogenannten Mismatch-Reparatur-Genen, die mit einem Funktionsverlust der Zellzyklus-kontrollierenden Mismatch-Reparatur-Proteinen einhergeht. Durch die fehlerhafte Replikation entstehen genomweite Basensequenzveränderungen, die zur sogenannten Mikrosatelliten-Instabilität führen, die wiederum nicht nur charakteristisch für die Entstehung des HNPCC ist, sondern auch in vielen anderen epithelialen Malignomen der Brust, der Eierstöcke, des Magens, der Leber, des Gallenganges, der Bauchspeicheldrüse, der Haut und in weiteren Tumoren zu finden ist [Ionov et al., 1993].

Ein weiterer autosomal dominant vererbter Gendefekt, der zu einem hereditären Dickdarm-Karzinom führt, betrifft das APC-Tumorsuppressorgen auf Chromosom 5q21-q22. Ein Defekt im *APC*-Gen (*APC: adenomatous polyposis coli*) führt zur Anreicherung von β -Catenin im Zellkern, welches sich dort mit weiteren Co-Aktivatoren an Zielproteine des Wnt-Signalweges bindet und diese aktiviert. Das so aktivierte Proto-Onkogen *MYC* exprimiert den Transkriptionsfaktor C-Myc, der zur dysregulierten Expression weiterer Gene führt, die zum Teil den Zellzyklus, die Zellproliferation oder die Apoptose regulieren, was wiederum zur unkontrollierten Zellteilung führt und im Falle der familiären adenomatösen Polyposis zu einer obligaten Präkanzerose. Bei dieser hereditären Erkrankung entwickeln sich mehrere 100 Darmpolypen die zwangsläufig immer zur Entstehung eines Malignoms führen.

Das Turcot-Syndrom, das Gardner-Syndrom, das Peutz-Jeghers-Syndrom und die juvenile Polyposis sind weitere, selten Erkrankungen die mit einer Prädisposition für ein erhöhtes Krebsrisiko einhergehen.

In der Literatur sind nicht nur genomische Mutationen beschrieben, die zur Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms führen, sondern auch epigenetische Veränderungen sind für die Tumorigenese verantwortlich [Shen et al., 2007].

2.1.2 Klassifikation, klinische Einteilung, Diagnose, Prognose und Therapie des kolorektalen Karzinoms

Die erste Klassifikation des kolorektalen Karzinoms geht auf den englischen Pathologen und Schriftsteller Guthbert Esquire Dukes im Jahr 1932 zurück. Seit 2002 ist die UICC-Klassifikation, die von der *Union internationale contre le cancer* (UICC) etabliert wurde, die gültige Stadieneinteilung (TNM-Klassifikation) des kolorektalen Karzinoms (www.uicc.com).

Der Amerikaner B. Vogelstein entwickelte 1988 mit E.R. Fearon das Modell der sogenannten Adenom-Karzinom-Sequenz. Die mittlerweile gut bestätigte Hypothese besagt, dass Drüsenzellen der Mukosa durch genetische Veränderungen (Mutationen) über eine benigne Vor- bzw. Zwischenstufe, den sogenannten Polypen (=Dickdarmadenome), zu einem Adenokarzinom entarten [Vogelstein et al., 1988].

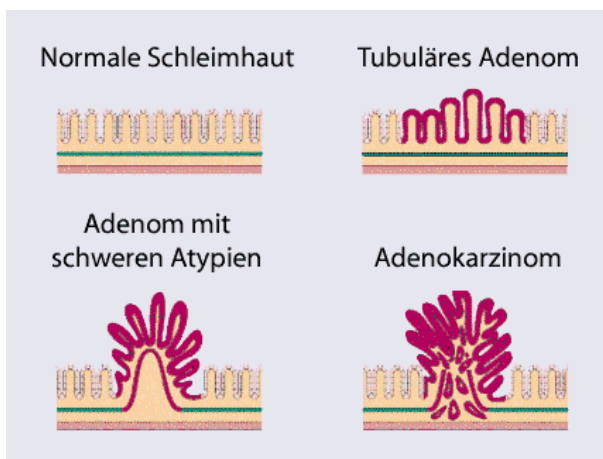


Abb. 4: Modell der Tumorigenese des kolorektalen Karzinoms nach Vogelstein und Fearon. Ausgehend von normalen Drüsenzellen der Darmschleimhaut entstehen durch genetische Veränderungen (Mutationen) zuerst gutartige tubuläre, tubulovillöse oder villöse Adenome (=Polypen) die durch weitere chromosomale Aberrationen (Genmutationen) zu malignen Adenokarzinomen entarten.
<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/1e/Adenom-Karzinom-Sequenz.PNG>

1970 wurde erstmals durch P. Deyhle et al die endoskopische Entfernung gutartiger Polypen im Dickdarm (Polypektomie) beschrieben [Deyhle P., 1980]. Seitdem gilt die Koloskopie (Darmspiegelung) als die effektivste Untersuchungsmethode zur Diagnose des kolorektalen Karzinoms und seiner benignen Vorstufen; den Polypen. Seit 2002 wird die Koloskopie als Screeningmethode für Veränderungen in der Darmschleimhaut für Patienten ab dem 55. Lebensjahr als Regelleistung von den Krankenkassen angeboten.

Eine weitere, etablierte Methode zur Früherkennung von Adenomen (Polypen) und malignen Darmtumoren ist der Nachweis von fäkalem, okkultem (lat. *occultus*: verborgen, verdeckt, geheim) Blut im Stuhl (FOBT-Test: *fecal occult blood test*) [Fleischer et al., 1989; Mak et al., 2004,].

Des Weiteren sind potenzielle Tumormarker im Blutserum für das kolorektale Karzinom beschrieben worden [Lofton-Day et al., 2007; Herbst et al., 2011]. Als Biomarker bzw. Tumormarker werden Proteine (meist Enzyme oder Hormone) bezeichnet, die im Normalgewebe und in krankhaft veränderten (bzw. genetisch mutierten/entarteten) Zellen in unterschiedlicher Konzentration gebildet und ins Blut abgegeben werden. Aufgrund ihrer Konzentrationsunterschiede im Serum können sie als diagnostischer Indikator für einen krankhaften Prozess im Körper genutzt werden. Bekannte Tumormarker sind u.a. das 36 kDa große Prostata-spezifische Antigen (PSA, erhöht beim Prostatakarzinom). Weitere, etablierte Tumormarker für verschiedene Tumorentitäten sind: *Carcinoembryonales Antigen* (CEA; 180 kDa), *Cancer Antigen 19.9* (CA 19.9; 200 kDa), Alpha-Fetoprotein (AFP; 70 kDa), Vasoaktives Intestinales Peptid (VIP) und Pankreasspezifisches Polypeptid (PP).

Grützmann et al. entwickelten 2008 einen Screeningtest, bei dem hypermethylierte DNA des *Sept9* Gens im Plasma der Patienten zum frühen Nachweis eines kolorektalen Karzinoms dient.

2.2 Der neuroendokrine Tumor (NET)

2.2.1 Definition, Klassifikation, Epidemiologie, Prognose und genetischer Hintergrund

Menschliche neuroendokrine Tumore (NET) sind mit einer Inzidenz von 1-4/100.000 sehr seltene Neoplasien, mit unterschiedlicher zellulärer und hormoneller Differenzierung, die aus dem diffusen neuroendokrinen Zellsystem entstehen [Schmitt-Gräff et al., 2001]. Diese disseminierten neuroendokrinen Zellen, (APUD-Zellen: *Amine Precursor Uptake and Decarboxylation*), nehmen ihren Ursprung aus der Neuralleiste (Neuro-Ektoderm) und liegen verstreut im Epithel verschiedener Organe. Sie sind die Ausgangszellen für die sehr langsam wachsenden neuroendokrinen Tumore. Neuroendokrine Zellen sind hormonbildende Zellen (*endokrine* Funktion) mit Verwandtschaft zu Neuronen, gekennzeichnet durch die Expression von neuronalen Markerproteinen wie Synaptophysin und Neuronspezifische Enolase (NSE).

Trotz einer relativ einheitlichen Morphologie sind die Neoplasien durch eine ausgeprägte biologische Heterogenität charakterisiert, die die Diagnose, Therapie und Prognose stark

beeinflusst. Relevante, prognostische Faktoren zur Einstufung der neuroendokrinen Tumore sind:

- Lokalisation des Primärtumors im Gastrointestinaltrakt (GI-Trakt)
- TNM-Klassifikation
- Tumor-*grading*: proliferative Aktivität: Ki-67-index, MIB1-Index, Mitosezählung
- Funktionalität: funktionell inaktiv bzw. aktiv; Hormonnachweis
- Endokrinologische Symptomatik: Karzinoid-Syndrom, Zollinger-Ellison-Syndrom, Verner-Morrison Syndrom etc.
- Vererbung: hereditär (MEN1) oder sporadisch auftretende Neoplasien [Scholzen and Gerdes, 2000; Tiling et al., 2002; Panzuto et al., 2005; Tomassetti et al., 2005; Tomassetti et al., 2006].

Neuroendokrine Primärtumore sind in Lunge, Pankreas, Magen, Dünndarm, Kolon, Rektum und Appendix nachgewiesen worden, wobei zweidrittel aller neuroendokrinen Tumore im gastro-entero-pankreatischen (GEP) System zu finden sind [Abbruzzese et al., 1994; Bornschein et al., 2008]. Abhängig von Lokalisation und molekularem Profil werden gastrointestinale NETs (GI-NET) und pankreatische NETs (PNET) unterschieden [Duerr and Chung, 2007; Duerr et al., 2008].

Neuroendokrine Tumore treten meist sporadisch auf, sie können aber auch im Zusammenhang mit komplexen familiär hereditären Tumor-Erkrankungen auftreten. Dazu gehören die multiplen endokrinen Neoplasien *MEN 1* (Wermer-Syndrom), *MEN 2a* (Sipple-Syndrom) und *MEN 2b* (Gorlin-Syndrom), sowie die Neurofibromatose Typ 1 (*NF 1*) und das von Hippel-Lindau-Syndrom.

Der der neuroendokrinen Tumorigenese zugrundeliegende molekulare Mechanismus und die dazugehörigen Signalwege (*pathways*) sind noch weitgehend unbekannt. Genetische Instabilität und chromosomale Aberrationen sind entscheidende Merkmale der Tumorigenese und können durch *microarray*-basierte CGH (*comparative genomic hybridization*) detektiert und analysiert werden. Bei NETs wurden chromosomale Deletionen auf Chromosom 3, 6, 11 und 21q beobachtet, sowie DNA-Amplifikationen auf Chromosom 4, 5, 7, 9q, 14, 19, 20 und Xq [Wang et al., 1998; Barghorn et al., 2001a; Barghorn et al., 2001b; Guo et al., 2002a; Guo et al., 2002b; Zikusoka et al., 2005]. Des Weiteren ist eine Vielzahl von Genen bekannt, die in Signaltransduktionswegen eine entscheidende Rolle spielen und in Neoplasien mutiert sind. In mehreren Studien wurde eine Vielzahl von deregulierten Genen beschrieben, allerdings fehlen

meist die histopathologischen Daten und der Bezug zu den klinischen Verläufen/Verhalten [Höcker and Wiedenmann, 1998; Capurso et al., 2006; Berković et al., 2007; Duerr and Chung, 2007; Oberg, 2009; Berković et al., 2010].

In früheren Studien konnte bei verschiedenen Tumor Entitäten (z.B. Lymphomen und kolorektalem Karzinom) eine viel größere Ähnlichkeit im Genexpressions-Profil zwischen Primärtumoren und ihren Metastasen gezeigt werden, als zwischen Primärtumor und dem umgebenden Gewebe [Melle et al., 2008]. Seit 2001 ist eine Korrelation in der Ähnlichkeit zwischen Genexpressions-Profil und der WHO-Klassifikation (*World Health Organisation*) von gut-differenzierten PNETs bekannt [Alizadeh et al., 2001]. In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass dem Genexpressions-Profil eine immer entscheidendere Rolle zur Vorhersage des klinischen Verlaufes der NETs zukommt [Giordano et al., 2001; Modlin et al., 2008].

In den letzten 40 Jahren nahmen die NET-Erkrankungen zu (0,2-1,1 Neuerkrankungen pro Jahr, pro 100.000 Einwohner) was primär auf die besseren Diagnosemöglichkeiten zurückzuführen sein dürfte [Modlin et al., 2008].

2.2.2 Klassifikation und klinische Einteilung des neuroendokrinen Tumors

Der deutsche Pathologe Siegfried Oberndorfer gilt als Pionier der neuroendokrinen Tumore, da er 1907 den Begriff „Karzinoid“ (=Karzinom-ähnliche Tumore) prägte. Die tatsächliche Erstbeschreibung neuroendokriner Tumore erfolgte allerdings noch viel früher durch F. Merling im Jahre 1838. Weitere, wichtige Wegbereiter zur Charakterisierung neuroendokriner Tumore sind: R. Heidenhain [1870], W.B. Ranson, N. Kulschitzky [1897], C. Ciaccio [1906], A. Gosset und P. Masson [1914], M.A. Cassidy [1930], A.J. Scholten [1931], Feyrter und Unna [1934], M. Rapport [1948], Erspamer und Asero [1952], F. Lemberk [1953], Thorson [1954], A. Pearse [1969], I. Modlin [2008] und G. Klöppel [1995, 1996, 1997, 2004, 2008 und 2010].

In den letzten hundert Jahren wurden mehrere Versuche unternommen die neuroendokrinen Tumore zu klassifizieren und klinisch einzuteilen [Klöppel et al., 1995 und 2004; Arnold et al., 1997]. Durch die WHO-Klassifikation von 2000 wurden die Begriffe eindeutig definiert: als „Karzinoid“ wurden alle gut (bzw. hoch) differenzierten, meist benignen endokrinen Tumore mit sehr guter Prognose bezeichnet. Unter dem Terminus „maligne Karzinoide“ wurden alle gut (bzw. hoch) differenzierten, malignen endokrinen Tumore mit guter Prognose

zusammengefasst. Die schlecht (bzw. niedrig) differenzierten, hoch malignen endokrinen Karzinome mit schlechter Prognose sind „klein- oder großzellige Karzinome“ (siehe Tabelle 1).

Die Termini „Karzinoid“ und „malignes Karzinoid“ werden nur für Tumore im Gastrointestinaltrakt verwendet, die endokrinen Tumore im Pankreas werden anders klassifiziert. Man unterscheidet die gastrointestinalen neuroendokrinen Tumoren (GI-NETs: Lokalisation im Magen, Duodenum, proximales und distales Jejunum, Ileum, Appendix, Kolon und Rektum) von den neuroendokrinen Tumoren im Pankreas (PNET). Kürzlich veröffentlichte Studien untermauern die Unterscheidung zwischen GI-NETs und PNETs durch genetisch verschiedene Profile beider Tumorentitäten (siehe Diskussion, Kapitel 6.2.2) [Solcia et al., 1981; Duerr und Chung, 2007; Oberg, 2009].

Tabelle 1: Klassifikation der neuroendokrinen Tumore des gastro-entero-pankreatischen Systems (GEP-NET)

	Differenzierung	Dignität
1a	hoch differenzierter neuroendokriner Tumor = Karzinoid	benigne
1b	hoch differenziertes neuroendokrines Karzinom = malignes Karzinoid	maligne
2	niedrig differenziertes neuroendokrines Karzinom	hoch maligne

(modifiziert nach Klöppel et al. 2004)

Die heutige, gültige Einteilung der neuroendokrinen Tumore trägt der enormen Heterogenität dieser Tumore Rechnung, da sie mehr Kriterien berücksichtigt, als nur die unterschiedliche Morphologie und das biologische Verhalten dieser Neoplasien. Die Klassifikation erstreckt sich, neben der Einteilung bezogen auf die ontogenetische Abstammung nach Williams und Sander [1963], auch über weitere Parameter wie: Lokalisation des Primärtumors, Tumorgöße, Differenzierungsgrad, Angioinvasion, Proliferationsindex (KI-67-Index), das Vorhandensein von Metastasen, die Invasion in benachbarte Organe und die damit verbundene Prognose, sowie die die klinische Unterscheidung in hormonell aktive (funktionelle) und hormonell nicht-aktive (nicht-funktionelle) Tumore (siehe Kapitel 2.2.1).

Aufgrund der extremen Heterogenität der neuroendokrinen Tumore ist ein einheitliches Einteilungsschema wichtig, um die Therapie so individuell und effektiv wie möglich zu gestalten. 2007 wurde von der ENET (*European Neuroendocrine Tumour Society*) eine TNM-Klassifikation für neuroendokrine Tumore des Magens, des Darms, des Pankreas und der Lunge vorgeschlagen. Diese Einteilung in vier Krankheitsstadien wurde 2009 weitestgehend von der UICC für neuroendokrine Tumore übernommen und veröffentlicht. Als

prognostischer Marker ist das Proliferationsverhalten des Tumors ebenfalls entscheidend. 2006 und 2007 wurde von der ENET ein Gradingssystem (G1, G2 und G3) vorgeschlagen, das auf dem Ki-67-Index (bzw. dem MIB1-Index) basiert und eine noch bessere Gruppierung der Tumore ermöglicht. 2010 hat die UICC das Gradingssystem übernommen. Abgerundet wird die Klassifikation der mittlerweile über 50 Tumorentitäten umfassende Gruppe der neuroendokrinen Tumore durch die von der WHO vorgegebenen Parameter: spezifischer Tumortyp, Hormonbildung, funktionelle Aktivität, Heredität und prädisponierende Faktoren.

Die klinische Symptomatik dieser langsam wachsenden, heterogenen Neoplasien ist durch sekretorische Eigenschaften mit daraus resultierenden hypersekretorischen Syndromen geprägt. Klinisch unterscheidet man funktionell aktive und funktionell nicht aktive Tumore, obwohl beide Hormone bilden, unabhängig von ihrer Dignität. Allerdings setzen nur die funktionell aktiven Tumore die in ihren Sekretgranula synthetisierten Hormone unkontrolliert frei, was auf einen Speicherdefekt der Tumorzellen zurückzuführen ist. Abhängig von der Art der freigesetzten Hormone (z.B. Insulin, Glukagon, Gastrin, Somatostatin, Vasoaktives Intestinales Polypeptid (VIP), Pankreatisches Peptid (PP) etc.) entsteht ein spezifisches Krankheitsbild, wobei das Karzinoid-Syndrom das häufigste ist, das u.a. durch unkontrolliertes, heftiges Erröten (*flush*), Durchfall und Rechtsherzinsuffizienz gekennzeichnet ist [Isler und Heidinger; 1953].

Die häufigsten Syndrome im Rahmen eines GEP-NETs sind: das Zollinger-Ellison-Syndrom, das Verner-Morrison-Syndrom, das Glukagonom-Syndrom und das Cushing-Syndrom. Die Syndrome sind im Anhang mit ihren Hauptsymptomen beschrieben (siehe Tabelle I).

Funktionell nicht aktive Tumore synthetisieren Hormone, die jedoch entweder nicht freigesetzt werden oder deren erhöhte Konzentration im Blut zu keiner spezifischen Symptomatik führt, weshalb diese Tumore meist erst bei fortgeschrittener metastasierter Erkrankung diagnostiziert werden.

Sehr seltene NET sind nicht funktionelle Inselzelltumore und PPome (=pankreatisches Polypeptidom), deren Symptome auf den Tumor selbst zurück zu führen sind und nicht auf die Hormonsekretion. Ebenfalls sehr selten sind das Kalzitininom und das Neurotension [Warner, 2005].

2.2.3 Diagnostik und Therapieprinzipien des neuroendokrinen Tumors

Charakteristisch für funktionell aktive und inaktive NET ist die multihormonale Sekretion von biogenen Aminen (Peptidhormone und Rezeptoren für regulative Peptide), sowie die Expression spezifischer Markerproteine wie Chromogranin A, Synaptophysin, Neuronenspezifische Enolase (NSE) und Somatostatin. Die Bestimmung des Serotoninspiegels wird seit 1955 für die Diagnose eines Karzinoids verwendet. Der biochemische Nachweis erfolgt über 5-Hydroxytryptamin (5-HIES) im Urin, was als Stoffwechselprodukt (Metabolit) des Serotonins entsteht [Bumpus et al., 1955]. Die genannten Proteine dienen als wichtigster Nachweis in der Diagnostik und als Verlaufskontrolle während der Behandlung [Heitz et al., 1982; Klöppel and Heitz, 1988; Stivanello et al., 2001]. Sie lassen sich im Blut und immunhistochemisch im Tumorgewebe nachweisen. Entscheidend für den Therapie-Ansatz und die Prognose ist auch das proliferative Verhalten des Tumors, über das der Mitose-Index (KI-67-Index) Auskunft gibt.

Für die bildgebende Diagnostik stehen verschiedene Methoden zur Verfügung: (abdominelle und endoskopische) Sonographie, Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT) (=Kernspintomographie), Angiographie und Nuklearmedizin zu der Skelettszintigraphie, Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphie (SRS), Positronen-Emissions-Tomographie (PET), Single-Photon-Emissions-Tomographie, sowie intraoperative Gamma- und PET-Sonden gehören. Im Rahmen der Konsensus-Empfehlung schlägt die ENET basierend auf biochemischen, immunhistochemischen und histopathologischen Kriterien eine standardisierte Diagnose-Strategie zur Lokalisation des Primärtumors und zum Aufspüren von Metastasen vor, die vom jeweiligen Tumortyp abhängt.

Obwohl die chirurgische Entfernung des Tumors als Goldstandard gilt, finden anti-proliferative Chemotherapien immer breitere Anwendung. Dabei bestimmt die Lokalisation des Primärtumors die Behandlungs-Strategie. Primäre NET im Ileum oder Jejunum reagieren auf langanhaltende, antiproliferativ wirksame Somatostatin-Analoga. Neuroendokrine Tumore im Pankreas werden am besten mit einer auf Streptozotocin basierten Chemotherapie behandelt

Auf weitere etablierte Therapieverfahren kann im Rahmen dieser Arbeit nicht eingegangen werden, zusammengefasste Therapie-Schemata sind in der Literatur zu finden [u.a.: Pape, 2000 und Pigorsch, 2004].

2.3 Das Magenkarzinom (MK)

Das Magenkarzinom weist weltweit sehr unterschiedliche geographische Inzidenzen auf. In Deutschland macht es etwa 5-8% aller bösartigen Tumorerkrankungen aus, d.h. etwa 20.000 Menschen erkranken pro Jahr in Deutschland (siehe Abb. 1). In Japan, Chile, Costa Rica, Kolumbien, China, Portugal, Russland und Bulgarien liegt die Erkrankungsrate bei 4-6%. Das Magenkarzinom ist die einzige Krebsart, die bezogen auf Häufigkeit und Mortalitätsrate, rückläufig ist. Männer sind mit einem Verhältnis von 3:2 häufiger betroffen als Frauen.

Die WHO unterteilt das Magenkarzinom seit 1997 in vier Histotypen: 90% aller Karzinome sind Adenokarzinome, mit papillärem, muzinösen, oder tubulären Wachstumstyp. Das Siegelringkarzinom ist eine Sonderform des Adenokarzinoms (siehe Kapitel 2.1.1). Weitere 5% aller Magenkarzinome sind histologisch betrachtet adenosquamöse Karzinome, die restlichen 5% teilen sich in Plattenepithelkarzinome, kleinzellige Karzinome und undifferenzierte Karzinome auf. Die Laurén-Klassifikation berücksichtigt die Wuchsform des Tumors, die großen Einfluss auf das Ausmaß der Operation und die Wahl der Chemotherapie hat. Unter diesem histomorphologischen Gesichtspunkt –der Laurén-Klassifikation– unterscheidet man den intestinalen (polypösen) Typ, den diffusen (ulzerierenden) Typ und den Mischtyp [Laurén, 1965]. Der intestinale Typ hat die beste Prognose, die mit der guten Differenzierung des Tumors assoziiert ist. Diese Karzinome wachsen in das Magenumen, sind gut abgegrenzt und trotz höherer Proliferationsrate weniger invasiv als z.B. der diffuse Typ. Dieser ist mit einer schlechten Prognose assoziiert, da er meist schlecht differenziert und räumlich begrenzt ist. Der diffuse Typ enthält keine Drüsenstrukturen und breitet sich in der Submucosa der Magenwand aus, wodurch er früher metastasiert als der intestinale Typ. Die unterschiedliche biologische Entwicklung des intestinalen und diffusen Magenkarzinoms resultiert aus den verschiedenen Signalwegen, die durch Genmutationen wie z.B. Amplifikationen, Deletionen, SNP (Single-Nukleotid-Polymorphismen), Mikrosatelliten-Instabilität, LOHs (*loss of heterozygosity*) und Hypermethylierung der Promotorregion bestimmter Gene entstehen [Grabiec et al., 1985; Correa, 1988; Grady et al., 2000; Hamilton et al., 2006; Carneiro et al., 2008]. Bekannte aberrante Gene im Magenkarzinom sind u.a.: *CDH1*, *ERBB2*, *KRAS*, *EGFR2*, *KLF6*, *IRF1*, *PIK3CA*, *CASP10*, *IL1RN*, *IL1B* und *MUTYH*.

Nach Laurén enthält der Mischtyp Merkmale beider vorgenannten Gruppen.

10% aller Magenkarzinome sind hereditär. Ihnen liegt eine Keimbahn-Mutation im E-Cadherin Gen zugrunde. Sind beide Allele des E-Cadherin kodierenden *CDH1*-Gens

betroffen, ist die laterale Zelladhäsion verändert, wodurch eine vererbte Prädisposition für die Entstehung eines diffusen Magenkarzinoms besteht (HDGC: *hereditary diffuse gastric cancer*) [Gayther et al., 1998; Guilford et al., 1998 und 1999; Frebourg et al., 2006]. Im Rahmen des vererbten non-polypösen kolorektalen Karzinoms (HNPCC) treten auch gehäuft familiäre Magenkarzinome auf (siehe Kapitel 2.1.1).

Risikofaktoren, die die Entstehung eines malignen Magentumors begünstigen, sind eine rezidivierende Gastritis, da sie die Azidität des Magens herabsetzt und so das Wachstum von Bakterien begünstigt, Geschwüre (*Ulcer*) und eine nitrat- und nitritreiche Nahrung (gepökeltes Fleisch, Konservennahrung, schlecht aufbereitetes Trinkwasser etc.). Nitrat wird im Magen durch Bakterien in Nitrosamine abgebaut, das *cancerogen* wirkt. Eine Infektion mit dem Bakterium *Helicobacter pylori*, das im sauren Milieu des Magens überleben kann, steigert das Krebsrisiko um das 4-6 fache. Nicht jede Infektion mit *Helicobacter pylori* führt zu einer malignen Neoplasie, allerdings kann das Bakterium in fast 100% aller Magenkarzinome vom intestinalen Typ nachgewiesen werden. Benzpyren, Tabakrauch und Alkohol gelten ebenfalls als Risikofaktoren.

Da das Magenkarzinom im Anfangsstadium keine oder nur geringe und uncharakteristische Beschwerden macht, werden die meisten Neoplasien in einem fortgeschrittenen Stadium (TNM-Stadium III und IV) entdeckt, wodurch die 5-Jahres-Überlebensrate (Heilungschance) unter 5% liegt. Etwa 70% aller Karzinome haben bei Diagnosestellung bereits Metastasen gebildet. Ist dies der Fall ist keine Heilung mehr möglich, es erfolgt eine palliative Gastrektomie (Magenentfernung). Sind keine Fernmetastasen nachweisbar, erfolgt eine Gastrektomie und Lymphadenektomie der regionalen Lymphknoten. Die 5-Jahres-Überlebensrate bei Stadium I liegt bei 65%, bei Stadium II bei 22%.

Die Diagnose eines Magenkarzinoms erfolgt durch eine Magenspiegelung (Gastroskopie) mit nachfolgender histopathologischer Begutachtung der Gewebe-Proben [Caldas et al., 1999; Fitzgerald et al., 2009].

Die Stadieneinteilung (*staging*) bzw. die TNM-Klassifikation der Tumorausbreitung beim Magenkarzinom erfolgt nach den Kriterien der 7. Auflage der AJCC (*American Joint Committee on Cancer*).

3 Ziele der Arbeit

Die Progression, Diagnose und das Therapieansprechen verschiedener Tumor-Entitäten im Gastrointestinaltrakt sollte mithilfe von Genexpressions-Analysen am Gewebe und im Serum charakterisiert und funktional beschrieben werden.

I. Etablierung der **Agilent Microarray Plattform** am Institut für Humangenetik am UKJ in Jena. Mithilfe der Genexpressions-Analyse sollten:

1. Genetische Marker für die Tumor-Progression aufgespürt werden.
2. Gen-Signaturen in Metastasen entschlüsselt werden, die für das Auffinden von Primärtumoren in Patienten mit CUP-Syndrom (*cancer of unknown primary*) verwendet werden können.
3. Validierung und Übertragung der Expressionsdaten auf Proteinebene am Gewebeschnitt (IHC: Immunhistochemie) und auf Proteinebene im Serum.

Für die Untersuchungen (I.1 - I.3) wurde der **neuroendokrine Tumor** verwendet, da das CUP-Syndrom bei dieser Entität vergleichsweise häufig ist und es in der Literatur kaum Beschreibungen auf molekularbiologischer Ebene gibt, die diesen Tumor charakterisieren oder Gen-Klassifikatoren benutzen, die den Entstehungsort des Primärtumors beim CUP-Syndrom bestimmen können.

4. Genexpressions-Analysen sollten durchgeführt werden, um verschiedene Expressionsprofile einer Tumorentität zu entschlüsseln, die aufgrund ihrer genetischen Heterogenität unterschiedlich auf gleiche Chemostatika ansprechen.

Für diese Studie (I.4) wurde das **Magenkarzinom** gewählt, da in der Literatur bereits beschrieben wurde, dass es genetisch divergente Subgruppen gibt. Ziel war es solche Subgruppen mit spezifischer Genexpression nachzuweisen, um eine individuellere und effektivere Therapie für den Patienten gewährleisten zu können.

II. Etablierung der **Randox Evidence Investigator™ Biochip Plattform** sowie die Evaluierung des kolorektalen Serum-Protein-Biochips (CRCS) der Firma Randox am Institut für Humangenetik am UKJ in Jena.

1. Die quantitative Bestimmung von neun Proteinen (Biomarkern) im Serum von Patienten soll eine frühestmögliche Diagnose eines vorhandenen **kolorektalen Karzinoms** sowie von Kolonpolypen (Adenomen) ermöglichen.

Für diese Studie (II.1) wurden Seren von Patienten mit **kolorektalem Karzinom** untersucht.

III. Funktionelle Charakterisierung von Proteinen, die in der Tumor-Progression eine entscheidende Rolle spielen.

1. Etablierung eines *in vitro* Modells für neuroendokrin differenzierte (kolorektale) Zelllinien.
2. Das für das Apoptose-inhibierende Protein Survivin kodierende Gen *BIRC5* sollte in neuroendokrinen und kolorektalen Zelllinien sowie in humanen Stammzellen ausgeknockt werden, wodurch die Zellproliferation gestoppt werden sollte.
3. Die Konzentrations-Unterschiede der neun Serummarker, für das kolorektale Karzinom sollten an verschiedenen kolorektalen Zelllinien getestet werden.

Für diese Studien (III.1 - III.3) wurden die Zelllinien BON, LCC-18, MIP-101, QGP1, Caco-2, Colo-94H und SW-1116 verwendet.

4 Material und Methoden

4.1 Der *Evidence Investigator*TM Biochip

Die *Evidence Investigator*TM Biochip Array Technologie von Randox wurde in dieser Arbeit zum Multi-Analyten-Screening eingesetzt, um gleichzeitig mehrere kolorektale Karzinom-Marker (Biomarker) quantitativ in einer Patientenprobe zu bestimmen. Die zu testenden Tumormarker im Serum der Patienten binden basierend auf einem Immuntest-Prinzip an Antikörper auf dem Biochip. Auf jedem Biochip befinden sich jeweils neun Testregionen (DTR: *discrete test regions* = „wells“). Auf jeder dieser neun Testregionen befinden sich 23 Areale. Auf jedes Areal kann ein Antikörper für einen spezifischen Biomarker immobilisiert werden. Aufgrund von sehr starken Variationen in der Konzentration der Biomarker im Serum wurden die neun zu testenden Antikörper auf zwei verschiedene Biochips CRCSI und CRCSII (*Colorectal Cancer Serum Array I+II*) fixiert.

Auf dem Biochips CRCSII sind fünf der insgesamt 23 möglichen Arealen auf allen neun Testregionen mit den Antikörpern gegen CEA, IL-8, VEGF, MCSF, S100A11 und NNMT besetzt. C3a desArg, CD26 und CRP sind auf den Arealen der neun Testregionen des Biochip CRCSI aufgebracht. Pro Biochip können somit neun Serumproben (eine Probe je Testregion) getestet werden. Der Versuchsaufbau ist so angelegt, dass jeweils sechs Biochips parallel gehandhabt werden können, d.h. abzüglich der drei Kontrollen und der neun Kalibratoren, die bei jedem Versuch mitgeführt werden müssen, können pro Versuchsdurchgang 42 Seren getestet werden (siehe Abb. 5 und Diskussion, Kapitel 6.1).

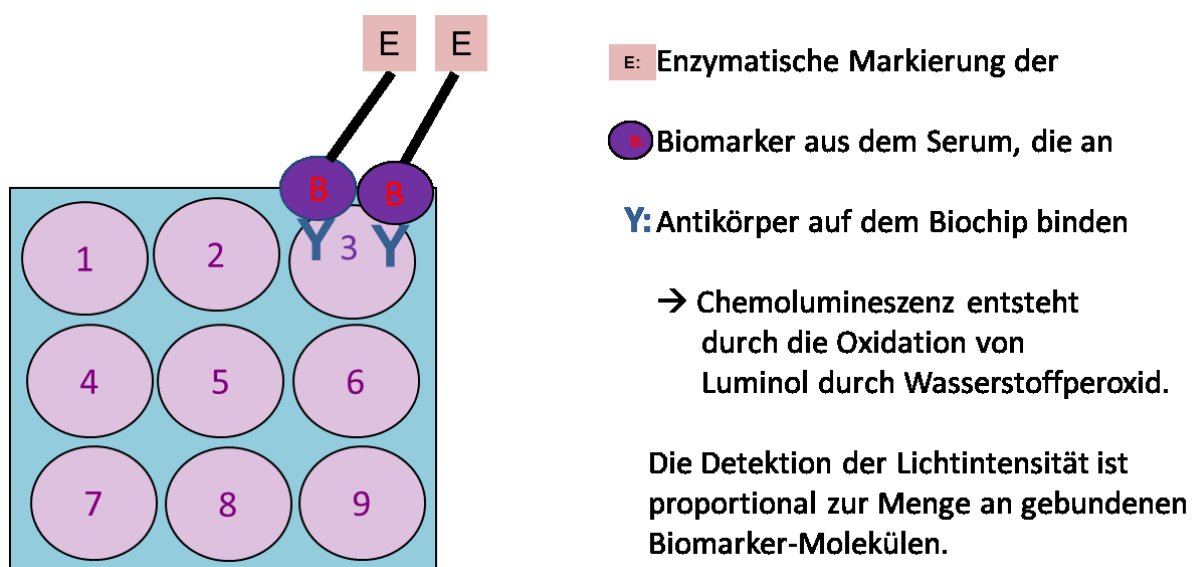


Abb. 5: Biochip-Design und Wirkungsprinzip

Vor Beginn des Versuches wurden die pulverisierten Kontrollen 1-3, sowie die Kalibratoren 1-9, mit 1 ml Aqua bidest versetzt und 30 min bei Raumtemperatur auf einem Roller-Mix inkubiert, bis das Pulver komplett gelöst ist. Auf jede Testregion (insgesamt 54) wurden jeweils 210 µl Assay-Diluent aufgetragen. Anschließend wurden auf die neun *wells* des ersten Biochips 90 µl der Kalibratoren 1-9 aufgetragen, so dass in jedem *well* ein Endvolumen von 300 µl vorlag. Auf die ersten drei *wells* des 2. Biochips wurden 90 µl der Kontrollen 1-3 aufgetragen, ab *well* vier des 2. Biochips wurden dann insgesamt jeweils 90 µl der 42 Patienten-Proben aufgetragen. Im Thermoshaker wurden die Proben 30 Minuten bei 37°C und 370 g inkubiert, so dass die Proteine (Antigene/Analyte) an die Antigene auf der Chipoberfläche binden konnten. Danach wurde die Flüssigkeit verworfen und jedes *well* wurde mit ca. 350 µl Waschpuffer zweimal gespült. Nach den beiden schnellen Wachsritten erfolgen sechs Waschsritte mit jeweils ca. 350 µl Waschpuffer für je zwei Minuten, um möglichst alle unvollständigen Bindungen zwischen Antigen und Antikörper zu lösen. Anschließend wurde auf jedes *well* 300 µl Konjugat pipettiert und erneut für 30 Minuten bei 37°C und 370 g inkubiert. Es folgten dieselben Waschsritte wie oben beschrieben. Die Testregionen der Biochips blieben bis zur Messung im *Evidence Investigator* mit Waschpuffer bedeckt. Pro *well* wurden 250 µl Signal-Reagenz aufgetragen, bestehend aus einem 1:1, frisch angesetzten Gemisch aus Luminol-EV840 und Peroxidase. Die Biochips wurden nacheinander in den *Evidence Investigator*TM eingeführt und das Chemilumineszenz Signal für jeden Antikörper auf jeder Testregion wurde detektiert und mit der Kalibrations-Kurve verglichen. Das Chemilumineszenz-Signal wird stärker je mehr Antigen (Biomarker) in der Serumprobe vorhanden ist, da mehr Antigene an die mit *horseradish peroxidase* (HRP) gelabelten Antikörper auf der Testregion binden.

CRC Serum *Array* I (CRCSI):

Die Durchführung des Immunoassays ist mit dem oben beschriebenen CRCSII Assay identisch, allerdings wurden nur 5 µl Serum eingesetzt, die mit einer im Kit enthaltenen Lösung 1:200 verdünnt wurden. Von der Verdünnung wurden 90 µl aufgetragen (siehe Protokoll CRCSII).

4.2 Microdissektion und DNA / RNA Isolation

Unter Mikrodissektion versteht man eine unter dem Mikroskop durchgeführte, Laser-basierte Trennung und Isolation von morphologisch unterschiedlichen Geweben um für bioanalytische Untersuchungen homogene Proben zu gewinnen. In dieser Arbeit wurden alle Tumorproben mikrodisseziert, um eine Kontamination mit DNA bzw. mRNA aus umliegenden Zellen (Bindegewebe, Strom, apoptotische und nekrotische Zellen etc.) nahezu ausschließen zu können. Sofort nach der chirurgischen Tumorentfernung wurden die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren um DNA- und RNA-Degradationen zu vermeiden. Alle Proben wurden bis zur Präparation bei -80°C aufbewahrt. Konsekutive $10\text{-}12\ \mu\text{m}$ dicke ungefärbte Kryoschnitte wurden von den Tumorproben auf einen Objektträger mit einer $1,33\ \mu\text{m}$ Membran (Polyethylen-Naphtalat, Zeiss, Germany) aufgetragen. Mit einem *laser microdissection and pressure catapulting microscope* (LMPC; PALM/Zeiss Micobeam C) wurden dann die Tumornester herausgeschnitten und direkt in ein Reaktionsgefäß zur Isolation von DNA bzw. mRNA gesammelt. Je nach Größe der Tumorareale wurden $10\text{-}30\ 10\ \mu\text{m}$ dicke Kryo-Schnitte mit einer Fläche von ca. $0,5\text{-}1,5\text{cm}^2$ verwendet. Um sich an den ungefärbten Kryoschnitten histopathologisch orientieren zu können, wurde zwischen der konsekutiven Schnittfolge ein Parallelschnitt auf einen Superfrost Objektträger aufgebracht und dieser Gewebeschnitt wurde mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt (siehe Abb. 6 und Kapitel 4.3). Weitere Schnitte wurden für immunhistochemische Untersuchungen angefertigt, über Nacht bei 37°C getrocknet und dann bei -20°C tiefgefroren (siehe Kapitel 4.6).

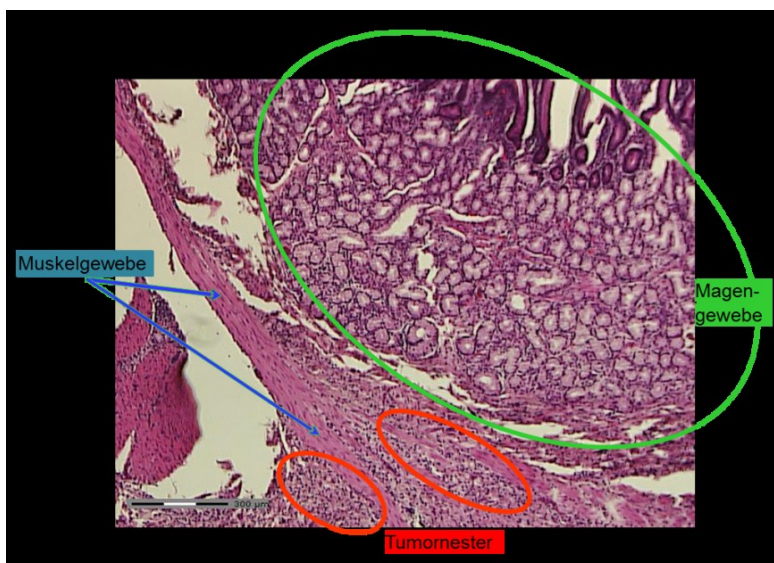


Abb. 6: HE-gefärbter, $12\ \mu\text{m}$ dicker Kryoschnitt eines Magenkarzinoms

Aus den gesammelten Tumorzellen wurde für die *array*-CGH Tumor-DNA mit dem DNA Mini Kit von Qiagen und für die Genexpressions-Analyse wurde mRNA aus den Tumornestern mithilfe des RNA Mini Kits von Qiagen laut Hersteller-Angaben isoliert.

Die Menge und die Reinheit der DNA bzw. der RNA wurden mithilfe des Nanodrops bestimmt. Für beide Experimente (*array*-CGH und Genexpressions-Analyse) ist es wichtig, dass die DNA- bzw. RNA-Fragmente hochmolekular, d.h. nicht degradiert, vorliegen. Um den Degradations-Zustand der beiden Nukleinsäuren zu bestimmen wurde jede Probe auf einem 2% igen Agarose Gel aufgetragen und begutachtet (siehe Kapitel 4.11).

4.3 *Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung*

Hämalaun ist ein dunkelblau-violetter Farbstoff, der in der Patho- und Immunhistochemie verwendet wird um verschiedene Gewebestrukturen in einer Zelle anzufärben. Hämalaun entsteht über mehrere chemische Zwischenstufen (Reifung durch Oxidation und Beizung mit einem positiv geladenen Metallsalz (z.B. dem Kation Fe^{3+} oder Al^{3+}) aus Hämatoxylin, welches aus dem Blutholzbaum (*Haematoxylum campechianum*) gewonnen wird. Hämalaun bindet kovalent an die negativ geladenen Strukturen in einer Zelle, z.B. an die Phosphatgruppe der Nukleinsäuren, wodurch die DNA im Zellkern und in den Mitochondrien angefärbt wird. Durch „Bläuen“ im Leitungswasser bei Raumtemperatur für 10 min wird der pH-Wert angehoben, wodurch der Farbstoff seine charakteristische blaue Farbe entfaltet und die Zellkerne tief dunkelblau erscheinen. Die Gegenfärbung erfolgt mit Eosin, ein roter Farbstoff der positiv geladene und eosinophile Gewebestrukturen in der Zelle anfärbt (z.B. kationische Proteine, das Zytoplasma und Granulozyten).

In der vorliegenden Arbeit wurden alle Tumorproben mithilfe einer HE-Färbung histopathologisch im Phasenkontrast-Mikroskop von einem Pathologen begutachtet, wodurch eindeutig zwischen Tumorarealen und anderen Zellstrukturen (Fettgewebe, Bindegewebe, Stroma, apoptotische und nekrotische Zellen etc.) unterschieden werden konnte. Für alle Analysen wurde (fast) ausschließlich Material aus Tumorzellen verwendet. 10-12 μm dicke Kryoschnitte aller Tumorproben wurden auf Superfrost Objektträger aufgebracht und für 10 min bei Raumtemperatur in einer sauren Hämalaunlösung inkubiert, dann 10 min bei Raumtemperatur gebläut und dann 30 sek mit Eosin gegengefärbt. Die Gewebeschnitte wurden anschließend jeweils 2 min in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert (70%-80%-90%-100%), dann 2 min in dem Lösungsmittel Xylol inkubiert und dann mit Entellan eingedeckelt.

4.4 *Array-CGH-Analyse (array-comparative genomic hybridization)*

Mithilfe der Oligo *array*-CGH Plattform von Agilent kann eine auf *Microarray* basierende komparative genomische Hybridisierung (aCGH: *comparative genomic hybridization*) durchgeführt werden, mit der chromosomale Aberrationen in einer Patientenprobe (z.B. Tumorgewebe) identifiziert und charakterisiert werden können. Durch die genomweite Abdeckung von DNA-Sonden können kodierende und nicht kodierende Genomregionen auf DNA-Amplifikationen und -Deletionen (sogenannte CNVs: *Copy Number Variations*, Kopiezahlveränderungen) untersucht werden, wodurch alle bekannten Gene, Promotoren, mRNAs und Telomerregionen analysiert werden können. Des Weiteren können mit diesem Chipformat Bruchpunkt-Analysen durchgeführt werden. Je nach Arraygröße (44 K-180 K) können genomische Kopiezahlveränderungen mit einer Auflösung ab 200 bp detektiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der *Human Genome Microarray Kit 105A* von Agilent nach Hersteller-Angaben (www.agilent.com; protocol v. 5.0, June 2007) verwendet, d.h. insgesamt erfolgte die genomweite Abdeckung mit über 105.000 60-mer Oligo-Sonden.

Für die *array*-CGH wird Tumor-DNA und Referenz-DNA mit jeweils unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen (Cy3 und Cy5) markiert und auf DNA-spots (=60-mer Oligos), die auf der Glas-Oberfläche des *Microarrays* immobilisiert sind, hybridisiert. DNA-Amplifikationen bzw. -Deletionen werden über die Menge an gebundener DNA ermittelt, indem die Fluoreszenz-Intensitäten beider Proben für jeden DNA-spot errechnet und verglichen werden.

Mithilfe der Feature Extraction Software 10.1.1.1. sowie der CGH Analytics 3.5.14(2) von Agilent wurden die Rohdaten extrahiert und ausgewertet.

4.4.1 DNA-Verdau

Bevor die Tumor- und Referenz-DNA in einem Replikationsschritt mit Fluorchrom-markierten Nukleotiden markiert und amplifiziert werden konnte, mussten die hochmolekularen 12-20 kb langen Nukleinsäuren in kleinere Fragmente zerlegt werden. Das Zerteilen des DNA-Moleküls erfolgte nicht unspezifisch durch Scherkräfte sondern koordiniert durch Restriktionsenzyme. Restriktionsenzyme sind Nukleasen die natürlich in Bakterien vorkommen und dort als Schutz vor Phagen-DNA dienen. 1970 wurde die erste Restriktionsendonuklease, das Restriktionsenzym *B.EcoRI*, aus dem Bakterium *Escherichia coli* isoliert und dient seitdem als unverzichtbares Werkzeug in der Gentechnik. Mittlerweile sind über 300 Restriktionsenzyme bekannt, wobei jedes eine eigene, spezifische, meist palindromische, 4-8 basenlange Sequenz im DNA-Doppelstrang erkennen kann und diese

definiert schneidet. Dabei entstehen DNA-Fragmente mit bestimmter Länge und bekannter Endsequenz, die in ihrer Größe je nach der Häufigkeit der verwendeten Schnittstelle im Genom variieren.

Als Ausgangsmaterial für eine *array*-CGH wurde jeweils 1 µg Tumor-DNA und 1 µg Referenz-DNA getrennt voneinander in 20,2 µl Nuklease-freiem Wasser gelöst. Für den enzymatischen Verdau der genomischen DNA wurden für beide Ansätze die Restriktionsenzyme *AluI* und *RsaI* verwendet.

Das Restriktionsenzym *AluI* wird aus dem Bakterium *Arthrobacter luteus* isoliert und schneidet die doppelsträngige DNA gerade, d.h. es entstehen stumpfe bzw. glatte Enden (*blunt ends*). Die Erkennungssequenz der Schnittstelle ist:



Das Restriktionsenzym *RsaI* wird aus dem Bakterium *Rhodopseudomonas sphaeroides* isoliert und schneidet die genomische DNA ebenfalls gerade, auch hier ist die Basenanordnung der Erkennungssequenz kreuzweise spiegelbildlich (Palindrom):



Für den Master-Mix wurden folgende Komponenten zusammen pipettiert:

Tabelle 2: Master Mix für DNA-Verdau für *array*-CGH

Komponente	1x	4 Proben in µl (2 Ko.+2 Pat.)	8 Proben in µl (4 Ko. + 4 Pat.) (x 8,5)
Nuklease-freies H ₂ O	2 µl	8 µl	17 µl
10 x Puffer C	2,6 µl	10,4 µl	22,1 µl
BSA	0,2 µl	0,8 µl	1,7 µl
<i>AluI</i>	0,5 µl	2 µl	4,25 µl
<i>RsaI</i>	0,5 µl	2 µl	4,25 µl
Summe	5,8 µl	23,2 µl	49,3 µl

U (units): ist die definierte Menge an Enzym die benötigt wird um 1 µg λ DNA in 1 Stunde bei 37°C in einem Gesamt-Reaktions-Volumen von 50 µl zu verdauen. Ko.: Kontrollen, Pat.: Patienten

Zu der genomischen Tumor- bzw. Referenz-DNA wurde jeweils 5,8 µl Master Mix dazu gegeben, so dass ein Gesamtvolumen von 26 µl vorlag. Das Gemisch wurde für 2 h bei 37°C inkubiert, dabei wurden die 12-20 kb langen DNA-Fragmente in etwa 200-2000 bp lange Fragmente geschnitten. Die Reaktion wurde gestoppt, indem die Restriktionsenzyme durch Erhitzen des Ansatzes auf 65°C für 20 min denaturiert und damit inaktiviert wurden. Der DNA-Verdau wurde auf 0°C abgekühlt und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gehalten. Die Länge der aus dem Verdau hervorgegangen DNA-Fragmente wurde mithilfe eines 2%igen Agarose Geles überprüft (siehe Kapitel 4.11).

4.4.2 Labeling Reaktion

Nachdem die DNA der Tumorzellen und der Referenz durch den enzymatischen Restriktionsendonukleasen-Verdau als 200-2000 bp lange Fragmente vorlag, wurden im nächsten Schritt Fluoreszenz-markierte Nukleotide in den DNA-Doppelstrang eingebaut. Das Prinzip der sogenannten DNA amplifizierenden *Label*-Reaktion folgte einer DNA-Replikation, bei der die Doppelhelix im 1. Schritt denaturiert wird und dann wird durch eine DNA-Polymerase die exakte, semikonservative, komplementäre Verdopplung beider Einzelstränge katalysiert. Dabei wurden Cy3-d-UTP Nukleotide in die Tumor-DNA eingebaut, in die Referenz-DNA wurden Cy5-d-UTP markierte Nukleotide eingebaut. Die *Label*-Reaktion wurde durch das Exo-Klenow-Fragment katalysiert. Bei diesem Enzym handelt es sich um das große Fragment der *E.coli* DNA-Polymerase I. Das Enzym ist für die *Label*-Reaktion am besten geeignet, da es weder die 3'→5' Exonuklease noch die 5'→3' Exonuklease-Aktivität der Polymerase I besitzt, wodurch die Cy3 bzw. Cy5 markierten Nukleotide nach ihrem Einbau in den DNA-Strang nicht wieder entfernt werden können. Für die Reaktion wurden folgende Reagenzien zusammen pipettiert, wobei der Master Mix für die Tumor- und die Referenz-DNA in zwei verschiedenen Reaktionsgefäßen angesetzt wurde.

Tabelle 3: Master Mix für die *Label*-Reaktion für die *array*-CGH

Komponente	1 Probe	2 Proben	4 Proben (x 4,05)
Nuclease-freies H ₂ O*	2 µl	4 µl	8,1 µl
5 x Puffer	10 µl	20 µl	40,50 µl
10 x dNTP	5 µl	10 µl	20,25 µl
Exo-Klenow-Fragment	1 µl	2 µl	4,05 µl
Cy3 oder Cy5	3 µl	6 µl	12,15 µl
Summe	21 µl	42 µl	86 µl

*Nuclease-freies H₂O wurde nur zugegeben, wenn von dem Verdau-Ansatz 2 µl auf ein Agarose-Gel aufgetragen wurden.

Zu jeder Tumor- und Referenzprobe wurden 21 µl (bzw. 19 µl ohne H₂O) des entsprechenden Master-Mixes zu gegeben (Cy3 bzw. Cy5), sodass ein Gesamtvolumen von 50 µl vorlag. Der Einbau der markierten Nukleotide erfolgte bei 37°C. Die Reaktion dauerte 2h, dann wurde das Exo-Klenow-Fragment durch 20 minütiges Erhitzen auf 65°C inaktiviert. Nachdem die Probe kurz auf Eis abgekühlt war, erfolgt die Aufreinigung der DNA bei Raumtemperatur.

4.4.3 Aufreinigung und Hybridisierung

Nach dem Verdau und der *Label*-Reaktion lagen in den beiden Ansätzen DNA-Fragmente vor, in die entweder Cy3-d-UTPs (Tumor-DNA) eingebaut war oder Cy5-d-UTPs (Referenz-DNA) und die eine Länge von 200-2000 bp aufwiesen. Da in dem Ansatz aber auch ungebundene Fluorochrome, Nukleotide, zu kurze DNA-Fragmente, Proteine und Salze

vorlagen, die die Hybridisierung negativ beeinflussen oder zu Artefakten führen würden, mussten diese Stoffe entfernt werden. Die Aufreinigung erfolgte über Säulen (Microcon YM-30 Filtereinheiten von Millipore). Die DNA-Ansätze wurden mit 430 µl 1 x TE Puffer auf ein Gesamtvolumen von 480 µl aufgefüllt und auf einen Zentrifugalfilter gegeben. Die Säule wurde 10 min bei 8000 g bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Die Membran der Säule enthält Poren, durch die kleine Fragmente wie Nukleotide, Proteine und Salze durch Zentrifugalkraft in das Auffang-Gefäß (*collection tube*) abzentrifugiert werden. Die 200-2000 bp langen, Fluoreszenz-markierten DNA-Fragmente bleiben in der Membran hängen. Die Flüssigkeit im *collection-tube* wurde verworfen. Im nächsten Schritt wurden 480 µl 1 x TE Puffer auf die Säule gegeben und es wurde erneut 10 min bei 8000 g zentrifugiert. Nachdem der Durchfluss verworfen war, wurde die Säule umgekehrt in ein neues *collection tube* gestellt und 1 min bei 8000 g zentrifugiert. Dadurch lösten sich die DNA-Fragmente von der Membran und wurden mit der vorhandenen Restflüssigkeit in dem *collection tube* aufgefangen. Das Endvolumen betrug nun idealerweise 42 µl, bei geringerem Volumen musste die Differenz mit 1 x TE Puffer aufgefüllt werden.

Für eine erfolgreiche Hybridisierung musste nicht nur die Gesamtmenge an DNA ausreichend hoch sein, sondern auch die spezifische Aktivität, d.h. die Einbaurate der Fluorochrome sollte für Cy3 zwischen 25 und 40 pmol/µg liegen und für Cy5 zwischen 20 und 35 pmol/µg.

1. Berechnung der Gesamtmenge der vorliegenden DNA in 40 µl Volumen

$$\text{Formel: } \frac{\text{DNA-Konz.} \times 40 \mu\text{l (Elutionsmenge)}}{1000}$$

$$\text{Berechnung: } \frac{217 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 40 \mu\text{l}}{1000} = 8,68 \mu\text{g}$$

2. Berechnung der Einbaurate des Cy3 Farbstoffes am Bsp.:

$$\text{Formel: } \frac{\text{Cy3-Konz.} \times 1000}{\text{DNA-Konz.}}$$

$$\text{Berechnung: } \frac{6,6 \text{ pmol}/\mu\text{l} \times 1000}{217 \text{ ng}/\mu\text{l}} = 30,4 \text{ pmol}/\mu\text{g}$$

Im nächsten Schritt wurde die Tumor-DNA mit der Referenz-DNA in einem Reaktionsgefäß vereint. Idealerweise kombinierte man ähnliche Einbauraten miteinander (wenn möglich). Es wurden folgende Komponenten zu dem Ansatz dazu pipettiert. Diesmal wurden für jeden Ansatz alle Komponenten einzeln dazu gegeben, es wurde kein Master Mix angesetzt.

Tabelle 4: Reagenzien für die Hybridisierung

Komponente	1 Ansatz (105K)
Cy3 + Cy5-DNA-Gemisch	2x 40 µl
Cot1-DNA	25 µl
10 x Blocking Agent	26 µl
2x Hi-RPM-Puffer	130 µl
Summe	261 µl

Die DNA-Doppelstränge wurden 3 min bei 95°C denaturiert und dann 30 min bei 37°C vorhybridisiert. 250 µl Probe wurden dann schnellstmöglich mit Luftblasen auf den einen speziellen Objektträger (*gasket-slide*) innerhalb der braunen Gummidichtung pipettiert. Dieser wurde vorher in eine Hybridisierungskammer drapiert. Der 105 K *Microarray* wurde mit der aktiven Seite, auf die die 105.000 60-mer Oligonukleotide immobilisiert sind, auf den *gasket-slide* gelegt. Danach wurde die Hybridisierungskammer verriegelt und in den vorgeheizten Hybridisierungssofen eingespannt. Die Luftblasen sorgten zwischen *array* und *gasket-slide* für die Zirkulation der Flüssigkeit. Die Hybridisierung erfolgte bei 65°C und 20g.

4.4.4 Waschen, Scannen und Auswertung der *Microarrays*

Um ungebundene DNA-Fragmente von dem *Microarray* zu entfernen, wurde dieser nach 40h Hybridisierung in drei Küvetten mit insgesamt zwei verschiedenen Waschlösungen gewaschen. In der 1. Küvette wurde das gesamte Konstrukt „*array+gasket-slide*“ auseinandergebaut, das *gasket-slide* konnte nach einer Reinigung wieder verwendet werden, der *array* wurde in der 2. Küvette mit Waschlösung eins fünf min bei RT gewaschen. Anschließend wurde er fünf min in einer 37°C warmen Waschlösung zwei gewaschen und dann mit der aktiven Seite nach oben zeigend in einen *array*-Halter platziert um dann im Scanner (G2565CA, Agilent) gescannt werden zu können. Der Agilent Scanner misst im roten Kanal die Fluoreszenz-Intensität des Cy5-Fluorchroms und im grünen Kanal die Fluoreszenz-Intensität des Cy3-Fluorchroms. Die Auflösung betrug 5 µm.

Tabelle 5: Exzitation und Emissions-Spektrum von Cy3 und Cy5-Farbstoffen in PBS

Eigenschaft	Cy3 (cyane)	Cy5
Exzitation max. (nm)	548	646
Emission max. (nm)	562	664
Extinctions Koeffizient ($M^{-1} cm^{-1}$)	$\lambda 550 = 150\ 000^*$	$\lambda 650 = 250\ 000^*$
Quantum Ausbeute	0,04*	0,27*
Fluoreszenz -Haltbarkeit/Lebenszeit	<0,3	1,0

*gemessen in PBS (*phosphate-buffered saline*) nach Mujumdar RB, 1993 (Mujumdar et al., 1993)

Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit der Feature Extraction vs. 10.5.1.1. von Agilent und mit der CGH Analytics v 3.5.14 von Agilent.

4.5 Genexpressions-Analyse

Mit dem *Whole Genome Microarray* von Agilent ist eine genomweite Analyse der Genexpression auf mRNA-Ebene möglich. Die Technik basiert auf der Hybridisierung der mRNA mit spezifischen Oligonukleotiden auf dem DNA-Chip. Die Orte und die Intensität der Target-Hybridisierungen werden wie bei der *array*-CGH über Fluoreszenzscanning analysiert. Anhand der Unterschiede der Genexpression zwischen zwei Proben kann auf die Bedeutung der differentiell exprimierten Gene für den betrachteten biologischen Prozess geschlossen werden. Ein großer Vorteil dieser Technik ist die Möglichkeit, die Expression mehrerer tausend Gene gleichzeitig untersuchen zu können.

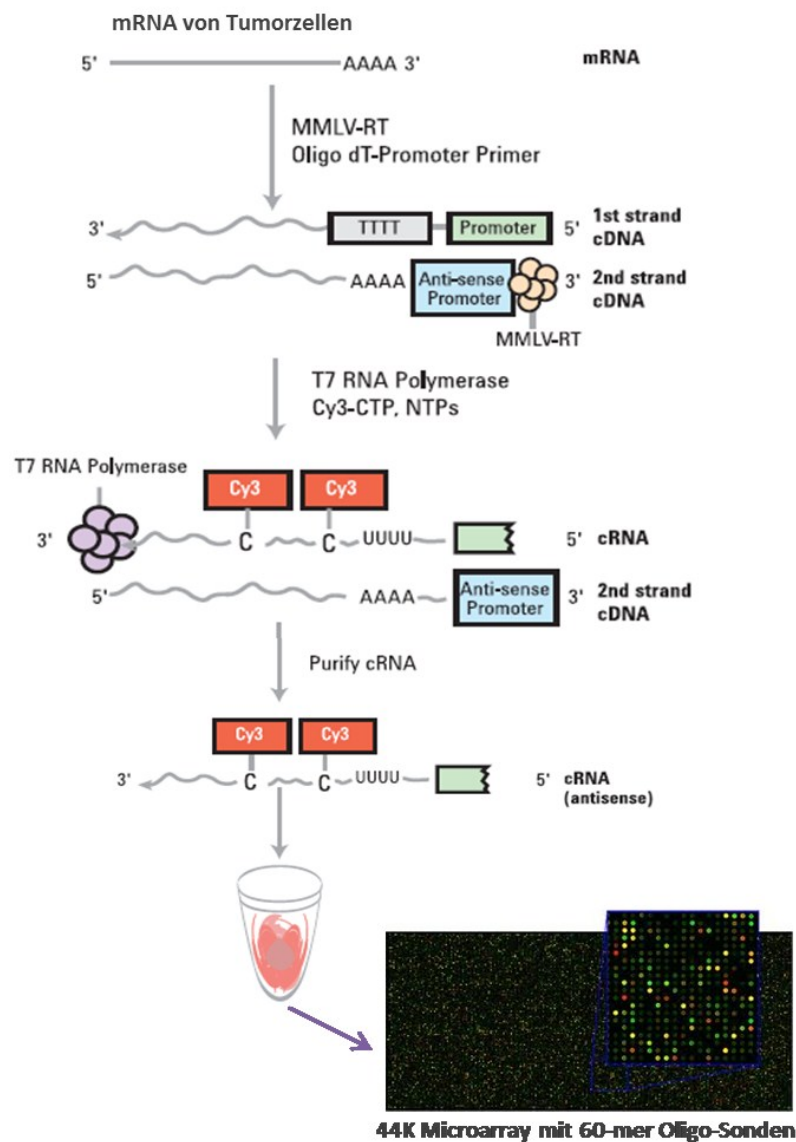


Abb. 7: Arbeitsablauf/FlowChart der Genexpressions-Analyse. www.Agilent.com und <http://www.kurdis-hup.com/rresearch-blogspot&page=2>

4.5.1 Umschreibung der RNA in cDNA mit anschließender *Label*-Reaktion

Als erstes wird die RNA in cDNA umgeschrieben. Als katalysierendes Enzym wird die *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT)* verwendet. Bei dem Enzym handelt es sich um eine RNA-abhängige DNA Polymerase die für diese Reaktion am besten geeignet ist, da sie für die cDNA-Synthese von sehr langen mRNA Templates geeignet ist (>5kb). Diese Eigenschaft beruht auf der Tatsache, dass die RNase H Aktivität von *M-MLV RT* schwächer ist als die von der üblicher verwendeten *Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase (AMV RT)*. Alle Reaktionen wurden laut Hersteller-Angaben durchgeführt (www.agilent.com, protocol v. 5.7, March 2008). Zuerst wurden 200 ng RNA in 8,3 µl Nuklease-freiem H₂O gelöst und zusammen mit 1,2 µl T₇ Promotor Primer für 10 min auf 65 C erhitzt. Währenddessen wurde der 5x *First Strand Buffer* 3-4 min auf 80°C erhitzt. Zu der Probe wurde 2 µl Spike in Mix zugegeben, anschließend wurden alle Reagenzien, wie in Tabelle 6 aufgelistet, zusammen pipettiert. Es war wichtig, dass alle Pipettierschritte auf Eis durchgeführt wurden und dass die Enzyme bei -20°C bereitgestellt wurden.

Tabelle 6: Master Mix für die Umschreibung von RNA in cDNA für die Genexpressions-Analyse

Komponente	1 Probe
5 x <i>First Strand Buffer</i>	4 µl
0.1 M DTT	2 µl
10 mM dNTP mix	1 µl
MMLV-RT	1 µl
RNase Inhibitor	0.5 µl
Summe	8,5 µl

DTT: Dithiothreitol; M-MLV RT: *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*

8,5 µl Master Mix wurden zu der RNA gegeben, dann wurde der Ansatz zwei Stunden bei 40°C inkubiert, anschließend wurden die beiden Enzyme (MMLV-RT und RNase Inhibitor) durch Erhitzen auf 65°C für 15 min deaktiviert.

Im nächsten Schritt wurde die cDNA mit einem Fluoreszenz-Farbstoff Cy3 (cyane) markiert, d.h. Cy3 gekoppelte Nukleotide (Cy-d-CTP) wurden in die cDNA eingebaut, wodurch auch die Amplifikation erfolgte. Auch hier erfolgten alle Schritte gemäß den Hersteller-Angaben. 50% PEG wurden bei 40 C eine Minute erhitzt. Die in Tabelle 7 aufgelisteten Reagenzien wurden zu den 20 µl cDNA aus der vorangegangenen Reaktion pipettiert. Die *Label*-Reaktion erfolgte bei konstanten 40°C für 2h. Eine Inaktivierung der Enzyme ist nicht nötig gewesen.

Tabelle 7: Master Mix für die *Label*-Reaktion für die Genexpressions-Analyse

Komponente	1 Probe	4 Proben (x4,5)
Nuklease-freies H ₂ O	15,3 µl	68,85 µl
4 x Transkriptionspuffer	20µl	90 µl
0.1 M DTT	6 µl	27 µl
NTP mix	8 µl	36 µl
50% PEG	6,4 µl	28,8 µl
RNase out	0,5 µl	2,25 µl
Inorganic pyrophosphatase	0,6 µl	2,7 µl
T7 RNA Polymerase	0,8 µl	3,6 µl
Cyane-3 CTP	2,4	10,8 µl
Summe	60 µl	270 µl

DTT: Dithiothreitol

4.5.2 Aufreinigung der Proben, Hybridisierung, Waschen und Scannen der *arrays*

Nach zwei Stunden wurde das Gemisch über spezielle Säulen (RNA Mini Kit von Qiagen) aufgereinigt, um ungebundene Nukleotide, Salze, Proteine etc. aus dem Gemisch zu entfernen. Hierzu wurden 20 µl Wasser, 350 µl RLT-Puffer und 250 µl 100% Ethanol zu der Probe gegeben. Das Ganze wurde vorsichtig gemischt und 700 µl wurden auf die Millipore Säulen aufgetragen und dann 30 sek bei 4°C und 13.000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Auf die Säule wurde 500 µl RPE-Puffer aufgetragen, dann wurde erneut für 30 sek bei 4 C und 13.000 g zentrifugiert; der Durchfluss wurde verworfen. Dann wurden nochmals 500 µl RPM-Puffer zugegeben, diesmal wurde für 1 min bei 4°C und 13.000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, anschließend wurde mit 30 µl RNase freiem Wasser eluiert. Hierfür wurde 30 sek bei 4 C und 13.000 g zentrifugiert. 2 µl Eluat wurden entnommen, um die cDNA-Menge sowie die Einbaurate des Fluorochroms am Nanodrop zu bestimmen. Für eine erfolgreiche Hybridisierung mussten mindestens 1,65 µg cDNA vorliegen und eine spezifische Aktivität von 6 pmol Cy3 pro µg cDNA) sollten erreicht werden.

3. Berechnung der Gesamtmenge der vorliegenden cDNA in 28 µl Volumen

$$\text{Formel: } \frac{\text{cDNA-Konz.} \times 28 \mu\text{l (Eluationsmenge)}}{1000}$$

$$\text{Berechnung: } \frac{86 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 28 \mu\text{l}}{1000} = 2,40 \mu\text{g}$$

4. Berechnung der Einbaurate des Cy3 Farbstoffes am Bsp.:

$$\text{Formel: } \frac{\text{Cy3-Konz.} \times 1000}{\text{DNA-Konz.}}$$

$$\text{Berechnung: } \frac{2,46 \text{ pmol}/\mu\text{l} \times 1000}{86 \text{ ng}/\mu\text{l}} = 28,6 \text{ pmol}/\mu\text{g}$$

Zu den restlichen 28 μl Eluat wurden 11 μl Blocking Agent, 14,8 μl Wasser und 2,2 μl Fragmentations-Puffer zugegeben. Für exakt 30 min wurde das Gemisch bei 60°C erhitzt.

Um die Fragmentations-Reaktion zu stoppen, wurden 55 μl 2 x GE *Hybridization Buffer* HI-RPM zugegeben. Das gesamte Gemisch wurde dann auf den, in der Hybridisierungskammer liegenden, *gasket-slide* pipettiert. Der 44 K *Microarray* von Agilent wurde aufgelegt und die Hybridisierungs-Kammer wurde verschlossen. Die Hybridisierung erfolgte bei 65°C und 10 g im Hybridisierungs-Ofen von Agilent.

Nach 17 Stunden wurde die Hybridisierungs-Kammer sowie der *gasket-slide* entfernt und der *Microarray* in einem ersten Waschpuffer für 1 min gewaschen. In einem zweiten Waschpuffer, der zuvor auf 37°C vorgewärmt wurde, wurde der *Microarray* ebenfalls 1 min gewaschen, dann in die Scan-Vorrichtung eingelegt im G2565CA Scanner von Agilent gescannt. Die Roh-Daten wurden mit Feature Extraction vs. 10.5.1.1. (Agilent Technologies) und Gene Spring GX v. 10.0.2 (Agilent Technologies) ausgewertet.

4.5.3 Auswertung der Roh-Daten

Die Hybridisierungs-Qualität wurden durch einen QC-Reports (Qualitäts-Report) überprüft. Die Normalisierung der Daten erfolgte durch Shift zur 75 Perzentile. Die Hintergrund-Korrektur wurde durch Verwendung der *Baseline Transformation* durchgeführt, wodurch \log_2 transformierte Daten vorlagen. Proben mit einem zu hohem Hintergrund-Signal (Hintergrund-Rauschen) wurden von weiteren Analysen ausgeschlossen. Es wurden Histogramme, Matrix Plots, Box-Whisker Plots, *Correlation Plots*, *Quality Control Metric Plots*, 3D PCA Scores (*Principal Component Analysis*) erstellt, um zum einen eine Gauß'sche-Verteilung zu gewährleisten und zum anderen, um die Qualität der Daten zu kontrollieren. Die statistische Berechnung erfolgte durch ANOVA mit dem *none posthoc test*; die *P-value* Berechnung erfolgte nach Benjamin Hochberg FDR (*false discovery rate*). Die *Fold Change* Analyse wurde anhand von 5400 ausgewählten Genen durchgeführt, welche alle ein FDR-korrigiertes *P-value* < 0.05 hatten. Der *Fold Change cut-off* wurde auf 10 gesetzt, wodurch aus den 5400 Genen 1760 selektiert werden konnten. Diese 1760 Gene mit einem *Fold Change* ≥ 10 wurden hierarchisch geclustert. Die Cluster-Analyse erfolgte nach *Entities* und Konditionen und wurde mit dem *euclidian distance metric* und der *centroid linkage rule* durchgeführt.

4.6 Immunhistochemie mittels *Dako Real Detection Kit*

Die immunhistochemische Färbung wurde mit dem *Dako Real Detection Kit* der Firma DAKO nach Hersteller-Angaben durchgeführt. Das Prinzip der indirekten Färbung beruht auf der starken Affinität von Avidin bzw. Streptavidin für das wasserlösliche Vitamin Biotin und wird als ABC-Methode (Avidin-Biotin-Komplex) bezeichnet. Avidin ist ein Glykoprotein aus dem Hühnereiweiß, das aufgrund seiner tetrameren Struktur vier Biotinmoleküle binden kann. Streptavidin ist eine gentechnisch veränderte Form des Avidins, welches aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* isoliert wird. Streptavidin ist kein Glykoprotein, weshalb es dem Avidin in der Biochemie dadurch überlegen ist, dass es nicht an Kohlehydrat-Rezeptoren binden kann, wodurch weniger unspezifische Bindungen entstehen. Der Primärantikörper bindet an das nachzuweisende Protein im Gewebeschnitt. An den Primärantikörper bindet ein Sekundärantikörper der wiederum kovalent an Biotin gebunden ist. Dann bindet Streptavidin an das Biotin des Sekundär-AK, wodurch ein Streptavidin-Biotin-Enzymkonjugat-Komplex entsteht. Mithilfe einer chromogenen Substrat-Lösung wird der Primärantikörper sichtbar gemacht. Als Enzym wird alkalische Phosphatase verwendet. Die ABC-Methode hat eine sehr gute Sensitivität und ist einfach in der Handhabung.

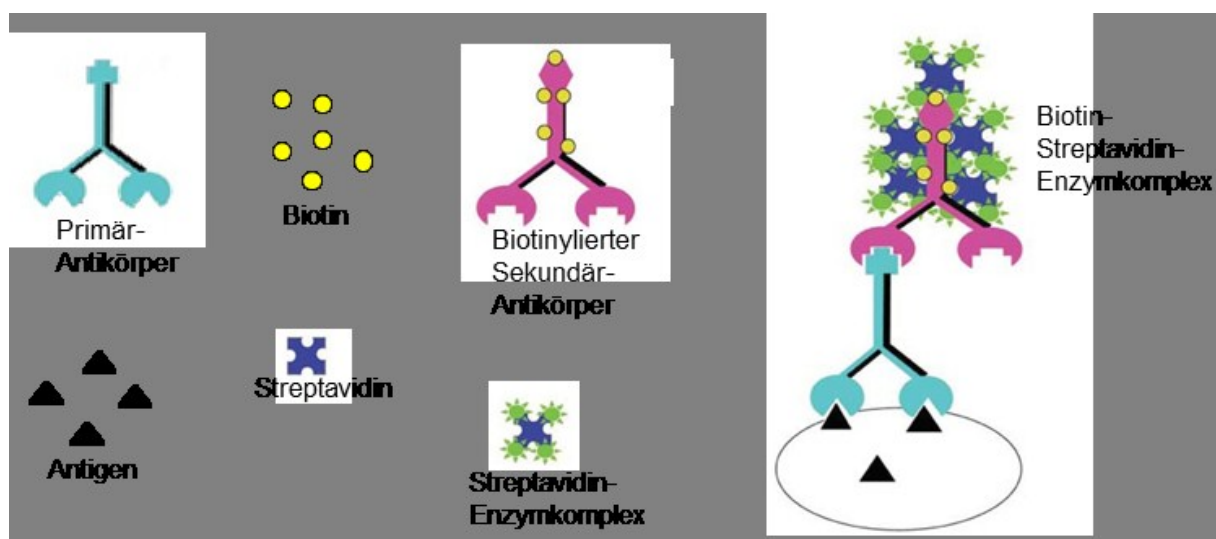


Abb. 8: Immunhistochemie: Prinzip der indirekten Färbung mithilfe der ABC-Methode (Avidin-Biotin Komplex), modifiziert nach G.E. Hoffmann [Hoffmann et al., 2008]; <http://media.wiley.com/CurrentProtocols/NS/ns0212/ns0212-fig-0002-1-full.jpg>

Die bei -20°C tiefgefrorenen $10\text{-}12\mu\text{m}$ dicken Kryoschnitte wurden aufgetaut, dann wurde das Gewebe auf dem Objektträger (OT) fixiert. Dazu wurden die OTs 9 min in eiskaltem Aceton gestellt und dann 30 min an der Luft getrocknet, bis das Aceton verflüchtigt war. Zuerst wurden zwei Tropfen Avidinlösung bei RT auf den Schnitt aufgetragen. Nach 10 min wurde

dreimal mit TBS-T gespült. Im nächsten Schritt band Biotin an das Avidin, indem zwei Tropfen Biotinlösung auf den Schnitt aufgetragen wurden. Die Lösung wurde nach 10 min durch dreimaliges Spülen mit TBS-T abgewaschen. Als nächstes erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (z.B. RET-AK, CD302-AK, PPWD1-AK, ABHD14B-AK, Chromogranin A-AK, Survivin-AK, Cyclin B-AK etc.). Die Antikörperverdünnung wurde je nach gewünschter Konzentration, mit der *Antibody-Diluent* Lösung hergestellt. 100 µl des primären Antikörpers wurden auf das Gewebe aufgetragen. Die Inkubation erfolgte entweder für 1h bei RT oder über Nacht bei 4°C. Nach der Inkubation wurden die nicht gebundenen Antikörper-Moleküle durch dreimaliges Waschen mit TBS-T ab gespült. Von dem biotinylierten Sekundärantikörper wurden zwei Tropfen pro Schnitt aufgetragen, die Inkubation erfolgte für 30 min bei RT in einer feuchten Kammer. Nachdem erneut dreimal mit TBS-T gespült wurde, wurden zwei Tropfen Streptavidin aufgetragen, die Inkubation erfolgte wieder für 30 min bei RT in einer feuchten Kammer. Nach erneutem Waschen wurden 100 µl des Chromogranin-Ansatzes pro Gewebeschnitt aufgetragen. Für den Chromogenansatz wurde ein Tropfen Levamisol in 10 ml Substratpuffer gegeben. Von dem Ansatz wurden 750 µl abgenommen, dann wurden jeweils 30 µl Chromogen 1-3 zugegeben. Die Chromogranin-Reaktion erfolgte innerhalb der nächsten 15 min bei RT in einer feuchten Kammer. Danach wurde dreimal mit TBS-T und Leitungswasser gespült, danach mit Aqua dest. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin für 1 min (siehe Kapitel 4.3). Das Bläuen der Kerne erfolgte in Leitungswasser für 10 min. Die Schnitte wurden mit Aqua dest ab gespült und dann mit Glycerol-Gelatine (auf 50°C vorgewärmt) eingedeckelt. Die histologische Auswertung erfolgte im Phasenkontrast-Mikroskop durch den Pathologen Dr. G. Ernst.

Für die Immunhistochemie an Zelllinien wurden diese auf Objektträgern in *quadriPERM* Platten (=Zellkulturgefäß mit vier getrennten Kompartimenten) über Nacht kultiviert (siehe Kapitel 4.7). Nach 24h wurden die Zellen fixiert (siehe Kapitel 4.10) und dann wie oben beschrieben immunhistochemisch für verschiedene Proteine angefärbt (siehe Kapitel 5.4).

4.7 Auftauen, Kultivierung und Einfrieren von Zellen

Die in flüssigem Stickstoff lagernden Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C für 1-2 min aufgetaut und dann sofort in kleine Zellkulturflaschen mit 8 ml des jeweiligen Kulturmediums überführt und dann für 24h bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Als Medium wurde **(a)** DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, **(b)** RPMI: *Roswell Park Memorial Institute* und **(c)** MEM: *Minimum Essential Medium* und **(d)** DMEM/Ham F-12 *Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient F-12 Ham* verwendet. Alle vier Medien wurden mit 10% hitzeinaktiviertem fötalen Kälberserum (FCS), 2 mM L-Glutamin, nicht essentiellen Aminosäuren (1:100) und 50µg/ml Streptomycin supplementiert. Nach 24h wurde das Medium abgenommen, 5 min bei 800 g zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen, die pelletierten Zellen wurden mit 8 ml frischem, 37°C warmen Medium in eine neue Zellkulturflasche überführt. Zu der ersten Flasche wurde zu den bereits festhaftenden Zellen 8 ml frisches, 37°C warmes Medium zugegeben. Die Weiterkultivierung erfolgte bei 37°C und 5% CO₂. Zweimal die Woche wurde wie oben beschrieben frisches Medium zugegeben. Für das Ernten der Zellen wurde das Medium abgenommen, einmal mit 1 x PBS gewaschen, dann wurden die Zellen mit 2-4 ml Trypsin-EDTA für ca. 10 min bei 37°C abtrypsiniert. Die Reaktion wurde mit Medium gestoppt. Die Zellen wurden durch zentrifugieren bei 900 g für 5 min pelletiert. Das Zellpellet wurde zweimal mit 1 x PBS gewaschen und bei 3200 g zentrifugiert. Das trockene Zellpellet wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Aufarbeitung bei -80°C tiefgefroren.

In Kultur gehaltene neuroendokrine Zellen können nach einer bestimmten Anzahl an Teilungen ihre neuroendokrinen Eigenschaften verlieren, sie können seneszent werden oder nicht immortalisierte Zellen sterben ab. Aus diesem Grund ist es nötig, aufgetaute Zellen beim ersten Splitten erneut einzufrieren, damit die Zellen für weitere Experimente so wenig wie mögliche Zellteilungen durchlaufen haben. Zum Einfrieren der Zellen wurde das Medium abgenommen, die Zellen wurden wie oben beschrieben abtrypsiniert und pelletiert. Das Zellpellet wurde mit 500 µl Medium + 400 µl FCS + 100 µl DMSO versetzt, gemischt und in 2 ml Kryoröhrchen abgefüllt. Die Kryoröhrchen wurden in eine mit Isopropanol gefüllte Box überführt und diese wurde bei -80°C eingefroren. Isopropanol kühlt pro Stunde um 1°C ab, wodurch die Zellen langsam -um 1°C pro Stunde- tiefgefroren werden und so optimale Überlebenschancen haben.

Tabelle 8: Charakteristik und Kulturmedium aller verwendeten Zelllinien

Zelllinie / Grund-medium	BON	LCC	MIP-101	QGP	CACO-2	Colo-94H	SW-1116
Organismus	H. sapiens	H. sapiens	H. sapiens	H. sapiens	H. sapiens	H. sapiens	H. sapiens
Ethnizität					Kaukasier	Kaukasier	Kaukasier
Alter / Geschlecht	28 / m			29 / m	72 / m	70 / m	73 / m
Gewebe	Pankreas			Jejunum	Colon	Colon ascendens	Colon
Zelltyp	gut diff. Tumor	schlecht diff. Karzinom	schlecht diff. Karzinom	gut diff. Karzinom	Adeno-karzinom	Adeno-karzinom	Karzinom Grad III Duke's
Morphologie					epithelial	epithelial	epithelial
	DMEM+ Ham's 12 (1:1) 10% FCS 2 mM Glutamin	DMEM 10% FCS 2 mM Glutamin	DMEM 10% FCS	RPMI 1640 10% FCS	DMEM+ Ham's 12 (1:1) 10% FCS 2 mM Glutamin	MEM in Earle's BSS 10% FCS	RPMI 1640 10%FCS 2 mM Glutamin

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* supplementiert mit 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS), 2 mM L-Glutamin, nicht essentiellen Aminosäuren (1:100), 50 µg/ml Streptomycin; FCS: fötales Kälberserum; m: männlich; w: weiblich

4.8. *BIRC 5* Gen knockdown mittels siRNA

Am 1. Tag des Versuches wurden die Zellen abtrypsiniert und mit dem jeweiligen Medium auf 6-well-Platten so ausplattiert, dass sie am 2. Tag eine Konfluenz von 50% erreichten. Am 2. Tag wurde das Medium verworfen und die adhärennten Zellen wurden mit 500 µl frischem Medium überschichtet. Pro well wurden 100 µl Serum-freies Medium benötigt, die mit 2 µl Transfektions-Reagenz von *Cell Signalling* versetzt wurden. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die benötigte Menge SignalSilence® Survivin siRNA von *Cell Signalling* zugegeben, um eine Endkonzentration von 50-100 nM zu erreichen. Das Gemisch wurde erneut bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert und dann wurden jeweils 100 µl zu 500 µl Medium pipettiert. Nach 24h wurde das Medium abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Nach jeweils 48h und 72h wurden die Zellen geerntet und bei -80°C tiefgefroren (siehe Kapitel 4.7). Da für weiterführende Experimente (Western Blot-Analysen) und (Genexpressions-Analysen) sowohl Proteine als auch RNA benötigt wurden, wurden von jeder Zelllinie sechs Ansätze angesetzt. Zusätzlich wurde eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt.

4.9 Western Blot

Um die Proteine (z.B. eines Zelllysates) entsprechend ihres Molekulargewichtes (und/oder ihrer Ladung) aufzutrennen, wird unter denaturierenden Bedingungen eine SDS-Polyacryl-Gelelektrophorese durchgeführt. Der Transfer der Proteine (Proteinbanden) von dem SDS-Polyacrylgel auf eine PVDF-Membran erfolgt durch ein angelegtes elektrisches Feld und wird als Western-Blot bezeichnet. Die Proteinbanden bleiben aufgrund hydrophober Wechselwirkungen an der Membranoberfläche haften und können dann durch Antikörper-Reaktionen angefärbt und sichtbar gemacht werden.

Die verschiedenen Zelllinien wurden nicht nur immunhistochemisch charakterisiert, sondern auch durch Western-Blot-Analysen. Die neuroendokrinen Zelllinien wurden auf die etablierten Marker für NETs getestet, bevor sie als Referenz-Zelllinie für siRNA Versuche, Apoptose-Versuche etc. weiter kultiviert wurden. Der Erfolg des siRNA-knockdown für Survivin wurde mithilfe eines Western Blots nachgewiesen.

4.9.1 Zelllysate herstellen und SDS-Polyacryl-Gelelektrophorese

Die pelletierten Zellen wurden mit 100-500 µl Lysepuffer (je nach Pelletgröße) durch Vortexen gemischt. Die Zelllyse erfolgte auf Eis für 15-30 min. Um die Proteine von den lysierten Zelltrümmern zu trennen, wurde 15 min bei 4°C bei 15.000 g zentrifugiert. Der Überstand enthielt die Proteine, der in ein neues Reaktionsgefäß übertragen wurde. Die Konzentration der Proteine wurde photometrisch am Nanodrop bei OD₂₈₀ gemessen. Die im Lysepuffer vorliegenden Proteine wurden mit dem gleichen Volumenanteil 4 x SDS-Puffer 10 min bei 96°C aufgeköcht, um sie dann in denaturierter Form auf das 4-12%ige Bis-Tris-Gel von Invitrogen auftragen zu können. Die kommerziell erhältlichen Bis-Tris Gele haben im Gegensatz zu den herkömmlichen Tris-Glycin SDS-PAGE Gelen einen neutralen pH-Wert, wodurch Protein-Modifikationen minimiert werden und sehr hohe Trennschärfen bei der Separierung von kleinen bis mittelgroßen Proteinen erreicht werden. Abhängig vom Molekulargewicht des gewünschten Proteins wurde entweder 1 x MOPS-Puffer oder 1 x MES-Puffer verwendet. Ein Proteinstandard, der gefärbte Proteine bekannter Größe enthält, wurde mitgeführt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 150-200 V und 500 mA in einer Invitrogen-Kammer für ca. 1-1,5 h.

- Lysepuffer:** 970 μ l Lysepuffer D
(0,1 M Na-phosphat, 2 mM $MgCl_2$, 5 mM EDTA)
10 μ l 50 mM Leupeptin
10 μ l 10 mM PMSF
10 μ l 10%iges CHAPS
- 4 x SDS-Auftragspuffer:** 40 mM Tris HCl (0,09g in 10 ml H_2O (pH 6,8))
4% SDS (0,8 g SDS)
10% β -Mercaptoethanol (2 ml β -ME)
40% Glycerin (8 ml Glycerin)
0,002% Bromphenolblau (0,4 mg Bromphenolblau)
- 10 x MOPS-Puffer (pH 8):** 500 mM MOPS (104,65 g/l)
500 mM Tris (60,56 g/l)
1% SDS (10 g/l)
10 mM EDTA, (3,722 g/l in 100 ml Tris, pH 8)
- 10 MES-Puffer (pH 7,3):** 500 mM MES (97,6 g/l)
500 mM Tris (60,57 g/l)
1% SDS (10g/l)
10 mM EDTA (3,722 g/l in 100 ml Tris, pH 8)

4.9.2 Blotten

Nachdem die Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes in dem Tris-Bis-Gel aufgetrennt wurden, wurden sie auf eine PVDF-Membran geblottet, wobei das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten blieb. Die PVDF-Membran wurde in 7,5 x 8,6 cm große Stücke geschnitten, in Methanol gewaschen und dann mit Aqua dest abgespült. Auf dieselbe Größe zugeschnittene Schwämme und Filter wurden in Transfer-Puffer eingeweicht. Die Blothalterung wurde wie folgt bestückt: weiße Oberseite - Schwamm - Filterpapier - Membran - Gel - Filterpapier - Schwamm - schwarze Unterseite. Die Blotkammer wurde mit Transferpuffer gefüllt, dann wurde mit 150 mA (pro Gel) für ca. 2 h bei 4°C geblottet. Um unspezifische Antikörperbindungen an freie Bindungsstellen auf der Membran zu vermeiden, wurde diese 30 min in 1 x TBS-T mit 2% Milchpulver geschwenkt. Anschließend wurde die Membran zweimal 10 min in 1 x TBS-T und einmal in 10 min in 1 x TBS gewaschen. Die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper (z.B. Survivin-AK) wurde über Nacht bei 4°C durchgeführt. Nach 24 h wurde der primäre AK verworfen und die Membran wurde zweimal 10 min in 1 x TBS-T und einmal 10 min in 1 x TBS gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären AK erfolgte für 3 h bei 4°C, dann wurde die Membran erneut wie oben beschrieben gewaschen. Die Detektion der Proteine erfolgte über die Alkalische Phosphatase

Reaktion, d.h. alle verwendeten sekundären Antikörper waren mit Alkalischer Phosphatase (AP) gekoppelt. Dieses Enzym nutzt als artifizielles, chromogenes Substrat BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat) und hydrolysiert den Redox-Farbstoff NBT (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid) zu einem blauen Indigo-Farbstoff. Die AP-Reaktion erfolgte im Dunkeln. Die Membran wurde mit 66 µl BCIP-Lösung und 132 µl NBT-Lösung in 20 ml AP-Puffer schwenkend inkubiert, bis die zu detektierenden Protein-Banden blau hervortraten. Die Reaktion wurde mit 1 x PBS abgestoppt. Nach dem Trocknen der Membran wurde diese eingescannt.

Transfer-Puffer:	100 mM Tris-HCL (50 ml 1 M Tris, pH 8) 767 mM Glyzin (28,8 g/l) 20% Methanol (200 ml)
10 x TBS-T:	250 mM Tris-HCl (30,28 g/l, pH 7,5) 1,37 M NaCl (80,06 g/l) 27 mM KCl (2,01 g/l) 0,5% Tween-20 (5 ml)
10 x TBS:	250 mM Tris-HCl (30,28 g/l, pH 7,5) 1,37 M NaCl (80,06 g/l) 27 mM KCl (2,01 g/l)
10 x PBS:	80 g NaCl 2g KCl 26,8 g Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O 2,4 g KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
Primäre AK-Lösung:	9,5 ml 1 x PBS 0,5 ml fetales Kälberserum (FCS) 25 µl Natriumazid x µl Antikörper je nach gewünschter Verdünnung
Sekundäre AK-Lösung:	50 mM Tris-HCl pH 7,5 150 mM NaCl x µl Antikörper je nach gewünschter Verdünnung
AP-Puffer:	100 mM Tris-HCl (6,8 g/500 ml Tris-HCl, pH 9,5) 100 mM NaCl (10 ml 5 M NaCl) 5 mM MgCl ₂ (0,5 g MgCl ₂)
BCIP-Lösung:	10 ml 70% Dimethylformamid + 500 µg BCIP
NBT-Lösung:	10 ml 70% Dimethylformamid + 500 µg NBT

4.10 Chromosomenpräparation aus Zelllinien

Für die erfolgreiche Präparation von Chromosomen müssen diese während der Metaphase arretiert werden. Zu diesem Zweck erfolgte die Inkubation mit dem Spindelgift Colcemid, entweder über Nacht oder bis zu 96h, abhängig von der Teilungsrate der Zellen. Die finale Colcemid Konzentration lag bei 0,1µg/ml. Die Zellen wurden mit Trypsin geerntet, in ein 15 ml Falcon Tube überführt und 5 min bei 1500 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde vorsichtig in 11 ml hypotoner KCl-Lösung resuspendiert. Während der 30 minütigen Inkubation bei 37°C quollen die Erythrocyten und zerplatzten [Hsu, 1952], danach wurden die Zellen durch Zugabe von 2 ml Fixativ anfixiert. Das Fixativ schützte die Kernmembran der Leukozyten vor dem vorzeitigen Zerplatzen. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 1500 g wurde der Überstand abgenommen und das Pellet erneut in 10 ml Fixativ gelöst. Durch dreifache Wiederholung dieses Waschschrattes wurde das Pellet von Erythrocyten und Plasma-Resten gereinigt. Nach dem letzten Zentrifugieren wurde das Pellet, je nach Größe, in ca. 1 ml Fixativ resuspendiert. Vor dem Auftropfen auf Objektträger (OT) wurde die Lösung 45 min auf Eis gestellt. Die Suspension wurde dann auf gereinigte, in kaltem Aqua dest stehende OTs aufgetropft, wobei die Kernmembran der Leukozyten zerplatzte und die Metaphase-Chromosomen gespreitet wurden. Um Plasmareste abzuspülen und den Verdunstungsvorgang zu verlängern, wurden die OTs nach ca. 20 s mit Fixativ nachgetropft und dann bei 40°C luft-getrocknet. Die Qualität der präparierten Chromosomen war stark durch äußere Faktoren wie Luftfeuchte und Temperatur abhängig, wobei 50% Luftfeuchte und 20°C optimal waren [Spurbeck et al., 1996; Hlics et al., 1997]. Die Chromosomen wurden über Nacht bei 60°C gealtert und dann mit einer Gimsa-Färbung gebändert.

Cocemid:	0,1 ml Colcemide [10µg/ml] (=0,1µg/ml final conc.)
Kaliumchlorid:	0,559 g / 100 ml Aqua dest
Fixativ:	Eisessig / Methanol (96%) = 1:3 (4°C)

4.11 Gelelektrophorese zur Bestimmung der DNA-Fragmentlängen

Unter Gel-Elektrophorese versteht man ein analytisches Verfahren, bei dem Moleküle durch Anlegen eines elektrischen Feldes an eine Gel-Matrix ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Als Gel-Matrix wurde Agarose verwendet. Die Agarose fungiert als engmaschiges Sieb, durch die die DNA-Moleküle wandern und so nach ihrer Größe und Ladung aufgetrennt werden. Die verwendete Menge an Agarose bestimmt die Maschenweite des Gels. Mit steigender Agarose-Konzentration werden die Poren der Gel-Matrix enger, wodurch eine noch feinere Aufspaltung der Moleküle erreicht wird. Die negativ geladene DNA wird am Minuspol (Kathode) aufgetragen und läuft zum Pluspol (Anode), wobei kleinere Moleküle schneller die Poren des Gels durchlaufen und so weiter unten im Gel lokalisiert sind.

Um den Degradationszustand der genomischen Tumor-DNA zu bestimmen, wurde ein 2%iges Agarose-Gel verwendet. Es wurden 0,8 g Agarose in 40 ml 1 x TBE Puffer für 2 min in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach dem Abkühlen des Gemisches wurden 8 µl Gelstar 2000 dazu pipettiert. Zum Auftragen wurden 200 ng DNA mit 2 µl Gelladepuffer versetzt und auf 10 µl Gesamtvolumen mit 1 x TBE aufgefüllt. Vom Längenstandard (Marker X) wurden 0,8 µl aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 120 V für 30-45 min durchgeführt. Die Banden wurden anschließend unter UV Licht begutachtet und fotografiert. Sichtbar wurden die Banden durch den Fluoreszenz-Farbstoff *Gelstar Nucleic Acid Gel Stain* von Cambrex.

Lag eine relativ scharfe Bande im Bereich um ≥ 12 kb vor, wies das auf einen relativ hohen Anteil hochmolekularer DNA und lies auf einen geringen Degradationsgrad schließen. Der verwendete Marker X enthält gefärbte DNA-Fragmente die zwischen 75 bp und 12 kb lang sind.

4.12 Verwendete, technische Geräte

Tabelle 9: Verwendete, technische Geräte

Geräte	Hersteller
Autoklav	KSG
Blockthermostat	Grant
CCD-Videocamera	Zeiss
Elektrophoresammern	Hoefer
Evidence Investigator	Randox
Fluoreszenz-Mikroskop (G2565CA) Scanner	Axioplan 2 (Zeiss, Jena) Agilent
Gefrierschrank	Heraeus
Hybridisierungsöfen	Agilent
Kryostat CM 1850	Leica
Mikrowellengerät	Bosch
Nano Drop (ND-1000 Spectrophotometer)	Meqlab
PCR-Maschine (<i>Thermo Cycler</i>)	MJ Research
Phasenkontrast-Mikroskop	Zeiss
Photometer	Uvicon 930 (Kontron Instruments)
Reinstwasser-Filteranlage	Milipore; Sereal
Schüttler (Rotamix 120)	Heidolph
Sterilbank	Heraeus
Software: Feature Extraction vs. 10.5.1.1 CGH Analytics v 3.5.14 Gene Spring GX v. 10.0.2 ISIS	Agilent Agilent Agilent Metasystems
Vortexer	IKA
Wasserbäder	Medingen / GFL
Wärmeschrank (Ofen)	Bachofer
Zentrifugen	Tischzentrifuge 5415 D (Eppendorf), Microzentrifuge MiniSpin (Eppendorf) Universal 30 RF (Hettich) Megafuge Rotina 35 R (Heidolph)

5 Ergebnisse

Im Folgenden werden alle Ergebnisse genannt und beschrieben, die im Rahmen dieser Arbeit erarbeitet wurden. Es wurde ein umfangreiches Spektrum an Methoden angewandt, wodurch die drei Tumorarten Magenkarzinom, kolorektales Karzinom und neuroendokriner Tumor im Magen-Darm-Trakt auf DNA-Ebene (Karyotypisierung, FISH und *array*-CGH), auf RNA-Ebene (Genexpressions-Analyse) und auf dem Protein-Level (Western-Blot, IHC, Serum-Protein-Biochip) charakterisiert, analysiert und spezifiziert wurden. Die Arbeit wurde durch Zelllinien-Experimente abgerundet, die zum einen mit drei kommerziell erhältlichen kolorektalen Karzinom-Zelllinien durchgeführt wurden und zum anderen mit drei neuroendokrinen Zelllinien, bei denen am Anfang erstmal deren erfolgreiche Kultivierung im Vordergrund stand.

5.1 Das kolorektale Karzinom (KRK) - Etablierung eines Serum-Protein-Biochips als Screeningmethode zur Früherkennung von Darmkrebs

Das Ziel der interdisziplinären Zusammenarbeit der vier Partner (**Jena:** Prof. F. von Eggeling, *Core Unit Chip Application* (CUCA), Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Jena; **Lübeck:** PD Dr. J. Habermann, Chirurgisches Forschungslabor, Klinik für Chirurgie, Universität zu Lübeck; **Heidelberg:** Prof. H. Brenner, Institut für Klinische Epidemiologie und Altersforschung, DKFZ Heidelberg; sowie **Randox Laboratories GmbH**) war die Entwicklung, Etablierung und Validierung eines diagnostischen Serum-Protein-Biochips als Screeningmethode zur Früherkennung des kolorektalen Karzinoms in der Bevölkerung. Die Arbeit wurde durch das BMBF (Bundesministerium für Bildung und Forschung) im Rahmen des Regierungsprogramms „Gesundheitsforschung: Forschung für den Menschen“ im Programm: „Molekulare Diagnostik“ finanziert. Das Förderkennzeichen für Jena war 01 ES 0720.

Die *Evidence Investigator*TM Biochip Technologie von Randox wurde in dieser Arbeit zum Multi-Analyten-Screening eingesetzt, um gleichzeitig mehrere kolorektale Karzinom-Marker (Biomarker) quantitativ in einer Patientenprobe zu bestimmen. Insgesamt wurden neun Biomarker evaluiert, die allerdings aufgrund ihrer verschiedenen Konzentrationen im Serum auf zwei verschiedenen Biochips (*Colorectal Cancer Serum Biochip II*: CRCSI und CRCSII) getestet wurden.

Aus der Literatur und aus eigenen Vorarbeiten wurden für das Chip-Design des Prototypen zwölf Tumormarker ausgewählt, die als optimale Kombination zur Diagnose von Darmkrebs auf dem Biochip von Radox aufgebracht wurden.

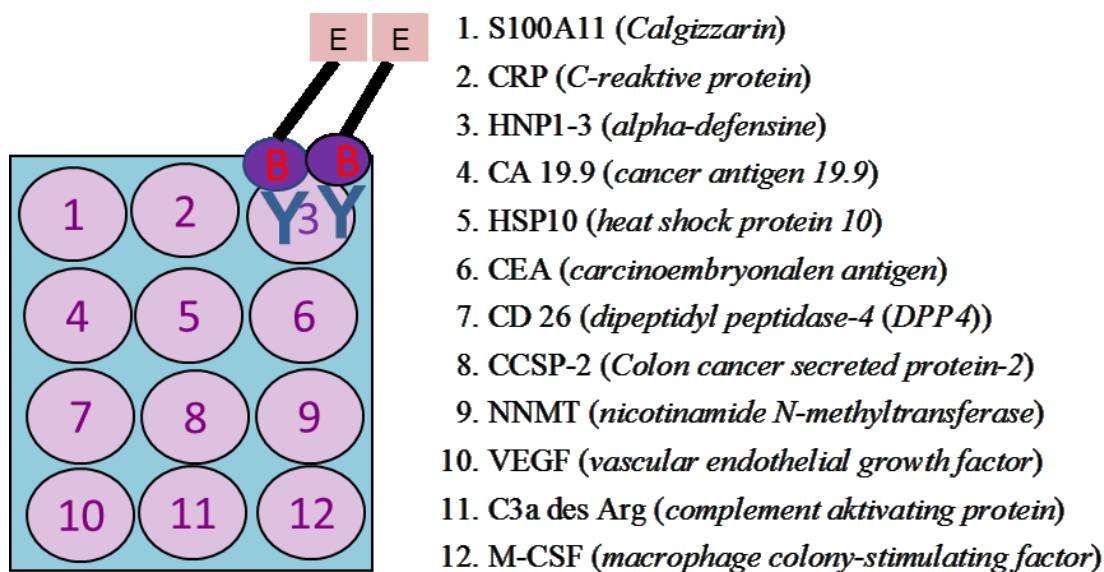


Abb. 9: Für das Biochip Design (CRCS Biochip) des Prototypen wurden 12 Tumormarker aus eigenen Vorarbeiten und aus der Literatur ausgewählt und die jeweiligen Antikörper wurden auf die Oberfläche (die Testregionen) des Biochips immobilisiert.

Vier dieser Tumormarker (HSP10, HNP1-3, CA19.9 und CCSP-2) konnten im ersten Anlauf nicht für die Herstellung der Serum-Protein-Biochips verwendet werden, da für sie keine qualitativ standardisierten Antikörper kommerziell erworben werden konnten. Aufgrund der geringen Anzahl an verbleibenden Marker-Möglichkeiten für den Biochip wurde eine zusätzliche Studie (Zytokinstudie) zur Validierung weiterer Marker mit diagnostischem Potenzial zur Früherkennung von Darmtumoren durchgeführt.

Im Rahmen dieser Zytokinstudie (siehe unten) konnte das Interleukin 8 (IL-8) mit einer Spezifität von 94% bei einer Sensitivität von 30% als neunter Tumormarker in das Biochip-Design integriert werden [Bünger et al., 2011].

Aufgrund von extremen Konzentrationsunterschieden der einzelnen Biomarker im Serum wurden zwei Biochips verwendet: auf den Biochip CRCSI wurden die Antikörper gegen die Serummarker: CEA, IL-8, VEGF, MCSF, S100A11 und NNMT aufgebracht, auf den Biochip CRCSII wurden die Antikörper gegen C3a desArg, CD26 und CRP immobilisiert.

Tabelle 10: Konzentrationsbereich der einzelnen Biomarker auf den beiden Biochips (CRCSI und CRCSII)

	CEA	IL-8	VEGF	MCSF	S100A11	NNMT	C3a	CD26	CRP
Assay range	0-300 (ng/ml)	0-3000 (pg/ml)	0-2000 (pg/ml)	0-2,5 (ng/ml)	0-50 (ng/ml)	0-50 (ng/ml)	0-200 (µg/ml)	0-4000 (ng/ml)	0-60.000 (ng/ml)

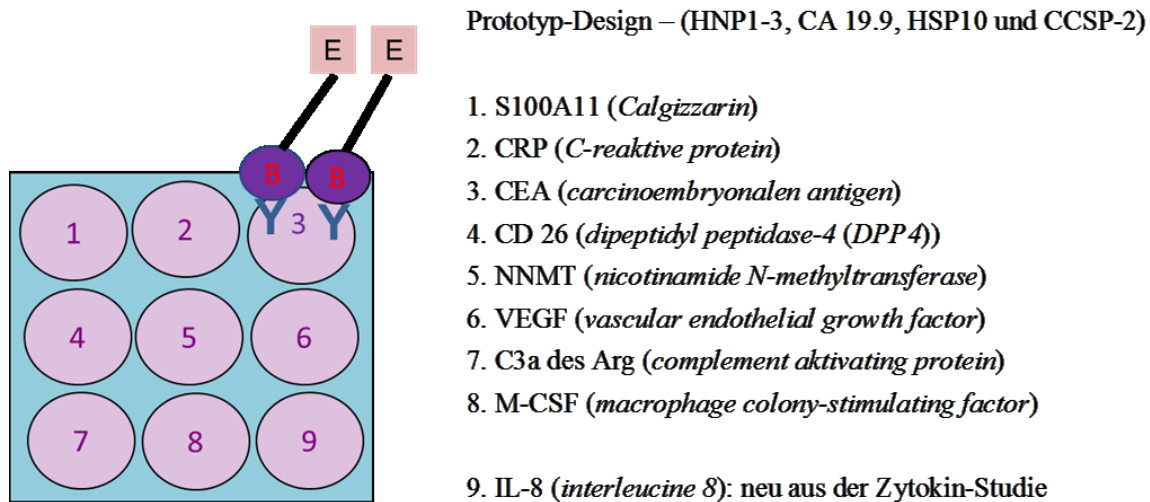


Abb. 10: Für das endgültige Biochip Design (CRCS Biochip) wurden von den 12 Tumormarkern des Prototypen vier Marker entfernt, dafür wurde IL-8, welches als vielversprechender Serummarker in der Zytokinstudie evaluiert wurde, neu in das Design aufgenommen.

Für die erste Kolon-Chip-Studie (Pilotstudie) wurden vom Chirurgischen Forschungslabor am Universitätsklinikum Lübeck 100 Serumproben bereitgestellt, die standardisiert gesammelt wurden. Das heisst, die Proben wurden 30 min nach Blutabnahme bei -170°C gelagert, auf Trockeneis nach Jena verschickt und dort bei -80°C bis zur Verarbeitung gelagert (siehe Kapitel 5.1.1). Die Proben der Blindstudie waren für Jena und Lübeck identisch und beinhalteten jeweils 50 Seren von Darmkrebs-Patienten und 50 Seren von gesunden Kontrollpersonen. Die biostatistische Auswertung der Ergebnisse wurde durch Frau Ulrike Haug aus der AG von Herrn Prof. Brenner vom DKFZ in Heidelberg durchgeführt.

In der AG von Prof. Dr. Dr. J. Habermann wurde im Chirurgischen Forschungslabor am Universitätsklinikum Lübeck eine weitere, unabhängige Studie (Zytokinstudie) durchgeführt, in der u.a. 52 Seren von Kolonkarzinom-Patienten und gesunden Personen mit dem Zytokin Multiplex Biochip von Radox untersucht wurden, die auch in der gemeinsamen Pilotstudie getestet und analysiert wurden. In dieser Studie wurden die Biomarker IL-8, VEGF, CEA, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-10, EGF, TNF α , IFNG, MCP-1 und CA 19-9 auf ihr mögliches diagnostisches Potenzial für einen serologischen Screeningtest zur Früherkennung von Darmkrebs untersucht. Die Marker CEA und CA 19-9 wurden zusätzlich mit dem Elektrochemilumineszenz-Assay (ECLIA) der Firma Roche analysiert. Für den Tumormarker CEA liegen somit Messungen mit drei verschiedenen Methoden (Assays), und Chip-Designs bzw. Geräten vor.

Tabelle 11: Übersicht über alle drei Studien, die Anzahl der untersuchten Patientenproben und die evaluierten Tumormarker.

Daten Set	Pilot-Studie		DKFZ Studie (Blindstudie)
	Zytokin-Daten	Kolon Chip Daten	Kolon Chip Daten
	Lübeck	Lübeck und Jena	Lübeck und Jena
Anzahl der Proben:	N=100: 50 KRKs 50 Kontrollen	N=100 50 KRKs 50 Kontrollen	N=400 100 KRKs 100 Fortgeschr. Adenome 100 andere Adenome 100 Kontrollen
Marker:	IL-8, VEGF, CEA IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-10, EGF, TNF α , IFNG, MCP-1, CA 19-9	IL-8, VEGF, CEA MCSF, S100all, NNMT, C3a, CD26, CRP	CEA, IL-8, VEGF, MCSF, S100all, NNMT, C3a, CD26, CRP
Methode:	Multiplex Biochip; außer für: CEA, CA 19-9	Multiplex Biochip	Multiplex Biochip
Proben-Präparation	Zentrifugation bei 4°C, 30 Min. nach Blutabnahme Lagerung bei -170°C		Zentrifugation, gekühlte Lagerung bei 8°C für 1-2 Tage, dann Lagerung bei -80°C

KRK: kolorektales Karzinom; die lila markierten Tumormarker wurden in allen drei Studien (Zytokin-Studie, Kolon-Chip-Studie 1 und 2) untersucht und evaluiert.

5.1.1 Erste Kolon-Chip-Studie (Pilotstudie) zur Testung geeigneter Serummarker

In der in Lübeck durchgeführten Zytokinstudie konnten die beiden Marker CEA und IL-8 mit signifikant höherer Konzentration im Serum von Kolonkarzinom-Patienten als bei den gesunden Kontrollen nachgewiesen werden. Für beide Marker lag die Sensitivität bei 40%, bei einer Spezifität von 90%. Bei der Kombination beider Marker konnte die Sensitivität auf 56% gesteigert werden, allerdings reduzierte sich die Spezifität dabei auf 80%.

Drei Tumormarker (CEA, IL-8 und VEGF) wurden in der Zytokinstudie und der Kolon-Chip-Studie (Pilotstudie), die parallel in Jena und Lübeck durchgeführt wurde, getestet. Die Analyse aller drei Datensätze zeigte eine Korrelation (*Spearman's correlation coefficient*) von 0,69 für den Marker CEA, 0,54 für IL-8 und 0,83 für VEGF (siehe Diskussion, Kapitel 6.1).

Die beiden Partner (Jena und Lübeck) konnten einen Anstieg der Konzentration von CEA, IL-8, VEGF, S100A11 und CRP in den Serum-Proben der Karzinom-Patienten detektieren (Tabelle 12 und Abb. 11). Die Konzentration von CD26 war im Durchschnitt bei den Serum-Proben der Kontrollpersonen höher als in den Seren der Karzinom-Patienten. Für die Tumormarker C3a desArg, MCSF und NNMT konnte -weder in Jena noch in Lübeck- ein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen den Seren der Kontrollpersonen und der Karzinom-Patienten detektiert werden.

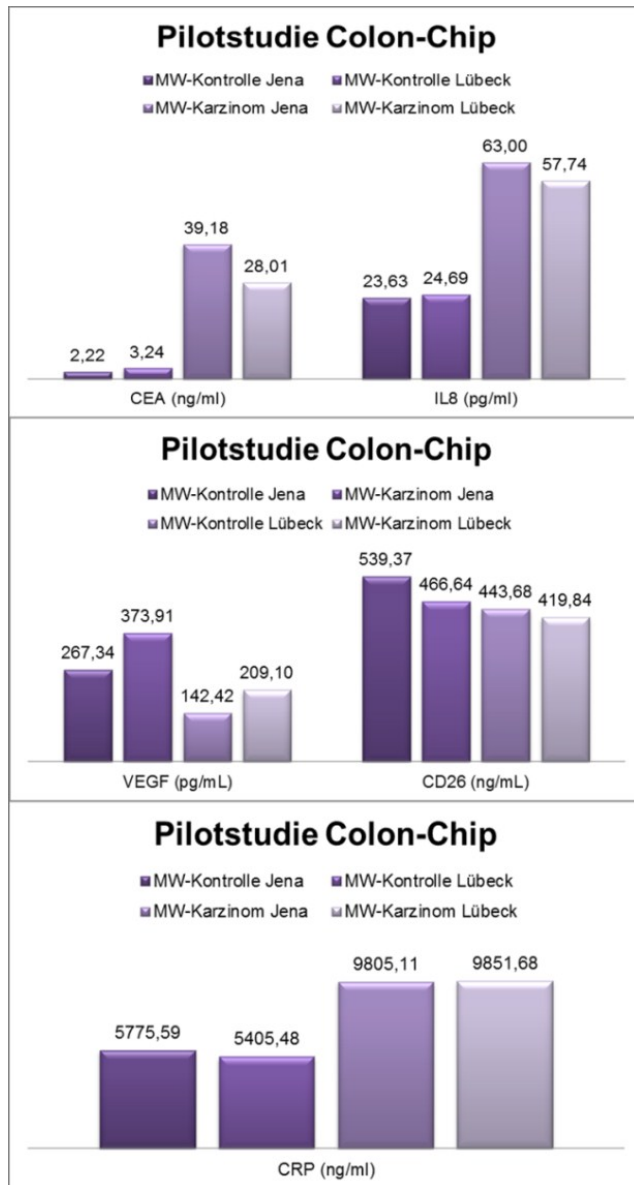


Abb. 11: Grafische Darstellung der Mittelwerte der Serummarker CEA, IL-8 (oberes Bild), VEGF, CD26 (mittleres Bild) und CRP (unteres Bild), die in Jena und Lübeck an jeweils 50 Karzinom-Patienten und an 50 tumorfreien Personen getestet wurden. Die Serum Konzentration der Marker CEA, IL-8, VEGF und CRP ist bei den Karzinom-Patienten deutlich höher als in den Seren der Kontrollgruppe. CD26 zeigt bei den Krebspatienten dagegen eine geringere Konzentration im Serum als bei den gesunden Kontrollpersonen. Für Jena und Lübeck waren die 100 Serum-Proben identisch.

Tabelle 12: Mittelwert aller neun getesteten Serummarker an 50 Kolon-Karzinom-Patienten und an 50 tumorfreien Kontrollpersonen.

	CEA (ng/ml)	IL-8 (pg/ml)	VEGF (pg/ml)	MCSF (ng/ml)	S100A11 (ng/ml)	NNMT (ng/ml)	C3a (µg/ml)	CD26 (ng/ml)	CRP (ng/ml)
MW-K Jena	2,22	23,63	267,34	0,03	24,26	3,46	0,79	539,37	5775,59
MW-K Lübeck	3,24	24,69	142,42	0,02	19,24	1,61	0,32	443,68	5405,48
MW-KRK Jena	39,18	63,00	373,91	0,02	28,03	3,64	0,82	466,64	9805,11
MW-KRK Lü.	28,01	57,74	209,10	0,01	23,43	2,14	0,36	419,84	9851,68

MW: Mittelwert; K: Kontrollen, KRK: kolorektales Karzinom

Beim Vergleich der Datensätze zwischen Jena und Lübeck der ersten Kolon-Chip-Studie (Pilotstudie) waren die Werte für die Tumormarker VEGF, NNMT, CD26 und CRP, die in Jena gemessen wurden, im Mittel deutlich höher als die in Lübeck gemessenen Werte. Dadurch mussten die *cut-off* Werte für die Berechnung der Sensitivität und Spezifität

individuell für Jena und Lübeck gesetzt werden (siehe Tabelle 13 und Diskussion, Kapitel 6.1). Der *cut-off* wurde definiert für die 90 (bzw. 95) Perzentile der gemessenen Werte gegenüber der Kontrolle. Die Serummarker, die aus der Pilotstudie als Top-Marker mit dem höchsten Screening-Potenzial hervorgingen, waren für Jena CEA, IL-8, S100A11 und CD26, die bei einer Spezifität von 96% eine Sensitivität von 29% (CEA), 14% (IL-8 und S100A11) und 10% (CRP) aufwiesen. Basierend auf der AUC-Kurve (*area under the receiver operating characteristics curve*) sind die Top-Marker für Jena: IL-8 mit 0,669; CEA mit 0,654 und CD26 mit 0,620. Für Lübeck haben sich als Top-Marker basierend auf der AUC-Kurve die Marker CEA mit 0,702; IL-8 mit 0,699 und CRP mit 0,641 heraus kristallisiert.

Tabelle 13: Vergleich der Datensätze für die erste Kolon-Chip-Studie (Pilotstudie) zwischen Jena und Lübeck

Marker	Median		Spearman's Korrelation Koeffizient	<i>cut-off</i> Level		Sensitivität in %		Spezifität in %	
	Jena	Lübeck		Jena	Lübeck	Jena	Lübeck	Jena	Lü.
CEA	2,1	2,6	0,857	6,3	8,9	29	27	96	96
IL-8	21,5	20	0,792	85,8	87,6	14	16	96	96
VEGF	246,7	132,5	0,855	707	380	12	14	96	96
MCSF	0,016	0,01	0,751	0,17	0,15	0	0	96	96
S100A11	24,8	19,9	0,829	41,5	33	14	14	96	96
NNMT	1,56	0,88	0,827	8,7	4,1	6	12	96	96
C3a	0,8	0	0,467	1,8	2	4	16	96	-100
CD26	480	422	0,701	966	698	2	6	96	96
CRP	2758	2434	0,97	26320	32696	10	8	96	96

5.1.2 Zweite Kolon-Chip-Studie (Doppelblindstudie) zur Evaluierung der Serum-Marker aus der Pilotstudie

Um die Ergebnisse der Pilotstudie zu verifizieren, wurden in einer 2. Kolon-Chip-Studie (Doppelblindstudie) 374 Seren vom DKFZ in Heidelberg zur Verfügung gestellt, die parallel und verblindet in Jena und Lübeck getestet und analysiert wurden. Die Patienten-Kohorte setzte sich aus 164 Patientenseren mit bestätigtem Kolonkarzinom, 34 Patienten mit prämaligmem Adenom (fortgeschrittenes Adenom), 15 Patienten mit Divertikulitis, 42 Patienten mit anderen Krebserkrankungen und aus 119 gesunden Kontrollpersonen zusammen. Aus diesem Patienten-Kollektiv wurde ein Trainingsset, bestehend aus 81 Kolonkarzinom-Patienten und 52 Gesunden, und ein unabhängiges, sich nicht

überschneidendes Validierungsset erstellt, welches sich aus 83 Karzinompatienten und 50 Kontrollen zusammensetzte.

In Tabelle 14 sind die Fallzahlen für jeden Tumormarker eingetragen, die in Jena und Lübeck untersucht wurden, sowie klinische Angaben zu den Patienten und der errechnete Median aller neun Marker. In Jena mussten 33 Proben aufgrund von zu wenig Probenmaterial und Fehlern bei der Messung (zu hohe Hintergrund-Signale) ausgeschlossen werden, in Lübeck aus denselben Gründen 39 (siehe Diskussion, Kapitel 6.1).

Tabelle 14: Untersuchte Fallzahlen für die neun kolorektalen Tumormarker und die Patienten- Charakteristik

	KRK-Fälle		Fortgeschr. Adenom		Andere Adenomas		Kontrollen				
	Jena	Lübeck	Jena	Lübeck	Jena	Lübeck	Jena	Lübeck	Median Jena	Median Lübeck	S.K.K
Alter	68,3		65,1		63,9		63,8				
männlich	54%		66%		59%		43%				
Stadien-Verteilung	I+II: 58% III+IV: 42%		/		/		/				
Marker	Jena	Lübeck	Jena	Lübeck	Jena	Lübeck	Jena	Lübeck	Median Jena	Median Lübeck	S.K.K
CEA	77	81	95	91	52	74	89	87	0,71	0,61	0,91
IL-8	70	73	91	89	48	88	81	82	31,27	30,97	0,94
VEGF	76	81	92	91	17	98	88	86	134,90	85,18	0,92
MCSF	78	81	95	90	52	74	89	86	0,01	0,01	0,63
S100A11	72	79	88	91	17	73	82	87	19,40	13,80	0,86
NNMT	74	80	91	89	51	90	86	85	0,81	0,67	0,87
C3a	69	100	84	100	49	100	86	98	3,80	2,00	0,51
CD26	69	100	83	100	49	100	85	98	575,20	516,00	0,57
CRP	69	97	84	100	49	100	86	98	1553,20	1579,00	0,81

S.K.K.: Spearman's Korrelations Koeffizient.

Der *cut-off* zur Berechnung der Spezifität und Sensitivität wurde für Jena und Lübeck, aufgrund von generell erhöhten Werten in Jena, individuell für beide Labore für die 90 (bzw. 95) Perzentile der gemessenen Werte gegenüber der Kontrolle gesetzt. Bei einer Spezifität von jeweils 90% ergab sich für den Marker CEA eine Sensitivität von 25% (Jena) und 32% (Lübeck). Der Marker MCSF erreichte in Jena eine Sensitivität von 17%, in Lübeck: 22%. Für den Marker CRP konnte eine Sensitivität von 32% in Jena errechnet werden und von 33% in Lübeck. Die 3 Top-Marker, bezogen auf die AUC-Kurve, waren für Jena IL-8 (0,679), CD26 (0,689) und CRP (0,630). Für Lübeck erwiesen sich CEA (0,607), CD26 (0,607) und CRP (0,643) als die Marker mit dem höchsten diagnostischen Potenzial für den Bluttest.

Als Endergebnis beider Kolon-Chip-Studien (Pilot- und Doppelblindstudie) steht die Aussage, dass die Marker CEA, IL-8, VEGF, S100A11, C3a desArg, CD26 und CRP aufgrund ihrer veränderten Expressionslevel im Serum von Kolonkarzinom-Patienten die

Anwesenheit des Karzinoms anzeigen können. Die höchste Sensitivität, bei einer berechneten Spezifität von 90%, zeigten CEA (26%), IL-8 (22%) und CRP (17%). Die Kombination der Marker CEA und IL-8 bzw. von CEA und CRP ergab bei einer Spezifität von 86% eine Sensitivität von 47% bzw. 39% für Karzinompatienten. Diese Markerkombination zeigte bei fortgeschrittenen Adenomen für CEA und IL-8 eine Sensitivität von 33% und für CEA und CRP 28%, bei gleicher Spezifität von 86%. Frühe Adenome konnten durch diese Markerkombination mit einer Sensitivität von 18% bzw. 15% detektiert werden, bei einer Spezifität von 86%.

Zum Schluss wurde die Spezifität und Sensitivität der Doppelblindstudie mit Daten eines immunhistochemischer FOBT Testes (iFOBT: *immunohistochemical based fecal occult blood test*), der ELISA-basierend Hämoglobin im Stuhl misst, verglichen. Die iFOBT Tests wurden routinemäßig im DKFZ Heidelberg durchgeführt. Beim iFOBT-Test lag die Sensitivität für das kolorektale Karzinom bei 70%, für andere Adenome bei 30-65%, wenn die Spezifität für 90% berechnet war. Die kombinierte Analyse von iFOBT-Test und CRCS-Biochip-Test ergab bei einer Spezifität von 90% für CEA eine Sensitivität von 83% für Jena und 77% für Lübeck. Der Marker CRP erreichte unter den gleichen Bedingungen in Jena eine Sensitivität von 81% und 75% in Lübeck.

5.1.3 Nachweis der Biomarker in Tumorgewebe

Zum Nachweis der Tumormarker in kolorektalen Karzinomen wurde eine Immunhistochemie an *Tissue Microarrays* (TMA) durchgeführt. Auf den Objektträgern waren jeweils 23 Kolonkarzinom-Proben aufgebracht. Aus der Studie wurden die beiden Marker IL-8 und S100A11 getestet und konnten sehr stark exprimiert nachgewiesen werden (Stufe 3). Des Weiteren wurden die Karzinome positiv auf Survivin, Cadherin 1 und α/β SNAP getestet (Stufe 2). Eine leichte Expression war für SYP (Synaptophysin), PDGFR α und β sowie für SSTR1 und 2 nachweisbar (Stufe 1). Die Karzinome waren negativ für RET, VAMP, CHGA (Chromogranin A), CD320, PPWD1 und ABHD14B (Stufe 0).

5.2 Der Neuroendokrine Tumor (NET) – Suche nach Markern für das CUP-Syndrom (*cancer of unknown primary*)

5.2.1 Charakterisierung neuroendokriner Tumore und Suche nach einem Klassifikator

Ein Ziel der Untersuchungen bestand darin, das DNA Aberrations-Profil und das Genexpressions-Profil von GEP-NET Primärtumoren und deren Metastasen zu untersuchen. Die Durchführung der Experimente ist in Kapitel 4.2, 4.4 und 4.5 beschrieben. Für die Pilotstudie der neuroendokrinen Tumore wurden 23 tiefgefrorene Tumorproben von 17 NET-Patienten einschließlich 17 Metastasen und sechs Primärtumore von der Abteilung Allgemeine Chirurgie und Visceralchirurgie der Zentralklinik Bad Berka bereitgestellt.

10 von 17 Patienten (59%) präsentierten in der Pilotstudie eine fortgeschrittene lokale Tumorausbreitung (T4-Status). 15 der 17 Patienten (88%) zeigten regionale Lymphknoten-Infiltration. Insgesamt wurden 17 Metastasen bei 14 Patienten reseziert. Zehn von 17 Tumoren wurden als gut differenzierte neuroendokrine Tumore (WDET, Ki-67: < 5%; WHO: Gruppe 1) klassifiziert, zwei als gut differenzierte endokrine Karzinome (WDEC, Ki-67: < 10%; WHO: Gruppe 2) und fünf als schlecht differenzierte Karzinome (PDEC, Ki-67: >10%; WHO: Gruppe 3) (siehe Tabelle 1). Der mediane Karnofsky-Index lag bei 90% (siehe Tabelle 15). Für die *array*-CGH wurden elf NET untersucht, darunter waren acht Metastasen und drei Primärtumore. Für die Genexpressions-Analyse wurden 22 NET untersucht, dabei handelte es sich um 16 Metastasen und sechs Primärtumore (siehe Tabelle 15). Die Patienten 8 und 27 wurden von der Cluster-Analyse ausgeschlossen, da es sich bei ihren Tumoren um ein CUP-Syndrom (*carcinoma of unknown primary*) handelte. Für die Cluster-Analyse wurden 14 Metastasen eingesetzt.

Tabelle 15: Patienten Charakteristik nach klinischen Angaben: Pilotstudie NET

Patient	Ge- schlecht/ Alter	Lokali- sation Primum	Lokalisation der Metastasen	TNM- Status	Karnof- sky-Index	KI-67 Index in%
1	W/45	Ileum	Uterus (1I), Lymphknoten (1II), small intestine	T4N2M1	90%	10%
4	M/51	Magen	Leber	T4N2M1	100%	5-10%
7	M/79	Pankreas	Magen	T4N0M1	100%	20%
8	W/71	CUP	Lymphknoten	TxNxM1	100%	40%
9	M/56	Ileum (9II)	Leber (9I), Lymphknoten	T4N2M1	90%	1%
11	M/73	Pankreas (11I)		T3N1M0	-	2-5%
12	M/61	Pankreas	Schilddrüse	T4N2M1	80%	1%
14	W/61	Pankreas (14II)	Lymphknoten (14I), Magen	T4N2M1		20%
15	M/52	Ileum	Lymphknoten, Peritoneum	T3N2M1	100%	2%
17	W/52	Zökum (17I)	Lymphknoten	T3N2M1	100%	2%
18	M/75	Pankreas (18I)	Lymphknoten, Dünndarmmeso	T4N2M1	70%	10-20%
19	M/49	Ileum	Uterus (19I), Leber (19II), MTS ohne Lokalisations-Angabe (19III)	T4N1M1	90%	1%
21	M/47	Magen (21I)	Leber (21II)	T4N2M1	90%	60%
22	M	Ileum	Peritoneum	T4N2M1	70%	2%
24	M/80	Ileum	Leber	T3N1M1	70%	1%
26	M/74	Ileum (26I)	Leber (26II), Lymphknoten	T3N2M1	80%	2%
27	M/14	CUP	Leber (27I+II)	TxNxM1	100%	2-5%

CUP: carcinoma of unknown primary, **M:** männlich, **W:** weiblich; **grün:** alle Primärtumore, die in die Genexpressions-Analyses einbezogen wurden. **rot:** alle Metastasen, die in die Genexpressions-Analyse einbezogen wurden. **blau:** Bei Tumorprobe 17 wurde mithilfe der array-CGH ein Aberrations-Profil erstellt, die Probe wurde nicht für die Genexpressions-Analyse verwendet.

5.2.1.1 Erstellung eines DNA-Aberrations-Profiles neuroendokriner Tumore

Alle elf untersuchten Tumore, unabhängig ob Primärtumor (n=3) oder Metastase (MTS) (n=8), wiesen im array-CGH-Profil chromosomale Imbalancen auf. In den MTS wurden mehr Aberrationen detektiert als in den neuroendokrinen Primärtumoren, wobei kleine DNA-Amplifikationen häufiger zu finden waren als DNA-Deletionen. Die häufigsten DNA-Zugewinne involvierten Chromosom 16p (42%), 7p (33%), 14q (33%), 15q (33%) und 17q (33%). In 25% aller untersuchten Tumoren war Chromosom 5p, 8q, 9q, und das X-Chromosom amplifiziert. Die meisten Deletionen wurden auf Chromosom 1, 10q, 11, 13q, 14q, 15q, 17p und 21q in 25% aller untersuchten Tumore detektiert. Das gesamte Chromosom

18 war bei 58% aller untersuchten Tumore deletiert. Es konnte kein einheitliches Aberrations-Profil erstellt werden.

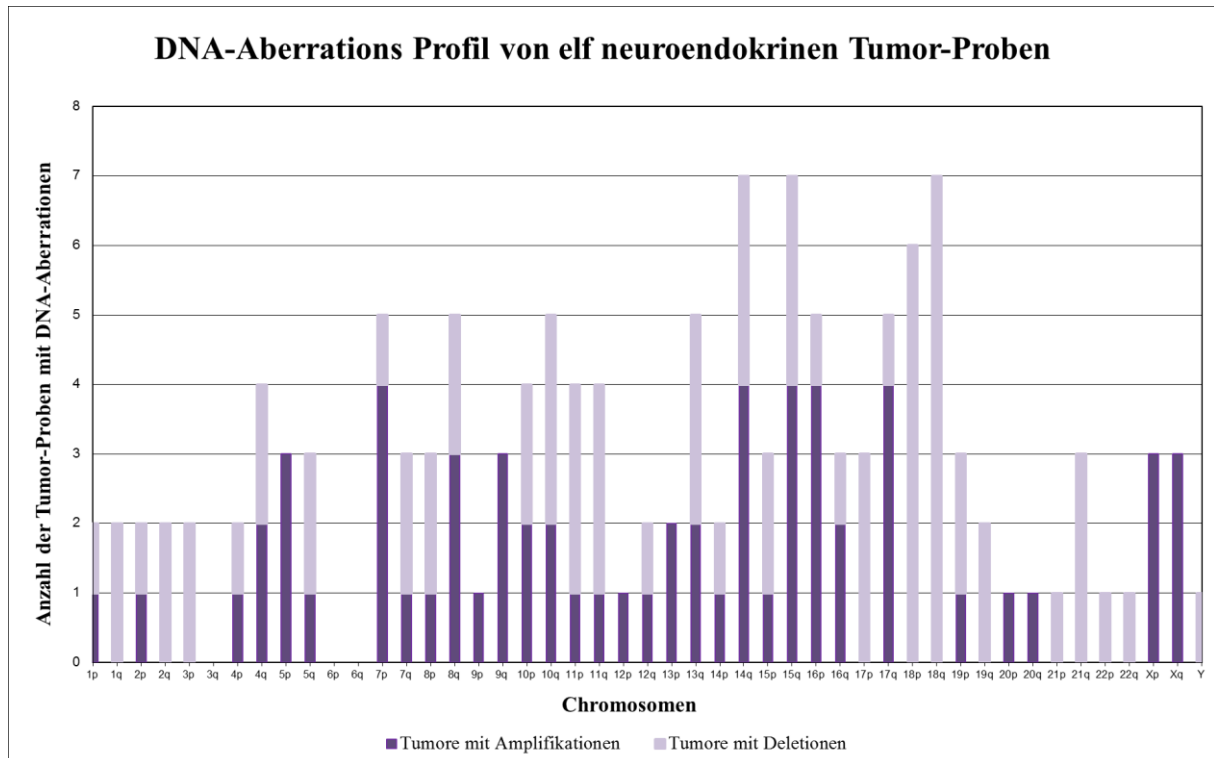


Abb. 12: DNA-Aberrations-Profil von elf neuroendokrinen Tumoren nach *array*-CGH.

5.2.1.2 Genexpressions-Analyse zur Identifizierung von Markergenen für die Tumor-Progression

In der Pilotstudie war das Ziel der Genexpressions-Analyse Gene zu finden, die in den Metastasen (MTS) gegenüber den Primärtumoren hoch- bzw. herunterreguliert sind und die somit als mögliche Marker für die Tumor-Progression in Frage kommen. Mithilfe des 44 K *Microarrays* von Agilent konnte das Expressionslevel von > 41.000 Genen aller 22 untersuchten Tumore gezeigt werden (Tabelle 15). In einem ersten Analyse-Schritt wurden die Expressionsdaten aller 16 MTS und der sechs Primärtumore zusammengefasst (gepoolt). Die GeneSpring-Software konnte 46 Gene in den MTS identifizieren, die gegenüber den Primärtumoren hoch- bzw. herunter- reguliert waren. All diese differentiell exprimierten Gene wiesen einen *Fold Change* > 8 und ein FDR corrected *P*-value < 0.05 auf (siehe Abb. 13).

MTS	Primum	Gen-Symbol	Zytoband	Fold Change MTS gegen Primum	Regulation MTS gegen Primum
		ZMAT4	11p11.21	10,872332	up
		RET	10q11.21	12,640854	up
		MTUS2	13q12.3	8,6123085	up
		SLC18A1	8p21.3	25,634071	up
		TAC3	12q14.1	8,918438	up
		MNX1	7q36.3	22,675976	up
		DACT2	6q27	18,303274	up
		PRODH2	19q12	15,726829	up
		GERH2	26q26.3	11,4901085	up
		BRSS12	4q26	12,611035	up
		ZFR2	19p13.3	16,85167	up
		DPYSL5	2p23.3	28,404333	up
		DCX	3q23	18,316994	up
		STXBP1L	3q13.33	13,358876	up
		NVA	22q12.1	22,58856	up
		RAB3C	5q11.2	16,928528	up
		GRIK3	1p34.3	18,340311	up
		KDH12	14q24.1	8,90054	up
		HS6ST3	13q32.2	16,141268	up
		ATCAY	19p13.3	85,39635	up
		CDH22	20q13.12	19,017267	up
		NVA	4q31.22	10,194237	up
		NVA	2q37.3	13,177182	up
		ASB4	7q21.3	35,09204	up
		NVA		9,37804	up
		CEYRA2	2q35	16,656275	up
		DACH2		15,010031	up
		DACH2	21q21.2	23,620348	up
		GB2	13q12.11	13,073014	down
		IL8	4q13.3	67,505066	down
		CXCL3	4q13.3	23,264528	down
		NVA	17q12	9,881194	down
		NVA	19q13.41	9,8750725	down
		NDRFA4L2		8,9760275	down
		HLA-DQA1	6p21.32	17,525208	down
		IKCS	16q13	11,169317	down
		MS4A7		12,126952	down
		HIG2	1q32.2	11,434404	down
		SAAI		25,82527	down
		NVA	1q32.1	18,456718	down
		LAMB3	1q32.3	12,304046	down
		REG1A	2p12	15,855765	down
		SST	3q27.2	22,207363	down
		EMBOX1	8p21.1	22,297865	down
		CCL18	17q12	28,33798	down
		KPS4Y1		19,134449	down
		GER109B	12q24.31	29,196228	down
		OSTbeta	15q23	22,222813	down
		LRRC2	3p21.31	10,361102	down

Abb. 13: Dargestellt ist das Ergebnis der Genexpressions-Analyse der gepoolten Tumorproben (Metastasen: n=16; Primärtumore: n=6). 28 Gene, darunter *RET*, *CDH22* und *DACT2*, sind in den Metastasen mit einem *Fold Change* (FC) bis 85 (*ATCAY* Gen) gegenüber den Primärtumoren deutlich überexprimiert. 21 Gene, darunter *IL-8*, sind in den Metastasen gegenüber den Primärtumoren deutlich herunterreguliert, bzw. im Umkehrschluss in den Primärtumoren mit einem FC bis 67 überexprimiert. Rot: Das jeweilige Gen ist überexprimiert. Blau: Das jeweilige Gen ist herunterreguliert.

Vier dieser differentiell exprimierten Gene wurden exemplarisch ausgesucht, um das Ergebnis auf Protein-Ebene mithilfe der Immunhistochemie (IHC) zu validieren (siehe Abb. 14). Die Auswertung der IHC erfolgte durch den Pathologen Dr. G. Ernst (CUCA).

Die Herunterregulation des Genes *IL-8* in den Metastasen gegenüber den Primärtumoren konnte durch das Interleukin 8-Protein bestätigt werden. Das Protein zeigte eine schwache

Expression in metastasierten Tumorgewebe und eine sehr starke Expression in den sechs untersuchten Primärtumoren (siehe Abb. 14).

Das Expressionslevel der drei Gene *RET*, *DACT2*, *CDH22* zeigte in den Metastasen eine 12-19 fache Hochregulation gegenüber den Primärtumoren. Mit der Immunhistochemie konnte eine starke Protein-Expression von *RET*, *Dapper antagonist of beta-catenin homolog 2* und von Cadherin 22 in Tumorzellen von Metastasen nachgewiesen werden. Die IHC für das *RET*-Protein zeigte eine starke Expression im Zytoplasma und insbesondere in der Membran von metastasierten Tumorzellen, die invasiv in das umliegende Stroma-Gewebe wucherten (siehe Abb. 14). Die Tumorprobe Nr. 4 war fast negativ für das *RET*-Protein, nur in einem sehr kleinen Bereich zeigten die Tumorzellen eine positive Reaktion. Interessant war die Beobachtung, dass Tumorzellen in der Leber keine Färbung zeigten, allerdings zeigten normale Leberzellen zum Teil eine sehr starke Reaktion. Das Protein *Dapper antagonist of beta-catenin homolog 2*, kodiert von *DACT2*, zeigte eine starke Expression im Metastasen-Gewebe, in den Tumorzellen der Primärtumoren dagegen keine bis eine schwache Expression. Cadherin 22 konnte stark exprimiert in Tumorzellen aus Metastasen detektiert werden und schwach bis gar nicht in den primären Tumorzellen (siehe Abb. 14).

Insgesamt bestätigte die IHC die Daten der Genexpression. Die 46 differentiell exprimierten Gene können als Marker für die Tumor-Progression angesehen werden.

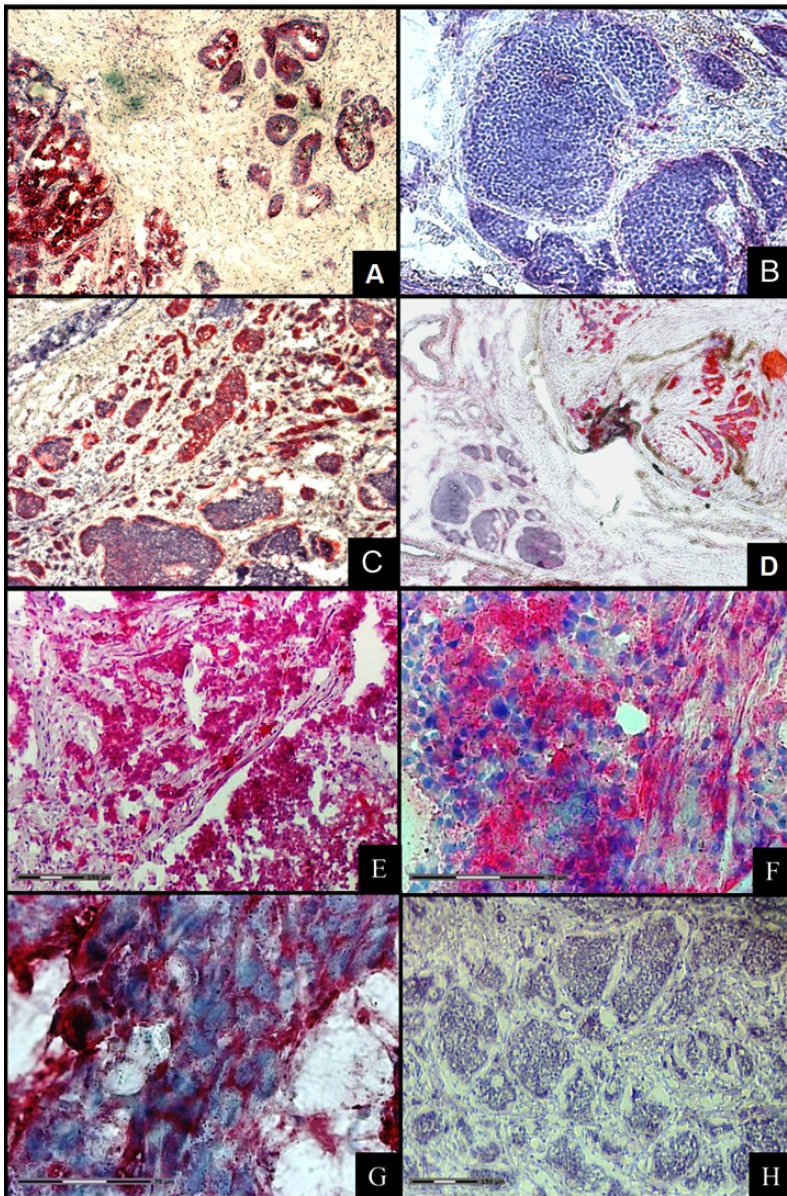


Abb. 14: Immunhistochemie (IHC) für das Interleukin 8-Protein (kodiert von *IL-8* Gen) (A, B); das RET-Protein (kodiert vom *RET* Proto-Onkogen) (C, D), das Cadherin 22 Protein (kodiert vom *CDH 22* Gen) (E, F), das Dapper antagonist of beta-catenin homolog 2 Protein (kodiert vom *DACT2* Gen) (G, H).

- A: IHC für das Interleukin-8-Protein in einem Primärtumor des Ileum (Patient 9II, Tabelle 15). Das Protein (rot gefärbt) ist im Zytoplasma und in der Membran der Tumorzellen nachweisbar.
- B: IHC für das Interleukin-8-Protein in einer Leber-Metastase (Patient 21II, Tabelle 15). Die Tumorzellen sind negativ für das Protein.
- C: Die Tumorphobie 19III (Metastase) zeigt ein sehr heterogenes Expressionsmuster für das RET-Protein (Patient 19III, Tabelle 15).
- D: Im Tumorgewebe der Probe 21II (Metastase) finden sich positive und negative Tumornester, die das RET Protein exprimieren (Patient 21II, Tabelle 15).
- E: IHC für das Cadherin 22 Protein in einer Leber-Metastase (Patient 21II; Tabelle 15). Das Protein (rot gefärbt) ist im Zytoplasma und in der Membran der Tumorzellen nachweisbar.
- F: IHC für Cadherin 22 in metastasierten Tumorzellen in der Leber (Patient 4; Tabelle 15). Das Protein (rot gefärbt) ist im Zytoplasma und der Zellmembran der Tumorzellen nachweisbar.
- G: IHC für das Dapper antagonist of beta-catenin homolog 2 Protein in einer Metastase im Magen (Patient 7; Tabelle 15). Das Protein (rot gefärbt) ist im Zytoplasma und der Zellmembran der Tumorzellen nachweisbar.
- H: Die Tumorzellen sind negativ für das Dapper antagonist of beta-catenin homolog 2 Protein.

5.2.1.3 Hierarchisches Clustern kann den Metastasen ihren Primärtumor zuordnen

In einem zweiten Analyse-Schritt wurde das Expressions-Profil aller sechs Primärtumore separat untersucht und durch eine hierarchische Cluster-Analyse konnten drei Gen-Cluster entdeckt werden, die sich jeweils im Expressionslevel von 1760 Genen unterschieden. Jeweils eins dieser drei Gen-Cluster war spezifisch für einen Primärtumor der im Magen, im Pankreas bzw. im Ileum lokalisiert war. Diese „Drei-Gen-Cluster-Schablone“ wurde im nächsten Schritt auf das Genexpressions-Profil aller 16 Metastasen übertragen. Für jede Metastase, ganz unabhängig von ihrer Lokalisation (Lymphknoten, Leber, Peritoneum, Uterus etc), war eines dieser drei Gen-Cluster nahezu identisch mit dem eines Primärtumors aus Magen, Pankreas oder Ileum. Anhand des Expressionslevels dieser 1760 Gene in einer Metastase konnte also auf die Lokalisation des dazugehörigen Primärtumors geschlossen werden (siehe Abb. 15).

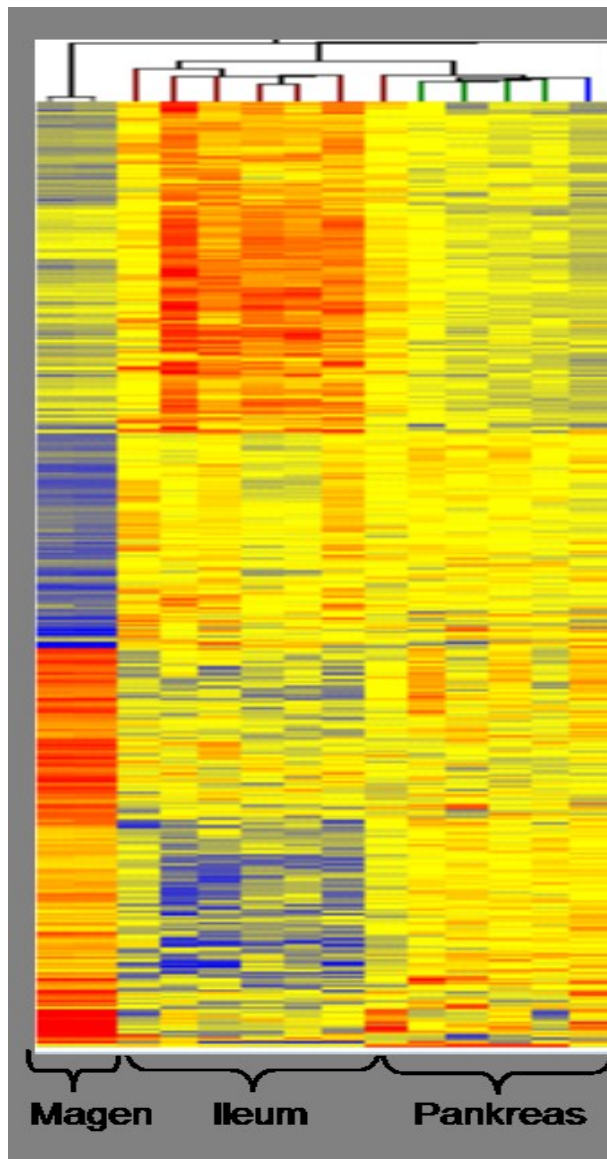


Abb. 15: Die *HeatMap* zeigt das Ergebnis der hierarchischen Cluster-Analyse von 14 neuroendokrinen Metastasen. Es sind drei verschiedene Expressions-Profile zu erkennen, die alle drei 1760 differentiell exprimierte Gene beinhalten, die identisch mit dem Expressionsprofil von Primärtumoren sind, die im Magen, im Ileum oder im Pankreas lokalisiert sind. Die 14 Metastasen können, unabhängig von ihrer eigenen Lokalisation im Körper, anhand dieses Profils in drei Gruppen unterteilt werden: Magen (n=2), Ileum (n=6) und Pankreas (n=6), abhängig von der Lokalisation ihres Primärtumors. Rot: Das jeweilige Gen ist überexprimiert. Blau: Das jeweilige Gen ist herunterreguliert.

Um die Vorhersage der Lokalisation des Primärtumors so signifikant und spezifisch wie möglich machen zu können, wurde ein statistischer Entscheidungsbaum (*decision tree*) mit sehr stringenten Bedingungen etabliert, der aus den 1760 Genen die drei signifikantesten Gene herausrechnet, um basierend auf deren Expressionslevel die Lokalisation des Primärtumors bestimmen zu können. Das erste Gen im Entscheidungsbaum ist *CD302*. Wenn *CD302* in der Metastase mit einem *Fold Change* > 13 hoch reguliert ist, deutet das auf einen Primum im Ileum hin. Das nächste Gen im Entscheidungsbaum ist *PPWD1*. Ist *PPWD1* mit einem *Fold Change* < 3 in der Metastase herunter reguliert, weist das auf das Pankreas als Sitz des Primärtumors hin. Wenn das dritte Gen (*ABHD14B*) im Entscheidungsbaum mit einem *Fold Change* > 4 in der Metastase hoch reguliert ist, impliziert das eine Lokalisation des Primärtumors im Magen (siehe Abb. 16).

Das Expressionslevel dieser drei Gene (*CD302*, *PPWD1* und *ABHD14B*) in den Metastasen der Patienten 8 und 27 mit CUP-Syndrom konnte Hinweise auf die Lokalisation des Primärtumors geben.

Der so erarbeitete Drei-Gen-Klassifikator zur Bestimmung des Entstehungsortes des Primärtumors bei NET-Patienten mit CUP-Syndrom ist einzigartig.

Der erarbeitete Drei-Gen-Klassifikator wurde unter dem Titel: „Verfahren zur Lokalisation von Primärtumoren aus Metastase-Gewebeproben und Applikationskit zu dessen Durchführung“ unter der Patentnummer 10 2011 016 191.0 patentiert

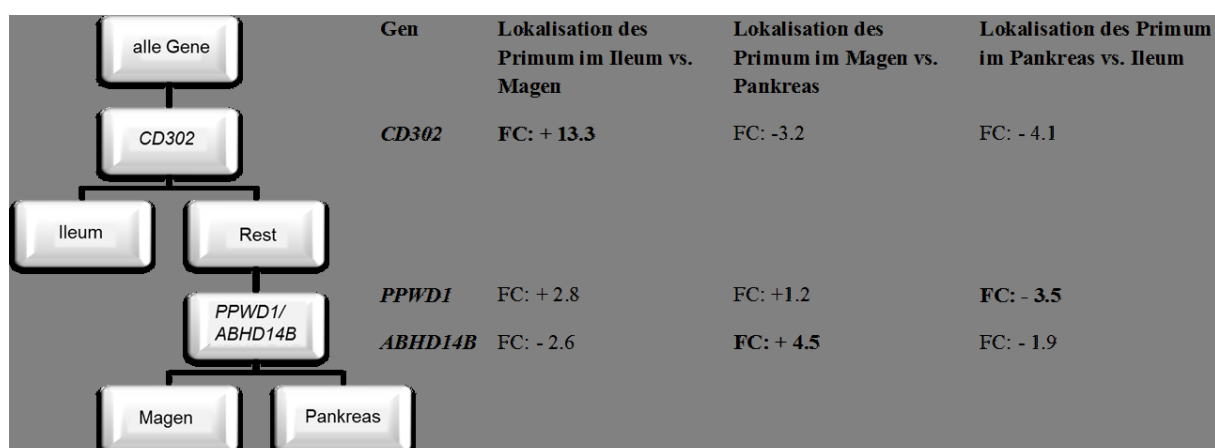


Abb. 16: Entscheidungsbaum, der das Prinzip des „Drei Gen-Klassifikators“ darstellt, der die Lokalisation des Primärtumors anhand des Expressionslevels von *CD302*, *PPWD1* und *ABHD14B* in Metastasen von NETs vorhersagen kann. Der *Fold Change* (FC) zeigt die Relation zwischen der Genexpression eines Gens gegenüber dem gemittelten Grund-Niveau (*baseline*) aller 41.000 untersuchten Gene an. Positive Werte zeigen eine Überexpression dieses Gens gegenüber dem gemittelten Wert aller 41.000 Gene. Ein negativer Wert zeigt eine Herunterregulation dieses Gens gegenüber dem *baseline*-Level aller untersuchten Gene an. Die Gene selbst sind weitestgehend unbekannt.

5.2.2 Evaluierung des gefundenen Drei-Gen-Klassifikators

5.2.2.1 Blindstudie zur Validierung des Drei-Gen-Klassifikators

Für die 1. Validierungsstudie, eine Blindstudie, standen 20 neuroendokrine Tumore aus der Zentralklinik Bad Berka zur Verfügung. Drei der 20 Tumorproben konnten nicht untersucht werden, da die benötigte RNA-Menge nicht isoliert werden konnte, bzw. die Qualität aufgrund des Degradationszustandes der RNA-Moleküle nicht ausreichend war. Anders als bei der Pilotstudie handelte es sich bei den verbleibenden 17 tiefgefrorenen Tumor-Proben ausschließlich um Metastasen. Die Lokalisation des Primärtumors wurde erst nach der Analyse und Auswertung bekannt gegeben. Drei von 17 Patienten (18%) präsentierten eine fortgeschrittene lokale Tumorausbreitung (T4-Status). Elf von 17 Patienten (65%) zeigten regionale Lymphknoten-Infiltration (siehe Tabelle 16). Insgesamt wurden zwölf Tumore als gut differenzierte neuroendokrine Tumore (WDET, Ki-67: < 5%; WHO: Gruppe 1) klassifiziert und fünf Tumore als schlecht differenzierte Karzinome (PDEC, Ki-67: >10%; WHO: Gruppe 3) (siehe Tabelle 1 und Tabelle 16). Gut differenzierte endokrine Karzinome (WDEC, Ki-67: < 10%; WHO: Gruppe 2) waren nicht in dem Patienten-Kollektiv enthalten. Der mediane Karnofsky-Index lag bei 85% (siehe Tabelle 16).

Tabelle 16: Patienten-Charakteristik mit neuroendokrinen Tumoren (NET) in der Blindstudie

Patient	Ge- schlecht	Lokalisation der Metastasen	TNM- Status	Karnofsky- Index	KI-67 Index
29	W	Leber, Peritoneum	T4N2M1	80%	1%
30	W	Leber, Peritoneum	T4N2M1	80%	2 - 5%
31	M	Leber, Lymphknoten	TxN2M1	80%	5%
32	W	Leber	TxNxM1	90%	1%
33	M	Leber, Lymphknoten	T3N1M1		2 - 5%
34	M	Peritoneum	TxN0M1	80%	40%
35	W	Leber, Mesenterium, Knochen	T3N0M1a	80%	15%
38	W	Leber, Lymphknoten	TxNxM1	90%	2%
39	M	Leber	T3N1M1	90%	60%
40	W	Lymphknoten	T2N1M0	90%	2%
42	W	Leber	TxNxM1	70%	30%
50	W	Leber, Ovar, Peritoneum	T3N1M1	90 - 100%	1%
51	M	Leber, Lymphknoten	T3N1M1	90%	2 - 5%
52	M	Leber	T1NxM1	90%	1%
53	M	Lymphknoten	T4N1M0	90%	5%
55	W	Leber, Knochen	TxNxM1	90 - 100%	20-30%
57	W	Leber/Lymphknoten	T3N1M1	80 - 90%	1%

M: männlich, W: weiblich

Von den 17 Patienten standen insgesamt 25 Metastasen zur Verfügung, die zum Teil doppelt untersucht wurden (50II, 50III und 51III). Das Genexpressions-Profil wurde von 29 Metastasen erstellt.

Bei 27 von 29 Metastasen konnte anhand des Expressionslevels von *CD302*, *PPWD1* und *ABHD14B* die Zuordnung des Entstehungsortes des Primärtumors erfolgreich benannt werden. Bei Probe 40I handelte es sich um einen Primärtumor, der im Pankreas lokalisiert war.

Patient Nr. 34 hatte einen Primärtumor in der Appendix. Bei Probe Nr. 39 handelte es sich um eine Lebermetastase, der dazugehörige Primärtumor befand sich im Rektum. Das Genexpressions-Profil der untersuchten peritonealen Metastasen lieferte kein Ergebnis („None“), da bei beiden Proben keines der drei Cluster-Muster für Ileum, Magen oder Pankreas übereinstimmte. Hier konnte die Software den beiden Metastasen keine ihr bekannte Primum-Lokalität zuordnen.

Um die Expressionsdaten mit einer unabhängigen, anerkannten Methode zu verifizieren, wurde an 148 neuroendokrinen Tumore ein Immunhistochemie (IHC) für die drei Proteine *CD302*, *PPWD1* und *ABHD14B* am Institut für Pathologie am Universitätsklinikum Jena durchgeführt. Die histologische Begutachtung der *Tissue Microarrays* erfolgte durch den Pathologen Prof. T. Knösel, die biostatistische Auswertung der 3 x 148 Proben erfolgte mit dem SPSS Programm (siehe Abb. 17, Abb. 18 und Abb. 19). Insgesamt konnte der Entstehungsort von 72% der Tumore durch Anwendung des Drei-Gen-Klassifikators richtig benannt werden.

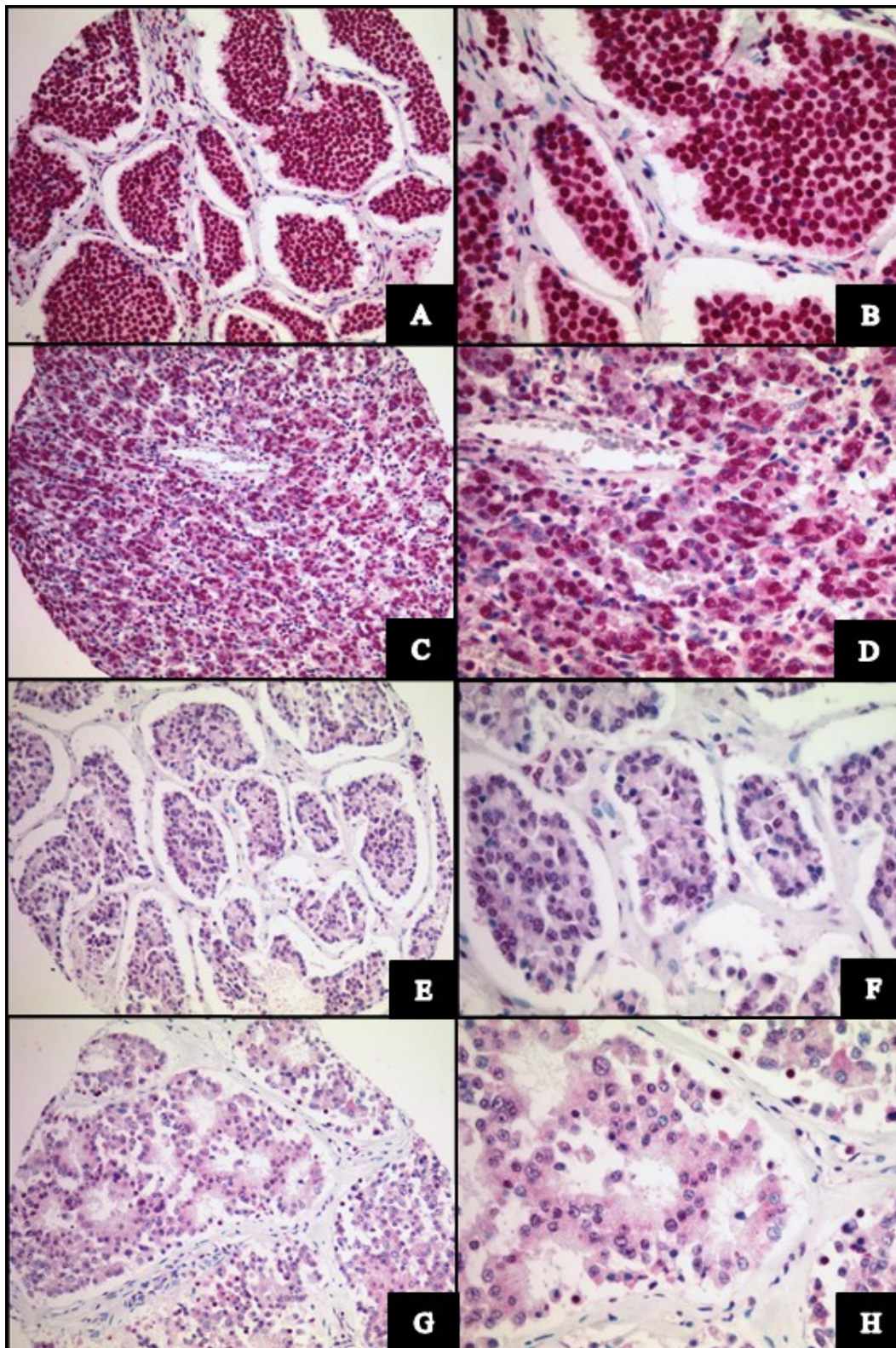


Abb. 17: Die Immunhistochemie für *CD302* wurde an *Tissue Microarrays* mit 148 neuroendokrinen Tumorproben durchgeführt. Abbildung **A** zeigt eine sehr starke Expression von *CD302* im Nukleus der Tumorzellen, bei einer 20 fachen Vergrößerung (Expressionsstufe 3). Abbildung **B** zeigt denselben Tumor, 40 fach vergrößert. Abbildung **C** und **D** zeigt einen neuroendokrinen Tumor in dem *CD302* weniger stark (Stufe 2) exprimiert wird; Vergrößerung: 20 fach (Bild **C**) und 40 x (Bild **D**). In Abbildung **E** und **F** ist ein Tumor beispielhaft für die Expressionsstärke (Stufe 1) zu sehen. Die Zellen in Bild **E** sind 20 x vergrößert, in Bild **F** 40 fach. Im 20 fach vergrößerten Bild **G**, ist keine nukleäre Expression von *CD302* zu sehen, ebenso wenig wie in Bild **H**, das 40 fach vergrößert ist (Stufe 0).

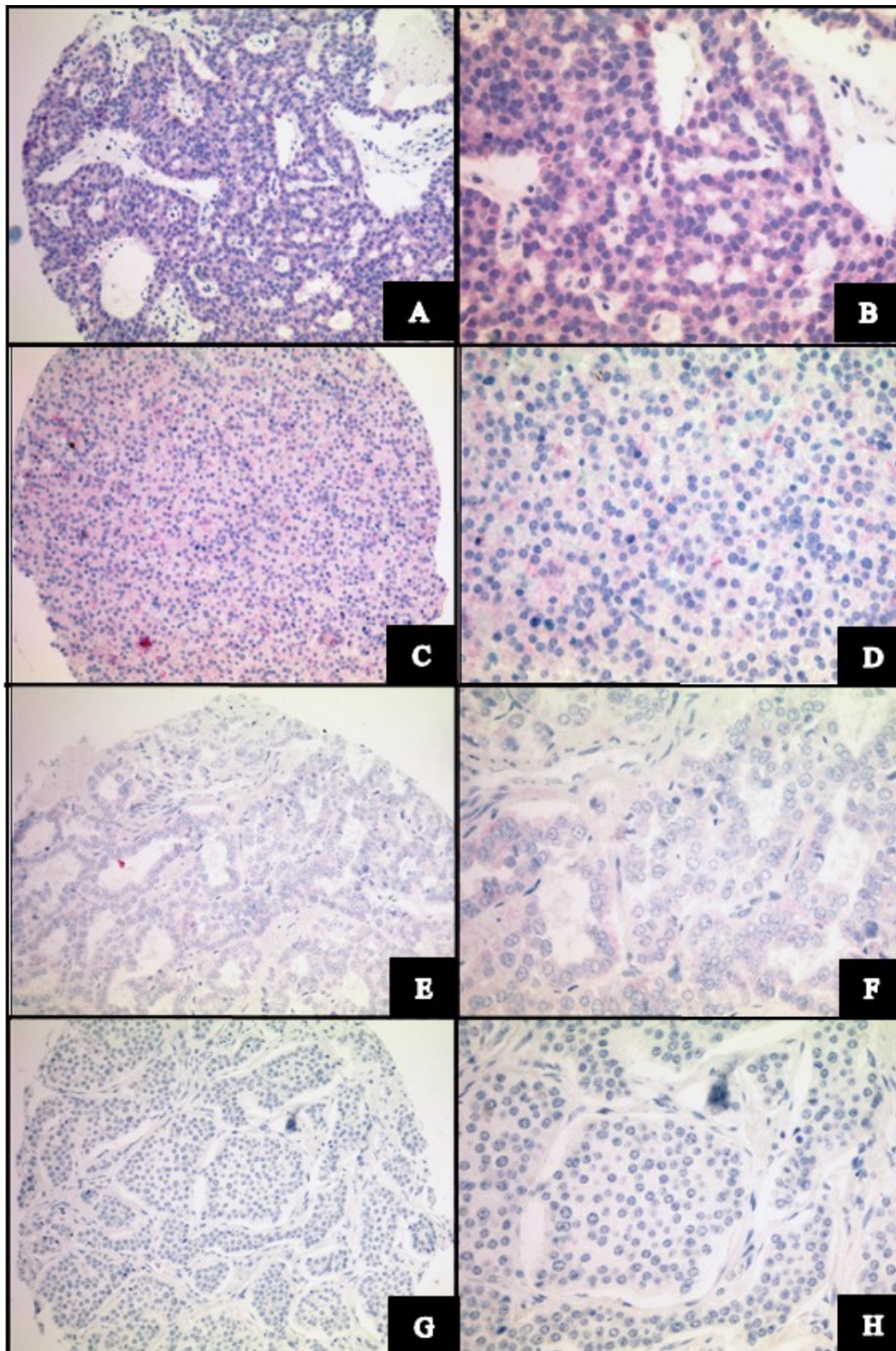


Abb. 18: Die Immunhistochemie für *PPWD1* wurde an *Tissue Microarrays* mit 148 neuroendokrinen Tumorproben durchgeführt. Abbildung **A** zeigt eine sehr starke Expression von *PPWD1* im Zytoplasma der Tumorzellen, bei einer 20 fachen Vergrößerung (Expressionsstufe 3). Abbildung **B** zeigt denselben Tumor, 40 fach vergrößert. Abbildung **C** und **D** zeigt einen neuroendokrinen Tumor in dem *PPWD1* weniger stark (Stufe 2) exprimiert wird; Vergrößerung: 20 fach (Bild **C**) und 40 x (Bild **D**). In Abbildung **E** und **F** ist ein Tumor beispielhaft für die Expressionsstärke (Stufe 1) zu sehen. Die Zellen in Bild **E** sind 20 x vergrößert, in Bild **F** 40 fach. Im 20 fach vergrößerten Bild **G**, ist keine zytoplasmatische Expression von *PPWD1* zu sehen, ebenso wenig wie in Bild **H**, das 40 fach vergrößert ist (Stufe 0).

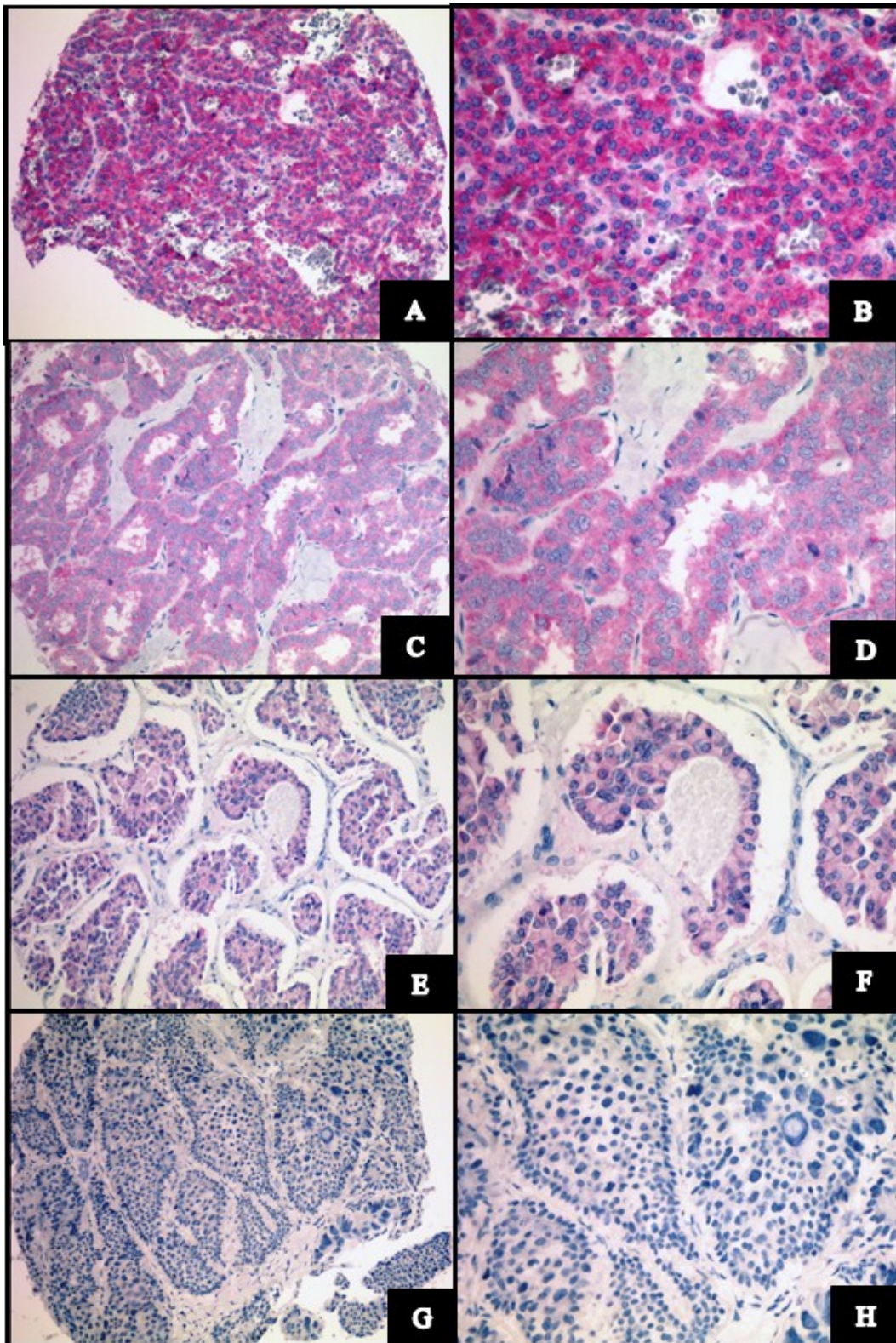


Abb. 19: Die Immunhistochemie für *ABHD14B* wurde an *Tissue Microarrays* mit 148 neuroendokrinen Tumorproben durchgeführt. Abbildung **A** zeigt eine sehr starke Expression von *ABHD14B* im Zytoplasma der Tumorzellen, bei einer 20 fachen Vergrößerung (Expressionsstufe 3). Abbildung **B** zeigt denselben Tumor, 40 fach vergrößert. Abbildung **C** und **D** zeigt einen neuroendokrinen Tumor in dem *ABHD14B* weniger stark (Stufe 2) exprimiert wird; Vergrößerung: 20 fach (Bild **C**) und 40 x (Bild **D**). In Abbildung **E** und **F** ist ein Tumor beispielhaft für die Expressionsstärke (Stufe 1) zu sehen. Die Zellen in Bild **E** sind 20 x vergrößert, in Bild **F** 40 fach. Im 20 fach vergrößerten Bild **G**, ist keine zytoplasmatische Expression von *ABHD14B* zu sehen, ebenso wenig wie in Bild **H**, das 40 fach vergrößert ist (Stufe 0).

5.2.2.2 Doppelblindstudie zur Validierung des Drei-Gen-Klassifikators

Für die Doppelblindstudie zur Evaluierung des Drei-Gen-Klassifikators standen 50 neuroendokrine Tumore von der Arbeitsgruppe um Prof. G. Klöppel vom Institut für Pathologie an der TU München zur Verfügung. Es handelte sich ausschließlich um Metastasen, die Lokalisation der Primärtumoren war nicht bekannt. Die Genexpressions-Analyse erfolgte für 48 Proben, da von zwei Patienten kein histologisch bestätigtes Tumormaterial vorlag. Die RNA-Ausbeute war zum Teil sehr gering, ebenso die qualitative Beschaffenheit der RNA-Moleküle, die stark degradiert waren.

Die Trefferquote zur Bestimmung des Entstehungsortes der Primärtumoren lag bei etwas über 60%.

Klinische Daten der Patienten lagen bis zur Anfertigung der Arbeit leider nicht vor.

5.2.3 Survivin als prognostischer Marker für neuroendokrine Tumore (NET)

5.2.3.1 Survivin-Expression korreliert bei NET-Patienten mit dem klinischen Verlauf

Die These, dass in malignen Karzinomen eine Überexpression von *BIRC5* zu finden ist, die mit einer schlechteren Prognose für den Patienten korreliert, sollte untersucht werden. Für 30 neuroendokrine Tumore wurden die Expressionsdaten für das Gen *BIRC5* ausgewertet. Das Gen kodiert für das Apoptose-inhibierende Protein Survivin. Für 15 (50%) Tumore konnte eine Herunterregulation des *BIRC5* Genes detektiert werden. Davon gehörten 13 Patienten (86,6%) in die Gruppe der gut differenzierten neuroendokrinen Tumore (WDET). Ein Patient (6,6%) gehörte in die Gruppe der gut differenzierten neuroendokrinen Karzinome (WDEC). Der andere Patient wurde mit einem KI-67-Index von 25% in die Gruppe der schlecht differenzierten Karzinome (PDEC) eingegliedert.

Bei elf der 30 Patienten (36,6%) wurde eine zum Teil sehr starke Überexpression des *BIRC5* Genes detektiert. Sieben der elf Tumore (63,6%) wurden als schlecht differenzierte Karzinome klassifiziert (PDEC). Drei Patienten (27,3%) fielen in die Gruppe der gut differenzierten Tumore, ein Patient (9%) gehörte in die Gruppe der gut differenzierten Karzinome.

Vier der 30 Patienten (drei Patienten: WDET; ein Patient: PDEC) zeigten keinen Expressionsunterschied von *BIRC5* gegenüber der Baseline aller Gene (siehe Kapitel 4.5.3 und 6.3).

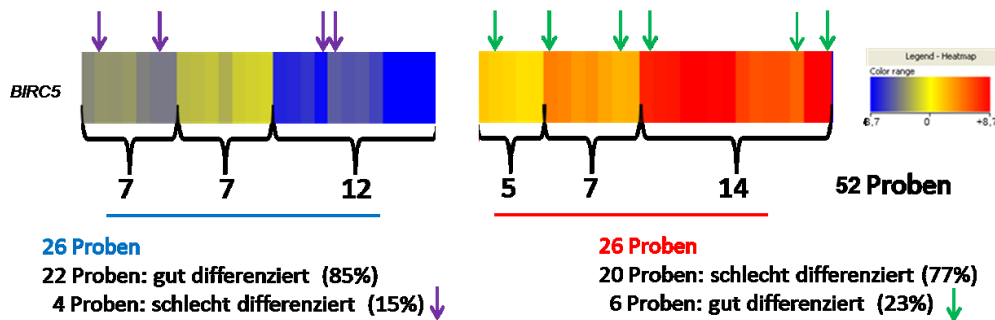


Abb. 20: Dargestellt ist die *HeatMap* für *BIRC5* für insgesamt 52 untersuchte neuroendokrine Tumore (Primärtumore: n=7; Metastasen: n=53) aus der Pilotstudie und der Blindstudie. Rot: Survivin ist überexprimiert gegenüber der *baseline* aller Gene. Blau: Survivin ist herunterreguliert gegenüber der *baseline* aller Gene (siehe Kapitel 4.5.3 und Abb. 16). Herunterregulation von *BIRC 5* in 85% aller gut differenzierter Tumore, in 77% aller schlecht differenzierten Karzinome ist *BIRC5* hochreguliert.

Die Expressionsdaten konnten mithilfe der Immunhistochemie auf Proteinebene validiert werden (siehe Abb. 21).

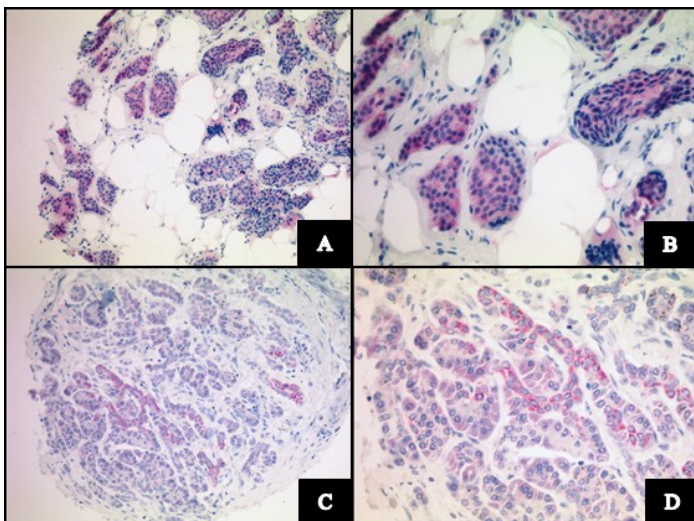


Abb. 21: Positive Immunhistochemie für Survivin (kodiert von *BIRC5*) an zwei verschiedenen neuroendokrinen Tumoren. Links: jeweils 20 fache Vergrößerung, rechts: 40 fache Vergrößerung.

5.2.3.2 Survivin-Verlust in neuroendokrin differenzierten Zelllinien führt zu Seneszenz

Der Nachweis der Expression von Survivin in den verschiedenen Zelllinien erfolgte durch Immunhistochemie (siehe Kapitel 5.4.1) und Genexpressions-Analysen.

Der knockdown mit siRNA für *BIRC5* wurde erfolgreich für die neuroendokrine Zelllinie BON, QGP1, LCC-18, sowie für die neuroendokrin differenzierte Kolonzelllinie Caco-2, Colo-94H und SW-1116 durchgeführt. Der Erfolg des knockdowns mit SignalSilence® Survivin siRNA von Cell Signalling erfolgte über Expressions-Analysen mithilfe des 44 K *Microarrays* von Agilent sowie mit Western Blot Analysen. Alle Versuche wurden in

dreifacher Ausführung durchgeführt, um Material für die Genexpression (RNA) und für die Western Blot Analyse (Proteine) zu erhalten und um eine mögliche Seneszenz der Zellen nach der Behandlung mit siRNA nachweisen zu können. Die Zellen wurden nach 48h, 72h und 96h geerntet und für weitere Analysen verarbeitet (siehe Kapitel 4.5 und 4.8).

Für die Zelllinie QGP ist nach 48h noch kein Konzentrations-Unterschied für Survivin gegenüber der Kontrolle (ohne siRNA-Behandlung) nachweisbar. Erst nach 72h ist eine signifikante Abnahme des Survivins messbar gewesen. Am 4. Tag (96h) nimmt die Konzentration an Survivin in der Probe wieder zu. Die Proben für QGP wurden doppelt aufgetragen und zeigen auch auf der 2. Hälfte des Blots dieselben Konzentrations-Unterschiede. Für die BON-Zelllinie ist eine direkte Abnahme von Survivin bereits nach 48h klar erkennbar, ebenso nach 72h. Für die LCC-18 Zelllinie ist der Survivin Verlust nach 48h und nach 72h nachweisbar (siehe Abb. 22).

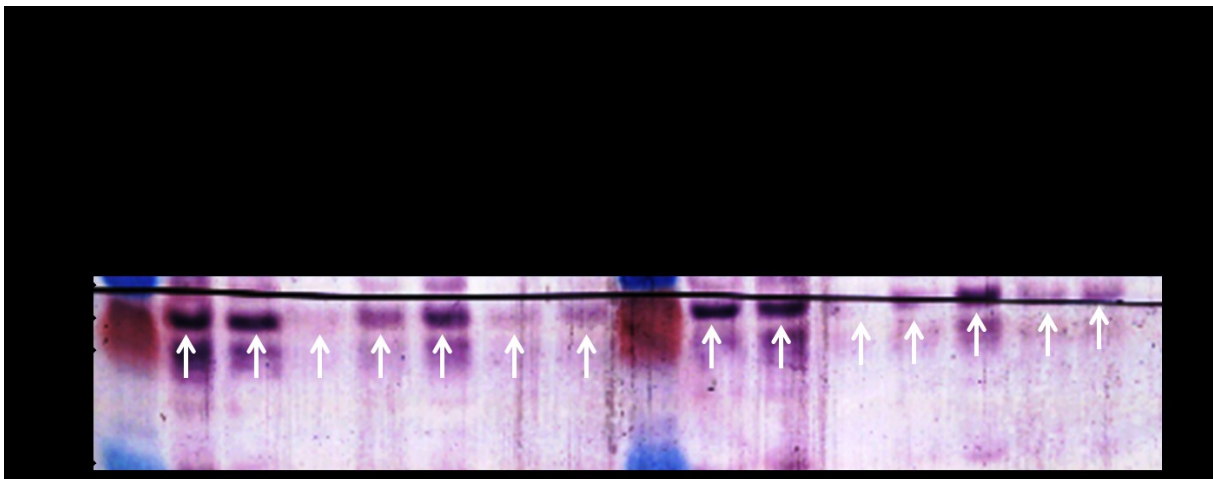


Abb. 22: Western Blot Analyse der Survivin Expression in den Zelllinien QGP, BON und LCC-18, nach dem knock down von *BIRC5* mit SignalSilence® Survivin siRNA. Die Inkubationszeit der siRNA betrug 24h. Die Zellen wurden nach 48h, 72h und 96h geerntet und die Proteine wurden isoliert. Die Detektion des 16 kDa großen Proteins erfolgte durch einen monoklonalen Antikörper (Survivin (3F342)) durch die Enzymreaktion mit alkalischer Phosphatase. (Die schwarze Linie im Blot kommt durch das ungünstige Zerschneiden des Blots vor der Enzymreaktion mit Alkalischer Phosphatase zustande.)

Für die Zelllinie Caco-2 lässt sich noch keine signifikante Abnahme der Genexpression von *BIRC5* nach 48h nachweisen, eine sehr deutliche Herunterregulation ist erst nach 72h erkennbar. Die Zelllinie Colo-94H zeigt eine Herunterregulation von *BIRC5* bereits nach 48h, nach 72h ist der Unterschied noch deutlicher. Bei SW-1116 ist der Erfolg des knock downs bereits nach 48h deutlich zu sehen, nach 72h noch signifikanter. *BIRC5* ist in der neuroendokrinen Zelllinie QGP deutlich überexprimiert, nach 48h Behandlung mit siRNA ist eine Herunterregulation signifikant messbar (siehe Abb. 23).



Abb. 23: Genexpressions-Analyse von *BIRC5* für die neuroendokrin differenzierte Kolon-Karzinom Zelllinie Caco-2, Colo-94H und SW-1116, sowie für die neuroendokrine Tumor-Zelllinie QGP nach dem knock down von *BIRC5* mit SignalSilence® Survivin siRNA. Die RNA-Isolation erfolgte nach der Ernte der Zellen nach 48h und 72h.

Der Nachweis der Seneszenz erfolgte 72h nach dem knock down von *BIRC5* durch siRNA mithilfe des Senescence β -Galactosidase Staining Kits von Cell Signalling gemäß den Hersteller-Angaben (siehe Abb. 24).

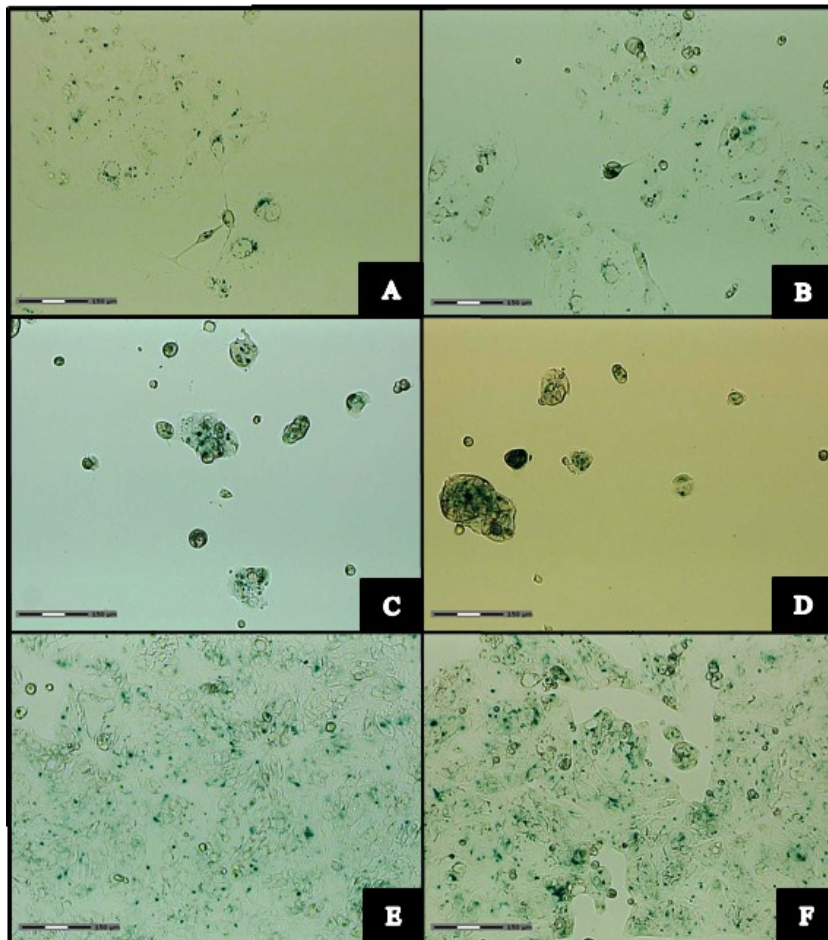


Abb. 24: Nachweis von Seneszenz in den neuroendokrin differenzierte Kolon-Karzinom Zelllinien Caco-2 (A, B), Colo-94H (C, D) und SW-1116 (E, F), nach dem knock down von *BIRC5* mit SignalSilence® Survivin siRNA.

5.2.3.3 Survivin-Verlust stoppt die Ausdifferenzierung von mesenchymalen Stammzellen

Die humanen mesenchymalen Stammzellen aus Knochenmarksstroma wurden zwei Wochen in speziellem Medium (*Stemline Mesenchymal Stem Cell Expansion Medium*) kultiviert. Danach wurden die Zellen in Differenzierungsmedium überführt und in Osteozyten und neuronale Zellen ausdifferenziert (siehe Abb 25). Der Nachweis für die neuronale Differenzierung erfolgte durch den Marker neuronenspezifische Enolase (NSE). Das Genexpressionsmuster aller Gene wurde mithilfe des 44 K *Microarrays* von Agilent erstellt. In nicht ausdifferenzierten mesenchymalen Stammzellen konnte eine erhöhte Expression von *BIRC5* nachgewiesen werden. Nach der Ausdifferenzierung der Zellen in Osteozyten und neuronale Zellen konnte eine Inaktivierung der Genexpression von *BIRC5* detektiert werden. Die Expression von *BIRC5* war in neuronal ausdifferenzierten Zellen 13,54 fach niedriger als in den mesenchymalen Stammzellen. Bei den Osteozyten war die Genexpression gegenüber den undifferenzierten Stammzellen um das 8,50 fache herunterreguliert (siehe Abb. 26).

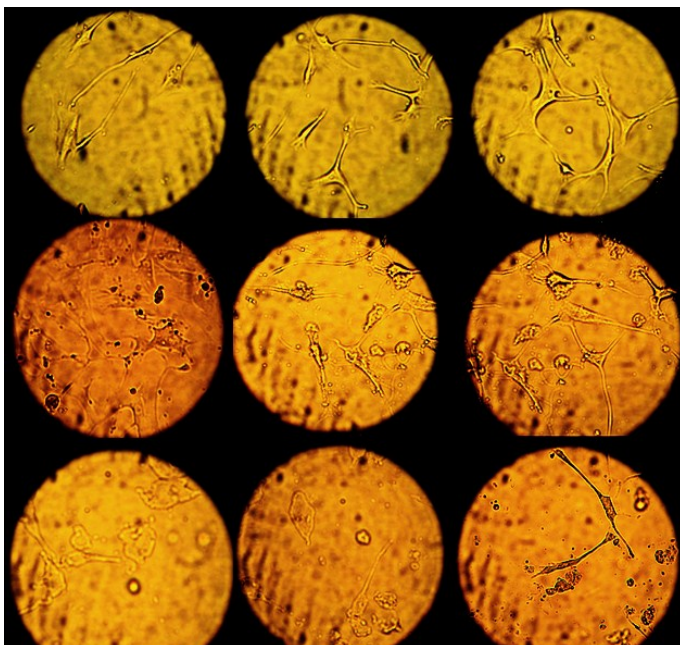


Abb. 25: Dargestellt ist die Morphologie von undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen aus Stromazellen von adultem Knochenmark (obere Bildreihe), von ausdifferenzierten Osteozyten (mittlere Bildreihe), sowie von ausdifferenzierten neuronalen Zellen (untere Bildreihe) im Phasenkontrast-Mikroskop bei 10-20 facher Vergrößerung.

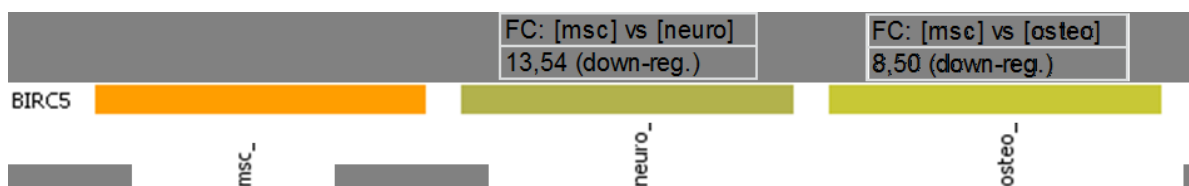


Abb. 26: Dargestellt ist die Genexpression von BIRC5 in mesenchymalen Stammzellen (msc) sowie in neuronal ausdifferenzierten Stammzellen (neuro) und in ausdifferenzierten Osteozyten (osteo). Der *Fold Change* (FC) beträgt zwischen mesenchymaler Stammzelle und neuronaler Stammzelle 13,54 und zwischen mesenchymaler Stammzelle und Osteozyten 8,50.

5.3 Das Magenkarzinom – Identifizierung von Subgruppen, die verschieden auf Chemotherapeutika ansprechen

Bei der Untersuchung der Magenkarzinome handelt es sich ebenfalls um eine prospektive Studie die in zwei Teile geteilt wurde.

5.3.1 Die Anzahl individueller Aberrationen im intestinalen Karzinom-Typ korreliert mit der Überlebenswahrscheinlichkeit des Patienten

Für den 1. Teil der Studie standen vier tiefgefrorene Magenkarzinom-Proben und fünf in Paraffin eingebettete Tumorproben zur Verfügung. Die Proben wurden aus der Visceralchirurgie des Universitätsklinikums Jena zur Verfügung gestellt und bestanden aus Operationsresektaten fortgeschrittener Magenkarzinome (Stadium II und IV) mit Metastasen in der Leber. Die Patienten erhielten eine palliative Gastrektomie und eine palliative Chemotherapie. Sechs Patienten zeigten ein Magenkarzinom vom intestinalen Typ, drei Patienten zeigten ein Magenkarzinom vom diffusen Typ. Von diesen neun Tumorproben wurde DNA aus mikrodisszierten Tumorgewebe isoliert und das Aberrationsprofil mithilfe der *array*-CGH (105 K *Microarray*) erstellt (siehe Kapitel 4.2 und 4.4).

In allen neun untersuchten Magenkarzinom-Proben konnten mithilfe der *array*-CGH Amplifikationen und Deletionen nachgewiesen werden, wobei insgesamt mehr Amplifikationen als Deletionen detektiert werden konnten (91:70). Die Verteilung manifestierte sich auch individuell in den einzelnen Tumorproben. Es konnten zahlreiche DNA-Veränderungen detektiert werden, die in den kodierenden Regionen von Genen lokalisiert waren, die für Proteine der Signalwege kodieren, die den Zell Zyklus, die Proliferation, Zelladhäsion, Apoptose und Angioinvasion steuern. Betroffen waren u.a. Gene des WNT-Weges, des SHH-Weges, des JAK/ STAT-Weges und des BMP-Weges (siehe Kapitel 2). Weitere DNA-Aberrationen befanden sich in Genen, die für Wachstumsfaktoren kodieren bzw. für deren Rezeptoren, wie z.B. EGF, VEGF und FGF, sowie in Genen, die für die Zelladhäsion verantwortlichen Proteine kodieren, wie E-Cadherin, Connexin, Vinculin und β -Catenin. Weiterhin waren bekannte Proto-Onkogene und Tumor-Supressor-Gene amplifiziert bzw. deletiert (siehe Tabelle II im Anhang).

Das Muster der chromosomalen Aberrationen war sehr heterogen bezogen auf Anzahl und Lokalisationen der chromosomalen Imbalancen. Bei drei von vier Patienten, die an der Krebs-Erkrankung verstarben, konnte in den Tumorzellen eine 1,1 Mb große Amplifikation auf 8q24.3 nachgewiesen werden. In dieser Region liegen 47 Gene, die in den Tumorzellen dieser drei Patienten mindestens in drei Kopien vorlagen (siehe Abb. 27 und Abb. 29).

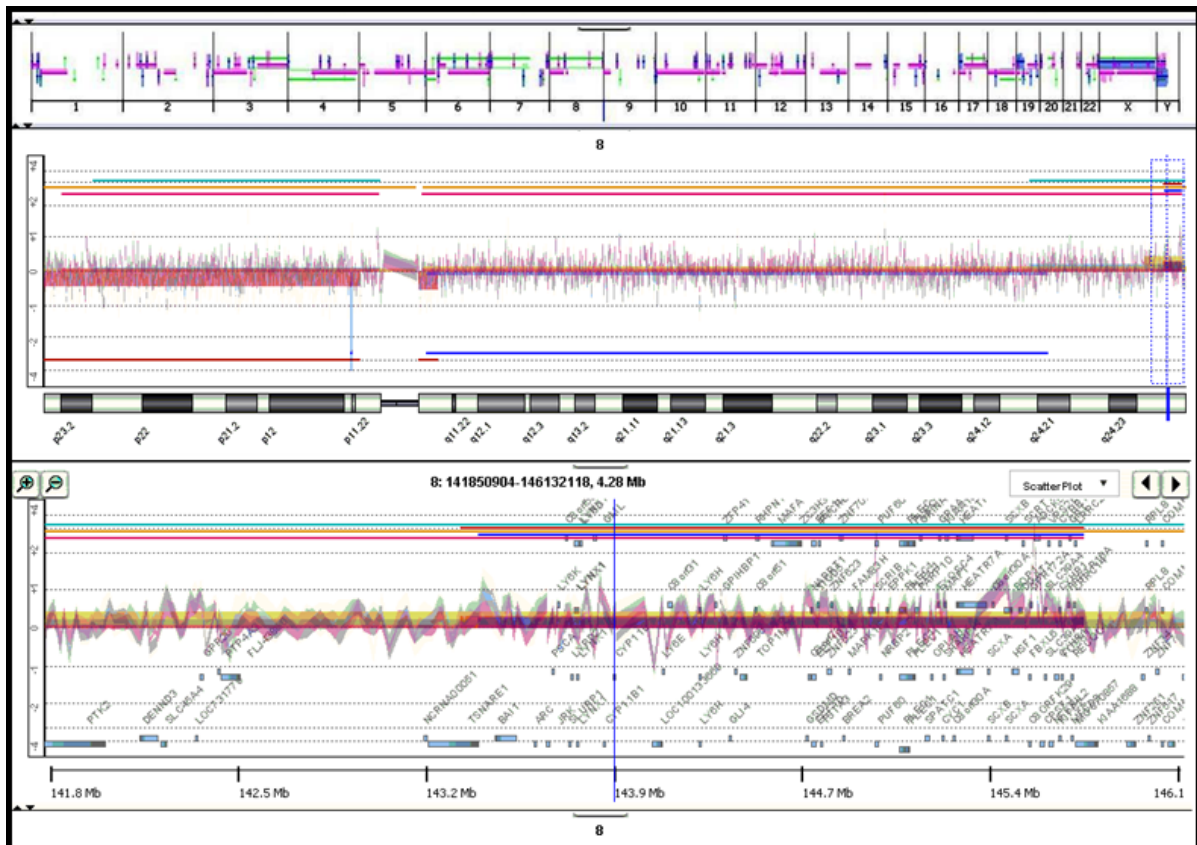


Abb. 27: Ergebnisse der *array*-CGH auf drei verschiedenen Auflösungs-Stufen **A)**: Die oberste Abbildung zeigt die Genom-Ansicht und gibt einen Überblick über alle Aberrationen (Kopiezahl-Veränderungen) auf allen Chromosomen für drei Patienten. Die Aberrationen für Patient 1 sind grün hervorgehoben, für Patient 2 blau und die DNA-Imbalancen für Patient 3 in pink. **B)**: Die mittlere Abbildung zeigt ein einzeln ausgewähltes Chromosom, in diesem Fall: Chromosom 8. Jede Zytobande ist sichtbar, wobei die Region 8q24.3 durch ein blaues Rechteck markiert ist. **C)**: In der untersuchten Ansicht ist die Zytobande 8q24.3 gezeigt. Die DNA-Amplifikation in dieser Region ist 1,1 Mb groß und beinhaltet 47 Gene, die mindestens in dreifacher Kopie in Tumorzellen der Patienten 1 (grün markiert), 2 (blau markiert) und 3 (grün hervorgehoben) vorliegen.

Alle sechs Tumorpatienten vom intestinalen Karzinom-Typ (Patient 1, 3, 5, 6, 8 und 9) zeigten eine Amplifikation auf 14q32.33. Bei diesen sechs Patienten konnte des Weiteren gezeigt werden, dass die Anzahl der individuellen Aberrationen mit der Überlebens-Wahrscheinlichkeit korreliert: Bei drei der sechs Patienten (1, 3 und 5) die krankheitsbedingt verstarben (1 und 3) bzw. bei dem der Tumor wiederkehrte (5), waren 26-53% der gesamten DNA-Sequenz in den Tumorzellen aberrant. Die anderen drei Patienten mit intestinalem Karzinom-Typ (6, 8 und 9), die zum Zeitpunkt der Arbeit tumorfrei waren, wiesen individuelle Aberrationen auf, die 0,05-6,15% des Tumor-Genoms betrafen (siehe Abb. 28 und Tabelle II im Anhang). Die drei Patienten (2, 4 und 7) mit dem diffusen Karzinom-Typ zeigten keine Korrelation zwischen Anzahl der Kopiezahl-Veränderungen in den Tumorzellen und ihrer Überlebenswahrscheinlichkeit.

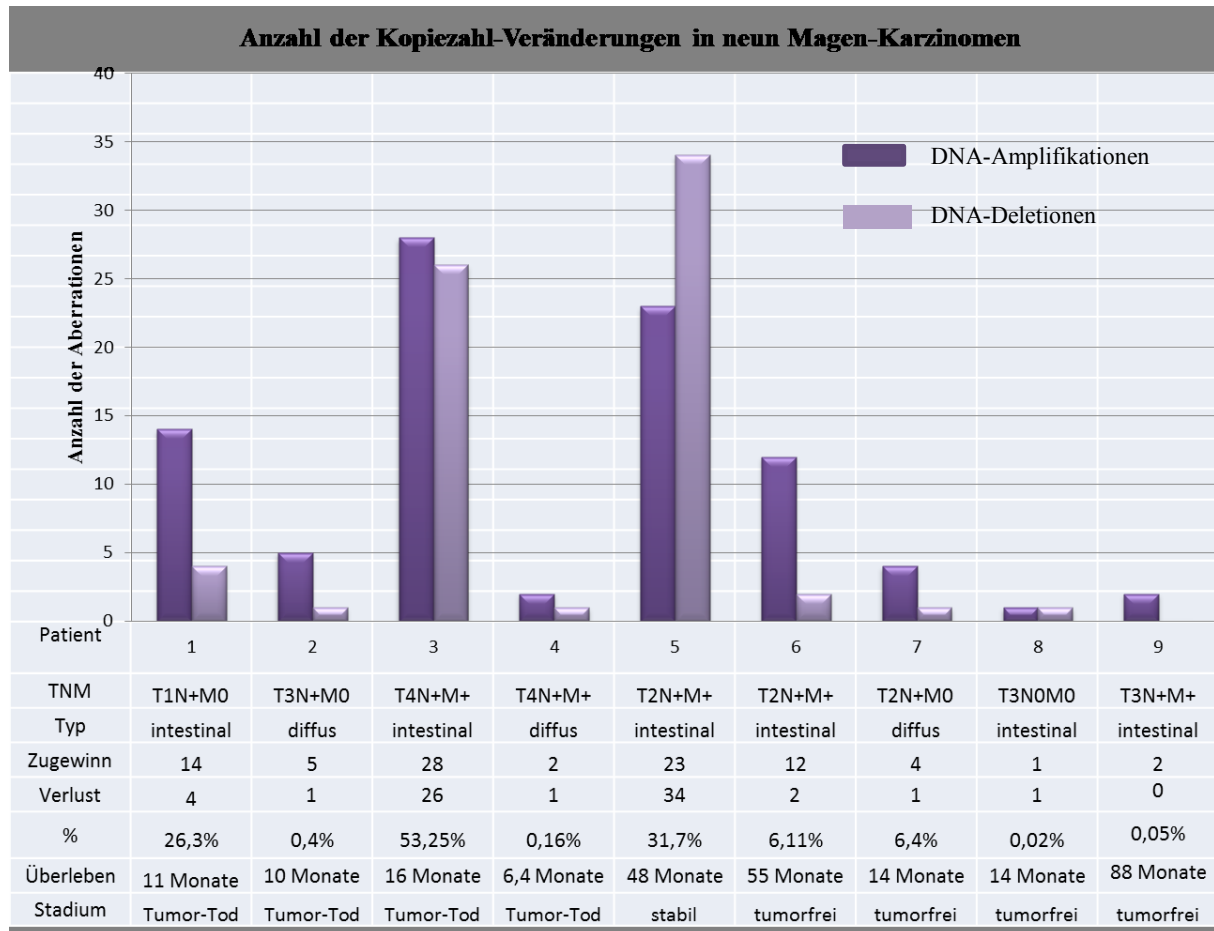


Abb. 28: Dargestellt ist die Tumor-Charakteristik für jeden Patienten (1-9), die Klinik, der Karzinom-Typ (intestinal bzw. diffus), die Anzahl der DNA-Aberrationen, die aberranten Genom-Abschnitte in %, das Überleben der Patienten in Monaten (zum Zeitpunkt der Arbeit) und das Stadium der Erkrankung.

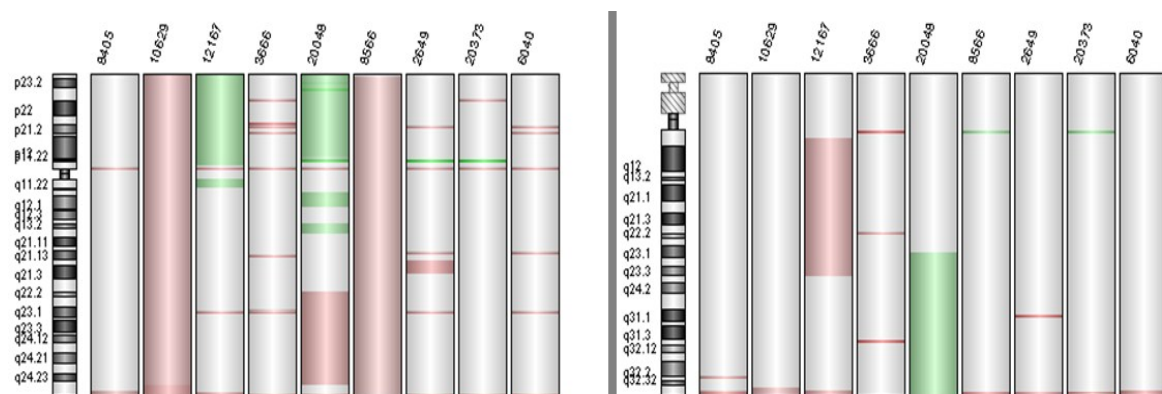


Abb. 29:Links: Übersicht über die DNA-Zugewinne und Verluste auf Chromosom 8 für alle neun Tumor - Patienten. Links jeder Abbildung ist das jeweilige Chromosom dargestellt, daneben die grafische Darstellung der DNA-Amplifikationen (rot) und -Deletionen (grün) für alle neun Tumor-Patienten. Bei drei von vier Patienten die verstarben, ist auf 8q24.3 eine 1,1 Mb große Amplifikation zu erkennen. **Rechts:** Übersicht über die DNA Zugewinne und Verluste auf Chromosom 14 für alle neun Tumor-Patienten. Alle sechs Patienten mit intestinale Magenkarzinom wiesen auf 14q32.33 einen DNA-Zugewinn auf.

5.3.2 Identifizierung differentiell exprimierter Gene in verschiedenen Subgruppen

In der oben beschriebenen Studie konnte an einer sehr kleinen Patienten-Kohorte eine Korrelation zwischen Anzahl und Lokalisation der individuellen, genomischen Imbalancen mit der Überlebensrate des Patienten gezeigt werden. Im nächsten Schritt wurde nicht nur die Patienten-Anzahl erhöht, sondern mit einer weiteren Technik, der Genexpressions-Analyse, wurden die komplexen Signalwege in den Tumorzellen auf RNA- Ebene angeschaut, um das heterogene Muster der Signaltransduktionswege unter der Behandlung verschiedener Chemotherapeutika zu entschlüsseln (siehe Kapitel 4.2 und 4.5).

Es standen 23 tiefgefrorene Magenkarzinome (MK) zur Verfügung, von denen mithilfe des 44 K *Microarrays* von Agilent eine Genexpressions-Analyse durchgeführt wurde. Unter den Proben befanden sich acht diffuse Magenkarzinome, 14 intestinale Karzinome und ein Mischtyp. Drei der acht Patienten mit diffusem Magenkarzinom und vier der 14 Patienten mit intestinalem Tumor erhielten keine Chemotherapie (siehe Tabelle 17).

Tabelle 17: Patienten Charakteristik: Einteilung der Magenkarzinom-Proben in Wachstum, Chemotherapie und Ansprechen auf die Therapie

Pat	Ges/ Alter	Gra ding	T-	N-	Lau- rén	CTX vor Op	CTX nach Op	Inten- sion	ÜLZ in Monat	Tumor- verlauf	Status
1	m/92	2	3	0	int	0	0	kurativ	11	tumorfrei	lebt + Kolon-Ca
2	m/87	3	3	1	diff	0	0	kurativ	0	x	postop. verst.
3	m/56	3	2b	0	int	0	0	kurativ	11	tumorfrei	lebt
5	w/51	3	2a	1	diff	FLOT	FLOT	kurativ	8	Rezidiv	Rezidiv
6	w/79	3	3	2	Misch	ECF	0	kurativ	8	tumorfrei	lebt
7	m/61	3	2b	1	diff	FLOT	FLT	kurativ	11	tumorfrei	lebt
8	m/58	3	2b	0	diff	0	???	kurativ	1	tumorfrei	lebt
9	m/69	2	3	0	int	FLOT	FLOT	kurativ	18	tumorfrei	lebt
11	m/81	3	1	0	diff	0	0	kurativ			
13	m/63	3	1	0	int	ECF	ECF	kurativ			
14	m/68	3	2b	0	diff	FLOTIII	FLOTIII	kurativ	6	tumorfrei	lebt
16	m/81	3	4	1	int	0	ELF	palliativ	3	Progress	lebt
18	m/81	3	4	1	int	0	0	palliativ	2	stable	lebt
19	w/71	3	2b	0	diff	0	0	kurativ		stable	lebt
20	m/81	2	2b	3	int	ECF (abgebr.)	0	kurativ	9	Rezidiv	lebt + CRC+ Leb.M
22	w/39	3	4	3	diff	ECF	FLOT	kurativ	10	Rezidiv	Rezidiv
23	w/68	3	3	2	diff	0	0	palliativ	0	x	periop. verst.
24	m/61	3	2a	2	int	TCF		kurativ	19	tumorfrei	lebt
	m/68	2	2b	2	int	ECF	ECF	kurativ	6	tumorfrei	lebt
	m/74	3	2b	2	int	ECF	ECF	kurativ	12	tumorfrei	lebt
	w/37	3	2b	0	diff	FLOT3	FLOT, dann ohne Platin	kurativ	17	Rezidiv	lebt
	m/50	3	1	0	diff	0	0	kurativ	6	tumorfrei	lebt
	m/70										
	w/60	3	4	3	int	0	ECF	kurativ	17	stable	lebt
	w/66	3	2b	2	int	ECF	0	kurativ	6	tumorfrei	lebt

CTX: Chemotherapie, diff.: diffuses Karzinom, ECF: Epirubicin, Cisplatin, 5-Fluorouracil, FLOT: Folinsäure, 5-Fluorouracil, Oxaliplatin Ges: Geschlecht, Grading: Tumorstadium (*staging*), int.: intestinales Karzinom, postop. verst.: postoperativ verstorben, ÜLZ: Überlebenszeit,

Die Karzinome wurden in verschiedene Gruppen geclustert. Bei der Gruppierung ihrer Laurén-Klassifikation in diffus bzw. intestinal konnten 34 Gene identifiziert werden, die in den diffusen Magenkarzinomen gegenüber den intestinalen zwischen 10 und 47 fach (FC: *Fold Change*) überexprimiert waren. Vier Gene waren in den intestinalen MK gegenüber den diffusen zwischen 10 und 39 fach überexprimiert (siehe Tabelle 18, Spalte 1-4).

Tabelle 18: Differentiell exprimierte Gene in geclusterten Magenkarzinom-Proben

Gen-Symbol	Zytobande	FC diffuses MK gegen intestinales MK	Regulation diffuses MK gegen intestinales MK	Gen-Symbol	Zytobande	FC Rezidiv gegen tumorfrei	Regulation Rezidiv gegen tumorfrei
HMBOX1	hs 8p21.1	45,76	up	SYT13	hs 11p11.2	30,80	up
CD86	hs 3q13.33	35,81	up	AQP5	hs 12q13.13	29,43	up
CGB1	hs 19q13.31	33,87	up	MMP7	hs 11q22.2	27,48	up
SAPS1	hs 19q13.33	31,69	up	FAM101A	hs 12q24.32	21,85	up
RPA4	hs Xq21.33	22,78	up	CEACAM6	hs 19q13.12	19,98	up
XIST	hs Xq13.2	20,93	up	TMC5	hs 16p12.3	15,97	up
GKN1	hs 2p14	20,30	up	C4BPA	hs 1q32.2	15,43	up
CABP7	hs 22q12.2	19,23	up	FAM101A	hs 12q24.32	15,17	up
NXF5	hs Xq22.1	17,51	up	SLC5A1	hs 22q12.3	14,98	up
PAH	hs 12q23.3	16,82	up	SLC4A11	hs 20p13	14,90	up
GAGE7	hs Xp11.23	13,86	up	CLDN3	hs 7q11.23	14,74	up
PAPPA2	hs 1q25.2	13,10	up	LOC440335	hs 16p13.3	14,64	up
IRX5	hs 16q13	12,83	up	PLA2G10	hs 16p13.11	14,42	up
ATP6V1B1	hs 2p13.3	12,29	up	PDZK1IP1	hs 1p33	14,31	up
MAB21L2	hs 4q31.3	11,97	up	GCNT3	hs 15q22.2	13,93	up
TMEM200C	hs 18p11.31	11,93	up	CEACAM6	hs 19q13.12	13,87	up
C6orf124	hs 6q27	11,65	up	TMPRSS3	hs 21q22.3	13,63	up
GRAMD1C	hs 3q13.2	11,58	up	TRIM15	hs 6p21.33	13,18	up
DPPA3	hs 14q13.3	11,19	up	hCG_1643808	hs 17q25.3	13,17	up
LOC389043	hs 2q21.1	11,13	up	C20orf103	hs 20p12.2	13,06	up
NXF2	hs Xq22.1	11,12	up	ANXA10	hs 4q32.3	13,01	up
SSX3	hs Xp11.23	11,06	up	ZG16B	hs 16p13.3	12,42	up
DBH	hs 9q34.2	10,90	up	PF4	hs 4q13.3	12,30	up
AFF3	hs 2q11.2	10,90	up	ATAD4	hs 17q21.33	12,28	up
HLA-DOB	hs 6p21.32	10,87	up	KRT19	hs 17q21.31	12,14	up
SSX4B	hs Xp11.23	10,85	up	B3GNT3	hs 19p13.11	11,46	up
CPLX2	hs 5q35.2	10,69	up	TFF1	hs 21q22.3	11,35	up
C4orf17	hs 4q23	10,60	up	CFTR	hs 7q31.31	11,17	up
REXO1L1	hs 8q21.2	10,38	up	TSPAN8	hs 12q21.1	11,02	up
SLC18A1	hs 8p21.3	10,35	up	MUPCDH	hs 11p15.5	10,83	up
FGF5	hs 4q21.21	10,33	up	OGDHL	hs 10q11.23	10,67	up
NPPA	hs 1p36.22	10,21	up	TMPRSS4	hs 11q23.3	10,48	up
CRYGN	hs 7q36.1	10,09	up	XIST	hs Xq13.2	10,48	up
PYY2	hs 17q11.2	10,01	up	SLC6A14	hs Xq23	10,16	up
OLFM4	hs 13q21.1	38,49	down	VIL1	hs 2q35	10,15	up
H19	hs 11p15.5	26,17	down	UCP2	hs 11q13.4	12,24	down
KRT6B	hs 12q13.13	14,39	down		hs 12p13.31	10,94	down
FBXO2	hs 1p36.22	10,22	down				

Eine zweite Gruppierung der Proben in „Rezidiv“ gegen „tumorfrei“ ergab 35 Gene, die in Karzinomproben von Patienten signifikant erhöht waren, die später ein wiederkehrendes Rezidiv aufwiesen. Bei den später tumorfreien Patienten waren in den Karzinomproben diese 35 Gene nicht überexprimiert (siehe Tabelle 18, Spalte 5-8).

Zum Schluss wurden die Patientenproben unabhängig von ihrer Laurén-Klassifikation, ihrer TNM-Klassifikation und ihrer Behandlung in vier Gruppen geclustert. Die 1. Gruppe umfasste alle Karzinomproben von Patienten mit wiederkehrender Tumorerkrankung (Rezidiv) (n=4), die zweite Gruppe beinhaltete alle Proben von verstorbenen Patienten (n=3), Gruppe 3 umfasste die Gruppe der stabilen Patienten, die zwar nicht kurativ geheilt werden konnten, aber stabil sind (n=3). In der letzten Gruppe befanden sich alle tumorfreien Patienten (n=13). In Abb. 30 sind vier deutlich unterschiedliche Expressionsmuster zu erkennen. Das Profil zeigt 41 differentiell exprimierte Gene, anhand derer die vier Subgruppen erstellt werden konnten.

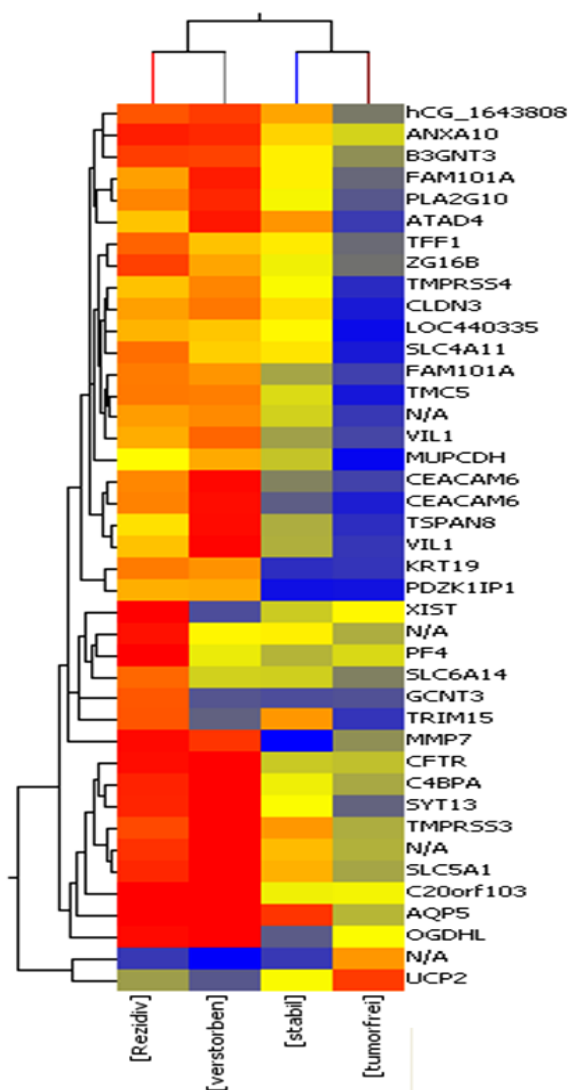


Abb. 30: *Heatmap* von 23 geclusterten Magenkarzinomen. Das Cluster zeigt vier Genexpressions-Profile, jedes beinhaltet 41 differentiell exprimierte Gene, anhand derer die Patienten in die vier Gruppen: 1. Patient mit Rezidiv (n=4), 2. verstorbene Patienten (n=3), 3. Patienten mit stabiler Erkrankung (n=3) und 4. tumorfreie Patienten (n=13) eingeteilt werden konnten.

5.4 Etablierung eines *in-vitro* Modelles für neuroendokrine Tumore

5.4.1 Charakterisierung von neuroendokrinen und kolorektalen Tumor-Zelllinien

Alle sechs Zelllinien (BON, MIP-101, QGP-1, LCC-18, CACO-2, COLO-95H, und SW-1116) wurden vor Versuchsbeginn auf ihre neuroendokrine Differenzierung für etablierte NET-Marker untersucht. Alle Zelllinien waren in der Immunhistochemie positiv für die Marker: Chromogranin A, Synaptophysin (SYP), SSTR1 und 2, PDGFR α und β , VAMP-1/2, Synaptobrevin, SNAP 25, Syntaxin (α/β -SNAP).

Die Zellen wurden ebenfalls positiv auf Survivin, RET, Cadherin 22, S100A11 und S100P getestet. Mit Western Blot-Analysen erfolgte die Verifizierung für Chromogranin A (siehe Abb. 31), Survivin und RET.

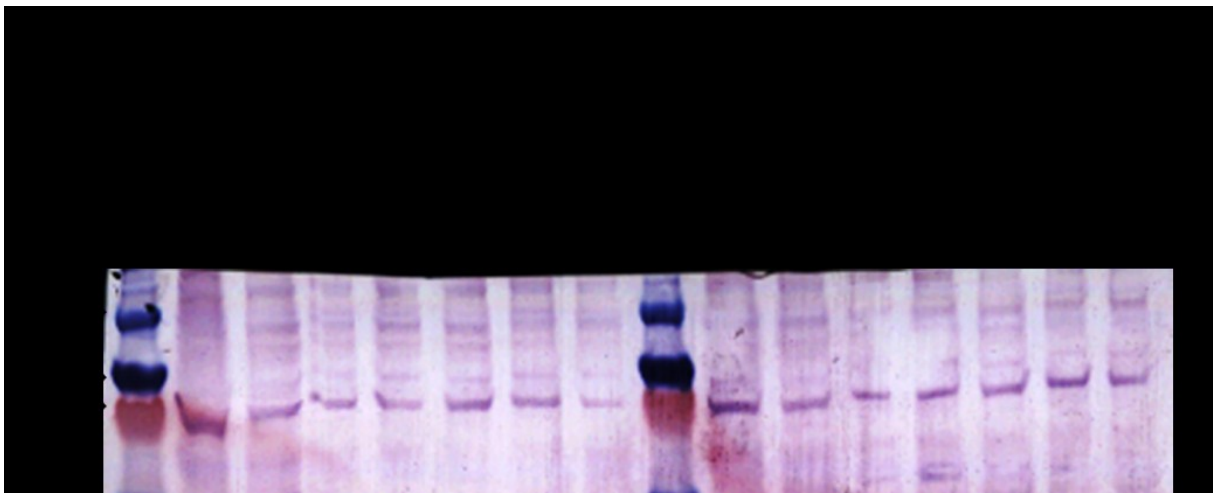


Abb. 31: Die Western Blot Analyse der Chromogranin A-Expression in den Zelllinien QGP, BON und LCC-18, zeigt sich über einen Kultivierungszeitraum von 0-96 Stunden als unverändert. Die Detektion des 68 kDa großen Proteins erfolgte durch einen monoklonalen Antikörper (Chr-A(LK2H10)) durch die Enzymreaktion mit alkalischer Phosphatase.

Die neuroendokrinen Zelllinien (BON, LCC-18, MIP-101 und QGP) zeigten im Phasenkontrastmikroskop eine sehr unterschiedliche Morphologie und Wachstumsmuster, bezogen auf Teilungsrate, Größe der Zellen und Koagulations-Verhalten.

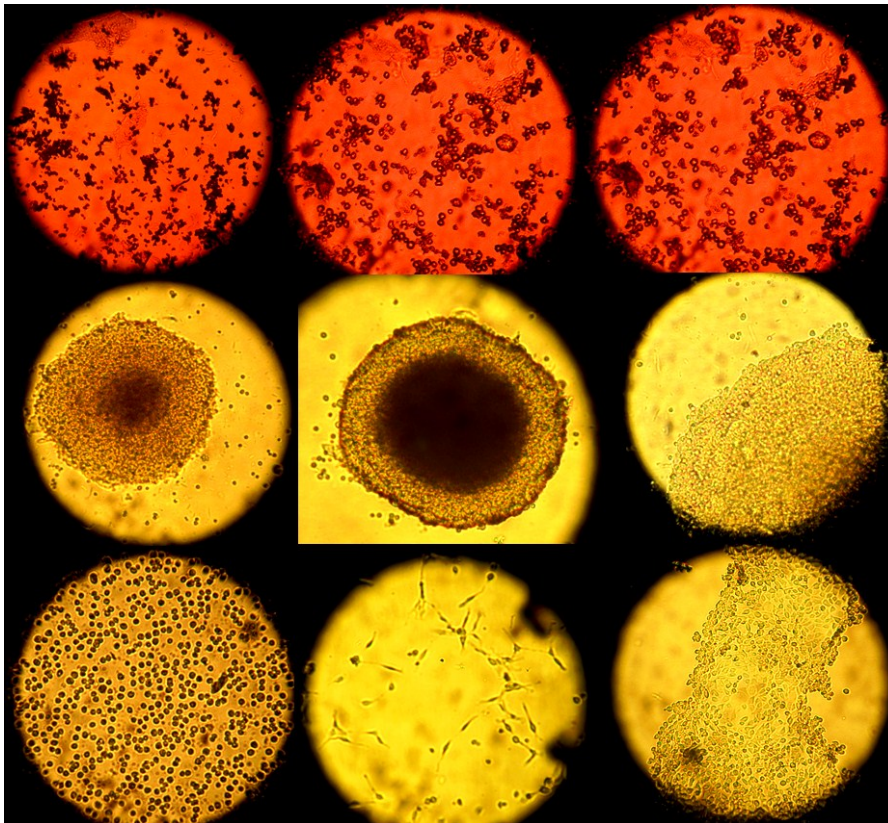


Abb. 32: Dargestellt ist die Morphologie, die Verteilung und die Wuchsform von vier neuroendokrinen Zelllinien im Phasenkontrast-Mikroskop bei 10-20 facher Vergrößerung. In der oberen Bild-Reihe ist die Zelllinie MIP-101 abgebildet. Die Zellen lagerten sich zusammen, bildeten aber keine Zellhaufen. Die mittlere Bild-Reihe zeigt die Zellhaufen-Bildung, zum Teil richtige Klumpen, der Zelllinie BON. Das linke Bild der untersten Reihe zeigt die Verteilung und Wuchsform von LCC-18. LCC-18 Zellen wuchsen separat, ohne Bildung von Zellhaufen. Im mittleren und rechten Bild der untersten Reihe ist die QGP-Zelllinie dargestellt. Die Zellen sind langgestreckt und dünn. Der morphologische Aufbau erinnert an multipolare Nervenzellen. Die Zellen lagern sich bei zunehmender Dichte zu einem lückenfreien Geflecht zusammen und bedecken den Boden der Kulturflasche.

Um die Zelllinien weiter zu charakterisieren wurde eine Karyotypisierung versucht, die allerdings nur für QGP, Colo-94H, und SW-1116 erfolgreich war (siehe Abb. 35 und Abb. 36). Für die Zelllinien BON, MIP-101 und LCC-18 war keine Karyotypisierung möglich, da es auch mit verschiedenen Methoden nicht möglich war DNA in ausreichender Menge und guter Qualität zu isolieren. Um sich einen Überblick über die Morphologie der Zellen zu machen, und um die geringe DNA-Ausbeute erklären zu können, wurden Zellen dieser drei Zelllinien auf Objektträgern fixiert und mit *Hämatoxylin-Eosin* angefärbt (HE-Färbung) (siehe Kapitel 4.3 und 4.10). Trotz mehrer Versuche mit verschiedenen Inkubationszeiten war im Phasenkontrast-Mikroskop keine Blaufärbung durch Hämatoxylin der DNA im Zellkern erkennbar. Die Zellen wiesen einen eosinophilen Zytoplasmasaum auf. Der Zellkern war sehr groß und ebenfalls eosinophil. Die Zellen waren kleiner ($6\ \mu\text{m}$) als „normale“ Zellen ($10\ \mu\text{m}$) und erinnerten in ihrer Morphologie an Erythrozyten.

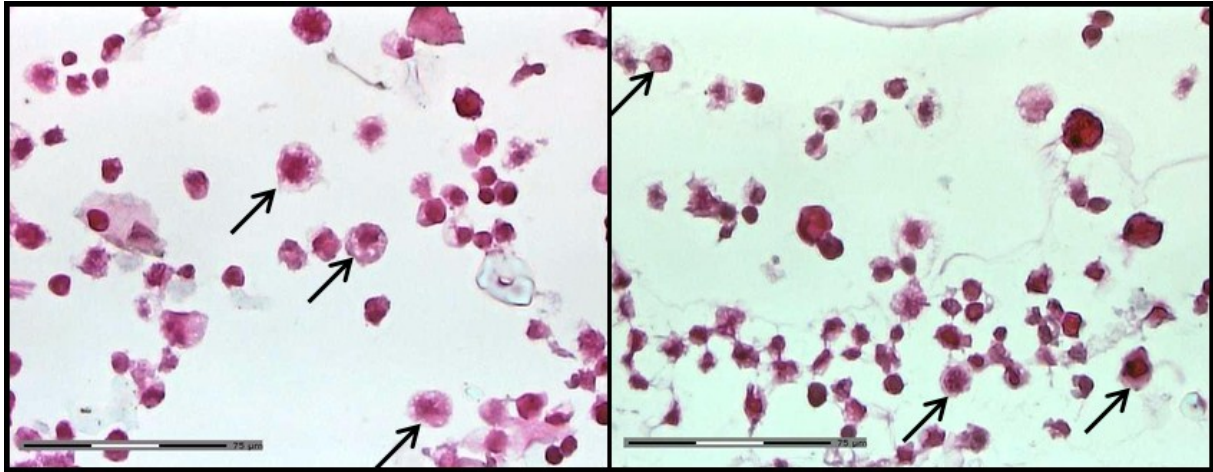


Abb. 33: HE-Färbung der Zelllinie LCC-18. Die Zellen sind kleiner ($6\mu\text{m}$) als „normale“ Zellen ($10\mu\text{m}$). Die Zellkerne sind groß, es ist wenig Zellplasma vorhanden und beide Zellkompartimente haben einen eosinophilen Charakter.

Um nachzuweisen, dass in den sich teilenden Zellen DNA vorhanden ist, die allerdings nicht anfärbbar noch isolierbar war, wurde von der Zelllinie BON und MIP-101 eine Interphase-FISH-Analyse durchgeführt (FISH: *Fluorescence in-situ Hybridisierung*). Die Zelllinie QGP wurde als positive Referenz (Kontrolle) mitgeführt, da hier DNA isoliert werden konnte. Nach der Zellkern-Präparation, wurden die Zentromersonden für Chromosom 7 (rot) und für Chromosom 8 (grün) auf die Objektträger hybridisiert. Es wurden nur Zellkerne ausgezählt, bei denen mindestens eine der beiden Zentromersonden ein Signal aufwies. In den Zellkernen der Zelllinie QGP und MIP konnten jeweils vier grüne und vier rote Signale detektiert werden, was darauf schliessen lässt, dass die Chromosomen 7 und 8 eine Tetrasomie aufweisen. In der Zelllinie BON wurden jeweils zwei grüne und drei rote Fluoreszenz-Signale detektiert. Somit ist der DNA-Nachweis ebenfalls positiv, und Chromosom 7 scheint in dreifacher Kopiezahl vorzuliegen (siehe Abb. 34). Für die Zelllinie QGP erfolgte die Verifizierung der Daten durch die Karyotypisierung aller Chromosomen (siehe Abb. 35).

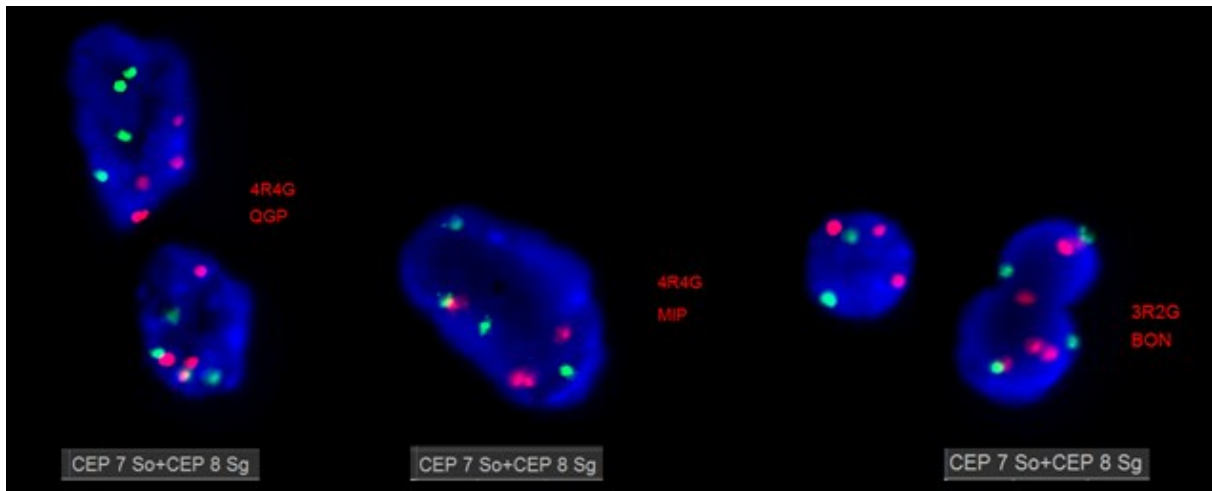


Abb. 34: Abbildung einer *Fluoreszenz in-situ Hybridisierung* (FISH) an Zellkernen neuroendokriner Zelllinien. Links sind zwei Zellkerne der Zelllinie QGP abgebildet, in der Mitte der Abbildung ein Zellkern der Zelllinie MIP-101 und rechts drei Zellkerne der Zelllinie BON die nach der Hybridisierung mit der Zentromersonde cep 7 (rot) und cep 8 (grün) für die Chromosomen 7 und 8 im Fluoreszenz-Mikroskop aufgenommen wurden. Die Gegenfärbung der DNA erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI).

Von der neuroendokrinen Zelllinie QGP konnte ein Karyogramm erstellt werden. Allerdings war nur eine Metaphaseplatte (MPP) beurteilbar, mit einem hypotriploidem Karyotyp: 64,XXYY,t(1;?)(p?31;?),del(1)(pter->p13:),-2,-3,+4,i(6)(p10)t(7;?)(q?22;?)add(7)(p22),+i(7)(p10),+i(7)(p10),-8,-9,-9,-10,-11,t(12;?)(p?11.2;?),t(12;?)(p?13;?)-14,-14,-15,-16,-16,-17,-18,-19,-19,-21,-22,+9mar (siehe Abb. 35).

Von den beiden neuroendokrin differenzierten Kolon-Zelllinien Colo-94H und SW-1116 konnte ebenfalls ein Karyotyp bestimmt werden. Für Colo-94H konnten insgesamt zehn Metaphaseplatte (MPP) beurteilt werden, die einen diploiden Karyotyp aufwiesen. Bei den Gonosomen ist nicht bekannt, ob ein X-Chromosom zugewonnen ist oder bereits konstitutionell ein XXY-Karyotyp existiert. Die zehn Karyotypen wurden zu einem Karyotyp (*composite karyotype = cp*) wie folgt zusammengefasst:

52~57,XXY[9],t(1;?)(p?13;?)[8],+3[5],+7[7],add(8)(p?23)[10],t(10;?)(q?22;?) bzw.: del(10)(?q22q24)[5],i(13)(q10),i(13)(q10)[10],+i(13)(q10)[8],add(17)(q?25)[10],add(17)(q?25)[8],+19[3],+20[9],+21[5],+1~6mar[cp10].

Für SW-1116 konnten 4 MPP beurteilt werden, die einen hypotriploiden Karyotyp zeigten. Die vier Karyotypen wurden zu einem Karyotyp (*composite karyotype = cp*) wie folgt zusammengefasst:

52~57,XXY[9],t(1;?)(p?13;?)[8],+3[5],+7[7],add(8)(p?23)[10],t(10;?)(q?22;?) bzw.: del(10)(?q22q24)[5],i(13)(q10),i(13)(q10)[10],+i(13)(q10)[8],add(17)(q?25)[10],add(17)(q?25)[8],+19[3],+20[9],+21[5],+1~6mar[cp10] (siehe Abb. 36).

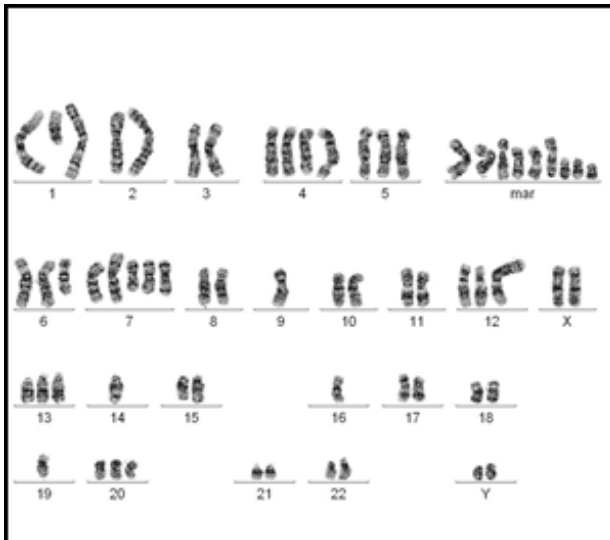


Abb. 35: Karyogramm der neuroendokrinen Zelllinie QGP. Es war nur eine Metaphaseplatte (MPP) beurteilbar mit einem hypotriploiden Karyotyp: 64,XXYY,t(1;?)(p?31;?),del(1)(pter->p13:;)-2,-3,+4,i(6)(p10),t(7;?)(q?22;?),add(7)(p22),+i(7)(p10),+i(7)(p10),-8,-9,-9,-10,-11,t(12;?)(p?11.2;?),t(12;?)(p?13;?),-14,-14,-15,-16,-16,-17,-18,-19,-19,-21,-22,+9mar

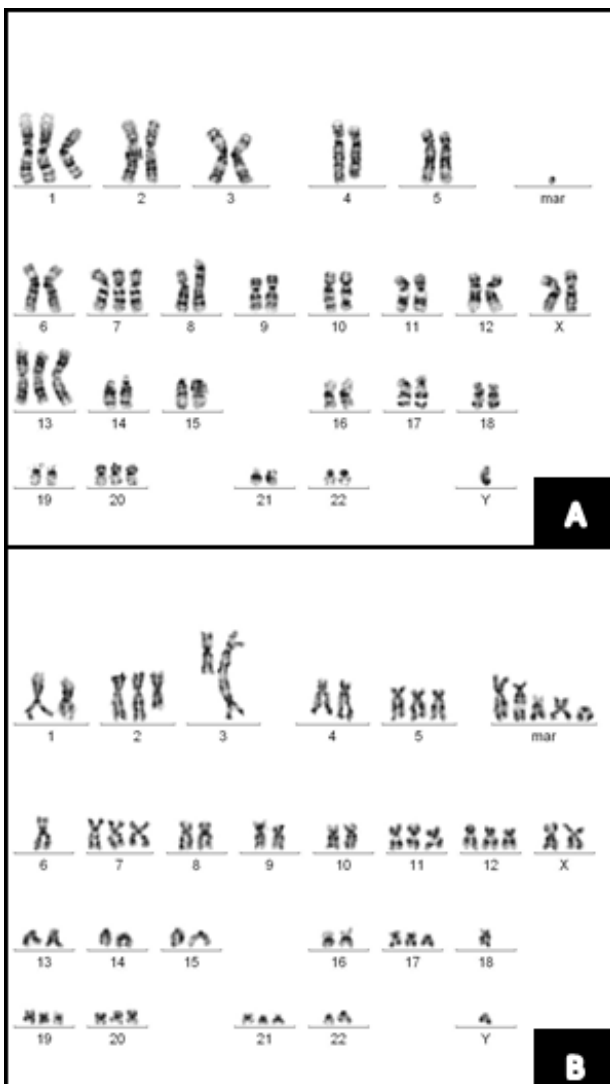


Abb. 36: Abbildung **A:** zeigt das Karyogramm der neuroendokrinen differenzierten Kolon-Zelllinie Colo-94H. Es konnten insgesamt zehn Metaphaseplatte (MPP) beurteilt werden, die einen diploiden Karyotyp aufwiesen. Bei den Gonosomen ist nicht bekannt, ob ein X-Chromosom zugewonnen ist oder bereits konstitutionell ein XXY-Karyotyp existiert. Die zehn Karyotypen wurden zu einem Karyotyp (*composite karyotype = cp*) wie folgt zusammengefasst:

52~57,XXY[9],t(1;?)(p?13;?)[8],+3[5],+7[7],add(8)(p?23)[10],t(10;?)(q?22;?)oder:
del(10)(?q22q24)[5],i(13)(q10),i(13)(q10)[10],+i(13)(q10)[8],add(17)(q?25)[10],add(17)(q?25)[8],+19[3],+20[9],+21[5],+1~6mar[cp10].

Abbildung **B:** zeigt das Karyogramm der neuroendokrinen differenzierten Kolon-Zelllinie SW-1116. Insgesamt konnten vier MPP beurteilt werden, die einen hypotriploiden Karyotyp zeigten. Die vier Karyotypen wurden zu einem Karyotyp (*composite karyotype = cp*) wie folgt zusammengefasst:

52~57,XXY[9],t(1;?)(p?13;?)[8],+3[5],+7[7],add(8)(p?23)[10],t(10;?)(q?22;?)oder:
del(10)(?q22q24)[5],i(13)(q10),i(13)(q10)[10],+i(13)(q10)[8],add(17)(q?25)[10],add(17)(q?25)[8],+19[3],+20[9],+21[5],+1~6mar[cp10].

6 Diskussion

6.1 Untersuchung von Serummarkern beim kolorektalen Karzinom

Wird das kolorektale Karzinom in einem frühen Stadium entdeckt (UICC: Stadium 1), liegt die 5-Jahres-Überlebensrate nach Chemotherapie, Bestrahlung und Operation bei über 90%, bei weiter fortgeschrittenen Tumoren (UICC: Stadium 3) sinkt sie auf 63% [O'Connell et al., 2004].

Goldstandard zur Diagnose des kolorektalen Karzinoms ist die routinemäßige Koloskopie, die eine 95%ige Sensitivität hat. Da die Untersuchung allerdings zeitaufwendig, unangenehm, schmerzhaft, invasiv und zum Teil mit Komplikationen verbunden ist sowie für einige Patienten ein extremes Eindringen in ihre Privatsphäre bedeutet, lehnen viele Patienten diese Möglichkeit der präventiven Diagnostik ab [Almong et al., 2008; Lisi et al., 2009; Ramos et al., 2011].

Der FOBT-Test (*fecal occult blood test*) gilt als zweitsicherste Screeningmethode für diese Tumorentität. Der Test hat mittlerweile eine Sensitivität von 61-91% bei einer Spezifität von 91-98% [Bang et al., 1986; Whitlock et al., 2008]. Ungenauigkeiten im Testergebnis können durch nicht standardisierte und nicht kontrollierbare Probenentnahme durch den Patienten zu Hause sowie durch unsachgemäße Lagerung der Stuhlproben entstehen. Wird in einer Stuhlprobe okkultes Blut gefunden, muss differentialdiagnostisch abgeklärt werden, ob Hämorrhoiden, Divertikel, Fissuren, Darmpolypen, Magen-Darm-Entzündungen oder ein Karzinom die Ursache dafür sind. Beim Hämporphyrin-Test besteht eine 60-90%ige Empfindlichkeit Darmtumore frühzeitig zu entdecken. Der Guajakbasierte Stuhlbluttest (gFOBT: *guaiac-based fecal occult blood*) weist nur eine 20-40%ige Sensitivität auf, da falsch-positive Ergebnisse durch *Häme* im Kot (Zahnfleisch-, Magen-, Hämorrhoidenblutungen und den Verzehr von Myoglobin (Fleisch)) verursacht werden können. Falsch-negative Resultate werden durch den Verzehr von Ascorbinsäure verursacht [Haemocult Sensa, Präparatinformation].

Obwohl die Diagnose des kolorektalen Karzinoms aufgrund der technischen Fortschritte (Koloskopie, Stuhltests) in einem frühen, gut heilbaren Tumor-Stadium möglich ist, nehmen viele Patienten die Routine-Screenings aus den oben beschriebenen Gründen nicht wahr. Pro Jahr versterben in Deutschland von den ca. 70.000 diagnostizierten Darmkrebs-Patienten 30.000, meist weil die Diagnose in einem fortgeschrittenen Tumor-Stadium gestellt wird [O'Connell et al., 2004]. Aus diesem Grund ist die Suche nach nicht invasiven, standardisierten, zeitsparenden und kostengünstigen Screening-Methoden Gegenstand vieler

Forschungsarbeiten [Srinivas et al., 2001; Petricoin et al., 2002; Conrads et al., 2004; Hanash, 2004]. Zentraler Fokus bildet dabei die Suche nach Biomarkern, die in Blut-, Serum-, oder Urinproben leicht identifiziert und nachgewiesen werden können.

Obwohl potenzielle Tumormarker für das kolorektale Karzinom beschrieben sind [Lofton-Day et al., 2007; Herbst et al., 2011], gab es bis zu dieser Studie im Rahmen dieser Dissertation keinen serologischen Screeningtest für diese Tumorentität.

In der AG von Prof. F. von Eggeling (CUCA, Institut für Humangenetik, UKJ) konnten 2005-2006 Calgizzarin (S100A11), das Hitzeschock-Protein 10 (HSP 10), sowie alpha-Defensine (HNP 1-3) aufgrund ihrer erhöhten Serumspiegel als potenzielle Tumormarker für das kolorektale Karzinom identifiziert und beschrieben werden [Melle et al., 2005; 2006; 2006]. Mithilfe von Serumproteinanalysen konnte das Komplement-aktivierende Protein: C3a desArg in der der AG von Prof. J. Habermann (Universität zu Lübeck) als Serummarker für das kolorektale Karzinom etabliert werden [Habermann et al., 2006]. Ein weiterer Tumormarker, der durch seine erhöhte Konzentration im Blut auf die Anwesenheit eines Tumors im Darm schließen lässt, wurde 2000 von Cordero et al. identifiziert: CD26 (Dipeptidyl peptidase-4 (DPP4)). Neben den oben genannten Routinemarkern CEA und CA 19.9, wurden VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) [De Vita et al., 2004], M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) [Mroczko et al., 2007], NNMT (Nicotinamide N-methyltransferase) [Roessler et al., 2005], CRP (C-reaktives Protein) [Helzlsouer et al., 2006] und CCSP-2 (*colon cancer secreted protein-2*) [Xin et al., 2005] als potenzielle Tumormarker zur Früherkennung des kolorektalen Karzinoms beschrieben. Die genannten Tumormarker sollten im Rahmen dieser Dissertation gemeinsam auf einem Multi-Analyten Protein-Serum-Biochip vereint und bezogen auf ihr diagnostisches Potenzial validiert werden. IL-8 (Interleukin 8) wurde im Laufe dieser Studie als neunter potenzieller Tumormarker evaluiert, nachdem HSP10, HNP 1-3, CA 19.9, CCSP-2 aufgrund von nicht verfügbaren Antikörpern vom Chip-Design ausgeschlossen werden mussten [Bünger et al., 2011].

Pilotstudie zur Testung geeigneter Serummarker für den CRCS-Biochip:

Die 100 Seren für die Pilotstudie stammten aus Lübeck und wurden im Rahmen der Norddeutschen Tumorbank Darmkrebs standardisiert entnommen und bei -170°C gelagert. Die Proben wurden auf Trockeneis verschickt und in Jena bei -80°C gelagert. Es wurde geschlussfolgert, dass die unterschiedliche Lagerung der Seren bereits einen erheblichen Einfluss auf die Qualität des Assays und die Aussagekraft des Ergebnisses haben. Durch Nachforschungen konnte erklärt werden, warum die Konzentration von C3a desArg bei den

Kontrollen in Jena um 55,5% gegenüber Lübeck erhöht waren (bzw. 59% bei den Karzinomen). C3 spielt als dritte Komplement-Komponente eine zentrale Rolle im klassischen und alternativen Signalweg in der Aktivierung des Komplement-Systems. C3 wird in C3a und C3b gespalten, wodurch das Neo-Epitop C3 desArg synthetisiert wird. Die Konzentration von C3 desArg steigt durch enzymgekoppelte Reaktionen im Serum an. Die erhöhten C3 desArg Werte, die in Jena gemessen wurden, lassen sich mit der zeitverzögerten Assay-Durchführung, (mehrere Auftau-Einfrier-Zyklen, höhere Lagertemperatur, Auftauen im Kühlschrank etc.) erklären.

Ebenfalls generell erhöht waren in Jena die Werte für MCSF, NNMT CD26 und CRP gegenüber Lübeck. Auch hier werden unterschiedliche Transportbedingungen und Lagerungsmodalitäten (Temperatur; mehrere Auftau-Einfrier-Zyklen) angenommen, die die Unterschiede in der Pilotstudie zwischen Jena und Lübeck erklären. Um unter diesen Bedingungen gleiche Voraussetzungen zu schaffen, mussten unterschiedliche *cut-offs* für Jena und Lübeck bestimmt werden, mit denen die Sensitivität und Spezifität der einzelnen Marker errechnet werden konnten.

Doppelblindstudie zur Evaluierung der Serummarker für den CRCS Biochip:

Für die 2. Blindstudie wurden vom DKFZ in Heidelberg 374 Seren für Jena und Lübeck zur Verfügung gestellt. Die Blutproben (bzw. Seren) stammten aus Arztpraxen niedergelassener Ärzte in der Umgebung, die die Blutproben unterschiedlich lagerten und verschickten. Alle Proben wurden zuerst auf Trockeneis nach Lübeck geschickt, dort aufgetaut, aufgeteilt, bearbeitet und der Rest wurde nach Jena geschickt. Die erhöhte Diskrepanz der Ergebnisse zwischen der Jena Pilotstudie und der Jena Doppelblindstudie, sowie der Lübeck Pilotstudie und der Lübeck Doppelblindstudie sind demnach auf die unterschiedliche Behandlung der primären Proben zurückzuführen (Blutabnahme und Lagerung). Die Unterschiede zwischen beiden Laboren sind auf die weitere Lagerung und Bearbeitung der Seren zurückzuführen.

Aufgrund der divergenten Ergebnisse zwischen Pilotstudie und Doppelblindstudie in Jena und Lübeck wurde von beiden Partnern ein 42 Proben umfassendes Trainingsset zur gleichen Zeit, am gleichen Standort (Lübeck) unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Da sich die Ergebnisse in dieser Untersuchung ähnelten, konnte darauf geschlossen werden, dass bereits geringe Abweichung bei der Blutentnahme, dem Transport und der Lagerung der Serumproben die Stabilität der Tumor-Marker stark beeinflussen. So ist z.B. die Korrelation für den Marker IL-8 zwischen Zytokin-Biochip und CRCS-Biochip mit 0,54 (Spearman's Korrelations Koeffizient) in Lübeck getestet worden, der Industriepartner Radox erreichte

eine Korrelation von 0,99 zwischen beiden Tests. Die Ursachen wurden im unterschiedlichen Handling beider Labore gesehen: Die Seren wurden bei Randox bei Raumtemperatur aufgetaut und nicht gevortext, in Lübeck und Jena wurden sie auf Eis aufgetaut, gevortext und zentrifugiert, wobei das Vortexen die Struktur der Proteine zerstören kann. Des Weiteren wurden die Proben auf dem Zytokin-Biochip viermal gewaschen, die Proben des CRCS-Biochips wurden erst in der Doppelblindstudie sechsmal gewaschen, in der Pilotstudie viermal. Randox wusch von Anfang mit sechs Zyklen. Demnach kann eine ungenügende Waschung der CRCS-Biochips in der Pilotstudie für die unterschiedlichen Ergebnisse verantwortlich sein.

Für alle weiteren Untersuchungen mit der *Evidence Investigator*TM Biochip Technologie von Randox werden für das Multi-Analyten-Screening ausschließlich Seren aus Lübeck eingesetzt, die max. 30 Minuten nach Probenentnahme im Forschungslabor, in der Klinik für Chirurgie bei -170°C gelagert werden. Weitere Maßnahmen, die die Auswertung der Biochips verbessern, basieren ebenfalls auf den genannten Ergebnissen und beinhalten die Erhöhung der Inkubationszeit von 30 Minuten auf 60 Minuten, sowie länger andauernde Waschschrte. Der Detektionsbereich der einzelnen Analyten auf dem Biochip wird von Randox *Laboratories* GmbH individuell erweitert, um eine bessere Sensitivität bei gleichbleibender (bzw. höherer) Spezifität zu erreichen.

In Jena mussten 33 Seren von der Untersuchung bzw. von der biostatistischen Auswertung ausgeschlossen werden, in Lübeck 39. Ein Grund war die zu geringe Probenmenge die zur Verfügung stand. Für den Biochip CRCSI wurden 5 µl Serum benötigt, für den Biochip CRCSII wurden 95 µl Serum benötigt. Ein weiterer Grund für den Ausschluss von Ergebnissen war ein zu hohes Hintergrund-Rausche bei der Detektion der Chemilumineszenz. Für weitere Untersuchungen muss auf die Mindestmenge von 100 µl Probenmaterial und auf ausreichend lange Wasch-Zyklen geachtet werden.

Kombination aus den Daten des CRCS-Biochip und FOBT-Test:

Die kombinierte Auswertung von Daten des immunhistochemischen FOBT Test (iFOBT) und den Biochip-Daten für CEA und CRC stellt die höchste Sensitivität (75-83%) aller Untersuchungen bei einer Spezifität von 90% dar. Für ein optimiertes Screeningverfahren kann in Erwägung gezogen werden, den iFOBT Test und diese zwei Marker des Biochip-Designs in Kombination zur Früherkennung von Darmkrebs einzusetzen, auch wenn dadurch der Schwerpunkt der Studie verschoben wird.

Zusammenfassende Schlussfolgerungen zu dem CRCS-Biochip:

Da es sich bei den getesteten Biochips um einen Multi-Analyten-Test (Multiplex Test / Multimarker-Test) handelt, können neun Marker simultan getestet und ausgewertet werden, sodass ein signifikanteres Ergebnis möglich ist, als bei herkömmlichen ELISA-Tests. Zur Detektion des kolorektalen Karzinoms wies die Marker-Kombination CEA und IL-8 bzw. CEA und CRP bei einer Spezifität von 86% eine Sensitivität von 47% bzw. 39% auf.

Bei dem von Grützmann et al. beschriebenen Bluttest, bei dem hypermethylierte DNA des *Sept9* Gens im Blutplasma als signifikanter Nachweis einer malignen Neoplasie gilt, werden 70% aller kolorektalen Karzinome detektiert und 20% aller Adenome [Grützmann et al., 2008]. Nachteil dieses Septin 9-Tests im Vergleich zu dem Biochip-Design von Randox, ist die kompliziertere Handhabung (DNA-Extraktion und Bisulfidbehandlung), die nötige Dreifachtestung einer Probe und der enorme Zeitaufwand, da jeder Patient einzeln getestet werden muss. Der Test auf dem Multi-Analyten Biochip ist dagegen von geschultem Personal einfach, schnell (max. 4h), kostengünstig, leicht reproduzierbar und mit 42 Patientenproben parallel durchführbar. Für die komplette Analyse sind nur 100 µl Probenmaterial (Serum) nötig.

Für den Patienten ist nicht nur die Zeitersparnis (durch einfache Blutabnahme beim Arzt und schnelle Ergebnisse) enorm, ihm bleibt auch die invasive, zum Teil schmerzhaft und unangenehme Koloskopie erspart.

Mithilfe des Biochips konnten auch frühe und fortgeschrittene Adenome rechtzeitig entdeckt und therapiert werden: Bei einer Spezifität von 86% erreichte die Marker-Kombination CEA und IL-8 eine Sensitivität von 18-33%, die beiden Marker CEA und CRP erreichten eine Sensitivität zwischen 15-28%. So kann dem Patienten im besten Fall die Diagnose „Krebs“ erspart bleiben und die kostenintensive Karzinom-Therapie fällt weg. Die Akzeptanz dieses Testes dürfte in der Bevölkerung als sehr hoch eingeschätzt werden.

Im weiteren Verlauf des vom BMBF geförderten Projektes sollen weitere Tumormarker auf ihr mögliches, diagnostisches Potenzial zur Früherkennung von Darmkrebs eruiert und validiert werden. Klinisch relevante Marker können dann dem Biochip-Design zugefügt werden, da auf dem Biochip CRCSII 18 Test-Areale ungenutzt sind und auf dem CRCSI Biochip sogar 20 freie Test-Areale vorhanden sind (siehe Kapitel 4.1).

Für die vier Tumormarker HSP10, HNP 1-3, CA 19.9 und CCSP-2, die aufgrund von nicht kommerziell erhältlichen Antikörpern aus der Studie ausgeschlossen werden mussten, kann die Herstellung eigener Antikörper in Erwägung gezogen werden.

Radox *Laboratories* GmbH arbeitet derzeit an einem vollautomatischen Gerät, mit dem 1200 Patientenproben parallel innerhalb kürzester Zeit (1h) auf 12 Tumormarker getestet werden können.

Die Etablierung und Evaluierung eines Serum-Protein-Biochips, der durch die quantitative Bestimmung von neun Biomarkern im Serum von Patienten eine standardisierte, zeitsparende und kostengünstige Screening-Methode für das kolorektale Karzinom und dessen Vorstufen darstellt, kann zusammenfassend als erfolgreich angesehen werden, wenngleich weitere klinische Studien die Einsetzbarkeit in der Praxis belegen müssen.

6.2 Charakterisierung neuroendokriner Tumore (NET)

Neuroendokrine Tumore sind sehr seltene, in ihrem klinischen Erscheinungsbild enorm heterogene Neoplasien. Der Primärtumor ist oft sehr klein, so dass er mit herkömmlichen Untersuchungsmethoden schwer zu detektieren ist, was zu einer späten Diagnose bei bereits fortgeschrittener Erkrankung führt [Abbruzzese et al., 1994; Abbruzzese et al., 1995; Bloom et al., 2004].

Die Therapie ist für jeden Tumor-Patienten so individuell wie möglich zu gestalten, wobei biologisch prognostische Faktoren wie Tumorgröße, Differenzierungsgrad, Angioinvasion, Vorhandensein von Leber-Metastasen, Proliferationsrate (Ki-67-Index), Infiltration in andere Gewebe und ob der Tumor funktionell aktiv oder inaktiv ist, zu berücksichtigen sind. Der wichtigste Anhaltspunkt für die Entscheidung der Therapie-Strategie ist allerdings die Lokalisation des Primärtumors. NET Patienten mit CUP-Syndrom (*carcinoma of unknown primary*) können nicht von den Therapien profitieren, die auf die verschiedenen Tumortypen zugeschnitten sind. Es wird angenommen, dass die Metastasen bei Tumor-Patienten mit einem CUP-Syndrom einen Wachstums-Vorteil gegenüber dem Primärtumor haben [Yuhas and Pazmiño, 1974]. Des Weiteren wird die Möglichkeit diskutiert, dass der Primärtumor, nachdem er metastasiert hat, durch das Immunsystem eliminiert wird, weshalb er dann nicht mehr vorhanden bzw. nachweisbar ist. Wird der Primärtumor nicht gefunden, ist eine komplette Heilung des Patienten nahezu ausgeschlossen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war 1. die Untersuchung des der Tumor-Progression zugrunde liegenden genetischen Mechanismus zur Erstellung eines einheitlichen Aberrations- und Genexpressions-Profiles für die neuroendokrinen Primärtumore und ihre Metastasen. Der zweite Ausgangspunkt war die Untersuchung von unterschiedlich exprimierten Gen-Clustern,

mit deren Hilfe man Organ-spezifische Klassifikatoren für neuroendokrine Metastasen mit unbekanntem Primärtumor etablieren kann.

Erstellung eines Aberrations-Profiles der NETs mithilfe der *array*-CGH

Der der neuroendokrinen Tumorigenese zugrunde liegende Mechanismus ist noch immer unklar. Es ist für viele solide Tumore bekannt, dass die Entartung auf chromosomale Aberrationen zurückzuführen ist, die entweder zur Amplifikation von (Proto-)Onkogenen führt oder zur Deletion von Tumorsuppressorgenen. Diese chromosomalen Zugewinne bzw. Verluste haben positive oder negative Einflüsse auf die genomische Stabilität, die Angiogenese, die Zellproliferation und auf die Apoptose, was alles wichtige Kennzeichen der Tumorigenese und der Metastasierung sind [Barghorn et al., 2001a; Barghorn et al., 2001b; Schmitt-Gräff et al., 2001; Albertson et al., 2003]. Mithilfe der genomweiten *array*-CGH-Analyse ist es möglich, relativ einfach nahezu alle Kopiezahl-Veränderungen (CNV: *copy number variations*) und Heterozygotie-Verluste (LOH: *loss of heterozygosity*) mit sehr hoher Auflösung in gefrorenem oder in Paraffin-eingebetteten Tumorgewebe-Proben aufzuspüren.

Für die *array*-CGH-Analysen in der vorliegenden Arbeit wurde der *cut-off* bei 5 Mb gesetzt, d.h. obwohl auch Aberrationen < 5 Mb gefunden wurden, wurden diese als Artefakt gewertet und nur Aberrationen > 5 Mb wurden als tatsächliche Imbalance bewertet. Mithilfe der *array*-CGH konnten mehr Aberrationen in den Metastasen gefunden werden als in den Primärtumoren. Diese Beobachtung deckt sich mit einer Studie von Zhao et al [Zhao et al., 2001]. Es konnten mehr DNA-Amplifikationen als Deletionen nachgewiesen werden. Beide Beobachtungen lassen die Vermutung zu, dass DNA-Zugewinne möglicherweise mit einer fortgeschrittenen Tumorerkrankung korreliert sind. Die häufigste Aberration war der Verlust des kompletten Chromosoms 18 in 58% aller untersuchten Fälle (siehe Abb. 12). Dieses Ereignis war in den Metastasen und den Primärtumoren statistisch gleich oft detektierbar, was zu dem Schluss führt, dass der Verlust von Chromosom 18, gepaart mit weiteren individuellen Aberrationen, ein frühes Ereignis in der Tumorigenese und Tumor-Progression ist. Diese Interpretation korreliert mit den Aussagen aus anderen Publikationen [Kytölä et al., 2001; Löllgen et al., 2001; Wang et al., 2005]. Interessant war die Entdeckung, dass fünf von sieben untersuchten Tumoren mit Verlust des Chromosom 18 als gut differenzierte neuroendokrine Tumoren (WDET) mit einem Ki-67-Index < 5% klassifiziert wurden (siehe Tabelle 15). So ein geringer Ki-67-Index impliziert eine langsame Zellteilungsrate, eine geringe Proliferationsrate und somit ein langsames Tumorwachstum [Scholzen et al., 2000]. Eine

Erklärung für diese widersprüchlichen Ergebnisse könnte sein, dass der Tumor so viele Aberrationen angehäuft hat, dass eine normale Mitose nicht mehr möglich war.

Eine *gain-of-function* Mutation im *RET* Proto-Onkogen, z.B. durch eine DNA-Amplifikation, oder eine Hochregulation der Genexpression, ist assoziiert mit der Entwicklung von verschiedenen Tumoren wie die multiple endokrine Neoplasien *MEN 1* (Wermer-Syndrom), *MEN 2a* (Sipple-Syndrom) und *MEN 2b* (Gorlin-Syndrom), sowie sporadische neuroendokrine Tumore mit verschiedenen Lokalisationen (Phäochromozytom, medulläres und papilläres Schilddrüsen-Karzinom und Nebenschilddrüsen-Karzinom) [Komminoth et al., 1996]. Das *RET*-Proto-Onkogen war in acht der elf untersuchten Tumore amplifiziert (siehe Abb. 12). Bei der Genexpressions-Analyse zeigte sich eine Überexpression des *RET*-Gens in den neuroendokrinen Metastasen (siehe Abb. 13 und Abb. 14). Anhand der Ergebnisse beider Analysen kann gemutmaßt werden, dass eine *gain-of-function* Mutation im *RET* Proto-Onkogen einen aktivierenden Einfluss auf die Progression des Tumors hat.

Weitere bekannte Gene, die entweder amplifiziert bzw. deletiert waren, sind: *BIRC5* (Survivin) *MEN1*, *H19*, *IGF2*, *Cyclin D*, *p53*, *c-Myc*, *c-Met*, *EGFR*, *erb-B2*, *CDH1* und *wnt*. Sie alle spielen eine zentrale Rolle im Zell-Zyklus und somit in der Tumor-Progression [Kytölä et al., 2001; Duerr and Chung, 2007].

Es kann zusammengefasst werden, dass die *array*-CGH eine enorme Menge an DNA-Aberrationen aufzeigen kann, die viele bekannte Proto-Onkogene und Tumorsuppressorgene betreffen. Trotzdem war es leider nicht möglich ein einheitliches Aberrations-Profil für Primärtumore und Metastasen zu ermitteln, was wohl an der geringen Fallzahl der untersuchten Tumoren lag.

Suche eines Gen-Klassifikators mithilfe der Genexpressions-Analyse

Abgesehen von den numerischen Aberrationen ist auch ein verändertes Genexpressions-Profil in Neoplasien häufig zu finden, wenn Signal-Pathways verändert, gestört und modifiziert sind. Mithilfe der auf *Microarray*-basierten Genexpressions-Analyse ist es prinzipiell möglich, die modifizierten Profile aller metabolischen, Signal- und Struktur-Gene, die für die Zellproliferation, Zelldifferenzierung und die Apoptose verantwortlich sind, abzubilden und zu bewerten.

In vorangegangenen Studien konnte auf dem Protein-Level gezeigt werden, dass sich anhand von spezifischen Protein-Signaturen Metastasen zu einer spezifischen Tumor-Entität zuordnen lassen [Melle et al., 2008]. Des Weiteren ist bekannt, dass es ein viel höheres Maß

an Gleichheit im Genexpressions-Profil zwischen Primärtumor und ihren Metastasen gibt, als zwischen Metastasen und das sie umgebende, normale Gewebe [Alizadeh et al., 2001]. In den letzten 10 Jahren wurden viele Versuche unternommen, um den Entstehungsort des Primärtumors mit spezifischen Genexpressions-Signaturen ihrer Metastasen aufzuspüren, wenn dieser nicht detektierbar ist.

Die ersten drei wegweisenden Studien über die Bestimmung der Lokalisation des Primärtumors mithilfe von auf *Microarray* basierten Genexpressions-Profilen der Metastasen wurden 2001 von Ramaswamy, Su and Yeang veröffentlicht [Ramaswamy et al., 2001; Su et al., 2001; Yeang et al., 2001]. In diesen Studien konnte der Entstehungsort der Primärtumore für Patienten mit CUP-Syndrom anhand von Expressions-Analysen prognostiziert werden. Allerdings handelte es sich bei den soliden Tumoren nicht um neuroendokrine Tumore. Andere Forschungsgruppen konnten erfolgreich zeigen, dass der Entstehungsort des Primärtumors bei CUP-Patienten durch Genexpressions-Analysen mit zur Hilfenahme von Datenbanken (z.B. die CupPrint Datenbank (www.Agendia.com; Amsterdam, the Netherlands) identifiziert werden kann. Diese Datenbanken generieren *Multiclass* Klassifikatoren, basierend auf verschiedenen Algorithmen (z.B. k-nearest neighbor algorithm and vectormachine algorithm), mit denen man die eigenen Genexpressionsdaten abgleichen kann und so Rückschlüsse auf die Lokalisation des Primärtumors schließen kann [Giordano et al., 2001; Khan et al., 2001; Ramaswamy et al., 2001; Su et al., 2001; Dennis et al., 2002; Buckhaults et al., 2003; Bloom et al., 2004; Tothill et al., 2005; Capurso et al., 2006; Ma et al., 2006; Talantov et al., 2006; Bridgewater et al., 2008; Dumur et al., 2008; Horlings et al., 2008; Shedden et al., 2008; Varadhachary et al., 2008; Monzon et al., 2009; van Laar et al., 2009].

Varadhachary et al entwickelte den Veridex-assay, der mithilfe von zehn Genen die Lokalisation des Primärtumors bei CUP-Syndrom der Lunge, der Brust, des Kolons, der Ovarien, des Pankreas und der Prostata zuordnen kann. Allerdings handelt es sich dabei ebenfalls um solide Tumore mit CUP-Syndrom, jedoch nicht um neuroendokrine Tumore [Varadhachary et al., 2008].

Des Weiteren wurden in der Literatur Studien beschrieben, in denen unterschiedlich exprimierte Gene in pankreatisch neuroendokrinen Tumoren (PNET) mit denen ihrer Metastasen, mit Zelllinien und mit anderen Pankreastumoren verglichen wurden um potenzielle, neue Marker für PNET mit CUP-Syndrom zu finden [Dennis et al., 2005; Capurso et al., 2006; Park et al., 2007]. In anderen Studien wurde das Genexpressions-Profil von gastrointestinalen neuroendokrinen Tumoren (GI-NET) mit dem ihrer Metastasen und mit

Zelllinien verglichen, um neue Tumormarker für die Tumorigenese und die Tumorprogression zu finden [Zikusoka et al., 2005]. Allerdings konnten keine Publikationen gefunden werden, die sich mit unterschiedlich exprimierten Genen zwischen Primärtumor und Metastasen für beide gastroenteropankreatische NET-Kategorien (PNET und GI-NET) gleichzeitig befassen und die darüber hinaus eine genetische Signatur für Metastasen beider Kategorien entschlüsseln, die Rückschlüsse auf den Entstehungsort des Primärtumors bei NET Patienten mit CUP-Syndrom zulassen. Molekulargenetische Ereignisse für beide GEP-NET-Kategorien sind nur anhand von *array*-CGH-Ergebnissen auf DNA-Ebene beschrieben und diskutiert [Lubensky and Zhuang, 2007; Kulke et al., 2008].

Neben der Genexpressions-Analyse ist und bleibt die Immunhistochemie (IHC) die wichtigste Methode zur phänotypischen Klassifikation und Identifikation von bestimmten Tumormarkern in verschiedenen Geweben [Moll, 2009]. Einige Gene, die in den vorher genannten Genexpressions-Studien entdeckt wurden, konnten daraufhin als Marker für die IHC etabliert werden. In weiteren Studien konnten diese IHC-Marker in Kombination mit bekannten, histopathologischen Markern genutzt werden, um eine Aussage über die Lokalisation des Primärtumors bei Adenokarzinomen bei Patienten mit CUP-Syndrom zu treffen [Dennis et al., 2002; Dennis et al., 2005; Dennis et al., 2005; Park et al., 2007; Horlings et al., 2008].

Es kann zusammengefasst werden, dass Primärtumore in der Lunge, der Brust, des Kolon verhältnismäßig leicht aufzuspüren sind, Primärtumore im Ileum, im Pankreas und im Gallengang sind schwieriger nachzuweisen [Park et al., 2007; Varadhachary et al., 2008]. Demnach sind diese etablierten assays (z.B. Veridex) oder Datenbank-gekoppelten-Genexpressions-Analysen nicht anwendbar für NET-Patienten mit CUP-Syndrom, wenn der Primärtumor im Ileum, Magen oder im Pankreas liegt. Alle bekannten Klassifikatoren sind *Multiclass*-Klassifikatoren, die das Expressionslevel von mindestens zehn Genen der Metastase benötigen, um den Primärtumor zu einem Organ zuordnen zu können.

Der in dieser Dissertation vorgestellte Drei-Gen-Klassifikator ist einzigartig.

Notwendigkeit von Microdissektion und Immunhistochemie

Auf dem Gebiet der genomischen und proteomischen Forschung ist die laser-basierte Gewebe-Mikrodissektion eine etablierte Methode, um homogene Proben von verschiedenen morphologischen Regionen (Tumorzellen, Tumorstroma, normales Gewebe, Bindegewebe etc.) eines Gewebestückes für weiterführende Analysen zu erhalten. Nichtsdestotrotz wird

basierend auf Zitationen geschätzt, dass nur in etwa 10% aller *array*-Studien Gewebe-Mikrodissektion durchgeführt wird [von Eggeling et al., 2007].

In der vorliegenden Arbeit wurde mikrodisseziertes Gewebe für alle *array*-Experimente verwendet, weshalb durch nachfolgende Analysen (hierarchische Cluster-Analyse und biostatistische Untersuchungen) ein so kleiner Entscheidungsbaum (Klassifikator), bestehend aus nur drei Genen (*CD302*, *PPWD1* und *ABHD14B*), etabliert werden konnte. Die drei gefundenen Gene sind nicht direkt mit Tumorentstehung und -entartung verknüpft. Das *CD302* Protein (*C-type lectin domain family 13 member A*) ist ein C-Typ Lectin Rezeptor, der in die Zelladhäsion und -migration, sowie in die Endozytose und Phagozytose involviert ist [Kato et al., 2003; 2007; Butler et al., 2007; Fujimoto et al., 2010; Yasuda et al., 2011]. Das *PPWD1* Gen kodiert für das Protein *peptidylprolyl isomerase containing WD40* und ist nur in einer Publikation beschrieben [Davis et al., 2008]. *ABHD14B* (*abhydrolase domain containing 14B*) ist ein nahezu unbekanntes Gen, es konnte keine Beschreibung in der Literatur gefunden werden.

Es konnte gezeigt werden, dass das Expressionslevel dieser drei Gene in Metastasen neuroendokriner Tumore den Entstehungsort des Primärtumors für Ileum, Magen und Pankreas mit einer Wahrscheinlichkeit (*prediction score*) zwischen 0.67 und 1 prognostizieren kann (siehe Tabelle 15 und Tabelle 16). In der 1. Blindstudie lag die Trefferquote bei 92%. Die Kombination aus drei Genen ist der kleinste, bekannte und beschriebene Klassifikator um die Lokalisation des Primärtumors in NET-Patienten mit CUP-Syndrom für beide GEP-NET-Kategorien (PNET und GI-NET) vorherzusagen. Es ist offensichtlich, dass dieser kleine Drei-Gen-Klassifikator etabliert werden konnte, weil durch die Mikrodissektion die Komplexität des Gewebes drastisch reduziert wurde. In allen vorangegangenen Studien erhielt man größere Klassifikatoren, da keine Mikrodissektion durchgeführt wurde und somit eine Kontamination des zu untersuchenden Tumorgewebes mit Normalgewebe (Bindegewebe, Muskelzellen, Fettgewebe etc.) wahrscheinlich stattgefunden hat oder zumindest nicht ausgeschlossen werden kann.

Des Weiteren wurden in die 1. Blindstudie zwei „Fallstricke“ eingebaut, um die „Wahrhaftigkeit“ des Klassifikators zu prüfen. Bei Probe 34 und 39 handelte es sich um Metastasen, deren Primärtumore in der Appendix bzw. im Rektum lokalisiert waren. Die Software wies den beiden Metastasen keine Primum-Lokalisation zu, sondern deklarierte den Ursprungsort des Primums als „None“, d.h. er ist unbekannt. An diesen beiden Beispielen

konnte gezeigt werden, dass die Software (bzw. der Drei-Gen-Klassifikator) keine falsch-positiven Ergebnisse generiert.

In der 2. Blindstudie lag die Trefferquote dagegen nur bei etwas über 60%. Der Grund lag in der schlechten molekularen Beschaffenheit der Proben. Die Tumor-Proben waren zum Teil sehr alt (älteste Probe von 1998), wodurch mögliches Auftauen und Einfrieren des Gewebematerials nicht ausgeschlossen werden kann. Dadurch kann (sehr wahrscheinlich!) eine Degradation der RNA-Moleküle stattgefunden haben, was zu „verfälschten“, artefakt-behafteten Expressionsdaten führte. Die Analyse müsste unter Ausschluss aller „schlechten“ RNA-Proben wiederholt werden. Dies war nicht möglich, da bis zur Fertigstellung der Arbeit keine klinischen Daten und somit keine Zuordnung der Tumor-Proben zu den Patienten vorlagen. Bei weiteren Genexpressions-Analysen ist bei Tumorgewebe dringend auf eine ununterbrochene Kühlkette bei mindestens -80°C bis zur Probenverarbeitung zu achten.

Um die Expressionsdaten mit einer unabhängigen, anerkannten Methode zu verifizieren, wurde an 148 neuroendokrinen Tumore eine Immunhistochemie (IHC) für die drei Proteine CD302, PPWD1 und ABHD14B auf *Tissue Microarrays* (TMAs) durchgeführt. Die Ergebnisse konnten die Wirkungsweise des Drei-Gen-Klassifikator zu 72% bestätigen. Die Diskrepanz zwischen der Trefferquote von 92% auf RNA-Ebene und nur 72% auf Protein-Ebene, lässt sich durch translationale Modifikationen erklären. So kann ein hochreguliertes Gen (viele abgeschriebene Genkopien) in einer Zelle trotzdem mit einer niedrigen Protein-Espression einhergehen, wenn die mRNA-Kopien nur einmal abgeschrieben werden. Die Ergebnisse der RNA-Studie (Genexpressions-Analyse) lassen sich nicht eins zu eins auf die Protein-Ebene übertragen.

6.3 Bedeutung von Survivin als Apoptose-inhibierendes Protein in neuroendokrinen, kolorektalen Zelllinien und in humanen Stammzellen

Etablierung eines neuroendokrinen Zelllinien-Modells

Zelllinienmodelle sind nötig, um Tumore besser charakterisieren zu können.

Es ist schwierig für neuroendokrine Tumore ein passendes, adäquates Zelllinienmodell zu finden, da diese nicht gut etabliert sind bzw. nicht kommerziell erhältlich. Als Zelllinienmodell für einen gut differenzierten Tumor wurde mir die Zelllinie BON von der Arbeitsgruppe Frau PD Dr. med. P. Grabowski in der Gastroenterologie, Infektiologie und

Rheumatologie in der Charité-Berlin; Campus Benjamin Franklin zur Verfügung gestellt. Dabei handelt es sich um einen gut differenzierten neuroendokrinen Tumor des Pankreas, der einem 28 jährigen Mann 1986 operativ entfernt wurde. Die Tumorzellen wurden aus einem befallenen Lymphknoten isoliert, in DMEM-Medium angezogen und konnten erfolgreich kultiviert werden. Beschrieben und charakterisiert wurde die Zelllinie erstmals 1994 von Evers et. al.

Als Modellorganismus für ein gut differenziertes endokrines Karzinom wurde die QGP Zelllinie verwendet, die 1982 erstmals von Debons-Guillemain et al. kultiviert und beschrieben wurde. Die Tumorzellen entstammen einem 29 jährigen Mann mit einem Karzinoid-Tumor des Jejunums. Die Zelllinie wurde mir ebenfalls von der AG Grabowski von der Charité Berlin zur Verfügung gestellt.

Die Zelllinien NCI-716, NCI-747, Colo320, MIP-101 und LCC-18 gelten als *in vitro*-Modell eines schlecht differenzierten endokrinen Karzinoms [Quinn et al., 1979; Park et al., 1987; wagner et al., 1990; Lundqvist et al., 1991; Thomas et al., 1995]. MIP-101 und LCC-18 stammen ebenfalls aus der AG Grabowski. Die anderen Zelllinien wurden kommerziell erworben. In dieser Arbeit wurde versucht, die fünf Zelllinien zur Charakterisierung von neuroendokrinen Tumoren zu kultivieren, was aber nur teilweise (MIP-101 und LCC-18) bzw. gar nicht gelang (NCI-716, NCI-747 und Colo320).

In der Literatur ist mehrfach beschrieben, dass undifferenzierte, neuroendokrine Karzinome zum Teil aus neuroendokrin differenzierten Adenokarzinomen durch Enddifferenzierung hervorgehen. Es wird weiter angenommen, dass 30-40% aller humanen kolorektalen Adenokarzinome neuroendokrin differenziert sind. Für diese These spricht auch die Tatsache, dass schlecht differenzierte endokrine Karzinome meist im Hinterdarm entstehen [Vortmeyer et al., 1997, Grabowski et al., 2001 und 2002].

Zum Nachweis dieser Theorie und aufgrund der leichteren Verfügbarkeit und Kultivierung wurden in dieser Arbeit drei Zelllinien verwendet, die aus kolorektalen Adenomen und Karzinomen isoliert wurden und neuroendokrine Eigenschaften besitzen. Bei den beiden Zelllinien Caco-2 und Colo-94H handelte es sich um kolorektale Adenokarzinome. Die Zelllinie SW-1116 entstammt einem Kolon-Karzinom Grad III, Dukes Typ A und wurde in dieser Arbeit auch als Modell für das kolorektale Karzinom verwendet.

Alle drei Kolon-Zelllinien (Caco-2, Colo-94H und SW-1116) wurden positiv auf die etablierten, neuroendokrinen Tumormarker Chromogranin A, Synaptophysin (SYP), PDGFR

α und β , VAMP-1/2, Synaptobrevin, SNAP 25 und Syntaxin (α/β -SNAP) getestet, wodurch die neuroendokrine Differenzierung als bewiesen angesehen werden kann.

Kultivierung von mesenchymalen Stammzellen

Als humane Stammzellen werden somatische Zellen bezeichnet, die das Potenzial haben sich in alle Zelltypen bzw. in jedes Gewebe ausdifferenzieren zu können. Stammzellen werden in drei Kategorien geteilt, abhängig ihres ontogenetischen Alters und ihres Differenzierungspotentials. Totipotente (bzw. omnipotente) Stammzellen („zu allem mächtig“) sind in der Lage einen ganzen Organismus zu bilden, da sie sich nicht nur genetisch in jede somatische Körperzelle und Keimbahnzelle differenzieren können, sondern sie können auch extraembryonales Gewebe (Trophoblast) bilden. Embryonale Stammzellen sind pluripotent („zu vielem mächtig“), d.h. sie können sich in jede somatische Zelle der drei Keimblätter (*Ektoderm*, *Entoderm* und *Mesoderm*) differenzieren und in Zellen der Keimbahn. Pluripotente Stammzellen sind in embryonalem und fetalem Gewebe zu finden sowie in Nabelschnurblut. Multipotente, adulte Stammzellen lassen sich in allen menschlichen Geweben nachweisen. Von besonderer Bedeutung in der Therapie von Leukämien sind die humanen, mesenchymalen Stammzellen aus dem Stroma des adulten Knochenmarks. Aufgrund der hohen Telomerase-Aktivität in mesenchymalen Stammzellen lassen sich diese *in vitro* fast unbegrenzt kultivieren. Durch verschiedene Substanzen, die dem Kultur-Medium zugefügt werden, ist es *in vitro* möglich, gezielten Einfluss auf die Ausdifferenzierung der Stammzellen z.B. in Osteozyten, Chondrozyten, Myozyten, Fibrozyten und Adipozyten zu nehmen.

In der vorliegenden Arbeit wurden mesenchymale Stammzellen aus adultem Knochenmarksstroma in neuronale Zellen und in Osteozyten ausdifferenziert. Der Nachweis für die neuronale Differenzierung erfolgte durch den Marker neuronenspezifische Enolase (NSE). Das Isoenzym der glycolytischen Enolase katalysiert die Umwandlung von 2-Phosphoglycerat in Phosphoenol-pyruvat und wird ausschliesslich in neuronalen Zellen exprimiert [Alouani et al., 1993] (siehe Abb. 25).

Durch nachfolgende Genexpressions-Analysen konnten differentiell exprimierte Gene identifiziert werden, die bei Ausdifferenzierung in die jeweilige Zellart an- bzw. abgeschaltet wurden (nicht dargestellt). Durch den Vergleich des Expressionslevels dieser Gene mit dem Profil der Gene in neuroendokrinen Tumorzellen, konnten diese Gene als mögliche Markergene für die Tumorentstehung und -progression von neuroendokrinen Tumoren angesehen werden.

Survivin knock down in neuroendokrinen Zellen und mesenchymalen Stammzellen führt zur Seneszenz

Survivin, auch bekannt als BIRC5 oder AP14, ist ein 16.390 kDa großes Protein, das zur Klasse 3 der IAP (*inhibitor of apoptosis*) Proteine gehört [Müller, 2004]. IAPs helfen der Zelle sich vor dem programmierten Zelltod -der Apoptose- zu schützen, indem sie die Wirkung bestimmter Enzyme, den sogenannten Caspasen inhibieren, die als „Zelltodproteasen“ für die Apoptose nötig sind. IAPs bestehen aus 1-3 sogenannten BIR-Domänen (*baculovirus inhibitor repeat*), die an bestimmte Caspasen binden können [Crook et al., 1993; Clem et al., 1994; Weikert, 2007]. Einige IAPs besitzen eine RING-Domäne, die im Zusammenspiel mit weiteren Enzymen Zielproteine mit Ubiquitin markieren können, wodurch diese markierten Proteine durch das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut werden [Grossmann et al., 2001; Conway et al., 2002].

Erfolgt in einer Zelle eine irreparable DNA-Schädigung, können drei Apoptose-Signaltransduktionswege beschrrieben werden, um die Zelle an den Eintritt in einen weiteren Zell-Zyklus zu hindern. Erstens: der extrinsische Weg, der durch Bindung eines Liganden an sogenannte „Todesrezeptoren“ (TNF-Rezeptorfamilie) an der Zell Oberfläche die Apoptose von außen einleitet. Zweitens: der intrinsische Weg wird z.B. durch p53 nach einer DNA-Schädigung ausgelöst und führt zu einer Funktionsstörung in den Mitochondrien, wodurch u.a. Cytochrom C ins Zytoplasma gelangt und zusammen mit anderen pro-apoptotischen Faktoren die Apoptose einleitet. In diese Apoptosekaskade greift Survivin inhibierend ein, indem es die Protease Caspase-9 inaktiviert. Der dritte Weg ist der stressinduzierte im endoplasmatischen Reticulum.

Survivin ist demnach ein Apoptose-hemmendes Protein, was natürlich in embryonalem und fetalem Gewebe exprimiert wird, sowie in proliferierenden Zellen, wie. z.B. neuronale Stammzellen, Endothelzellen, im Thymus, im basalen Ösophagus- und im Kolonepithel. Es hat die Aufgabe, die korrekte Weitergabe der Chromosomen an die Tochterzellen zu überwachen. In adulten, ausdifferenzierten Gewebe wird Survivin normalerweise nicht exprimiert. Survivin, auch bekannt als Tumorantigen (bzw. „Überlebens-Protein“), findet man allerdings in vielen Tumorentitäten überexprimiert. Diese Beobachtung legt die anti-apoptotische Funktion von Survivin in malignen Neoplasien während der Tumorigenese und der Tumor-Progression nahe. Es wird geschlussfolgert, dass die Überexpression von Survivin mit aggressivem Tumorverhalten und einer schlechten Prognose für den Patienten einhergeht. Der hinter dieser Re-Aktivierung liegende Mechanismus von Survivin in ausdifferenzierten Zellen ist z. B. für das Neuroblastom beschrieben: hier führt eine Amplifikation des 14,7 kb

großem Gens *BIRC5* auf Chromosom 17q25 zur Expression von Survivin [Kappler, 2005]. Für das Ovarialkarzinom wurde eine Demethylierung von Exon 1 im Survivin-Gen beschrieben, infolge dessen das Gen aktiviert und abgeschrieben wird.

In der vorliegenden Arbeit konnte mithilfe der Genexpressions-Analyse bei 77,7% aller schlecht differenzierten Karzinome (PDEC) eine Überexpression von *BIRC5* nachgewiesen werden. Die Validierung erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper gegen Survivin mittels Immunhistochemie (IHC). Dem gegenüber zeigten 68,4% aller gut differenzierten Tumore (WDET) eine Herunterregulation des *BIRC5* Gens. In der jeweiligen IHC war kein Survivin nachweisbar. Grabowski et al. korrelierte 2005 die Lokalisation von Survivin im Zellkern von neuroendokrinen Tumoren mit einer schlechten Prognose für den Patienten. Die Ergebnisse der Genexpressions-Analyse von *BIRC5* in der vorliegenden Arbeit bestätigen dieses Ergebnis, allerdings konnten die Expressionsdaten nur mit dem KI-67-Index korreliert werden, da zum einen keine Angaben über das tatsächliche Überleben der Patienten verfügbar waren und zum anderen zeitnah operierte Patientenproben untersucht wurden, von denen zum Zeitpunkt der Arbeit keine Verlaufskontrollen bekannt waren (siehe Abb. 20).

Survivin wird in der G2/M Phase der Mitose exprimiert und ist im Nukleus und im Zytoplasma nachweisbar. In den beiden Zellkompartimenten bindet es an das Kinetosom der Metaphase-Chromosomen, an die Mikrotubuli und ist in der Meta- und Anaphase mit dem Spindel-Apparat verknüpft. Erfolgt in der G2/M Phase die Phosphorylierung von Survivin an Thr34 durch die Cyclin-abhängige Kinase 2, bindet und inhibiert Survivin die Caspase 3, wodurch die Apoptosekaskade unterbrochen wird und die Zelle durchläuft einen weiteren Zellzyklus [Li F. et al., 1998 und 1999].

Survivin wird wie oben beschrieben in embryonalem, fetalem und in nicht differenzierten Stammzellen sowie in malignen Tumorzellen exprimiert und gewährleistet die korrekte Weitergabe der Chromatiden an die Tochterzellen. Ein Survivin-Verlust kann durch einen knockout mit siRNA, oder durch eine phosphorylierungsdefekte Thr34 Survivin Mutante erreicht werden. Aufgrund der fehlenden Spindel und der Mikrotubuli in der Mitose wird so die Zellteilung verhindert, was wiederum zu seneszenten Zellen führt.

Neben dem Nachweis einer Überexpression von *BIRC5* in den neuroendokrinen Karzinomen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass der knockdown von *BIRC5* in mesenchymalen Stammzellen und in neuroendokrin differenzierten Zelllinien die Zellen in die Seneszenz führen (siehe Kapitel 5.2.3, sowie Abb. 20, Abb. 22, Abb. 23, Abb. 24 und Abb. 26).

Während in undifferenzierten, mesenchymalen Stammzellen Survivin nachweisbar war, konnte in den ausdifferenzierten Osteozyten und neuronalen Zellen kein Survivin-Nachweis erfolgen (siehe Abb. 26). Der knockdown von *BIRC5* in den mesenchymalen Stammzellen resultierte in seneszenten Zellen, die trotz Kultivierung im Differenzierungsmedium nicht zur Ausdifferenzierung gelangten. In drei neuroendokrin differenzierten Zelllinien konnte ein *BIRC5* knockdown das Zellwachstum verlangsamen, u.a. dadurch, dass Zellen seneszent wurden. Der schwache Anstieg der Survivin-Konzentration im Zelllysat nach 96h kann damit begründet werden, dass die Inkubation der siRNA für 24 h zu kurz war und nicht betroffene Zellen weiter wuchsen und Survivin exprimierten. Eine längere Inkubation wäre ratsam.

Bezieht man die Ergebnisse der Zelllinien-Experimente auf neuroendokrine Tumore, sollte der knockdown von Survivin in dieser Entität zur Inhibierung des Tumorwachstums führen.

6.4 Nachweis molekularbiologischer Subgruppen beim Magenkarzinom

Das Magenkarzinom hat, obwohl es eine rückläufige Inzidenz aufweist, eine sehr schlechte Prognose, da die meisten malignen Tumore erst in einem fortgeschrittenen Tumorstadium (III und IV) mit meist hepato-lärer Metastasierung diagnostiziert werden. Die komplette Resektion des Tumors (R0 Resektion) ist die Hauptvoraussetzung für ein Überleben des Patienten [Adachi et al., 1998; Swan et al., 2006]. Dies gelingt aber nur in 50% der Fälle. Die Publikation von Lawrence et al. 1958 revolutionierte die Therapie des Magenkarzinoms, da er auch bei nicht kurativen Tumoren eine palliative Magenresektion (partiell oder komplett) postulierte, die das Leben des Patienten signifikant und qualitativ verlängert. In den nächsten 50 Jahren konnte diese These an großen Patienten-Kollektiven in weiteren Studien bewiesen werden [ReMine, 1979; Bozzetti et al., 1987; Ouchi et al., 1998].

Dennoch wird die palliative Resektion unter Wissenschaftlern kontrovers diskutiert [Hartgrink et al., 2002; Miner et al., 2004; Sarela et al., 2006; Moehler et al., 2007; Lin et al., 2008].

Zudem rückt auch die palliative Chemotherapie in den letzten beiden Dekaden immer mehr in den Vordergrund. Goldstandard bei nicht operablem Tumor (Stadium IV) ist die Chemotherapie nach dem ECF-Schema (Epirubicin, Cisplatin, 5-Fluorouracil) und dem FOLFOX-Schema (Folinsäure, 5-Fluorouracil, Oxaliplatin) [Dittmar et al., 2009]. Dittmar et al. konnten nachweisen, dass Patienten mit fortgeschrittenem Magenkarzinom, die eine palliative Gastrektomie und parallel dazu eine palliative Chemotherapie erhielten, einen

deutlichen Überlebensvorteil gegenüber Patienten hatten, die mit anderen palliativen Methoden behandelt wurden.

Ein Grund für die kontroverse Diskussion, ob eine palliative Tumor-Resektion (z.T. komplette Gastrektomie) und Chemotherapie tatsächlich mit einer besseren Prognose für den Patienten einhergeht, liegt in den Beobachtungen, dass die palliative Behandlung einiger Patienten tatsächlich zu einem längeren Überleben führt, andererseits versterben viele kurativ operierte Menschen an der Erkrankung.

Als Erklärung für dieses Phänomen gilt, dass die Entstehung eines Magenkarzinoms ein sehr heterogener Prozess ist, der in verschiedenen, komplexen, molekulargenetischen Mustern von Signaltransduktionswegen endet. Aus der Verknüpfung der unterschiedlich veränderten Signalwege resultieren demnach Subgruppen, die unabhängig ihrer histologischen Klassifizierung nach Laurén oder der TNM-Stadieneinteilung die klinische Prognose des Patienten und seine Überlebenswahrscheinlichkeit (mit)-bestimmen (siehe Kapitel 2.4) [Hasegawa et al., 2002; Terashima et al., 2005]. In mehreren Arbeitsgruppen konnten durch Genexpressions-Analysen solche Subgruppen des Magenkarzinoms erstellt werden, die nicht auf histologischen, sondern auf molekulargenetischen Kriterien basieren [Chen et al., 2003; Gylling et al., 2007; Han et al., 2007; Katoh, 2007; Fujimoto et al., 2008; Silva et al., 2008; Solcia et al., 2009].

In der vorliegenden Arbeit konnte diese These zum einen an einem Patienten-Kollektiv von sechs intestinalen Magenkarzinomen bestätigt werden, die auf DNA-Ebene untersucht wurden, und zum anderen an einem Patienten-Kollektiv von 23 Magenkarzinomen, die auf RNA-Ebene untersucht wurden. Die Studie wurde 2010 in *Onkologie* publiziert [Dittmar et al., 2010]. Bei den sechs Patienten mit fortgeschrittenem intestinale Magenkarzinom-Typ mit Metastasen in der Leber war eine Korrelation zwischen der Anzahl und Lokalisation der individuellen Aberrationen im Genom mit dem klinischen Verlauf der Erkrankung zu erkennen. Die drei Patienten mit wenig genomischen Imbalancen (0,05-6,1%), erhielten eine palliative Gastrektomie und Chemotherapie und sind seit 4 Jahren in vollständiger Remission (Stand Sommer 2010). Die anderen drei Patienten dieser Gruppe wiesen Aberrationen auf, die 26-53% des Genoms betrafen, zwei Patienten verstarben. Somit konnten zwei Subgruppen des intestinalen Typs nachgewiesen werden.

Aufgrund der geringen Probenzahl war es nicht möglich, ein einheitliches Aberrations-Profil für alle Magenkarzinom-Proben zu erstellen, wodurch auch keine statistisch signifikante Einteilung in Hochrisiko- bzw. Niedrigrisiko-Gruppe getroffen werden konnte. Allerdings deuten die Daten auf eine mögliche Subgruppierung des intestinalen Magenkarzinoms hin.

Weitere Analysen mit größeren Patienten-Kollektiven sind nötig. Auch Loncarevic et al., konnte 2008 die Anzahl der individuellen DNA-Aberrationen mit der Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten mit Nebennieren-Karzinom korrelieren.

Für die Genexpressions-Analyse wurden die Patienten in verschiedene Gruppen unterteilt: diffuses bzw. intestinales Karzinom; Chemotherapie erhalten bzw. nicht und in Chemotherapie-Protokoll: „FOLFOX“ (Folinsäure, 5-Fluorouracil, Oxaliplatin) bzw. „ECF“ (Epirubicin, Cisplatin, 5-Fluorouracil). Es konnten mehr als 69 Gene identifiziert werden, die in den jeweiligen Gruppen unterschiedlich stark über- oder unterexprimiert waren. Des Weiteren konnte ein -aus 41 differentiell exprimierten Genen bestehendes- Profil erstellt werden, welches die Patienten in vier Gruppen einteilt: 1. Patient mit Rezidiv, 2. verstorbene Patienten, 3. Patienten mit stabiler Erkrankung und 4. tumorfreie Patienten.

Die Ergebnisse bestätigen das Vorhandensein von molekulargenetisch unterschiedlichen Subgruppen für das intestinale und diffuse Magenkarzinom. Weitere Studien mit höherer Patienten-Zahl sind erforderlich, um noch deutlichere Einschätzungen zu erhalten, mit welcher Therapie behandelt werden sollte, um den größtmöglichen Nutzen für den Patienten zu erzielen.

7 Literaturverzeichnis

Abbruzzese, J., Abbruzzese, M., Hess, K., Raber, M., Lenzi, R. and Frost, P. (1994) 'Unknown primary carcinoma: natural history and prognostic factors in 657 consecutive patients.', *J Clin Oncol* 12(6): 1272-80.

Abbruzzese, J., Abbruzzese, M., Lenzi, R., Hess, K. and Raber, M. (1995) 'Analysis of a diagnostic strategy for patients with suspected tumors of unknown origin.', *J Clin Oncol* 13(8): 2094-103.

Albertson, D., Collins, C., McCormick, F. and Gray, J. (2003) 'Chromosome aberrations in solid tumors.', *Nat Genet* 34(4): 369-76.

Adachi Y, Aramaki M, Shiraishi N, Shimoda K, Yasuda K, Kitano S. Long-term survival after perforation of advanced gastric cancer: Case report and review of the literature. *Gastric Cancer*. 1998 Dec;1(1):80-83.

Almog R, Ezra G, Lavi I, Rennert G, Hagoel L. The public prefers fecal occult blood test over colonoscopy for colorectal cancer screening. *Eur J Cancer Prev*. 2008 Oct;17(5):430-7.

Alizadeh, A., Ross, D., Perou, C. and van de Rijn, M. (2001) 'Towards a novel classification of human malignancies based on gene expression patterns.', *J Pathol* 195(1): 41-52.

Alouani S, Ketchum S, Rambosson C, Eistetter HR. Transcriptional activity of the neuron-specific enolase (NSE) promoter in murine embryonic stem (ES) cells and preimplantation embryos. *Eur J Cell Biol*. 1993 Dec;62(2):324-32

Arnold R. Carcinoid tumor--a questionable entity?. *Chirurg*. 1997 Feb;68(2):132-5

Barghorn, A., Komminoth, P., Bachmann, D., Rütimann, K., Saremaslani, P., Muletta-Feurer, S., Perren, A., Roth, J., Heitz, P. and Speel, E. (2001a) 'Deletion at 3p25.3-p23 is frequently encountered in endocrine pancreatic tumours and is associated with metastatic progression.', *J Pathol* 194(4): 451-8.

Bang KM, Tillett S, Hoar SK, Blair A, McDougall V. Sensitivity of fecal hemoccult testing and flexible sigmoidoscopy for colorectal cancer screening. *J Occup Med*. 1986 Aug;28(8):709-13.

Barghorn, A., Speel, E., Farspour, B., Saremaslani, P., Schmid, S., Perren, A., Roth, J., Heitz, P. and Komminoth, P. (2001b) 'Putative tumor suppressor loci at 6q22 and 6q23-q24 are involved in the malignant progression of sporadic endocrine pancreatic tumors.', *Am J Pathol* 158(6): 1903-11.

Berković, M., Jokić, M., Marout, J., Radosević, S., Zjacić-Rotkvić, V. and Kapitanović, S. (2007) 'IL-6-174 C/G polymorphism in the gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (GEP-NETs).', *Exp Mol Pathol* 83(3): 474-9.

Berković, M., Jokić, M., Marout, J., Radosević, S., Zjacić-Rotkvić, V. and Kapitanović, S. (2010) 'IL-2 -330 T/G SNP and serum values-potential new tumor markers in neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract and pancreas (GEP-NETs).', *J Mol Med* 88(4): 423-9.

Bloom, G., Yang, I., Boulware, D., Kwong, K., Coppola, D., Eschrich, S., Quackenbush, J. and Yeatman, T. (2004) 'Multi-platform, multi-site, microarray-based human tumor classification.', *Am J Pathol* 164(1): 9-16.

Bornschein, J., Kidd, M., Malfertheiner, P. and Modlin, I. (2008) '[Gastrointestinal neuroendocrine tumors]', *Dtsch Med Wochenschr* 133(28-29): 1505-10.

- Bridgewater, J., van Laar, R., Floore, A. and Van'T Veer, L. (2008) 'Gene expression profiling may improve diagnosis in patients with carcinoma of unknown primary.', *Br J Cancer* 98(8): 1425-30.
- Buckhaults, P., Zhang, Z., Chen, Y., Wang, T., St Croix, B., Saha, S., Bardelli, A., Morin, P., Polyak, K., Hruban, R. et al. (2003) 'Identifying tumor origin using a gene expression-based classification map.', *Cancer Res* 63(14): 4144-9.
- Bozzetti F, Bonfanti G, Audisio RA, Doci R, Dossena G, Gennari L, Andreola S. Prognosis of patients after palliative surgical procedures for carcinoma of the stomach. *Surg Gynecol Obstet.* 1987 Feb;164(2):151-4.
- Bumpus, F. M. and Page, I. H. (1955) 'Serotonin and its methylated derivatives in human urine.', *J Biol Chem* 212(1): 111-6.
- Bünger S, Haug U, Kelly FM, Klempt-Giessing K, Cartwright A, Posorski N, Dibbelt L, Fitzgerald SP, Bruch HP, Roblick UJ, von Eggeling F, Brenner H, Habermann JK; BMBF-Consortium "Colorectal Cancer Screening Chip". Toward standardized high-throughput serum diagnostics: multiplex-protein array identifies IL-8 and VEGF as serum markers for colon cancer. *J Biomol Screen.* 2011 Oct;16(9):1018-26. Epub 2011 Aug 1.
- Butler M, Morel AS, Jordan WJ, Eren E, Hue S, Shrimpton RE, Ritter MA. Altered expression and endocytic function of CD205 in human dendritic cells, and detection of a CD205-DCL-1 fusion protein upon dendritic cell maturation. *Immunology.* 2007 Mar;120(3):362-71. Epub 2006 Dec 8.
- Caldas, C., Carneiro, F., Lynch, H. T., Yokota, J., Wiesner, G. L., Powell, S. M., Lewis, F. R., Huntsman, D. G., Pharoah, P. D. P., Jankowski, J. A., MacLeod, P., Vogelsang, H., and 12 others. (1999) Familial gastric cancer: overview and guidelines for management. *J. Med. Genet.* 36: 873-880.
- Capurso, G., Lattimore, S., Crnogorac-Jurcevic, T., Panzuto, F., Milione, M., Bhakta, V., Campanini, N., Swift, S., Bordi, C., Delle Fave, G. et al. (2006) 'Gene expression profiles of progressive pancreatic endocrine tumours and their liver metastases reveal potential novel markers and therapeutic targets.', *Endocr Relat Cancer* 13(2): 541-58.
- Carneiro F, Oliveira C, Leite M, Seruca R. Molecular targets and biological modifiers in gastric cancer. *Semin Diagn Pathol.* 2008 Nov;25(4):274-87. Review.
- Chen X, Leung SY, Yuen ST, Chu KM, Ji J, Li R, Chan AS, Law S, Troyanskaya OG, Wong J, So S, Botstein D, Brown PO. Variation in gene expression patterns in human gastric cancers. *Mol Biol Cell.* 2003 Aug;14(8):3208-15. Epub 2003 Apr 17.
- Ciaccio C. (1906) Sur une nouvelle espèce cellulaire dans les glandes de Lieberkühn. *CR Soc Biol.* 1: 76-78.
- Clem R.J. u. a. (1994) Control of programmed cell death by the baculovirus genes p35 and iap. In: *Mol Cell Biol* 14: 5212–5222
- Conrads TP, Hood BL, Issaq HJ, Veenstra TD. Proteomic patterns as a diagnostic tool for early-stage cancer: a review of its progress to a clinically relevant tool. *Mol Diagn.* 2004;8(2):77-85. Review.
- Conway E.M. u. a. (2002) Deficiency of survivin in transgenic mice exacerbates Fas-induced apoptosis via mitochondrial pathways. In: *Gastroenterology* 123: 619–631.
- Cordero OJ, Ayude D, Nogueira M, Rodriguez-Berrocal FJ, de la Cadena MP. Preoperative serum CD26 levels: diagnostic efficiency and predictive value for colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2000 Nov;83(9):1139-46.

Correa P. A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res.* 1988 Jul 1;48(13):3554-60. Review. No abstract available.

Crook N.E. u. a. (1993) An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc fingerlike motif. In: *J Virol* 67: 2168–2174.

Davis TL, Walker JR, Ouyang H, MacKenzie F, Butler-Cole C, Newman EM, Eisenmesser EZ, Dhe-Paganon S. The crystal structure of human WD40 repeat-containing peptidylprolyl isomerase (PPWD1). *FEBS J.* 2008 May;275(9):2283-95. Epub 2008 Apr 3.

Debons-Guillemain MC, Launay JM, Roseto A, Périès J. Serotonin and histamine production by human carcinoid cells in culture. *Cancer Res.* 1982 Apr;42(4):1513-6.

Dennis, J., Hvidsten, T., Wit, E., Komorowski, J., Bell, A., Downie, I., Mooney, J., Verbeke, C., Bellamy, C., Keith, W. et al. (2005) 'Markers of adenocarcinoma characteristic of the site of origin: development of a diagnostic algorithm.', *Clin Cancer Res* 11(10): 3766-72.

Dennis, J. and Oien, K. (2005) 'Hunting the primary: novel strategies for defining the origin of tumours.', *J Pathol* 205(2): 236-47.

Dennis, J., Vass, J., Wit, E., Keith, W. and Oien, K. (2002) 'Identification from public data of molecular markers of adenocarcinoma characteristic of the site of origin.', *Cancer Res* 62(21): 5999-6005.

De Vita F, Orditura M, Lieto E, Infusino S, Morgillo F, Martinelli E, Castellano P, Romano C, Ciardiello F, Catalano G, Pignatelli C, Galizia G. Elevated perioperative serum vascular endothelial growth factor levels in patients with colon carcinoma. *Cancer.* 2004 Jan 15;100(2):270-8.

Deyhle P. Results of endoscopic polypectomy in the gastrointestinal tract. *Endoscopy.* 1980;(Suppl):35-46. No abstract available.

Dittmar Y, Voigt R, Heise M, Rabsch A, Jandt K, Settmacher U. (2009) Indications and results of palliative gastric resection in advanced gastric carcinoma. *Zentralbl Chir.* 134(1):77-82.

Dittmar Y, Posorski N, Rauchfuss F, Voigt R, Heise M, Jandt K, Gajda M, Settmacher U. Relationship between degree of chromosomal aberration and survival in intestinal-type gastric cancer - a preliminary report based on three cases of hepatic metastasized gastric cancer with long-time survival. *Onkologie.* 2010;33(11):591-6. Epub 2010 Oct 25.

Duerr, E. and Chung, D. (2007) 'Molecular genetics of neuroendocrine tumors.', *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 21(1): 1-14.

Duerr, E., Mizukami, Y., Ng, A., Xavier, R., Kikuchi, H., Deshpande, V., Warshaw, A., Glickman, J., Kulke, M. and Chung, D. (2008) 'Defining molecular classifications and targets in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors through DNA microarray analysis.', *Endocr Relat Cancer* 15(1): 243-56.

Dumur, C., Lyons-Weiler, M., Sciulli, C., Garrett, C., Schrijver, I., Holley, T., Rodriguez-Paris, J., Pollack, J., Zehnder, J., Price, M. et al. (2008) 'Interlaboratory performance of a microarray-based gene expression test to determine tissue of origin in poorly differentiated and undifferentiated cancers.', *J Mol Diagn* 10(1): 67-77.

Erspamer, V., B. Asero (1952) Identification of enteroamine, the specific hormone of the enterochrom- affine cell system, as 5HIES. *Nature.* 169: 800-801.

- Evers BM, Ishizuka J, Townsend CM Jr, Thompson JC. The human carcinoid cell line, BON. A model system for the study of carcinoid tumors. *Ann N Y Acad Sci.* 1994 Sep 15;733:393-406.
- Feyrter F., K. Unna (1936) Über den Nachweis eines blutdrucksteigernden Stoffes im Carcinoid. *Virchows Arch.* 298: 187-194.
- Fleischer DE, Goldberg SB, Browning TH, Cooper JN, Friedman E, Goldner FH, Keffe EB, Smith LE. Detection and surveillance of colorectal cancer. *JAMA.* 1989 Jan 27;261(4):580-5. Review.
- Fitzgerald, R. C., Hardwick, R., Huntsman, D., Carneiro, F., Guilford, P., Blair, V., Chung, D. C., Norton, J., Ragnath, K., Van Krieken, J. H., Dwerryhouse, S., Caldas, C., (2009) International Gastric Cancer Linkage Consortium. Hereditary diffuse gastric cancer: updated consensus guidelines for clinical management and directions for future research. *J. Med. Genet.* 47: 436-444.
- Frebourg, T., Oliveira, C., Hochain, P., Karam, R., Manouvrier, S., Graziadio, C., Vekemans, M., Hartmann, A., Baert-Desurmont, S., Alexandre, C., Lejeune Dumoulin, S., Marroni, C., and 16 others. (2006) Cleft lip/palate and CDH1/E-cadherin mutation in families with hereditary diffuse gastric cancer. *J. Med. Genet.* 43: 138-142.
- Fujimoto D, Hirono Y, Goi T, Katayama K, Yamaguchi A. Prognostic value of protease-activated receptor-1 (PAR-1) and matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) in gastric cancer. *Anticancer Res.* 2008 Mar-Apr;28(2A):847-54.
- Fujimoto S, Mochizuki K, Shimada M, Hori T, Murayama Y, Ohashi N, Goda T. Insulin resistance induced by a high-fat diet is associated with the induction of genes related to leukocyte activation in rat peripheral leukocytes. *Life Sci.* 2010 Dec 18;87(23-26):679-85. Epub 2010 Oct 8.
- Gayther, S. A., Goringe, K. L., Ramus, S. J., Huntsman, D., Roviello, F., Grehan, N., Machado, J. C., Pinto, E., Seruca, R., Halling, K., MacLeod, P., Powell, S. M., Jackson, C. E., Ponder, B. A. J., Caldas, C. (1998) Identification of germ-line E-cadherin mutations in gastric cancer families of European origin. *Cancer Res.* 58: 4086-4089.
- Giordano, T., Shedden, K., Schwartz, D., Kuick, R., Taylor, J., Lee, N., Misek, D., Greenon, J., Kardia, S., Beer, D. et al. (2001) 'Organ-specific molecular classification of primary lung, colon, and ovarian adenocarcinomas using gene expression profiles.', *Am J Pathol* 159(4): 1231-8.
- Gosset A., P. Masson (1914) Tumeurs endocrines de l'appendice. *Presse Med.* 22: 237-240.
- Grabiec J, Owen DA. Carcinoma of the stomach in young persons. *Cancer.* 1985 Jul 15;56(2):388-96.
- Grady, W. M., Willis, J., Guilford, P. J., Dunbier, A. K., Toro, T. T., Lynch, H., Wiesner, G., Ferguson, K., Eng, C., Park, J.-G., Kim, S.-J., Markowitz, S. (2000) Methylation of the CDH1 promoter as the second genetic hit in hereditary diffuse gastric cancer. *Nature Genet.* 26: 16-17.
- Grabowski P, Schindler I, Anagnostopoulos I, Foss HD, Riecken EO, Mansmann U, Stein H, Berger G, Buhr HJ, Scherübl H. Neuroendocrine differentiation is a relevant prognostic factor in stage III-IV colorectal cancer. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;13:405-411.
- Grabowski P, Schönfelder J, Ahnert-Hilger G, Foss HD, Heine B, Schindler I, Stein H, Berger G, Zeitz M, Scherübl H. Expression of neuroendocrine markers: a signature of human undifferentiated carcinoma of the colon and rectum. *Virchows Arch* 2002;441:256-263.
- Grabowski P, Scherubl H. Survivin--an anti-apoptosis protein. *Med Sci Monit.* 2003 Nov;9(11):LE25.

Grabowski P, Kühnel T, Mühr-Wilkenshoff F, Heine B, Stein H, Höpfner M, Germer CT, Scherübl H. Prognostic value of nuclear survivin expression in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2003 Jan 13;88(1):115-9.

Grabowski P, Griss S, Arnold CN, Hörsch D, Göke R, Arnold R, Heine B, Stein H, Zeitz M, Scherübl H. Nuclear survivin is a powerful novel prognostic marker in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor disease. *Neuroendocrinology*. 2005;81(1):1-9. Epub 2005 Apr 4.

Grossman D. u. a. (2001) Transgenic expression of survivin in keratinocytes counteracts UVB-induced apoptosis and cooperates with loss of p53. In: *J Clin Invest* 108: 991–999;

Grützmann R, Molnar B, Pilarsky C, Habermann JK, Schlag PM, Saeger HD, Miehke S, Stolz T, Model F, Roblick UJ, Bruch HP, Koch R, Liebenberg V, Devos T, Song X, Day RH, Sledziewski AZ, Lofton-Day C. Sensitive detection of colorectal cancer in peripheral blood by septin 9 DNA methylation assay. *PLoS One*. 2008;3(11):e3759. Epub 2008 Nov 19.

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

Guilford, P. J., Hopkins, J. B. W., Grady, W. M., Markowitz, S. D., Willis, J., Lynch, H., Rajput, A., Wiesner, G. L., Lindor, N. M., Burgart, L. J., Toro, T. T., Lee, D., Limacher, J.-M., Shaw, D. W., Findlay, M. P. N., Reeve, A. E. (1999) E-cadherin germline mutations define an inherited cancer syndrome dominated by diffuse gastric cancer. *Hum. Mutat.* 14: 249-255.

Guo, S., Arora, C., Shimoide, A. and Sawicki, M. (2002a) 'Frequent deletion of chromosome 3 in malignant sporadic pancreatic endocrine tumors.', *Mol Cell Endocrinol* 190(1-2): 109-14.

Guo, S., Wu, A. and Sawicki, M. (2002b) 'Deletion of chromosome 1, but not mutation of MEN-1, predicts prognosis in sporadic pancreatic endocrine tumors.', *World J Surg* 26(7): 843-7.

Heitz, P. U., Kasper, M., Polak, J. M. and Klöppel, G. (1982) 'Pancreatic endocrine tumors.', *Hum Pathol* 13(3): 263-71.

Gylling A, Abdel-Rahman WM, Juhola M, Nuorva K, Hautala E, Järvinen HJ, Mecklin JP, Aarnio M, Peltomäki P. Is gastric cancer part of the tumour spectrum of hereditary non-polyposis colorectal cancer? A molecular genetic study. *Gut*. 2007 Jul;56(7):926-33. Epub 2007 Jan 31.

Habermann JK, Roblick UJ, Luke BT, Prieto DA, Finlay WJ, Podust VN, Roman JM, Oevermann E, Schiedeck T, Homann N, Duchrow M, Conrads TP, Veenstra TD, Burt SK, Bruch HP, Auer G, Ried T. Increased serum levels of complement C3a anaphylatoxin indicate the presence of colorectal tumors. *Gastroenterology*. 2006 Oct;131(4):1020-9; quiz 1284.

Hamilton JP, Meltzer SJ. A review of the genomics of gastric cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006 Apr;4(4):416-25. Review.

Han JC, Zhang KL, Chen XY, Jiang HF, Kong QY, Sun Y, Wu ML, Huang L, Li H, Liu J. Expression of seven gastric cancer-associated genes and its relevance for Wnt, NF-kappaB and Stat3 signaling. *APMIS*. 2007 Dec;115(12):1331-43.

Hanash S. Integrated global profiling of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004 Aug;4(8):638-44. Review. No abstract available

Hartgrink HH, Putter H, Klein Kranenbarg E, Bonenkamp JJ, van de Velde CJ; Dutch Gastric Cancer Group. Value of palliative resection in gastric cancer. *Br J Surg*. 2002 Nov;89(11):1438-43.

Hasegawa S, Furukawa Y, Li M, Satoh S, Kato T, Watanabe T, Katagiri T, Tsunoda T, Yamaoka Y, Nakamura Y. Genome-wide analysis of gene expression in intestinal-type gastric cancers using a complementary DNA microarray representing 23,040 genes. *Cancer Res.* 2002 Dec 1;62(23):7012-7.

Helzlsouer KJ, Erlinger TP, Platz EA. C-reactive protein levels and subsequent cancer outcomes: results from a prospective cohort study. *Eur J Cancer.* 2006 Apr;42(6):704-7. Epub 2006 Mar 2.

Herbst A, Rahmig K, Stieber P, Philipp A, Jung A, Ofner A, Crispin A, Neumann J, Lamerz R, Kolligs FT. Methylation of NEUROG1 in serum is a sensitive marker for the detection of early colorectal cancer. *Am J Gastroenterol.* 2011 Jun;106(6):1110-8. Epub 2011 Feb 15

Hliscs R, Mühlig P, Claussen U. The spreading of metaphases is a slow process which leads to a stretching of chromosomes. *Cytogenet Cell Genet.* 1997;76(3-4):167-71

Hoffman, G. E., Le, W. W. and Sita, L. V. (2008) 'The importance of titrating antibodies for immunocytochemical methods.', *Curr Protoc Neurosci* Chapter 2: Unit 2.12.

Horlings, H., van Laar, R., Kerst, J., Helgason, H., Wesseling, J., van der Hoeven, J., Warmoes, M., Floore, A., Witteveen, A., Lahti-Domenici, J. et al. (2008) 'Gene expression profiling to identify the histogenetic origin of metastatic adenocarcinomas of unknown primary.', *J Clin Oncol* 26(27): 4435-41.

Höcker, M. and Wiedenmann, B. (1998) 'Molecular mechanisms of enteroendocrine differentiation.', *Ann N Y Acad Sci* 859: 160-74.

Hsu TC (1952) 'Mammalian chromosomes in vitro. 1. karyotype of man.', *J of Hereditary* 43:167-172.

Isler, P. and Heidinger, C. (1953) '[Metastatic carcinoid of the small intestine with severe valvular defects especially in the right part of the heart and with pulmonary stenosis; a peculiar symptom complex].', *Schweiz Med Wochenschr* 83(1): 4-7.

Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature.* 1993 Jun 10;363(6429):558-61.

Kappler M (2005) Molekulare Charakterisierung des IAP Survivin in Weichteilsarkomen: Bedeutung für Prognose und Etablierung neuer Therapiestrategien. Dissertation, Universität Halle-Wittenberg.

Kato M, Khan S, Gonzalez N, O'Neill BP, McDonald KJ, Cooper BJ, Angel NZ, Hart DN. Hodgkin's lymphoma cell lines express a fusion protein encoded by intergenically spliced mRNA for the multilectin receptor DEC-205 (CD205) and a novel C-type lectin receptor DCL-1. *J Biol Chem.* 2003 Sep 5;278(36):34035-41. Epub 2003 Jun 24.

Kato M, Khan S, d'Aniello E, McDonald KJ, Hart DN. The novel endocytic and phagocytic C-Type lectin receptor DCL-1/CD302 on macrophages is colocalized with F-actin, suggesting a role in cell adhesion and migration. *J Immunol.* 2007 Nov 1;179(9):6052-63.

Kato M. Dysregulation of stem cell signaling network due to germline mutation, SNP, Helicobacter pylori infection, epigenetic change and genetic alteration in gastric cancer. *Cancer Biol Ther.* 2007 Jun;6(6):832-9. Epub 2007 Mar 26. Review.

Khan, J., Wei, J., Ringnér, M., Saal, L., Ladanyi, M., Westermann, F., Berthold, F., Schwab, M., Antonescu, C., Peterson, C. et al. (2001) 'Classification and diagnostic prediction of cancers using gene expression profiling and artificial neural networks.', *Nat Med* 7(6): 673-9.

- Klöpffel, G. and Heitz, P. U. (1988) 'Pancreatic endocrine tumors.', *Pathol Res Pract* 183(2): 155-68.
- Klöpffel G, Clemens A. The biological relevance of gastric neuroendocrine tumors. *Yale J Biol Med*. 1996 Jan-Feb;69(1):69-74.
- Klöpffel G. Classification of neuroendocrine tumors. *Verh Dtsch Ges Pathol*. 1997;81:111-7.
- Klöpffel G, Perren A, Heitz PU. The gastroenteropancreatic neuroendocrine cell system and its tumors: the WHO classification. *Ann N Y Acad Sci*. 2004 Apr;1014:13-27.
- Klöpffel, G., Rindi, G., Perren, A., Komminoth, P. and Klimstra, D. S. (2010) 'The ENETS and AJCC/UICC TNM classifications of the neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract and the pancreas: a statement.', *Virchows Arch* 456(6): 595-7.
- Komminoth, P., Roth, J., Muletta-Feurer, S., Saremaslani, P., Seelentag, W. and Heitz, P. (1996) 'RET proto-oncogene point mutations in sporadic neuroendocrine tumors.', *J Clin Endocrinol Metab* 81(6): 2041-6.
- Krieg RC, Paweletz CP, Liotta LA, Petricoin EF 3rd. Clinical proteomics for cancer biomarker discovery and therapeutic targeting. *Technol Cancer Res Treat*. 2002 Aug;1(4):263-72. Review.
- Kulke, M. H., Freed, E., Chiang, D. Y., Philips, J., Zahrieh, D., Glickman, J. N. and Shivdasani, R. A. (2008) 'High-resolution analysis of genetic alterations in small bowel carcinoid tumors reveals areas of recurrent amplification and loss.', *Genes Chromosomes Cancer* 47(7): 591-603.
- Kulschitzky N. (1897) Zur Frage über den Bau des Darmkanals. *Arch Microsk Anat*. 49: 70-111.
- Kytölä, S., Höög, A., Nord, B., Cedermark, B., Frisk, T., Larsson, C. and Kjellman, M. (2001) 'Comparative genomic hybridization identifies loss of 18q22-qter as an early and specific event in tumorigenesis of midgut carcinoids.', *Am J Pathol* 158(5): 1803-8.
- Laurén P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1965;64:31-49.
- Lawrence W Jr, McNeer G. The effectiveness of surgery for palliation of incurable gastric cancer. *Cancer*. 1958 Jan-Feb;11(1):28-32. No abstract available.
- Lembeck, F. (1953) 5-Hydroxytryptamine in a carcinoid tumour. *Nature*. 172: 910-911
- Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature*. 1998 Dec 10;396(6711):580-4.
- Li F, Ackermann EJ, Bennett CF, Rothermel AL, Plescia J, Tognin S, Villa A, Marchisio PC, Altieri DC. Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with survivin function. *Nat Cell Biol*. 1999 Dec;1(8):461-6.
- Lin SZ, Tong HF, You T, Yu YJ, Wu WJ, Chen C, Zhang W, Ye B, Li CM, Zhen ZQ, Xu JR, Zhou JL. Palliative gastrectomy and chemotherapy for stage IV gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2008 Feb;134(2):187-92. Epub 2007 Jul 5.
- Lisi D, Hassan CC, Crespi M; AMOD Study Group. Participation in colorectal cancer screening with FOBT and colonoscopy: an Italian, multicentre, randomized population study. *Dig Liver Dis*. 2010 May;42(5):371-6. Epub 2009 Sep 10

Lofton-Day C, Model F, Devos T, Tetzner R, Distler J, Schuster M, Song X, Lesche R, Liebenberg V, Ebert M, Molnar B, Grützmann R, Pilarsky C, Sledziewski A. DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening. *Clin Chem*. 2008 Feb;54(2):414-23. Epub 2007 Dec 18.

Lubensky, I. and Zhuang, Z. (2007) 'Molecular genetic events in gastrointestinal and pancreatic neuroendocrine tumors.', *Endocr Pathol* 18(3): 156-62.

Lundqvist M, Mark J, Funa K, Heldin NE, Morstyn G, Wedell B, Layton J, Oberg K. Characterisation of a cell line (LCC-18) from a cultured human neuroendocrine-differentiated colonic carcinoma. *Eur J Cancer*. 1991;27(12):1663-8.

Löllgen, R. M., Hessman, O., Szabo, E., Westin, G. and Akerström, G. (2001) 'Chromosome 18 deletions are common events in classical midgut carcinoid tumors.', *Int J Cancer* 92(6): 812-5.

Ma, X., Patel, R., Wang, X., Salunga, R., Murage, J., Desai, R., Tuggle, J., Wang, W., Chu, S., Stecker, K. et al. (2006) 'Molecular classification of human cancers using a 92-gene real-time quantitative polymerase chain reaction assay.', *Arch Pathol Lab Med* 130(4): 465-73.

Mak T, Lalloo F, Evans DG, Hill J. Molecular stool screening for colorectal cancer. *Br J Surg*. 2004 Jul;91(7):790-800. Review.

Melle, C., Ernst, G., Schimmel, B., Bleul, A. and von Eggeling, F. (2008) 'Colon-derived liver metastasis, colorectal carcinoma, and hepatocellular carcinoma can be discriminated by the Ca(2+)-binding proteins S100A6 and S100A11.', *PLoS One* 3(12): e3767.

Miner TJ, Jaques DP, Karpeh MS, Brennan MF. Defining palliative surgery in patients receiving noncurative resections for gastric cancer. *J Am Coll Surg*. 2004 Jun;198(6):1013-21.

Modlin, I., Oberg, K., Chung, D., Jensen, R., de Herder, W., Thakker, R., Caplin, M., Delle Fave, G., Kaltsas, G., Krenning, E. et al. (2008) 'Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours.', *Lancet Oncol* 9(1): 61-72.

Moehler M, Galle PR, Gockel I, Junginger T, Schmidberger H. The multidisciplinary management of gastrointestinal cancer. Multimodal treatment of gastric cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2007;21(6):965-81. Review.

Moll, R. (2009) '[The initial CUP situation and CUP-Syndrome: pathological diagnostics]', *Pathologe* 30 Suppl 2: 161-7.

Monzon, F., Lyons-Weiler, M., Buturovic, L., Rigl, C., Henner, W., Sciulli, C., Dumur, C., Medeiros, F. and Anderson, G. (2009) 'Multicenter validation of a 1,550-gene expression profile for identification of tumor tissue of origin.', *J Clin Oncol* 27(15): 2503-8.

Möslein G. [Hereditary colorectal cancer]. *Chirurg*. 2008 Nov;79(11):1038-46. Review. German

Mroczo B, Szmitkowski M, Wereszczyńska-Siemiatkowska U, Okulczyk B, Kedra B. Pretreatment serum levels of hematopoietic cytokines in patients with colorectal adenomas and cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2007 Jan;22(1):33-8. Epub 2006 Mar 7.

Mujumdar, R. B., Ernst, L. A., Mujumdar, S. R., Lewis, C. J. and Waggoner, A. S. (1993) 'Cyanine dye labeling reagents: sulfoindocyanine succinimidyl esters.', *Bioconjug Chem* 4(2): 105-11.

Müller M. (2004) Survivin und seine alternativen Spleißvarianten: Untersuchungen zu ihrer Bedeutung für eine Zytostatika-induzierte Apoptose und ihren molekularen Interaktionspartnern. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

- Oberg, K. (2009) 'Genetics and molecular pathology of neuroendocrine gastrointestinal and pancreatic tumors (gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors).', *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 16(1): 72-8.
- Oberndorfer, S. (1907) Karzinoide Tumoren des Dünndarms. Frankfurt Z Pathol. 1: 426-429.
- O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *J Natl Cancer Inst.* 2004 Oct 6;96(19):1420-5
- Ouchi K, Sugawara T, Ono H, Fujiya T, Kamiyama Y, Kakugawa Y, Mikuni J, Yamanami H. Therapeutic significance of palliative operations for gastric cancer for survival and quality of life. *J Surg Oncol.* 1998 Sep;69(1):41-4.
- Page, I. H., Corcoran, A. C., Udenfriend, S., Szoedsma, A. and Weissbach, H. (1955) 'Argentaffinoma as endocrine tumour.', *Lancet* 268(6856): 198-9.
- Panzuto, F., Nasoni, S., Falconi, M., Corleto, V., Capurso, G., Cassetta, S., Di Fonzo, M., Tornatore, V., Milione, M., Angeletti, S. et al. (2005) 'Prognostic factors and survival in endocrine tumor patients: comparison between gastrointestinal and pancreatic localization.', *Endocr Relat Cancer* 12(4): 1083-92.
- Pape U.-F. (2000) 'Diagnostik und Therapie gastroenteropankreatischer neuroendokriner Tumore aus internistischer Sicht.' *Der Onkologe* 6/7: 105-113
- Park JG, Oie HK, Sugarbaker PH, Henslee JG, Chen TR, Johnson BE, Gazdar A. Characteristics of celllines established from human colorectal carcinoma. *Cancer Res* 1987;47:6710-6718.
- Park, S., Kim, B., Kim, J., Lee, S. and Kang, G. (2007) 'Panels of immunohistochemical markers help determine primary sites of metastatic adenocarcinoma.', *Arch Pathol Lab Med* 131(10): 1561-7.
- Pigorsch S. (2004) 'Strahlentherapie neuroendokriner Tumoren.' *Der Onkologe* 10:1092–1097.
- Quinn LA, Moore GE, Morgan RT, Woods LK. Cell lines from human colon carcinoma with unusual cell products, double minutes, and homogeneously staining regions. *Cancer Res* 1979;39:4914-4924.
- Ramaswamy, S., Tamayo, P., Rifkin, R., Mukherjee, S., Yeang, C., Angelo, M., Ladd, C., Reich, M., Latulippe, E., Mesirov, J. et al. (2001) 'Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures.', *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(26): 15149-54.
- Ramos M, Llagostera M, Esteva M, Cabeza E, Cantero X, Segarra M, Martín-Rabadán M, Artigues G, Torrent M, Taltavull JM, Vanrell JM, Marzo M, Llobera J. Knowledge and attitudes of primary healthcare patients regarding population-based screening for colorectal cancer. *BMC Cancer.* 2011 Sep 25;11(1):408.
- Ranson, W.B. (1890) A case of primary carcinoma of the ileum. *Lancet* 2: 1020.
- Rapport M.M., A.A. Green, I.C. Page (1948) Serum vasoconstrictor (Serotonin). Isolation and characterization. *J Biol Chem.* 176 (3): 1243-1251.
- ReMine WH. Palliative operations for incurable gastric cancer. *World J Surg.* 1979 Nov;3(6):721-9.
- Rindi, G., Klöppel, G., Alhman, H., Caplin, M., Couvelard, A., de Herder, W. W., Eriksson, B., Falchetti, A., Falconi, M., Komminoth, P. et al. (2006) 'TNM staging of foregut (neuro)endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system.', *Virchows Arch* 449(4): 395-401.

- Rindi, G., Klöppel, G., Couvelard, A., Komminoth, P., Körner, M., Lopes, J. M., McNicol, A. M., Nilsson, O., Perren, A., Scarpa, A. et al. (2007) 'TNM staging of midgut and hindgut (neuro) endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system.', *Virchows Arch* 451(4): 757-62.
- Rindi G, Klöppel G. Endocrine tumors of the gut and pancreas tumor biology and classification. *Neuroendocrinology*. 2004;80 Suppl 1:12-5.
- Rinke, A., Müller, H., Schade-Brittinger, C., Klose, K., Barth, P., Wied, M., Mayer, C., Aminossadati, B., Pape, U., Bläker, M. et al. (2009) 'Placebo-controlled, double-blind, prospective, randomized study on the effect of octreotide LAR in the control of tumor growth in patients with metastatic neuroendocrine midgut tumors: a report from the PROMID Study Group.', *J Clin Oncol* 27(28): 4656-63.
- Roessler M, Rollinger W, Palme S, Hagmann ML, Berndt P, Engel AM, Schneidinger B, Pfeffer M, Andres H, Karl J, Bodenmüller H, Rüschoff J, Henkel T, Rohr G, Rossol S, Rösch W, Langen H, Zolg W, Tacke M. Identification of nicotinamide N-methyltransferase as a novel serum tumor marker for colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2005 Sep 15;11(18):6550-7.
- Sarela AI, Miner TJ, Karpeh MS, Coit DG, Jaques DP, Brennan MF. Clinical outcomes with laparoscopic stage M1, unresected gastric adenocarcinoma. *Ann Surg*. 2006 Feb;243(2):189-95.
- Schmitt-Gräff, A., Nitschke, R. and Wiedenmann, B. (2001) '[Gastroenteropancreatic neuroendocrine/endocrine tumors. Current pathologic-diagnostic view].', *Pathologe* 22(2): 105-13.
- Scholzen, T. and Gerdes, J. (2000) 'The Ki-67 protein: from the known and the unknown.', *J Cell Physiol* 182(3): 311-22.
- Shedden, K., Taylor, J., Enkemann, S., Tsao, M., Yeatman, T., Gerald, W., Eschrich, S., Jurisica, I., Giordano, T., Misek, D. et al. (2008) 'Gene expression-based survival prediction in lung adenocarcinoma: a multi-site, blinded validation study.', *Nat Med* 14(8): 822-7.
- Shen L, Toyota M, Kondo Y, Lin E, Zhang L, Guo Y, Hernandez NS, Chen X, Ahmed S, Konishi K, Hamilton SR, Issa JP. Integrated genetic and epigenetic analysis identifies three different subclasses of colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Nov 20;104(47):18654-9. Epub 2007 Nov 14.
- Silva EM, Begnami MD, Fregnani JH, Pelosof AG, Zitron C, Montagnini AL, Soares FA. Cadherin-catenin adhesion system and mucin expression: a comparison between young and older patients with gastric carcinoma. *Gastric Cancer*. 2008;11(3):149-59. Epub 2008 Sep 30.
- Solcia E., C. Capella, R. Buffa, et al. (1981) The diffuse endocrine-paracrine system of the gut in health and disease: ultrastructural features. *Scand J Gastroenterol Suppl*. 70: 25-36
- Solcia E, Klersy C, Mastracci L, Alberizzi P, Candusso ME, Diegoli M, Tava F, Riboni R, Manca R, Luinetti O. A combined histologic and molecular approach identifies three groups of gastric cancer with different prognosis. *Virchows Arch*. 2009 Sep;455(3):197-211. Epub 2009 Aug 12.
- Spurbeck JL, Zinsmeister AR, Meyer KJ, Jalal SM. Dynamics of chromosome spreading. *Am J Med Genet*. 1996 Feb 2;61(4):387-93.
- Stivanello, M., Berruti, A., Torta, M., Termine, A., Tampellini, M., Gorzegno, G., Angeli, A. and Dogliotti, L. (2001) 'Circulating chromogranin A in the assessment of patients with neuroendocrine tumours. A single institution experience.', *Ann Oncol* 12 Suppl 2: S73-7.

Su, A., Welsh, J., Sapinoso, L., Kern, S., Dimitrov, P., Lapp, H., Schultz, P., Powell, S., Moskaluk, C., Frierson, H. J. et al. (2001) 'Molecular classification of human carcinomas by use of gene expression signatures.', *Cancer Res* 61(20): 7388-93.

Srinivas PR, Srivastava S, Hanash S, Wright GL Jr. Proteomics in early detection of cancer. *Clin Chem*. 2001 Oct;47(10):1901-11. Review

Talantov, D., Baden, J., Jatkoa, T., Hahn, K., Yu, J., Rajpurohit, Y., Jiang, Y., Choi, C., Ross, J., Atkins, D. et al. (2006) 'A quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay to identify metastatic carcinoma tissue of origin.', *J Mol Diagn* 8(3): 320-9.

Terashima M, Maesawa C, Oyama K, Ohtani S, Akiyama Y, Ogasawara S, Takagane A, Saito K, Masuda T, Kanzaki N, Matsuyama S, Hoshino Y, Kogure M, Gotoh M, Shirane M, Mori K. Gene expression profiles in human gastric cancer: expression of maspin correlates with lymph node metastasis. *Br J Cancer*. 2005 Mar 28;92(6):1130-6.

Thomas P, Gangopadhyay A, Steele G Jr, Andrews C, Nakazato H, Oikawa S, Jessup JM. The effect of transfection of the CEA gene on the metastatic behavior of the human colorectal cancer cell line MIP-101. *Cancer Lett*. 1995 May 25;92(1):59-66.

Thorson, A., G. Björk, G. Björkman, J. Waldenström (1954) Malignant carcinoid of the small intestine with metastases to the liver, valvular disease of the right heart (pulmonary stenosis and tricuspid regurgitation without septal defect), peripheral vasomotor symptoms, bronchoconstriction and an unusual type of cyanosis. *Am Heart J*. 47: 795-817.

Tiling, N., Ricke, J. and Wiedenmann, B. (2002) '[Neuroendocrine tumors of the gastrointestinal-pancreatic system. Classification and diagnosis].', *Internist (Berl)* 43(2): 210-8.

Tomassetti, P., Campana, D., Piscitelli, L., Casadei, R., Nori, F., Brocchi, E., Santini, D., Pezzilli, R. and Corinaldesi, R. (2006) 'Endocrine tumors of the ileum: factors correlated with survival.', *Neuroendocrinology* 83(5-6): 380-6.

Tomassetti, P., Campana, D., Piscitelli, L., Casadei, R., Santini, D., Nori, F., Morselli-Labate, A., Pezzilli, R. and Corinaldesi, R. (2005) 'Endocrine pancreatic tumors: factors correlated with survival.', *Ann Oncol* 16(11): 1806-10.

Tothill, R., Kowalczyk, A., Rischin, D., Bousioutas, A., Haviv, I., van Laar, R., Waring, P., Zalberg, J., Ward, R., Biankin, A. et al. (2005) 'An expression-based site of origin diagnostic method designed for clinical application to cancer of unknown origin.', *Cancer Res* 65(10): 4031-40.

van Laar, R., Ma, X., de Jong, D., Wehkamp, D., Floore, A., Warmoes, M., Simon, I., Wang, W., Erlander, M., van't Veer, L. et al. (2009) 'Implementation of a novel microarray-based diagnostic test for cancer of unknown primary.', *Int J Cancer* 125(6): 1390-7.

Varadhachary, G., Talantov, D., Raber, M., Meng, C., Hess, K., Jatkoa, T., Lenzi, R., Spigel, D., Wang, Y., Greco, F. et al. (2008) 'Molecular profiling of carcinoma of unknown primary and correlation with clinical evaluation.', *J Clin Oncol* 26(27): 4442-8.

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*. 1988 Sep 1;319(9):525-32.

von Eggeling F, Ernst G. Microdissected tissue: an underestimated source for biomarker discovery? *Biomark Med*. 2007 Aug;1(2):217-9.

- Vortmeyer AO, Lubensky IA, Merino MJ, Wang CY, Pham T, Furth EE, Zhuang Z. (1997) Concordance of genetic alterations in poorly differentiated colorectal neuroendocrine carcinomas and associated adenocarcinomas. *J Natl Cancer Inst* 89: 1448-1453.
- Wagner HE, Thomas P, Wolf BC, Zamcheck N, Jessup JM, Steele GD, Jr. Characterization of the tumorigenic and metastatic potential of a poorly differentiated human colon cancer cell line. *Invasion Metastasis* 1990;10:253-266.
- Wang, E., Ebrahimi, S., Wu, A., Kashefi, C., Passaro, E. J. and Sawicki, M. (1998) 'Mutation of the MENIN gene in sporadic pancreatic endocrine tumors.', *Cancer Res* 58(19): 4417-20.
- Wang, G. G., Yao, J. C., Worah, S., White, J. A., Luna, R., Wu, T. T., Hamilton, S. R. and Rashid, A. (2005) 'Comparison of genetic alterations in neuroendocrine tumors: frequent loss of chromosome 18 in ileal carcinoid tumors.', *Mod Pathol* 18(8): 1079-87.
- Warner, R. R. (2005) 'Enteroendocrine tumors other than carcinoid: a review of clinically significant advances.', *Gastroenterology* 128(6): 1668-84.
- Washington: *7th edition of the AJCC cancer staging manual: stomach*. In: *Ann Surg Oncol* 17, 2010, 3077-79.
- Weikert, S. (2007) *Der Apoptose-Inhibitor Survivin: Ein Tumormarker mit dem Expressionsprofil eines Cancer/Testis-Antigens*. Habilitationsschrift, FU Berlin.
- Williams, E. D. and Sandler, M. (1963) 'The classification of carcinoid tumors.', *Lancet* 1(7275): 238-9.
- Whitlock EP, Lin J, Liles E, Beil T, Fu R, O'Connor E, Thompson RN, Cardenas T. Screening for Colorectal Cancer: An Updated Systematic Review [Internet]. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US); 2008 Oct.
- Xin B, Platzer P, Fink SP, Reese L, Nosrati A, Willson JK, Wilson K, Markowitz S. Colon cancer secreted protein-2 (CCSP-2), a novel candidate serological marker of colon neoplasia. *Oncogene*. 2005 Jan 20;24(4):724-31.
- Yasuda S, Hasegawa T, Hosono T, Satoh M, Watanabe K, Ono K, Shimizu S, Hayakawa T, Yamaguchi T, Suzuki K, Sato Y. AW551984: a novel regulator of cardiomyogenesis in pluripotent embryonic cells. *Biochem J*. 2011 Jul 15;437(2):345-55.
- Yeang, C., Ramaswamy, S., Tamayo, P., Mukherjee, S., Rifkin, R., Angelo, M., Reich, M., Lander, E., Mesirov, J. and Golub, T. (2001) 'Molecular classification of multiple tumor types.', *Bioinformatics* 17 Suppl 1: S316-22.
- Yuhas, J. and Pazmiño, N. (1974) 'Inhibition of subcutaneously growing line 1 carcinomas due to metastatic spread.', *Cancer Res* 34(8): 2005-10.
- Zhao, J., Moch, H., Scheidweiler, A., Baer, A., Schäffer, A., Speel, E., Roth, J., Heitz, P. and Komminoth, P. (2001) 'Genomic imbalances in the progression of endocrine pancreatic tumors.', *Genes Chromosomes Cancer* 32(4): 364-72.
- Zikusoka, M., Kidd, M., Eick, G., Latich, I. and Modlin, I. (2005) 'The molecular genetics of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors.', *Cancer* 104(11): 2292-309.

Anhang

Tabelle I: Klassifizierung und Hauptsymptome der häufigsten GEP-NETs

Name (Syndrom)	Leitsymptome	verantwort. Hormon	andere Hormone	Malignität (%)	Lokalisation des Primum	Metastasen
Karzinoid-Syndrom	Flush, Diarrhö, Bronchial-Obstruktion, Dyspnoe, Rechtsherz-insuffizienz, Pellagra	Serotonin	Tachykinine, Prostaglandine, Chromogranin A	100	Ileum	Leber, Pankreas (selten)
Insulinom	Hypoglykämie	Insulin	Glukagon, PP	10-15	Pankreas	sehr selten
Gastrinom (Zollinger-Ellison-Syndrom)	petische, (rez.) Ulzera, Diarrhö, Refluxoesophagitis	Gastrin	Insulin, PP, Glukagon, Somatostatin, Chromogranin A, ACTH	30-50	Pankreas (30%), Duodenum (60%)	Duodenum, Magen, Mesenterium
Glukagonom (Glukagonom-Syndrom)	Diabetes mellitus, Glucose-intolleranz, nekrolytisches migranes Erythem	Glukagon	Insulin, PP, Somatostatin, Chromogranin A	50	Pankreas	selten
VIPom (Verner-Morrison-Syndrom; Pankreatische Cholera)	dramatische, wässrige Diarrhö, Hypokaliämie, Hypochlorhydrie	VIP, PHI	Glukagon, PP, Somatostatin, Chromogranin A	75	Pankreas	
Somatostatinom	Diabetes mellitus, Steatorrhoe, Gallensteine	Somatostatin	Insulin, PP, Calcitonin	50	Pankreas	Duodenum
GHRHom	Akromegalie	GHRH	Somatostatin, Gastrin, Insulin, CgA	100	Pankreas	Lunge
CRHom, ACTHom	Cushing-Syndrom	CRH, ACTH	Gastrin, PP, CgA	> 90	Pankreas	Lunge

Tabelle II: Alle individuellen Aberrationen in neun Patienten mit Magenkarzinom

Chromosom	Region	10629/08	8405/08	12167/05	3666/05	20048/06	26496/04	8566/08	20373/08	6040/02
			verstorben	verstorben	verstorben		tumorfrei	tumorfrei	tumorfrei	tumorfrei
		intestinal	intestinal	intestinal	diffus	intestinal	intestinal	diffus	intestinal	intestinal
1	p36.33	A					A			
1	p36.33-p36.31					D				
1	p36.33-p36.11			A						
1	p36.21-p36.13					A				
1	p36.12-p35.2					D				
1	p36.11-p21.3			D						
1	p34.3-p31.3					A				
1	p22.3-p13.1					D				
1	q23.3-q32.1					A				
1	q32.1					A				
2	p22.1-p11.1			A						
2	q14.2-q21.2					D				
2	q13-q22.3			D						
2	q24.1-q31.1					D				
3	p26.3-p12.1			D						
3	p24.3-p22.3					D				
3	p21.31-p14.3					D				
3	q11.2-q29	A								
3	q13.33-q22.3					D				
3	q13.33-q29			A						
3	q25.1-q29							A		
3	q26.31						A			
3	q27.2-q29					D				
4	p16.2-q35.1	D								
4	p16.3-p15.2						D			
4	p15.2-p15.1						A			
4	q13.2-q35.2			D						

Anhang

4	q25-q35.2					D				
4	q31.3			A						
5	p15.33	A								
5	p15.33-p14.3			A						
5	p15.1-p13.2					A				
5	p14.3-p13.3				D					
5	p11-q31.2					D				
5	p11-q35.3				D					
5	q35.3		A							
6	p25.3-p22.1	D								
6	p25.3-p22.2				D					
6	p22.2-p22.1						A			
6	p22.1-q27	A								
6	p21.33			A						
6	p21.32-p12.1			A						
6	q11.1-q27				D					
6	q15-16.1						D			
6	q21-q25.3						A			
6	q27						D			
7	p22.3-q22.2	A								
7	p22.3-p11.2							A		
7	p11.2-q11.23							D		
7	q11.23-q33							A		
7	q36.1-q36.3					D				
8	p23.3-q24.3	A							A	
8	p23.3-p12					D				
8	p23.3-p11.21				D					
8	q21.13-q21.3							A		
8	q11.1-q11.22				D					
8	q11.23-q12.1						D			
8	q13.2-q13.3						D			
8	q22.2-q24.23						A			
8	q24.3	A	A	A						
9	p24.3-p21.3				D					
9	p13.3	A								
9	p24.3-p13.1						D			
9	q34.13-q34.3	A								
9	q34.3			A						
10	p15.3-p13								A	
10	p15.3-p11.23				D					
10	p11.23-p11.22				A					
10	p11.22-q26.3				D					
10	p15.3-q21.2						D			
10	q21.2-q21.3						A			
10	q21.3-q22.1						D			
10	q22.2-q23.2						A			
10	q26.3							A		
11	p15.5-p14.2						D			
11	p13							A		
11	p15.5-p12				D					
11	p11.2-q11				D					
11	q12.2-q13.5				A					
11	q22.3-q25						D			
12	p13.33-p13.1				A					
12	p13.1-p11.1				A					
12	q12-q13-13				D					
12	q13.13				A					
12	q13.2				A					
12	q13.2-q13.3				D					
12	q13.3-q14.1				A					

Anhang

12	q14.1-q14.3			D						
12	q14.3-q21.1			A						
12	q15-q21.2					A				
12	q21.1-q24.33			D						
12	q24.12-q24.21						A			
12	q24.32-q24.33				D					
12	q24.31-q24.33					D				
13	q14.11-q34			D						
13	q14.3-q31.1					A				
13	q21.1-q31.1					A				
13	q22.1			A						
13	q33.3-q34					A				
14	q11.2						D	D		
14	q11.2-q23.3			A						
14	q32.33	A	A	A		A	A		A	A
14	q23.1-q32.33					D				
15	q11.2		D		A	D				
15	q11.2-q14			A						
15	q13.3-q14						A			
15	q15.1-q21.2					A				
15	q21.2-q22.2					D				
15	q22.2-q26.3			A						
16	p13.3	A								
16	p12.3-p12.1					A				
16	p12.1					D				
16	p12.1-p11.2					A				
16	p11.2					D				
16	p11.2					A				
16	q23.1			D						
17	p13.2-p11.2					D				
17	p13.3-p11.2			D						
17	p11.1-q25.3	A								
17	p11.2			A						
17	q11.1-q21.2						A			
17	q11.1-q25.3			A						
17	q25.3		A				A			A
18	p11.32-q23			D						
18	q12.2-q23	D				D				
19	p13.3					D				
19	p13.3-13.12			D						
19	p12	D								
19	p12-q12			D						
19	q12-q13.31					D				
19	q12-q13.43			A						
20	p13			A						
20	p13-p12.1					A				
20	p11.21-q11.1	A								
20	q11.1-q11.21					A				
20	q11.21-q12	A								
20	q11.21-q11.23					D				
20	q13.13-q13.33					A				
20	q13.33	A								
21	q21.1-q22.12					A				
21	q22.2-q22.3			A						
21	q22.12					D				
22	q11.1-q11.21			D						
22	q11.21-q13.33			A						
22	q13.31				A					
Anzahl Aberrationen		14A/4D	5A/1D	28A/26D	2A/1D	23A/34D	12A/2D	4A/1D	1A/1D	2A/0D
Aberrationen in Prozent		26,30%	0,40%	53,25%	0,16%	31,70%	6,11%	6,40%	0,02%	0,05%

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Nicole Posorski
Geburtsdatum: 24.11.1981 in Suhl
Anschrift: Saalstr. 8a, 07743 Jena
Telefon: 0175/1757786
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1988-1992 Ernst-Thälmann-Schule, Sonneberg
1992-2000 Heinrich-Heine-Gymnasium, Sonneberg; Abschluss: Abitur

Studium

2000-2007 Friedrich-Schiller-Universität Jena
Studium der Biologie
Abschluss: **November 2007 als Diplom-Biologin; Note: 1.1**
Hauptfach: Genetik
Nebenfächer: Anatomie und Anthropologie

2005-2006 10 monatiges Biologie-Studium an der Faculty of Life Sciences an der Universität von Manchester (UK), verbunden mit einem 5-monatigen Forschungs-Praktikum in der AG Molekulare Parasitologie von Prof. Dr. J.E. Hyde an der Faculty of Life Science in Manchester (UK). **Thema: Isolierung des SHMT-Genes (Serine-hydroxymethyltransferase) vom humanen Malaria-Parasit *Plasmodium falciparum* und dessen Expression in einem *E.coli* System.**

2006-2007 Diplomarbeit am Institut für Humangenetik und Anthropologie, FSU-Jena. **Thema: Nachweis von Genom-Imbalancen mit dem 100K SNP-Array von Affymetrix beim kindlichen Nebennierenrinden-Karzinom.**

seit Dezember 2007 Doktorarbeit am Institut für Humangenetik und Anthropologie, FSU-Jena. **Thema: Biologische und funktionale Charakterisierung von Tumoren im Gastrointestinaltrakt durch genomweite Genexpressions-Analyse und Identifizierung von potenziellen Tumormarkern.**

Berufspraxis

- 2003 6-wöchiges Betriebspraktikum in der AG Pflanzliche Molekularbiologie von Prof. Dr. R. Hell am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben. Thema: Charakterisierung von Sulfatmangel-induzierbaren Transkriptionsfaktoren aus *Arabidopsis thaliana*.
- 2003 2-wöchiges zytogenetisches und molekulargenetisches Praktikum in der AG Tumorgenetik von Dr. Loncarevic am Institut für Humangenetik und Anthropologie an der FSU-Jena.
- 2004 2-wöchiges Praktikum in der AG Gynäkologische Molekularbiologie von PD Dr. A. Henke an der Universitäts-Frauenklinik in Jena.
- 2006 5-monatiges Forschungs-Praktikum in der AG Molekulare Parasitologie von Prof. Dr. J.E. Hyde an der Faculty of Life Science in Manchester (UK). Thema: Isolierung des SHMT-Genes (Serine-hydroxymethyltransferase) vom humanen Malaria-Parasit *Plasmodium falciparum* und dessen Expression in einem *E.coli* System.

Berufspraxis als wissenschaftliche Hilfskraft

- 2003 7-monatige Arbeit in der AG Molekularbiologie von Dr. S. Wölfl am Klinikum für Innere Medizin (KIM) in Jena. Thema: Auswirkung von niedrig dosiertem MMS auf den Kohlehydrat-Metabolismus von *S.cerevisiae*.
- 2004-2005 15-monatige Arbeit in der Abteilung Biochemie von Dr. J. Degenhardt am Max-Planck-Institut (MPI) für chemische Ökologie in Jena. Thema: Auswirkung von Terpenen und Bt-Toxin auf den Herbivorenbefall von Mais.

Sprachen

Deutsch, Muttersprache
Englisch, konversationsfähig

EDV-Kenntnisse

MS Word, Excel, PowerPoint
GCOS, GTYPE von Affymetrix
ISIS von MetaSystems
CGH Analytics und Gene Spring von Agilent

Eigene Publikationsliste:

Bünger S, Haug U, Kelly FM, Klempt-Giessing K, Cartwright A, **Posorski N**, Dibbelt L, Fitzgerald SP, Bruch HP, Roblick UJ, von Eggeling F, Brenner H, Habermann JK; BMBF-Consortium "Colorectal Cancer Screening Chip". Toward standardized high-throughput serum diagnostics: multiplex-protein array identifies IL-8 and VEGF as serum markers for colon cancer. *J Biomol Screen*. 2011 Oct;16(9):1018-26. Epub 2011 Aug 1.

Posorski N, Kaemmerer D, Ernst G, Grabowski P, Hoersch D, Hommann M, von Eggeling F. Localization of sporadic neuroendocrine tumors by gene expression analysis of their metastases. *Clin Exp Metastasis*. 2011 Oct;28(7):637-47. Epub 2011 Jun 17

Heinzelmann J, Henning B, Sanjmyatav J, **Posorski N**, Steiner T, Wunderlich H, Gajda MR, Junker K. Specific miRNA signatures are associated with metastasis and poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *World J Urol*. 2011 Jun;29(3):367-73. Epub 2011 Jan 13.

Dittmar Y, **Posorski N**, Rauchfuss F, Voigt R, Heise M, Jandt K, Gajda M, Settmacher U. Relationship between degree of chromosomal aberration and survival in intestinal-type gastric cancer - a preliminary report based on three cases of hepatic metastasized gastric cancer with long-time survival. *Onkologie*. 2010;33(11):591-6. Epub 2010 Oct 25.

Aktas D, Utine EG, Mrasek K, Weise A, von Eggeling F, Yalaz K, **Posorski N**, Akarsu N, Alikasifoglu M, Liehr T, Tuncbilek E. Derivative chromosome 1 and GLUT1 deficiency syndrome in a sibling pair. *Mol Cytogenet*. 2010 May 28;3(1):10.

Uz E, Alanay Y, Aktas D, Vargel I, Gucer S, Tuncbilek G, von Eggeling F, Yilmaz E, Deren O, **Posorski N**, Ozdag H, Liehr T, Balci S, Alikasifoglu M, Wollnik B, Akarsu NA. Disruption of ALX1 causes extreme microphthalmia and severe facial clefting: expanding the spectrum of autosomal-recessive ALX-related frontonasal dysplasia. *Am J Hum Genet*. 2010 May 14;86(5):789-96. Epub 2010 May 6.

Liehr, T., Bartels, I., Zoll, B., Ewers, E., Mrasek, K., Kosyakova, N., Merkas, M., Hamid, A., von Eggeling, F., **Posorski, N.** and Weise, A., 2010. Is There a Yet Unreported Unbalanced Chromosomal Abnormality without Phenotypic Consequences in Proximal 4p?, *Cytogenet Genome Res*.

Kob R, Kelm J, **Posorski N**, Baniahmad A, von Eggeling F, Melle C. Regulation of the anaphase-promoting complex by the COP9 signalosome. *Cell Cycle*. 2009 Jul 1;8(13):2041-9. Epub 2009 Jul 27.

Loncarevic IF, Hering A, **Posorski N**, Linden T, Hoyer H, Bucszy P. Number of genomic imbalances correlates with the overall survival for adrenocortical cancer in childhood. *Pediatr Blood Cancer*. 2008 Sep;51(3):356-62.

Patent:

Der erarbeitete Drei-Gen-Klassifikator wurde unter dem Titel: „**Verfahren zur Lokalisation von Primärtumoren aus Metastase-Gewebeproben und Applikationskit zu dessen Durchführung**“ unter der Patentnummer 10 2011 016 191.0 patentiert.

Poster:

3. Posterpreis: “Localization of sporadic neuroendocrine tumors by gene expression analysis of their metastases” bei der 8. ENETS Konferenz 2011 in Lissabon.

The primary in CUP-Syndrome (*cancer of unknown primary origin*) can be identified by gene expression analysis. 7. ENETS Konferenz 2010 in Berlin.

Description of genomic imbalances in adrenocortical carcinoma (ACC) using gene chip copy number analysis (CNA) from Affymetrix. 11. Status Seminar Chip Technologies 2009 in Frankfurt am Main.

Description of genomic imbalances in adrenocortical carcinoma (ACC) using gene chip copy number analysis (CNA) from Affymetrix. GFH-Tagung (Gesellschaft für Humangenetik) 2008 in Hannover.

Description of genomic imbalances in adrenocortical carcinoma (ACC) using gene chip copy number analysis (CNA). GFH-Tagung (Gesellschaft für Humangenetik) 2007 in Bonn.

Vorträge:

“The primary in CUP-Syndrome (*cancer of unknown primary origin*) can be identified by gene expression analysis” zum Novartis Oncology Research Day am 07.05.2011 in Nürnberg.

“The primary in CUP-Syndrome (*cancer of unknown primary origin*) can be identified by gene expression analysis” zum 2. Und 3. *postgraduate symposium on cancer research* im Mai bzw. April 2010 und 2011 in Dornburg.

“Description of genomic imbalances in adrenocortical carcinoma (ACC) using gene chip copy number analysis (CNA) from Affymetrix” zum 1. *postgraduate symposium on cancer research* am 09.05.2009 in Dornburg.

„Genomische Imbalancen im Nebennierenrinden-Karzinom korrelieren mit der Prognose bei Kindern und Jugendlichen“ zur 69. Wissenschaftlichen Halbjahrestagung der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) im Juni 2007 in Berlin.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die mir diese Arbeit ermöglicht und erleichtert haben.

Zuerst möchte ich mich bei den drei Institutsdirektoren (bzw. kommissarischen Leitern): **Prof. U. Claussen**, **Prof. A. Baniahmad** und **Prof. C. Hübner** für die Ermöglichung der Absolvierung meiner Promotion am Institut für Humangenetik am Universitätsklinikum Jena bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem „Doktorvater“ **Prof. F. von Eggeling** für seine intellektuelle, kooperative und freundschaftliche Unterstützung sowie für seine Diskussionsbereitschaft und für die Übernahme des Erstgutachtens.

Besonderer Dank gilt Herrn **Dr. G. Ernst**, der mir immer freundlich und hilfsbereit, mit einem flotten Spruch auf den Lippen, durch das histologische Chaos meiner Tumorproben geholfen hat.

Ich danke **allen Patienten**, für die Möglichkeit und das Vertrauen an menschlichen Gewebeproben und Seren forschen zu dürfen. Den einzelnen Kliniken danke ich für die Bereitstellung der Proben.

Herzlichst bedanken möchte ich mich bei **Katrin Henning** und **Dr. Robert Kob**, sowie allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik für die immer freundliche Atmosphäre, die stete Bereitschaft Fragen zu beantworten, Probleme zu lösen und die Tücken des Laboralltags zu meistern, sowie für ihre großartige moralische Unterstützung.

Frau **PD P. Grabowski** danke ich von ganzen Herzen für ihre zwischenmenschliche Wärme und individuelle Einmaligkeit, für ihre Freundschaft und nicht zuletzt für die neuroendokrinen Zelllinien.

Dem **Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF)** danke ich für die finanzielle Unterstützung. Der Firma **Norvatis**, und insbesondere Frau **Dr. S. Fister**, danke ich ebenfalls vielmals für die finanzielle Unterstützung und das Interesse an dieser Arbeit.

Anja Gass danke ich herzlichst für das akribische Suchen und Finden von Rechtschreibfehlern und grammatikalischen Entgleisungen im fast fertigen Manuskript.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, **Bernd** und **Martina Posorski** für ihre geduldige, moralische und finanzielle Unterstützung. Ohne ihre unermüdliche Hilfe und Motivation hätte ich mein Studium, meine Diplomarbeit und meine Promotion nicht in dieser Form erleben können.

Mein größter Dank gilt meiner Zwillingsschwester **Nadine Posorski**, die wirklich immer für mich da war, stetig ein offenes Ohr für all meine Probleme und Sorgen hatte, die mir nicht nur immer einen guten Rat geben konnte, sondern auch fair und ehrlich auf eine ganz besondere, liebe Art und Weise kritisieren konnte. Durch die Liebe meines ganz eigenen, besonderen Spiegels werde ich niemals alleine sein. Danke!

Tanja Posorski danke ich aus tiefsten Herzen für die Fähigkeit mir aufgrund ihrer lebhaften Fröhlichkeit, ihrer ganz individuellen Persönlichkeit und kreativer Leichtigkeit im Umgang mit den Widrigkeiten des Lebens, ein Lächeln aufs Gesicht zu zaubern.

Markus Templin danke ich für seine Contenance in schwierigen Situationen der Interaktion und Kommunikation *in vivo* und *in silico*, für seine unerschütterliche Loyalität und Ehrlichkeit, sowie für seinen einzigartigen Humor und Frohsinn, der die nötige Distanz zur Tristesse des Alltags schafft.

Meiner besten Freundin **Therese Wilhelm** danke ich für ihre unermüdliche und aufopfernde Unterstützung, Hilfsbereitschaft und Freundschaft.

Meinen Freunden, die ich während des Studiums kennen und schätzen gelernt habe, möchte ich für ihre Geduld mit mir und ihrer freundschaftlichen Verbundenheit danken.

Ebenfalls aus tiefsten Herzen möchte ich: Dörte, Anne, Beate und Gudrun danken, die mir die richtige Sichtweise auf das Leben gezeigt haben.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei **Annemarie Blume** bedanken, die mein Interesse für die Biologie geweckt hat.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass mir die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,

ich die Dissertation eigenständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Alle Stellen, die in Wortlaut oder dem Sinn entsprechend aus anderen Arbeiten übernommen wurden, sind mit Quellenangaben als Zitat gekennzeichnet.

Ich versichere weiter, dass mich ausschließlich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie beim Schreiben des Manuskripts unterstützt haben: Prof. F. von Eggeling und Dr. G. Ernst,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde,

Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen und,

dass ich diese Arbeit in dieser Form oder ähnlicher Abhandlung keiner anderen Hochschule oder Prüfungsbehörde vorgelegt habe.

Jena, den 21.12.2011

Nicole Posorski

Abkürzungsverzeichnis

Abk.	Erklärung
α	Anti
Abb.	Abbildung
<i>ABHD14B</i>	<i>abhydrolase domain containing 14B</i>
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxdisulfat
BSA	Rinderserumalbumin
Bp	Basenpaare
cep	Zentromer
<i>CD302</i>	<i>C-type lectin domain family 13 member A</i>
GEP-NET	gastroenteropankreatische neuroendokrine Tumor
CGH	<i>comparative genomic hybridization</i> (komparative genomische Hybridisierung)
GI-NET	gastrointestinale neuroendokrine Tumor
CNV	<i>copy number variations</i>
CUP	<i>cancer of unknown primary</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphat
dUTP	Desoxyuridin-Triphosphate
DOP	Degenerierte Oligonukleotid Primer
DTT	Dithiothreitol
EB	Eluierungspuffer
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>ENET</i>	<i>European Neuroendocrine Tumour Society</i>
et al.	et alii (und andere)
EtOH	Ethanol
FCS	Fetales Kälberserum
FISH	Fluoreszenz In Situ Hybridisierung
h	Stunde(n)
IHC	Immunhistochemie
k.D.	keine Daten
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
LOH	<i>loss of heterozygosity</i>
Lsg.	Lösung
M	Molar [mol/l]
m	männlich
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
Min	Minute(n)
MPP	Metaphaseplatten
<i>NEB</i>	<i>New England Biolabs</i>
NET	neuroendokrine Tumore
OT	Objektträger

Abkürzungsverzeichnis

PBS	<i>phosphat buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
<i>PDEC</i>	<i>poor differentiated carcinomas</i>
pH	pondus Hydrogenii
PNET	pankreatisch neuroendokrine Tumore
PPWD1	peptidylprolyl isomerase containing WD40 repeat
RE	Restriktionsenzym
RET	proto-oncogene
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>real time polymerase chain reaction</i>
s	Sekunde(n)
s. Kap.	siehe Kapitel
SDS	<i>sodium dodecyl sulfat</i> (Natriumdodecylsulfat)
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TE	Tris-EDTA Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TBS	<i>tris buffered saline</i> (Trisgepufferte Kochsalzlösung)
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
Triton-X-100	Oktylphenol-Ethelenglykolether
Tween-20	Polyoxyethylenesorbitanmonolaurat
U	unit, Einheit
u.a.	unter anderem
<i>UICC</i>	<i>International Union against Cancer</i>
U/min	Umdrehungen pro Minute
Vs.	Version
W	weiblich
<i>WDET</i>	<i>well differentiated neuroendocrine tumors</i>
<i>WHO</i>	<i>World Health Organisation</i>
x	z.B. 10 x, zehnfach
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Die 20 häufigsten Krebstodesursachen im Jahr 2008	3
Abb. 2: Stufenweise Entstehung eines malignen Karzinoms	4
Abb. 3: Verteilung der Lokalisation.....	5
Abb. 4: Modell der Tumorigenese des kolorektalen Karzinoms-	7
Abb. 5: Biochip-Design und Wirkungsprinzip	18
Abb. 6: HE-gefärbter, 12 µm dicker Kryoschnitt eines Magenkarzinoms	20
Abb. 7: Arbeitsablauf/FlowChart Genexpression	27
Abb. 8: Immunhistochemie: Prinzip der indirekten Färbung.....	31
Abb. 9: vorläufiges Biochip Design (CRCS Biochip) Prototyp.....	42
Abb. 10: endgültiges Biochip Design (CRCS Biochip).....	43
Abb. 11: Grafische Darstellung der Mittelwerte der Serummarker	45
Abb. 12: DNA-Aberrations-Profil von elf neuroendokrinen Tumoren nach <i>array</i> -CGH.	51
Abb. 13: Genexpressions-Analyse der gepoolten Tumorproben	52
Abb. 14: Immunhistochemie (IHC)	54
Abb. 15: <i>HeatMap</i> der hierarchischen Cluster-Analyse von 14 NET-Metastasen.	55
Abb. 16: Entscheidungsbaum, der das Prinzip des „Drei Gen-Klassifikator“ darstellt,	56
Abb. 17: Die Immunhistochemie für <i>CD302</i>	59
Abb. 18: Die Immunhistochemie für <i>PPWD1</i>	60
Abb. 19: Die Immunhistochemie für <i>ABHD14B</i>	61
Abb. 20: <i>HeatMap</i> für <i>BIRC5</i> für 60 neuroendokrine Tumore.....	63
Abb. 21: Positive Immunhistochemie für Survivin (kodiert von <i>BIRC5</i>).....	63
Abb. 22: Western Blot Analyse der Survivin Expression in NET Zelllinien	64
Abb. 23: Genexpressions-Analyse von <i>BIRC5</i>	65
Abb. 24: Nachweis von Seneszenz.....	65
Abb. 25: Morphologie von undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen.....	66
Abb. 26: Genexpression von <i>BIRC5</i> in mesenchymalen Stammzellen (msc).....	66
Abb. 27: Ergebnisse der <i>array</i> : CGH für das Magenkarzinom.....	68
Abb. 28: Tumor-Charakteristik für jeden Patienten (1-9).....	69
Abb. 29: Übersicht über die DNA-Zugewinne und Verluste auf Chromosom 8	69
Abb. 30: <i>Heatmap</i> von 23 geclusterten Magenkarzinomen.....	72
Abb. 31: Western Blot Analyse der Chromogranin A-Expression NET-Zelllinien.....	73
Abb. 32: Morphologie der NET-Zelllinie	74
Abb. 33: HE-Färbung der Zelllinie LCC-18	75
Abb. 34: <i>Fluoreszenz in-situ Hybridisierung</i> (FISH) an Zellkernen NET-Zelllinien	76
Abb. 35: Karyogramm der neuroendokrinen Zelllinie QGP	77
Abb. 36: Karyogramm neuroendokrin differenzierter Kolon-Zelllinien.....	77

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation der neuroendokrinen Tumore des gastro-entero-pankreatischen Systems..	11
Tabelle 2: Master Mix für DNA-Verdau für <i>array</i> -CGH.....	23
Tabelle 3: Master Mix für die <i>Label</i> -Reaktion für die <i>array</i> -CGH.....	24
Tabelle 4: Reagenzien für die Hybridisierung.....	26
Tabelle 5: Exzitation und Emissions-Spektrum von Cy3 und Cy5-Farbstoffen in PBS	26
Tabelle 6: Master Mix für die Umschreibung von RNA in cDNA für die Genexpressions-Analyse .	28
Tabelle 7: Master Mix für die <i>Label</i> -Reaktion für die Genexpressions-Analyse.....	29
Tabelle 8: Charakteristik und Kulturmedium aller verwendeten Zelllinien.....	34
Tabelle 9: Verwendete, technische Geräte	40
Tabelle 10: Konzentrationsbereich der einzelnen Biomarker auf den beiden Biochips	42
Tabelle 11: Übersicht über alle drei Studien, die Anzahl der untersuchten Patientenproben	44
Tabelle 12: Mittelwert aller neun getesteten Serummarker	45
Tabelle 13: Vergleich der Datensätze für die erste Kolon-Chip-Studie (Pilotstudie)	46
Tabelle 14: Untersuchte Fallzahlen für die neun kolorektalen Tumormarker.....	47
Tabelle 15: Patienten Charakteristik nach klinischen Angaben: Pilotstudie NET	50
Tabelle 16: Patienten-Charakteristik mit neuroendokrinen Tumor (NET) in der Blindstudie.....	57
Tabelle 17: Patienten Charakteristik: Einteilung der Magenkarzinom-Proben	70
Tabelle 18: Differentiell exprimierte Gene in geclusterten Magenkarzinom-Proben	71

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Das kolorektale Karzinom (KRK).....	5
2.1.1	Definition, Epidemiologie, Diagnose und Prognose des kolorektalen Karzinoms.....	5
2.1.2	Klassifikation, klinische Einteilung, Diagnose, Prognose und Therapie des kolorektalen Karzinoms.....	7
2.2	Der neuroendokrine Tumor (NET).....	8
2.2.1	Definition, Klassifikation, Epidemiologie, Prognose und genetischer Hintergrund	8
2.2.2	Klassifikation und klinische Einteilung des neuroendokrinen Tumors.....	10
2.2.3	Diagnostik und Therapieprinzipien des neuroendokrinen Tumors.....	13
2.3	Das Magenkarzinom (MK).....	14
3	Ziele der Arbeit	16
4	Material und Methoden	18
4.1	Der <i>Evidence Investigator</i> TM Biochip.....	18
4.2	Microdissektion und DNA / RNA Isolation.....	20
4.3	<i>Hämatoxylin-Eosin</i> (HE)-Färbung	21
4.4	<i>Array-CGH-Analyse (array-comparative genomic hybridization)</i>	22
4.4.1	DNA-Verdau	22
4.4.2	<i>Labeling</i> Reaktion	24
4.4.3	Aufreinigung und Hybridisierung	24
4.4.4	Waschen, Scannen und Auswertung der <i>Microarrays</i>	26
4.5	Genexpressions-Analyse	27
4.5.1	Umschreibung der RNA in cDNA mit anschließender <i>Label</i> -Reaktion.....	28
4.5.2	Aufreinigung der Proben, Hybridisierung, Waschen und Scannen der <i>arrays</i>	29
4.5.3	Auswertung der Roh-Daten.....	30
4.6	Immunhistochemie mittels <i>Dako Real Detection Kit</i>	31
4.7	Auftauen, Kultivierung und Einfrieren von Zellen	33
4.8.	<i>BIRC 5</i> Gen knockdown mittels siRNA.....	34
4.9	Western Blot.....	35
4.9.1	Zelllysate herstellen und SDS-Polyacryl-Gelelektrophorese	35
4.9.2	Blotten	36
4.10	Chromosomenpräparation aus Zelllinien	38
4.11	Gelelektrophorese zur Bestimmung der DNA-Fragmentlängen	39
4.12	Verwendete, technische Geräte	40
5	Ergebnisse	41
5.1	Das kolorektale Karzinom (KRK) - Etablierung eines Serum-Protein-Biochips als Screeningmethode zur Früherkennung von Darmkrebs	41

Inhaltsverzeichnis

5.1.1	Erste Kolon-Chip-Studie (Pilotstudie) zur Testung geeigneter Serummarker	44
5.1.2	Zweite Kolon-Chip-Studie (Doppelblindstudie) zur Evaluierung der Serum- Marker aus der Pilotstudie.....	46
5.1.3	Nachweis der Biomarker in Tumorgewebe	48
5.2	Der Neuroendokrine Tumore (NET) – Suche nach Markern für das CUP-Syndrom (<i>cancer of unknown primary</i>)	49
5.2.1	Charakterisierung neuroendokriner Tumore und Suche nach einem Klassifikator	49
5.2.2	Evaluierung des gefundenen Drei-Gen-Klassifikators	57
5.2.3	Survivin als prognostischer Marker für neuroendokrine Tumore (NET).....	62
5.3	Das Magenkarzinom – Identifizierung von Subgruppen, die verschieden auf Chemotherapeutika ansprechen.....	67
5.3.1	Die Anzahl individueller Aberrationen im intestinalen Karzinom-Typ korreliert mit der Überlebenswahrscheinlichkeit des Patienten.....	67
5.3.2	Identifizierung differentiell exprimierter Gene in verschiedenen Subgruppen	70
5.4	Etablierung eines <i>in-vitro</i> Modelles für neuroendokrine Tumore	73
5.4.1	Charakterisierung von neuroendokrinen und kolorektalen Tumor-Zelllinien.....	73
6	Diskussion	78
6.1	Untersuchung von Serummarkern beim kolorektalen Karzinom	78
6.2	Charakterisierung neuroendokriner Tumoren (NET).....	83
6.3	Bedeutung von Survivin als Apoptose-inhibierendes Protein in neuroendokrinen, kolorektalen Zelllinien und in humanen Stammzellen	89
6.4	Nachweis molekularbiologischer Subgruppen beim Magenkarzinom	94
7	Literaturverzeichnis.....	97
	Lebenslauf	113
	Danksagung	117
	Eidesstattliche Erklärung.....	119
	Abkürzungsverzeichnis	120
	Abbildungsverzeichnis	122
	Tabellenverzeichnis.....	123